



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ
ΜΕΛΕΤΗ & ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Συγκριτική μελέτη αυτοφυούς και καλλιεργούμενου πληθυσμού
του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*
ως προς τον φαινότυπο, τη χημική σύσταση και τη βιοδραστικότητα τους



Ευαγγελία Γ. Καβάσαλη

Επιβλέπων καθηγητής:
Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα 2024

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Συγκριτική μελέτη αυτοφυούς και καλλιεργούμενου πληθυσμού
του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*
ως προς τον φαινότυπο, τη χημική σύσταση και τη βιοδραστικότητα τους

Comparative study of wild and cultivated populations
of *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* in terms of their phenotype,
chemical composition, and bioactivity

Ευαγγελία Γ. Καβάσαλη

Εξεταστική Επιτροπή:

Ταραντίλης Πέτρος Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Οικονόμου Γαρυφαλλιά, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Πανάγου Ευστάθιος, Καθηγητής ΓΠΑ

Συγκριτική μελέτη αυτοφυούς και καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* ως προς τον φαινότυπο, τη χημική σύσταση και τη βιοδραστικότητα τους

ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή & Υγεία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το είδος *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ενδημικά φυτά του όρους Πάρνωνα. Οι ιδιόμορφες κλιματικές συνθήκες και το ιδιαίτερο ανάγλυφο του όρους δημιουργούν έναν ξεχωριστό χημειότυπο του είδους *Sideritis clandestina* που είναι γνωστό για το πλήθος των ιδιοτήτων που περιέχει και τις χρήσεις του στην λαϊκή κυρίως ιατρική.

Υπό το πρίσμα των παραπάνω, η παρούσα μελέτη επιχειρεί την εκτενή μελέτη αυτοφυούς και καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* με απώτερο σκοπό την μεταξύ τους σύγκριση. Πιο συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός του φαινοτύπου, της χημικής σύστασης και της βιοδραστικότητας των δύο πληθυσμών καθώς επίσης και οι διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ τους αποτελεί τον σημαντικότερο στόχο της εργασίας. Επιπροσθέτως, η μελέτη του υδατικού εκχυλίσματος, υποπροϊόν της υδροαπόσταξης, που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή των αιθέριων ελαίων, όπως επίσης και η περιγραφή του υποείδους αποτελούν ενδιαφέροντα σημεία της μελέτης.

Αναλυτικότερα, ερευνητικές αποστολές έλαβαν χώρα σε αυτοφυή και καλλιεργούμενους οικοτόπους του ορεινού σχηματισμού, όπου εντοπίστηκε το φυτικό υλικό. Πραγματοποιήθηκαν εκτενείς μελέτες και μετρήσεις των πληθυσμών και των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών και η συλλογή τους στο στάδιο της πλήρους άνθισης. Ακολούθησε η αποξήρανση τους και η παραλαβή των αιθέριων ελαίων και των υδατικών εκχυλισμάτων τους με την μέθοδο της υδρο-απόσταξης με την χρήση της συσκευής Clevenger και η παραλαβή των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο της εκχύλισης στερεού-υγρού.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός, με την χρήση χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών. Πιο αναλυτικά, τα συστατικά των αιθέριων ελαίων προσδιορίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με την χρήση της Αέριας Χρωματογραφίας συζευγμένη με Φασματομετρία Μαζών ενώ στην περίπτωση των εκχυλισμάτων ο προσδιορισμός έλαβε χώρα με την χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας και η ταυτοποίηση με την βοήθεια της βιβλιογραφίας και καταλόγου πρότυπων ουσιών που διαθέτει το Εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών όπου και πραγματοποιήθηκε το εργαστηριακό κομμάτι της παρούσας εργασίας.

Τέλος, η εργασία ολοκληρώθηκε με την μελέτη της βιοδραστικότητας των υπό μελέτη δειγμάτων με τις μεθόδους DPPH και ABTS για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής

δράσης, με την μέθοδο Folin-Ciocalteu για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών και με την μέθοδο διάχυση σε τρυβλία για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης των δειγμάτων έναντι παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών.

Κύρια αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποτελούν, η απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών των μορφολογικών χαρακτηριστικών των υπό μελέτη πληθυσμών, οι ομοιότητες στην χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων τους, των υδρομεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων τους, η βιοδραστικότητα των δειγμάτων που επηρεάζεται από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής που αναπτύσσεται το φυτικό υλικό, παράγοντες που καθορίζουν τη περιεκτικότητα τους σε φαινολικά συστατικά και συνεπώς και την αντιοξειδωτική τους δράση και τέλος, η έλλειψη παρεμποδιστικής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων έναντι των μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus* B134, *Bacillus subtilis* B109, *Escherichia coli* B16 & *Pseudomonas fluorescens* B29.

Επιστημονική περιοχή εργασίας: Μελέτη και Αξιοποίηση Δευτερογενών Μεταβολιτών των Φυτών

Λέξεις Κλειδιά: *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*, Αυτοφυής και Καλλιεργούμενος πληθυσμός, Αιθέριο Έλαιο, Υδρομεθανολικό Εκχύλισμα, Υδατικό Εκχύλισμα, GC-MS, HPLC, ABTS, DPPH, Folin-Ciocalteu, Μέθοδος Διάχυσης σε Τρυβλία.

Comparative study of wild and cultivated populations of *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* in terms of their phenotype, chemical composition, and bioactivity

MSc Food, Nutrition & Health
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of General Chemistry

ABSTRACT

The species *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* is one of the most important endemic plants of Mount Parnonas. The peculiar climatic conditions and the special relief of the mountain create a distinct chemotype of the species *Sideritis clandestina* which is known for the multitude of properties it contains and its uses mainly in folk medicine.

Considering the above, the current research focuses on an extensive study of native and cultivated populations of the subspecies *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* with the ultimate aim of comparing them. More specifically, the determination of the phenotype, the chemical composition and the bioactivity of the two populations as well as the differences between them, is the most important objective of the work. In addition, the study of the residual water extract, a by-product of the hydrodistillation which used to obtain the essential oils, as well as the description of the subspecies, are interesting points of the study.

More specifically, research missions took place in natural and cultivated habitats of the mountain, where the plant material was located. Moreover, extensive studies and the measurements of the population and the morphological plant elements along with the harvest at the full bloom stage were conducted. Following was their drying and the reception of their essential oils and their residual water extract using the hydro-distillation technique with the Clevenger apparatus, as well as the reception of the hydromethanolic extracts by the method of solid-liquid extraction.

Subsequently, the quantitative and qualitative determination was carried out, using chromatographic and spectroscopic techniques. More specifically, the components of the essential oils were determined and identified using Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry, while in the case of the extracts, the determination took place using Liquid Chromatography and the identification with the help of the bibliography and a list of standard substances which is available at the Chemistry Laboratory of the Agricultural University of Athens, where the laboratory part of the present work was carried out.

Finally, the work was completed by studying the bioactivity of the samples with the DPPH and ABTS methods to determine the antioxidant activity, with the Folin-Ciocalteu method to determine the total phenolic components and with the plate diffusion method to determine the antimicrobial activity of the samples against pathogenic and microorganism contaminants.

The main results of this work are the absence of statistically significant differences in the morphological characteristics between the native and cultivated plants population, the similarities in the chemical composition of their essential oils, their hydromethanolic and aqueous extracts, the bioactivity of the samples which is affected by the soil and climate conditions of the area where the plant material develops, factors that determine their content of phenolic components and therefore their antioxidant activity and finally, the lack of inhibitory action of the aqueous extracts against the microorganisms *Staphylococcus aureus* B134, *Bacillus subtilis* B109, *Escherichia coli* B16 and *Pseudomonas fluorescens* B29.

Scientific Work Area: Study and Exploitation of Secondary Metabolites of Plants

Keywords: *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*, Native and Cultivated Plant Population, Essential Oil, Hydromethanolic Extract, Aqueous Extract, GC-MS, HPLC, ABTS, DPPH, Folin-Ciocalteu, Well Diffusion Assay Method.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Περιοχή στόχος- Όρος Πάρνωνα	1
1.2 Η γλωρίδα του Πάρνωνα	1
1.3 Βότανα του Πάρνωνα- Αρωματικά και Φαρμακευτικά φυτά	2
1.3.1 Τσάι του βουνού.....	2
1.4 Χρήσεις των Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών	3
1.5 Παραλαβή των φυσικών προϊόντων από τα φυτά	4
1.5.1 Παραλαβή των αιθέριων ελαίων από τα φυτά.....	4
1.5.2 Παραλαβή των εκχυλισμάτων από τα φυτά	5
1.6 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός Χημειότυπο	6
1.6.1 Αέρια Χρωματογραφία- Φασματοσκοπία Μαζών (GC-MS)	6
1.6.2 Υγρή Χρωματογραφία (HPLC).....	7
1.7 Παραπροϊόντα απόσταξης και οι χρήσεις τους	7
1.8 Χημική σύσταση του υποείδους <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	8
1.9 Προσδιορισμός της Βιοδραστικότητας των Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών	10
1.9.1 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Ικανότητας	10
1.9.2 Προσδιορισμός Παρεμποδιστικής δράσης παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών	10
1.10 Σημασία προστασίας, Διατήρησης και Ανάδειξης των Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών	11
1.11 Σημασία της καλλιέργειας	12
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	13
2.1 Ερευνητικές αποστολές και μακροσκοπικές παρατηρήσεις στις θέσεις εντοπισμού του είδους και στους αποδεικτικούς αγρούς.	13
2.2 Βοτανική ταξινόμηση, Προσδιορισμός μορφολογικών χαρακτηριστικών	15
2.3 Επεξεργασία μορφολογικών χαρακτηριστικών	15
2.4 Συλλογή δειγμάτων	16
2.5 Χαρακτηρισμός πληθυσμών	16
2.6 Παραλαβή αιθέριου ελαίου	16
2.7 Ποιοτικός προσδιορισμός με Αέρια Χρωματογραφική Ανάλυση (GC/MS)	17
2.8 Παραλαβή υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων	17
2.9 Παραλαβή υδατικών εκχυλισμάτων	18
2.10 Ποιοτικός προσδιορισμός με Υγρή Χρωματογραφία (HPLC)	18

2.11 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αιθέριων ελαίων και των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων	19
2.11.1 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή DPPH	19
2.11.2 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή ABTS	20
2.12 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών των αιθέριων ελαίων και των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων	20
2.12.1 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με την δοκιμή Folin-Ciocalteu.....	20
2.13 Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων της απόσταξης έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών με την μέθοδο της διάχυσης σε τρυβλία. ...	21
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	24
3.1 Έλεγχος σημαντικότητας των διαφορών που παρουσιάζονται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά μεταξύ του καλλιεργούμενου και αυτοφυούς πληθυσμού και μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων του καλλιεργούμενου πληθυσμού.....	24
3.1.1 Έλεγχοι κανονικότητας, ισότητας διακυμάνσεων και μέσων μεταξύ του καλλιεργούμενου και αυτοφυούς πληθυσμού	24
3.1.2 Έλεγχοι κανονικότητας των σφαλμάτων με βάση τα υπόλοιπα, ισότητας διακυμάνσεων και παραγοντική ανάλυση διασποράς ANOVA μεταξύ θέσεων καλλιεργούμενου πληθυσμού.....	26
3.1.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	28
3.2 Περιγραφή του υποείδους <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	31
3.3 Αποτελέσματα Ποιοτικού και Ποσοτικού Προσδιορισμού με Αέρια Χρωματογραφική Ανάλυση (GC/MS)	32
3.3.1. Χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου του αυτοφυούς δείγματος.....	32
3.3.2. Χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου του καλλιεργούμενου δείγματος.....	34
3.4 Αποτελέσματα Ποιοτικού Προσδιορισμού με Ξηρή Χρωματογραφική Ανάλυση (HPLC)	37
3.4.1. Χημική σύσταση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του αυτοφυούς δείγματος.....	37
3.4.2 Χημική σύσταση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του καλλιεργούμενου δείγματος.....	39
3.4.3 Χημική σύσταση του υδατικού εκχυλίσματος του αυτοφυούς δείγματος.....	42
3.4.4 Χημική σύσταση του υδατικού εκχυλίσματος του καλλιεργούμενου δείγματος... ..	43
3.5 Αποτελέσματα προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας	46
3.5.1 Αποτελέσματα Δοκιμής DPPH.....	46
3.5.2 Αποτελέσματα Δοκιμής ABTS.....	47
3.6 Αποτελέσματα της περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών με την Μέθοδο Folin- Ciocalteu.....	49
3.7 Συσχέτιση των ολικών φαινολικών συστατικών με την αντιοξειδωτική ικανότητα	50

3.8 Αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων της απόσταξης έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών με την μέθοδο της διάχυσης σε τρυβλία	52
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	55
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59
5.1. Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία	59
5.2 Ελληνική Βιβλιογραφία	62
5.3 Άδειες Έρευνας.....	63
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	64

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Παραδείγματα φαινολικών συστατικών που βρίσκονται σύμφωνα με την βιβλιογραφία στο γημειότυπο του είδους <i>Sideritis clandestina</i> subsp <i>clandestina</i>	9
Πίνακας 2 Πληροφορίες των αποστολών στα ερευνητικά πεδία	13
Πίνακας 3 Χαρακτηριστικά μεθόδου υγρής χρωματογραφίας HPLC.....	18
Πίνακας 4 Υπό μελέτη Βακτηριακά στελέχη.....	21
Πίνακας 5 Υπό μελέτη μικροοργανισμοί, χρόνος και θερμοκρασία επώασης.....	22
Πίνακας 6 Αποτελέσματα ελέγχων προυποθέσεων και της παραγοντικής ανάλυσης των μέσων.....	24
Πίνακας 7 Αποτελέσματα προυποθέσεων και της παραγοντικής ανάλυσης διασποράς	26
Πίνακας 8 Αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του αιθέριου ελαίου αυτοφυούς πληθυσμού με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας.....	32
Πίνακας 9 Αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του αιθέριου ελαίου καλλιεργούμενου πληθυσμού με την χρήση της αέριας χρωματογραφίας.....	34
Πίνακας 10 Αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος αυτοφυούς πληθυσμού με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας.....	37
Πίνακας 11 Αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος καλλιεργούμενου πληθυσμού με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας.....	39
Πίνακας 12 Αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του υδατικού εκχυλίσματος αυτοφυούς πληθυσμού με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας.....	42
Πίνακας 13 Αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του υδατικού εκχυλίσματος καλλιεργούμενου πληθυσμού με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας.....	43
Πίνακας 14 Αποτελέσματα προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων των υπό μελέτη πληθυσμών με τη χρήση της δοκιμής DPPH	46
Πίνακας 15 Αποτελέσματα του προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υπό μελέτη δειγμάτων των δύο πληθυσμών με τη χρήση της δοκιμής ABTS	48
Πίνακας 16 Αποτελέσματα προσδιορισμού της περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών στα υπό μελέτη δείγματα των δύο πληθυσμών με τη χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu.....	50
Πίνακας 17 Συσχέτιση περιεκτικότητας ολικών φαινολικών συστατικών με τα αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας	50

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1 Αποτελέσματα προϋποθέσεων για πραγματοποίηση παραγοντικής ανάλυσης των μέσων.....	25
Διάγραμμα 2 Αποτελέσματα παραγοντικής ανάλυσης μέσων	26
Διάγραμμα 3 Αποτελέσματα προϋποθέσεων για πραγματοποίηση παραγοντικής ανάλυσης διασποράς.....	27
Διάγραμμα 4 Αποτελέσματα παραγοντικής ανάλυσης διασποράς.....	28
Διάγραμμα 5 Ποσοστό μήκους αιχμής βρακτίου φύλλου στο ολικό μήκος βρακτίου φύλλου	29
Διάγραμμα 6 Ποσοστό απόστασης τελευταίου κόμβου από την κύρια ταξιανθία.....	30
Διάγραμμα 7 Διαφορά μήκους βρακτίου φύλλου και μήκους πετάλων του άνθους.....	31
Διάγραμμα 8 Απεικόνιση χημειοτύπων αιθερίων ελαίων, αυτοφυούς και καλλιεργούμενου πληθυσμού σε πίτα	36
Διάγραμμα 9 Απεικόνιση χημειοτύπων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων, καλλιεργούμενου και αυτοφυούς πληθυσμού σε πίτα.....	41
Διάγραμμα 10 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς του Trolox- Δοκιμή DPPH.....	46
Διάγραμμα 11 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς του Trolox- Δοκιμή ABTS.....	47
Διάγραμμα 12 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος- Δοκιμή Folin-Ciocalteu..	49
Διάγραμμα 13 Απεικόνιση της συσχέτισης των ολικών φαινολικών συστατικών με τα αποτελέσματα της δοκιμής ABTS.....	51
Διάγραμμα 14 Απεικόνιση της συσχέτισης των ολικών φαινολικών συστατικών με τα αποτελέσματα της δοκιμής DPPH.....	51

Κατάλογος Χρωματογραφημάτων

Χρωματογράφημα 1 Αέριο χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του αιθέριου ελαίου του αυτοφυούς πληθυσμού του είδους <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	34
Χρωματογράφημα 2 Αέριο χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του αιθέριου ελαίου του καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	36
Χρωματογράφημα 3 Υγρό χρωματογράφημα των μη πτητικών συστατικών του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του αυτοφυούς πληθυσμού του είδους <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	39
Χρωματογράφημα 4 Υγρό χρωματογράφημα των μη πτητικών συστατικών του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	41
Χρωματογράφημα 5 Υγρό χρωματογράφημα των μη πτητικών συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος του αυτοφυούς πληθυσμού του είδους <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	43
Χρωματογράφημα 6 Υγρό χρωματογράφημα των μη πτητικών συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος του καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>Clandestina</i>	45

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1 <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	2
Εικόνα 2 Συσκευή Clevenger (πηγή: Selen Lab).....	5
Εικόνα 3 Καλλιέργεια στα Άνω Δολιανά Αρκαδίας και Αυτοφυής πληθυσμός στην Μικρή Τούρλα του Όρους Πάρνωνα	13
Εικόνα 4 Καλλιεργούμενος πληθυσμός με έντονη παρουσία ζιζανίων.....	14
Εικόνα 5 Προσβολή αυτοφυούς πληθυσμού από κτηνοτροφικά ζώα	14
Εικόνα 6 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	15
Εικόνα 7 Υδρο- απόσταξη με συσκευή Clevenger.....	16
Εικόνα 8 Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία μαζών	17
Εικόνα 9 Εκχύλιση υγρού-στερεού	17
Εικόνα 10 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού UV-Vis.....	19
Εικόνα 11 Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης υπό ασηπτικές συνθήκες	21
Εικόνα 12 Καλλιεργούμενο και αυτοφύες φυτό.....	26
Εικόνα 13 Φυτά από διαφορετικές θέσεις του καλλιεργούμενου πληθυσμού	28
Εικόνα 14 Απεικόνιση αιχμής βράκτιου φύλλου.....	29
Εικόνα 15 Απεικόνιση τελευταίου κόμβου εμφανώς απομακρυσμένο από την υπόλοιπη ταξιανθία	30
Εικόνα 16 Απεικόνιση διαφοράς μήκους βράκτιου φύλλου και μήκους ανθέων.....	31
Εικόνα 17 Αποτελέσματα δοκιμής αυτοφυούς και καλλιεργούμενου υδατικού εκχυλίσματος έναντι του βακτηρίου <i>Escherichia coli</i> B16	52
Εικόνα 18 Αποτελέσματα δοκιμής αυτοφυούς και καλλιεργούμενου υδατικού εκχυλίσματος έναντι του βακτηρίου <i>Pseudomonas fluorescens</i> B29.....	52
Εικόνα 19 Αποτελέσματα δοκιμής αυτοφυούς και καλλιεργούμενου υδατικού εκχυλίσματος έναντι του βακτηρίου <i>Bacillus subtilis</i> B109	53
Εικόνα 20 Αποτελέσματα δοκιμής αυτοφυούς και καλλιεργούμενου υδατικού εκχυλίσματος έναντι του βακτηρίου <i>Staphylococcus aureus</i> B134	53

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Περιοχή στόχος- Όρος Πάρνωνα

Ο Πάρνωνας είναι ένας ορεινός σχηματισμός στα νότιο-ανατολικά τμήματα της Πελοποννήσου. Λόγω της ιδιαίτερης γεωγραφικής του θέσεως, της μεγάλης έκτασης του και του πλούσιου ανάγλυφου της, η περιοχή του χαρακτηρίζεται από διαφορετικές κλιματικές ζώνες. Η υψομετρική του διαβάθμιση αποτελεί σημαντικό παράγοντα στον καθορισμό των κλιματικών συνθηκών που επικρατούν σε κάθε σημείο του. Στις ορεινές περιοχές και σε υψόμετρα που ξεπερνούν τα 900m το κλίμα χαρακτηρίζεται ηπειρωτικό με ψυχρούς χειμώνες και παρουσία πολλών βροχοπτώσεων και χιονοπτώσεων, καλοκαίρια δροσερά με συχνές βροχές. Ενώ σε χαμηλότερα υψόμετρα το κλίμα αλλάζει και γίνεται εύκρατο με ξηρό και θερμό καλοκαίρι και ήπιους χειμώνες με το χιόνι να εμφανίζεται σποραδικά στις ημιορεινές περιοχές.

Το όρος αποκαλείται και Πάρνων ή Μαλεβός ή Κρόνιον Όρος και πλήθος κορυφών συνθέτουν τον ορεινό όγκο του. Η υψηλότερη κορυφή του είναι γνωστή με την ονομασία Μεγάλη Τούρλα και έχει υψόμετρο 1.935m. Μεταξύ των κορυφών του, δημιουργούνται οροπέδια διαφόρων υψομέτρων και ποικίλης έκτασης, με σημαντικότερο αυτό του Προφήτη Ηλία. Αποτελείται από πλήθος ποταμών και χειμάρρων συνθέτοντας ένα έντονο ανάγλυφο και μία εντυπωσιακή γεωμορφολογία.

Σε όλο τον σχηματισμό του όρους απαντάται πλήθος πετρωμάτων με τον κυρίαρχο ρόλο να κατέχουν ο ασβεστόλιθος, ο δολομίτης ασβεστόλιθος και δολομίτες διαφόρων ενοτήτων και ηλικιών. Τα φημισμένα υπόλευκα όπως και τα ξακουστά για την ομορφιά τους μαύρα μάρμαρα του Πάρνωνα συμβάλλουν και αυτά στο ιδιαίτερο οικοσύστημα της περιοχής. (Κωνσταντινίδης & Καλπουτζάκης, 2015)

1.2 Η χλωρίδα του Πάρνωνα

Ο Πάρνωνας κρύβει έναν ανεκτίμητο βοτανικό πλούτο που όμως δεν είναι πλήρως γνωστός. Η γεωλογική ιστορία του, οι ιδιόμορφες κλιματικές συνθήκες και το έντονο ανάγλυφο του συνθέτουν μια εντυπωσιακή ποικιλία οικολογικών συνθηκών, ιδανικών για την ανάπτυξη μιας ξεχωριστής χλωρίδας.

Ο βοτανικός παράδεισος με την τεράστια οικολογική σημασία φιλοξενεί πολυάριθμα κοινά είδη αλλά και πλήθος σπάνιων και ενδημικών φυτών σε διάφορες περιοχές της έκτασης του. Σύμφωνα με νεότερα έχουν καταγραφεί 12 ενδημικά φυτά αποκλειστικά του Πάρνωνα και 223 είδη φυτών στα μεγαλύτερα υψόμετρα εκ των οποίων το 20% αποτελούν ενδημικά της Ελλάδας και το 13% ενδημικά της Βαλκανικής χερσονήσου. Τα σπάνια αριθμούνται στα 11, μερικά από τα οποία έχουν ασιατική καταγωγή και είναι μοναδικά στον ευρωπαϊκό χώρο. (Tan & Iatrou, 2001, Φορέας Διαχείρισης Πάρνωνα και Υγροβιότοπου Μουστού, 2015, Παππά *et al.* 2001)

1.3 Βότανα του Πάρνωνα- Αρωματικά και Φαρμακευτικά φυτά

Η χλωρίδα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της περιοχής είναι αξιοσημείωτη, γεγονός που οφείλεται στις ευνοϊκές εδαφοκλιματικές συνθήκες και στο πολύπλοκο ανάγλυφο της. Τα φυτά αυτά, χαρακτηρίζονται από την παρουσία διάφορων βιοδραστικών ουσιών στον χημειότυπο τους, οι οποίες τους προσδίδουν ποικίλες ιδιότητες καθιστώντας τα πολύτιμα σε πολλούς κλάδους της βιομηχανίας και σε σημαντική θέση στην ζωή του ανθρώπου.

Πιο συγκεκριμένα, σε μεγάλα υψόμετρα του ορεινού όγκου και σε πετρώδεις πλαγιές μπορεί κανείς να συναντήσει μια σειρά από ενδιαφέροντα είδη της οικογένειας Lamiaceae όπως το είδος *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*, ένα από τα πολλά συγγενικά είδη του γένους *Sideritis* που χρησιμοποιείται παραδοσιακά για την παρασκευή τσαγιού, το είδος *Nepeta orphanidea* ενδημικό αρωματικό του όρους και το *Thymus leucotrichus* subsp. *leucotrichus*, με αρκετά ενδιαφέρον αιθέριο έλαιο με αρωματικές και φαρμακευτικές ιδιότητες.

Παράλληλα, σε χαμηλότερα σημεία του ορεινού σχηματισμού βρίσκουν πρόσφορο έδαφος αρκετά κοινά είδη του ελλαδικού χώρου όπως το *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, που ξεχωρίζει για το μοναδικό του άρωμα, τα δύο είδη φασκόμηλου *Salvia pomifera* και *S. fruticosa* καθώς και το ενδημικό *Thymus laconicus*, το οποίο συγγέεται πολύ συχνά με το κοινό θυμάρι (*Thymbra capitata*). (Κωνσταντινίδης & Καλπουτζάκης, 2015, Polumin *et al.*, 1987)

1.3.1 Τσάι του βουνού

Sideritis clandestina* subsp. *clandestina

Ένα από τα σημαντικότερα ενδημικά φυτά του Πάρνωνα είναι το είδος *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*. Το γνωστό και ως τσάι του βουνού είναι ένα πολυετές βότανο το οποίο εντοπίζεται στις ψηλότερες κορυφές του Πάρνωνα, σε υψόμετρα από 1.400m έως 1930m και ευδοκιμεί σε πετρώδεις πλαγιές, ήπιας έως μέτριας κλίσης, στις παρυφές δάσους Μαύρης Πεύκης, Δενδρόκεδρου, Κεφαλληνιακής Ελάτης, σε ορεινά λιβάδια, σε ανοιχτές εκτάσεις με αραιή ξυλώδη βλάστηση και σε ασβεστόλιθο. Οι πληθυσμοί του είναι αξιόλογοι και η περίοδος ανθοφορίας του ξεκινάει από τα τέλη Μαΐου και συνεχίζει μέχρι και τον Αύγουστο. Τον Ιούλιο που βρίσκεται στην πλήρη άνθιση πραγματοποιείται και η συλλογή του, όπου η αλόγιστη και μη ορθή κοπή των αυτοφυών πληθυσμών απειλεί την ύπαρξη του.



Εικόνα 1 *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*

Το φυτό είναι ελαφρώς ξυλώδες στην βάση του και σχηματίζει συστάδες διαμέτρου 10-60 εκ ή περισσότερο με ανθοφόρους βλαστούς και μη ανθοφόρα στελέχη. Αποτελείται από όρθιους, τετραγωνικούς βλαστούς, μήκους 20-50cm αραιά διακλαδισμένους κυρίως στο κατώτερο τμήμα

τους, καλυμμένους με γκριζωπό, εριώδες τρίχωμα. Τα κατώτερα φύλλα είναι σπατουλοειδή έως επιμήκη, έμμισχα, καλυμμένα με πυκνό, εριώδες τρίχωμα, ελαφρώς οδοντωτά ενώ τα φύλλα του βλαστού είναι αντίθετα, άμισχα, στενά, επιμήκη, μήκους 25-60mm ίσα ή μακρύτερα των μεσογονατίων διαστημάτων του βλαστού. Η ταξιανθία είναι πυκνή ή με διακριτό τον κατώτερο σπόνδυλο, με μεσαία βράκτια ωσειδή-καρδιοειδή, εριώδη, μια με τρεις φορές μακρύτερα από τα άνθη και με ακραία προεκβολή μήκους 5-15μμ. Ο κάλυκας είναι τριχωτός με 5 ίσια δόντια, 10 νευρώσεις, μήκους 3-4μμ και η στεφάνη είναι κίτρινη, με το σωλήνα πιο μικρό από τον κάλυκα, δίχειλη με το άνω χείλος δισχιδές, συχνά με δύο καστανές γραμμώσεις και το κάτω τρίλοβο συνήθως πιο σκούρου κίτρινου χρωματισμού. Τέλος, ο καρπός του αποτελείται από 4 ή λιγότερα, λεία καρπίδια.(Strid & Tan, 1991, Tan & Iatrou, 2001, Lafranchis & Sfikas, 2009, Κωνσταντινίδης & Καλπουτζάκης, 2015 Strid, 2016)

1.4 Χρήσεις των Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον των καταναλωτών για τα φυσικά προϊόντα στους τομείς των τροφίμων, των ζωοτροφών, των καλλυντικών και των φαρμάκων. Τα ζητήματα βιωσιμότητας και ασφάλειας έχουν ωθήσει την έρευνα στα φυτικά υλικά, όπως αιθέρια έλαια και εκχυλίσματα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, τα οποία εδώ και πολλά χρόνια αποτελούν φυσικά εργοστάσια παραγωγής πολύτιμων βιοδραστικών ουσιών με ποικίλες χρήσεις. (Christaki *et al.*, 2020, Grigoriadou *et al.*, 2020)

Οι βιοδραστικές ουσίες που περιέχονται στα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού και κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες όπως στα αλκαλοειδή, στους γλυκοζίτες (φαινολικοί, φαινυλοπροπανοειδείς), στα αιθέρια έλαια, στις ρητίνες, ελαιορητίνες και στερεοειδή. (Pandey *et al.*, 2020) Η χημική σύσταση τους ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με το είδος του φυτού, τα μέρη του φυτού, τους τρόπους καλλιέργειας και επεξεργασίας, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και άλλους παράγοντες. (Kokkini *et al.*, 1997, Góra *et al.*, 2002).

Ανάλογα με την περιεκτικότητα τους και τις ιδιότητες που διαθέτουν, έχει διαπιστωθεί ότι επιδρούν ποικίλως σε άλλους οργανισμούς και χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα για λόγους αισθητικής, διατροφικούς σκοπούς, για την θεραπεία διάφορων ασθενειών και διαταραχών σε ανθρώπους και ζώα. Ορισμένες από αυτές τις ουσίες μπορούν να δράσουν και συνεργατικά με αποτέλεσμα να ενισχύεται η βιοδραστικότητα τους. Τέτοιες ιδιότητες είναι η αντιοξειδωτική, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδεις, αναλγητική, αντικαρκινική κ.α. (Christaki *et al.*, 2020, Grigoriadou *et al.* 2020).

Τα είδη του γένους *Sideritis* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως αφέψημα, βελτιωτικά γεύσης ή για θεραπευτικού σκοπούς. Αν και οι περισσότερες χρήσεις των *Sideritis* spp. συναντώνται

στην λαϊκή ιατρική με σκοπό τις θεραπευτικές τους ιδιότητες, το ενδιαφέρον για το γένος αυτό έχει οδηγήσει σε περαιτέρω έρευνα και επέκταση της χρήσης των βιοδραστικών ουσιών του σε μια ευρεία ποικιλία προϊόντων. (González-Burgos *et al.*, 2011) Για παράδειγμα η αντιμικροβιακή δράση, που διαθέτει και οφείλεται στην παρουσία μονοτερπενικών υδρογονανθράκων στον χημειότυπο του αιθέριου ελαίου, οδήγησε την βιομηχανία των καλλυντικών και τροφίμων να χρησιμοποιεί συστατικά του φυτού με σκοπό την επέκταση της ζωής των προϊόντων και την ασφάλεια τους έναντι παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Οι ιδιότητες και οι χρήσεις των συστατικών του φυτού όμως ποικίλουν και εξαρτώνται κυρίως από το είδος και την περιοχή στην οποία αναπτύσσεται. (Koutsaviti *et al.*, 2013)

Βιβλιογραφικά, στις διάφορες περιοχές του πλανήτη που αναπτύσσονται τα είδη του γένους *Sideritis*, το αφένημα των εναέριων μερών του φυτού, χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση γαστρεντερικών, πεπτικών, ουρογεννητικών διαταραχών και φλεγμονών του αναπνευστικού συστήματος ενώ το έγχυμα χορηγούμενο τοπικά βοηθάει στην καταπολέμηση των διάφορων λοιμώξεων των ματιών, της οσφυαλγίας, της υπέρτασης και μπορεί να δράσει ως διεγέρτης της όρεξης και επουλωτικό των πληγών. (González-Burgos *et al.*, 2011) Τέλος, έχει αποδειχτεί ότι διαθέτει αντιοξειδωτική δράση, λόγω των πολυφαινολικών ενώσεων που διαθέτει, αντιελκωτική, αντιμικροβιακή, αντιβακτηριακή, αντισπασμωδική, κυτταροστατική, αναλγητική και δράση έναντι του ιού HIV και καρδιακών παθήσεων. (Ghoumari *et al.*, 2005, Aneva *et al.*, 2019)

1.5 Παραλαβή των φυσικών προϊόντων από τα φυτά

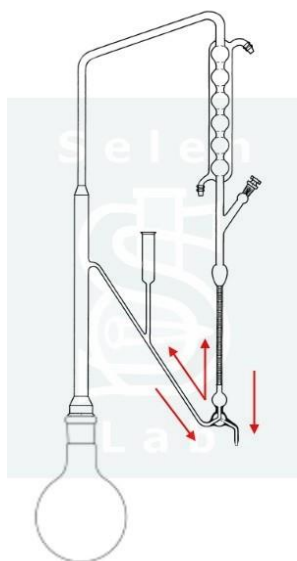
Η παραλαβή των φυσικών προϊόντων από τα φυτά μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους για παράδειγμα οι μέθοδοι της απόσταξης και της εκχύλισης αποτελούν τους πιο διαδεδομένους τρόπους παραλαβής, με τη χρήση παραδοσιακών ή σύγχρονων διαδικασιών ανάλογα τους στόχους ανάλυσης, το φυτικό υλικό και οικονομικούς παράγοντες. (Δόρδας, 2012)

1.5.1 Παραλαβή των αιθέριων ελαίων από τα φυτά

Υδροαπόσταξη ή Απόσταξη με νερό (water distillation)

Έναν από τους τρόπους παραλαβής των αιθέριων ελαίων από τα φυτά αποτελεί η υδροαπόσταξη ή απόσταξη με νερό κατά την οποία, το προς απόσταξη φυτικό υλικό τοποθετείται σε γυάλινη φιάλη σε άμεση επαφή με το νερό. Η μέθοδος πραγματοποιείται με την χρήση της συσκευής κλειστού τύπου Clevenger η οποία αποτελείται από το κύριο μέρος που περιλαμβάνει ένα γυάλινο κατακόρυφο σωλήνα και ένα ψυκτήρα που είναι συνδεδεμένος με ένα βαθμονομημένο κυλινδρικό σωλήνα, όπου συλλέγεται το αιθέριο έλαιο διαχωριζόμενο από το

νερό. Τέλος ένας σωλήνας επιστροφής του αποσταζόμενου νερού συνδέει το κάτω μέρος του βαθμονομημένου σωλήνα με τον κατακόρυφο σωλήνα.



Εικόνα 2 Συσκευή Clevenger (πηγή: Selen Lab)

Η διαδικασία ξεκινά με την θέρμανση της φιάλης, επομένως και του νερού και του φυτικού υλικού που περιέχει. Οι υδρατμοί του νερού που σχηματίζονται λόγω της υψηλής θερμοκρασίας παρασέρνουν τις πτητικές ουσίες που περιέχει το φυτικό υλικό και τις οδηγούν στον ψυκτήρα όπου και υγροποιούνται. Οι υγροποιημένοι υδρατμοί και το αιθέριο έλαιο σχηματίζουν δύο στοιβάδες μέσα στον βαθμονομημένο σωλήνα λόγω του διαφορετικού μοριακού βάρους τους. Η υπερκείμενη στοιβάδα είναι το αιθέριο έλαιο ενώ η υποκείμενη είναι το νερό με μικρή ποσότητα ουσιών αιθέριου ελαίου που παρουσίασαν διαλυτότητα στο νερό. Η υδάτινη φάση επιστρέφει στην γυάλινη φιάλη και η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι να ληφθεί η μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα ελαίου στο βαθμονομημένο σωλήνα. Η χρονική διάρκεια της διαδικασίας κυμαίνεται από μία έως τρεις ώρες ανάλογα με τον τύπο και το είδος του φυτικού υλικού ενώ η ταχύτητα της απόσταξης ρυθμίζεται από την ένταση της φωτιάς. Στην αρχή της απόσταξης η ταχύτητα της είναι μικρή και στη συνέχεια αυξάνεται για να ληφθεί το μέγιστο ποσοστό του αιθέριου ελαίου. Στην υδροαπόσταξη πρέπει να αποφεύγεται η υπερθέρμανση του φυτικού υλικού που έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνθεση διαφόρων συστατικών του αιθέριου ελαίου. Το γυάλινο δοχείο θα πρέπει να έχει μικρό ύψος και μεγάλη διάμετρο ώστε να έχει μεγάλη επιφάνεια εξάτμισης. (Δόρδας, 2012, Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010)

1.5.2 Παραλαβή των εκχυλισμάτων από τα φυτά

Υπάρχουν αρκετές τεχνικές εκχύλισης ως μέσο παραλαβής των φυσικών προϊόντων. Η επιλογή της τεχνικής γίνεται με βάση το προϊόν που θέλουμε να απομονώσουμε και την δομή του

υπό μελέτη φυτικού υλικού. Οι τεχνικές που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι η απλή εκχύλιση με ανάδευση, η υπερκρίσιμη εκχύλιση, η εκχύλιση με συσκευή Soxhlet, στερεής φάσης, υποβοηθούμενη από υπερήχους, υποβοηθούμενη από μικροκύματα και η μικρο-εκχύλιση στερεής φάσης.

Απλή εκχύλιση στερεού με υγρό (extraction)

Η απλή εκχύλιση στερεού με υγρό είναι η απομόνωση μίας ή περισσότερων ενώσεων από στερεά μίγματα με το υγρό να είναι συνήθως κάποιος διαλύτης, που επιλέγεται με βάση τον σκοπό της εκχύλισης. Βασίζεται στη διαφορά διαλυτοποίησης των ουσιών στον διαλύτη και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου ή εν θερμό και η διαδικασία ξεκινάει τοποθετώντας το κορμιτοποιημένο φυτικό υλικό μαζί με τον διαλύτη σε ένα ποτήρι ζέσεως όπου επιτυγχάνεται η διαλυτοποίηση των ενώσεων και η διείσδυση του διαλύτη στην μάζα του στερεού με ή χωρίς μηχανική ανάδευση. Ο χρόνος εκχύλισης ρυθμίζεται ανάλογα με το είδος της δρόγης και ανάλογα με το είδος του εκχυλίσματος που πρόκειται να παραληφθεί.

Μετά το πέρας της εκχύλισης ακολουθεί συνήθως η διαδικασία της διήθησης με σκοπό να διαχωριστεί η στερεή φάση από την υγρή. Για να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιείται είτε ένα χωνί Buchner μαζί με κενό αντλίας είτε ένα γυάλινο χωνί πάνω στο οποίο τοποθετείται ένας πτυχωτός ηθμός ή κώνος για να συγκρατήσει το στερεό υλικό.

1.6 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός Χημειότυπο

1.6.1 Αέρια Χρωματογραφία- Φασματοσκοπία Μάζων (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία με φασματογράφο μάζας αποτελεί μια σύγχρονη και ενδεδειγμένη μέθοδο για την λεπτομερή ανάλυση και ταυτοποίηση των συστατικών των αιθέριων ελαίων, οποιασδήποτε πολυπλοκότητας ή ακόμα και ανακάλυψη νέων συστατικών. Η φασματοσκοπία μάζας αποτελεί τον ανιχνευτή των συστατικών που διαχωρίζονται από την Αέρια Χρωματογραφία. Τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας καταγράφονται με την μορφή μιας σειράς κορυφών που ονομάζεται Ολικό Χρωματογράφημα Ιόντων (TIC). Οι σύγχρονες συσκευές σχεδιασμένες να προσφέρουν στον ερευνητή μεγαλύτερη ευκολία σε μικρότερο χρόνο διαθέτουν ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες και εξελιγμένα συστήματα αναζήτησης έτσι το φάσμα μάζας κάθε συστατικού μπορεί να ταυτοποιηθεί συγκρίνοντας το με χιλιάδες φάσματα μάζας από διαφορετικές βιβλιοθήκες που περιέχει ο υπολογιστής. Μαζί με τα φάσματα μάζας για την ορθή ταυτοποίηση χρησιμοποιούνται και οι χρόνοι ανάσχεσης κάθε συστατικού ή ακόμα και η «συν-έγχυση» μαζί με έναν μάρτυρα γνωστής ουσίας. (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010)

1.6.2 Υγρή Χρωματογραφία (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο ποιοτικού διαχωρισμού και ποσοτικής ανάλυσης των φυσικών προϊόντων. Η μέθοδος είναι ευρέως διαδεδομένη και έχει προσαρμοστεί στην ανάλυση ενός ευρέος φάσματος φυσικών προϊόντων, χωρίς την ανάγκη για σύνθετη προετοιμασία δειγμάτων. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η ανάλυση και ο διαχωρισμός ασταθών και ευαίσθητων ουσιών σε υψηλές θερμοκρασίες καθώς και ουσιών που είναι αδύνατος ο διαχωρισμός τους από άλλες τεχνικές χρωματογραφίας γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη δύο φάσεων (κινητή και στατική) σε αντίθεση με την Αέρια Χρωματογραφία που περιέχει μόνο την στατική φάση. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ανίχνευσης στην HPLC είναι κρίσιμη λόγω της ποικιλομορφίας των φυσικών προϊόντων και του γεγονότος ότι δεν υπάρχει ενιαία τεχνική για την αποτελεσματική ανίχνευση τους. Σε αυτήν την διαδικασία χρησιμοποιούνται τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές εφαρμογές HPLC με UV, DAD, FD, ECD, RID, FID, CL, ESLD, CAD, MS, MS-MS και NMR για να παρέχουν μια γενική, πολλές φορές πιο γρήγορη λόγω της επιλεκτικότητας τους, ανάλυση (Hamilton & Sewell, 1982, Wolfender, 2009)

1.7 Παραπροϊόντα απόσταξης και οι χρήσεις τους

Ως γνωστόν από την διαδικασία της απόσταξης προκύπτουν τα αιθέρια έλαια, προϊόντα χρήσιμα για τα πτητικά τους συστατικά με ποικίλες χρήσεις. Ωστόσο, η αναλογία μεταξύ της παραγωγής των αιθέριων ελαίων και της φυτικής βιομάζας που επεξεργάζεται είναι πολύ χαμηλή, γεγονός που δημιουργεί σημαντικές ποσότητες υποπροϊόντων των οποίων η διαχείριση πρέπει να λαμβάνεται υπόψη γιατί ελλείψει εναλλακτικών λύσεων καταλήγουν στα απορρίμματα και μετέπειτα στο περιβάλλον προκαλώντας πολλές φορές οικολογικά προβλήματα. Έτσι λοιπόν είναι σημαντική η αναφορά τους και ο έλεγχος για τυχόν χρήσεις που μπορεί να διαθέτουν.

Από την διαδικασία απόσταξης των Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών προκύπτουν συνήθως πέρα από το αιθέριο έλαιο ,το υδρόλυμα, ένα υδατικό διάλυμα το οποίο πιθανώς να περιέχει συστατικά που έχουν περάσει στο νερό καθώς και η υπολειπόμενη βιομάζα που ονομάζεται στερεό απόβλητο.

Βιβλιογραφικά αναφέρονται αρκετοί έλεγχοι για την βιοδραστικότητα των παραπροϊόντων αυτών που προέρχονται από διάφορα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. Για παράδειγμα οι Drinic *et al.* (2021) εξέτασαν την χημική σύσταση του υδατικού εκχυλίσματος (αποβλήτου) της απόσταξης του είδους *Sideritis raeseri* και ανακάλυψαν ότι περιέχει αρκετά βιοδραστικά συστατικά όπως φλαβονοειδείς γλυκοζίτες συμπεραίνοντας ότι αντιπροσωπεύουν πολύτιμο υλικό ως πηγή βιολογικών ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικά συστατικά. Παράλληλα, οι Saha & Basaka (2020) αναφέρουν αρκετές πιθανές χρήσεις και

εναλλακτικές λύσεις αξιοποίησης για απόβλητα απόσταξης αρωματικών φυτών όπως: βιοενεργά φυτοχημικά, βιοπροσροφητικά, ζωοτροφές, βιοκαύσιμα, παραγωγή βιοαερίου, σύνθεση ενζύμων, βιοπαρασιτοκτόνα, χειλικοί παράγοντες, βιοκάρβουνο, κομπόστ, αλλά και πιθανές πηγές για την ανάκτηση βιοδραστικών φαινολικών ενώσεων.

Συνεπώς τα προϊόντα που παράγονται σε πολύ μεγάλες ποσότητες κατά την διαδικασία της μεταποίησης των Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών αποτελούν μια τεράστια δεξαμενή πολύτιμων μεταβολιτών που λόγω της βιοδραστικότητάς τους είναι αναγκαία η αξιοποίησή τους έναντι της αντιμετώπισης τους ως κατώτερα προϊόντα και της απόρριψής τους στο περιβάλλον. Η ανάδειξη των προϊόντων αυτών θα συντελέσει τόσο στην μείωση σπατάλης φυτικού υλικού με αποτέλεσμα έναν πιο οικολογικό χαρακτήρα στον βιομηχανικό χώρο σύμφωνα με τις αρχές της κυκλικής βιώσιμης οικονομίας όσο και στην ενίσχυση της έρευνας και την διεύρυνση της πιθανής εφαρμογής των προϊόντων απόσταξης στην φαρμακευτική ή καλλυντική βιομηχανία.

1.8 Χημική σύσταση του υποείδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*

Λόγω της τάσης των ειδών του γένους να υβριδίζουν με μεγάλη ευκολία οι φυτοχημικές μελέτες που αναφέρονται σε αυτά είναι λίγες και μεγάλο ποσοστό των δευτερογενών μεταβολιτών που απαντώνται στα διάφορα είδη είναι άγνωστο. Οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στο αιθέριο έλαιο το οποίο βρίσκεται σε χαμηλό ποσοστό στα διάφορα είδη με πλούσιο όμως χημικό προφίλ σε φυσικά προϊόντα.

Τα κύρια συστατικά που έχουν εντοπιστεί στο γένος *Sideritis* είναι τα τερπένια, τα φλαβονοειδή, ιριδοειδή, κουμαρίνες, λιγνάνες και στερόλες. (González-Burgos *et al.*, 2011). Πιο συγκεκριμένα, από τα πτητικά συστατικά που είναι σύνηθες να συναντήσει κανείς στον χημειότυπο τους είναι το α και β- πινένιο ενώ από τα μη πτητικά απαντώνται παράγωγα κινικού οξέος, πολλά φλαβονοειδή και τα γλυκοσίδια τους, φαινυλοπροπανοειδείς γλυκοζίτες όπως ο βερμπασκοσίδης και ο ισοβερβασκοσίδης και ορισμένα ιριδοειδή, με τη μελιτοσίδη να είναι το πιο συνηθισμένο. (Dimaki *et al.*, 2022)

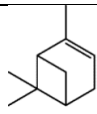
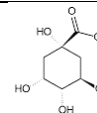
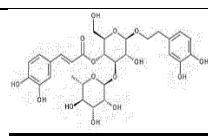
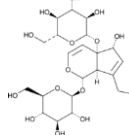
Τα υποείδη του είδους *Sideritis clandestina* ως ενδημικά της Πελοποννήσου δεν έχουν ερευνηθεί σε μεγάλη κλίμακα γι' αυτό το χημειοτυπικό του προφίλ δεν αναφέρεται σε αρκετές βιβλιογραφικές μελέτες. Σύμφωνα με τους Vasilopoulou *et al.* (2013) στο υποείδος *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* που αποτελεί και αντικείμενο της παρούσας μελέτης, κατάφεραν να διαχωρίσουν και να ταυτοποιήσουν 17 ουσίες που ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες φυτοχημικών όπως παράγωγα κινικού οξέος, μελιτοσίδης, φαινυλοπροπανοειδών και φλαβονοειδών. Παράλληλα, σύμφωνα με την μελέτη των Koutsaviti *et al.* (2013) το υποείδος χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε μονοτερπένια 44,4% για παράδειγμα περιέχει α-πινένιο, σεσκιτερπένια σε ποσοστό 39,3% με παράδειγμα τα παράγωγα καρυφυλλένιου και

διτερπένια 1.1%. Πιο αναλυτικά οι σημαντικότερες κατηγορίες ουσιών που περιέχονται στο υποείδος που μελετάται στην παρούσα εργασία είναι:

Τερπενοειδή: Τα τερπενοειδή είναι μια κατηγορία οργανικών χημικών ουσιών που αποτελούν το κύριο συστατικό των αιθέριων ελαίων και τους προσδίδουν πολλές ιδιότητες. Προέρχονται από την ένωση τερπενίων με οξυγόνο. Τα τερπένια αποτελούνται από 5 άνθρακες ισοπρενίου (C₅H₈) και παρουσιάζουν μεγάλη δομική ποικιλομορφία ανάλογα τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου που έχουν στην ανθρακική τους αλυσίδα. Τα τερπένια ταξινομούνται ως ημιτερπένια (C₅), μονοτερπένια (C₁₀), σεσκιτερπένια (C₁₅), διτερπένια (C₂₀), σεστερτερπένια (C₂₅), τριτερπένια (C₃₀) και τετρατερπένια/καροτενοειδή (C₄₀). (Ayu *et al.*, 2022)

Φαινολικά συστατικά: Η κατηγορία των φαινολικών συστατικών περιλαμβάνει τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα φαινυλοπροπανοειδή, τις ανθοκυανίνες κ.α., τα οποία προκύπτουν μέσω πολλών αντιδράσεων συμπύκνωσης και προσθήκης. Η πρόδρομη ένωση όλων είναι η φαινόλη, στην οποία οφείλουν και το όνομά τους. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των φαινολικών συστατικών είναι ο αρωματικός δακτύλιος (C₆) με ένα ή περισσότερα υδροξύλια (-OH) συνδεδεμένα με άλλους υποκατάστατες.

Πίνακας 1 Παραδείγματα φαινολικών συστατικών που βρίσκονται σύμφωνα με την βιβλιογραφία στο χημείο του είδους Sideritis clandestina subsp clandestina

<u>Κατηγορία</u>	<u>Όνομα συστατικού</u>	<u>Χημικός τύπος</u>	<u>Χημική Δομή</u>	<u>Βιβλιογραφία</u>
μονοτερπένιο	α-πινένιο	C ₁₀ H ₁₆		Koutsaviti <i>et al.</i> (2013)
Φαινολικό οξύ	Κινικό οξύ	C ₇ H ₁₂ O ₆		Vasilopoulou <i>et al.</i> (2011)
Φαινυλοπροπανοειδής γλυκοζίτης	βερμπασκοσίδης	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅		Dimaki <i>et al.</i> 2022
Ιριδοειδές γλυκοζίδιο	μελιτοσίδη	C ₁₅ H ₁₈ O ₈		Dimaki <i>et al.</i> 2022

1.9 Προσδιορισμός της Βιοδραστικότητας των Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών

1.9.1 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Ικανότητας

Οι δύο πιο διαδεδομένες μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών ειδών είναι η μέθοδος DPPH και η μέθοδος ABTS των οποίων οι αρχές είναι οι ακόλουθες:

Μέθοδος DPPH

Η ρίζα DPPH χρησιμοποιείται ευρέως για τον έμμεσο προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα, μωβ χρώματος 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH είναι μία από τις πρώτες συνθετικές ελεύθερες ρίζες και μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT). Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[·]) ανάγεται και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μια μεταβολή που είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 515nm. Η μείωση της απορρόφησης του μεθανολικού διαλύματος DPPH* στα 515nm μετριέται αφού αυτή σταθεροποιηθεί. Ο χρόνος που απαιτείται για να σταθεροποιηθεί κυμαίνεται από 10- 30 λεπτά και μερικές φορές μέχρι 6 ώρες. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.

Μέθοδος ABTS

Η μέθοδος στηρίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και σε μια αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή κυανοπράσινου χρώματος ρίζα ABTS*. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS* ανάγεται είτε μέσω της προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικού και συνέπεια τη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730nm.

1.9.2 Προσδιορισμός Παρεμποδιστικής δράσης παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών

Για τον προσδιορισμό της παρεμποδιστικής δράσης ουσιών έναντι παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και την συγκριτική μελέτη τους χρησιμοποιείται συνήθως η

μέθοδος της μέτρησης των ζωνών αναστολής, η οποία δίνει ποιοτικό αλλά και ποσοτικό αποτέλεσμα, σε ότι αφορά την ουσία με τη μεγαλύτερη αναστολή.

Μέθοδος Well-Diffusion Assay

Η μέθοδος έχει να κάνει με την διάχυση της αντιμικροβιακής ουσίας από το βοθρίο στο κέντρο του τρυβλίου προς το υπόλοιπο υπόστρωμα. Αρχίζει επιστρώνοντας ή ενσωματώνοντας 0,1ml εναιωρήματος καθαρής καλλιέργειας από τον μικροοργανισμό-στόχο σε τρυβλία με κατάλληλο πλούσιο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα κοινής χρήσης ή εκλεκτικό υπόστρωμα για συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. Στην συνέχεια, ακολουθεί η δημιουργία βοθρίου διαμέτρου $\approx 0,5\text{cm}$ στο κέντρο του στερεοποιημένου υποστρώματος όπου τοποθετείται η υπό μελέτη αντιμικροβιακή ουσία (ποσότητα $\approx 20\mu\text{l}$). Ακολουθεί η επώαση σε συνθήκες θερμοκρασίας-χρόνου κατάλληλες για τον μικροοργανισμό-στόχο και στο τέλος πραγματοποιούνται οι μετρήσεις των ζωνών αναστολής, εάν υπάρχουν, δηλαδή τα mm της διαμέτρου της ζώνης πέρα από το άκρο του βοθρίου στην οποία δεν παρατηρείται εξάπλωση των αποικιών του μικροοργανισμού (Balouirgin *et al.*, 2016).

1.10 Σημασία προστασίας, Διατήρησης και Ανάδειξης των Αρωματικών και Φαρμακευτικών φυτών

Στις μέρες μας, αρκετοί παράγοντες όπως η συνεχή αύξηση του πληθυσμού και η διαρκή βιομηχανική ανάπτυξη, θέτουν σε κίνδυνο τη διατήρηση της βιοποικιλότητας, των φυσικών πόρων και σταθερών κλιματικών συνθηκών. Η κλιματική αλλαγή έχει οδηγήσει στην ανησυχητική υφιστάμενη κατάσταση με πολλά είδη να μπαίνουν στην «Κόκκινη Λίστα» σύμφωνα με την τελευταία έκθεση της Διεθνούς Ένωσης για την Διατήρηση της Φύσης (IUCN). Πιο συγκεκριμένα λόγω της ανεξέλεγκτης αύξησης της θερμοκρασίας της γης, των μεγάλων περιόδων ξηρασίας και της μείωσης του πληθυσμού των επικονιαστών πολλά είδη φυτών βιώνουν τις επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής και βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο.

Ο ανθρώπινος παράγοντας έχει και αυτός συμβάλλει στην μείωση της πυκνότητας τους στους φυσικούς βιότοπους τους. Πιο αναλυτικά η απληστία και η μη συνετή διαχείριση πολλών αρωματικών ειδών οδήγησαν στο φαινόμενο της αειφορικής υπερκάρπωσης, δηλαδή της συλλογής φυτών από την φύση, περισσότερων από όσα αυτή μπορεί γρήγορα να αναπληρώσει. Παράλληλα, η ληστρική, αλόγιστη και χρόνια εκρίζωση των μητρικών φυτών, η παράνομη εμπορία τους και οι εμπρησμοί έχουν οδηγήσει στην μείωση στο ελάχιστο της πυκνότητας τους στις περιοχές που έδρασαν καθώς και της βιοποικιλότητας των ελληνικών βουνών.

Η αναζήτηση πιο ποιοτικού τρόπου ζωής τα τελευταία χρόνια αλλά και το ενδιαφέρον του ανθρώπου για την φύση, θέτει σε ισχύ την διατήρηση και την προστασία της. Χρέος κάθε πολίτη

αλλά και κάθε δασικής υπηρεσίας είναι να διασφαλίσει την προστασία της βιοποικιλότητας των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών όπως και των δασικών σχηματισμών της χώρας, έναντι των ανθρωπίνων παρεμβάσεων, εφαρμόζοντας τις σχετικές διατάξεις της δασικής νομοθεσίας.

Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με το νομοθετικό πλαίσιο απαγορεύεται ρητά η εκρίζωση και η ολοκληρωτική αποκοπή αρωματικών – μελισσοτροφικών φυτών όπως το τσάι του βουνού, θυμάρι, φασκόμηλο κ.α. ενώ επιτρέπεται η συλλογή τους ατελώς και σε περιορισμένη ποσότητα (έως 1 κιλού), μόνο κατά την εποχή πλήρους άνθισης τους, αποκλειστικά για προσωπική χρήση.

1.11 Σημασία της καλλιέργειας

Τα Αρωματικά και Φαρμακευτικά φυτά θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες στην βιώσιμη ανάπτυξη, στην περιβαλλοντική προστασία και στην δημόσια υγεία. Στην χώρα μας η καλλιέργεια και η ορθή εκμετάλλευση τους συμβάλει στην αξιοποίηση μειονεκτικών, ορεινών ή ημιορεινών εκτάσεων συνεισφέροντας στην αναδιάρθρωση των καλλιεργειών, στον εμπλουτισμό της μελισσοκομικής χλωρίδας, στην διατήρηση πολύτιμου πολλαπλασιαστικού υλικού, στην ανάπτυξη επιχειρηματικών δραστηριοτήτων στην περιοχή, στην ανάπτυξη εναλλακτικών μορφών τουρισμού και της οικονομίας αλλά και στην ανακάλυψη του βοτανικού πλούτου της χώρας και των πολύτιμων ιδιοτήτων του. (Δόρδας, 2012, Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010)

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ερευνητικές αποστολές και μακροσκοπικές παρατηρήσεις στις θέσεις εντοπισμού του είδους και στους αποδεικτικούς αγρούς.

Ο εντοπισμός πληθυσμών του είδους πραγματοποιήθηκε μετά από εξερευνητικές αποστολές στον ορεινό όγκο του Πάρωνα, που αποτέλεσε τον πειραματικό αγρό για τον αυτοφυή πληθυσμό ενώ για τον καλλιεργούμενο πληθυσμό, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ιδιωτική έκταση στην περιοχή των Άνω Δολιανών Αρκαδίας. Οι αποστολές αυτές όπως αναλύονται εκτενώς στον παρακάτω πίνακα έλαβαν χώρα κατόπιν άδειας από τους αρμόδιους φορείς όπως επιτάσσει η αντίστοιχη νομοθεσία. Πιο συγκεκριμένα, άδεια έρευνας δόθηκε από το Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας- Διεύθυνση Προστασίας Δασών, το Δασαρχείο Σπάρτης, και από το Φορέα Διαχείρισης Πάρωνα Μουστού, Μαινάλου και Μονεμβασίας.

Πίνακας 2 Πληροφορίες των αποστολών στα ερευνητικά πεδία

Πληθυσμός	Καλλιεργούμενο	Αυτοφύες
Περιοχή	Άνω Δολιανά Αρκαδίας	Μικρή Τούρλα Όρους Πάρωνα
Συντεταγμένες	N 37°22'36.8976" E 22°30'34.1676"	N 37°17'10.1328" E 22°36'42.6348"
Υψόμετρο	1.200 m	1.716 m
Ημερομηνίες Επισκέψεων	21.04.2022 29.05.2022 21.06.2022	21.04.2022 29.05.2022 24.06.2022
Στάδιο Ανάπτυξης	Βλαστητικό στάδιο Έκπτυξη ανθοφόρων βλαστών Πλήρης ανθοφορία	Βλαστητικό στάδιο Έκπτυξη ανθοφόρων βλαστών Πλήρης ανθοφορία

Το δεύτερο στάδιο της διαδικασίας αποτέλεσε η επιλογή τυχαίων αγροτεμαχίων με διαστάσεις 5×5m στις δύο περιοχές. Στην συνέχεια, έπειτα από την καταγραφή του πληθυσμού σε κάθε αγροτεμάχιο, επιλέχθηκαν τρία φυτά του πληθυσμού και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους.



Εικόνα 3 Καλλιέργεια στα Άνω Δολιανά Αρκαδίας και Αυτοφύες πληθυσμός στην Μικρή Τούρλα του Όρους Πάρωνα

Κλιματικές συνθήκες πληθυσμών:

Η κλιματικές συνθήκες των δύο πληθυσμών, καλλιεργούμενου και αυτοφυούς, χαρακτηρίζονται από ηπειρωτικό κυρίως κλίμα με ψυχρούς χειμώνες και παρουσία πολλών βροχοπτώσεων και χιονοπτώσεων, καλοκαίρια δροσερά με συχνές βροχές. Οι θερμοκρασίες κυμαίνονται κυρίως σε χαμηλά επίπεδα και παρατηρείται μεγάλη διαφορά θερμοκρασίας ανάμεσα στις εποχές χειμώνας και καλοκαίρι. (Κωνσταντινίδης Θ., Καλπουτζάκης Ε., 2015). Εν τούτοις, τα τελευταία χρόνια στο πλαίσιο της κλιματικής αλλαγής, παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας και απόκλιση από την κανονικότητα των βροχοπτώσεων.

Στοιχεία καλλιεργούμενου πληθυσμού:

Η καλλιέργεια, εγκαταστάθηκε τον Απρίλιο του 2021, ενώ είχε προηγηθεί ήπιο όργωμα και εδαφοβελτίωση με την εφαρμογή ανθρακικού ασβεστίου για τη ρύθμιση του pH του εδάφους. Στη φάση της φύτευσης των έρριζων μοσχευμάτων, εφαρμόστηκε άρδευση, ενώ κατά την καλλιεργητική περίοδο το μεγαλύτερο πρόβλημα ήταν η παρουσία ζιζανίων τα οποία απομακρύνθηκαν χειρωνακτικά.



Εικόνα 4 Καλλιεργούμενος πληθυσμός με έντονη παρουσία ζιζανίων

Στοιχεία αυτοφυούς πληθυσμού:

Ο πολυετής αυτοφυής πληθυσμός, ως ενδημικό φυτό της περιοχής είναι καλά προσαρμοσμένος στις συνθήκες της περιοχής. Παρατηρήθηκε να απειλείται από την παρουσία κτηνοτροφικών ζώων κατά την περίοδο της έκπτυξης των ανθοφόρων βλαστών με αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού και του μεγέθους των ταξιανθιών συγχρόνως με τον κίνδυνο της μόλυνσης των φυτών από φυτοπαθογόνους μύκητες.



Εικόνα 5 Προσβολή αυτοφυούς πληθυσμού από κτηνοτροφικά ζώα

2.2 Βοτανική ταξινόμηση, Προσδιορισμός μορφολογικών χαρακτηριστικών

Ο προσδιορισμός και η ταυτοποίηση των μορφολογικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών των υπό μελέτη φυτικών δειγμάτων της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια μικροσκοπίων, κλείδων και βιβλιογραφίας.



Εικόνα 6 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*

2.3 Επεξεργασία μορφολογικών χαρακτηριστικών

Για την σύγκριση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των υπό μελέτη αυτοφυών και καλλιεργούμενων δειγμάτων συλλέχτηκαν δεδομένα, τα οποία με την χρήση του προγράμματος Statgraphics πραγματοποιήθηκε η ανάλυση και επεξεργασία τους με σκοπό να βρεθούν οι ομοιότητες και οι διαφορές τους. Πιο συγκεκριμένα, για τον εντοπισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών ή μη ανάμεσα στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν παραμετρικά τεστ όπως έλεγχος δύο μέσων (τ-τεστ) ανάμεσα στα δεδομένα των διαφορετικών πληθυσμών, ενώ για την αξιολόγηση των δειγμάτων του ίδιου πληθυσμού χρησιμοποιήθηκε η παραγοντική ανάλυση διασποράς (ANOVA). Για την εφαρμογή και των δύο αυτών τεστ είναι απαραίτητες οι ακόλουθες προϋποθέσεις.

1. Τα δείγματα να είναι ανεξάρτητα
2. Τα δείγματα να προέρχονται από κανονικού πληθυσμούς
3. Τα δείγματα να έχουν ίσες διακυμάνσεις

Στην παρούσα εργασία, τα δείγματα χαρακτηρίζονται ως ανεξάρτητα διότι ανήκουν σε διαφορετικούς πληθυσμούς που βρίσκονται σε διαφορετικές περιοχές του ορεινού σχηματισμού και οι τιμές του ενός πληθυσμού δεν επηρεάζουν τις τιμές του άλλου και αντίστροφα. Για την αξιολόγηση της προέλευσης των δειγμάτων από κανονικούς ή μη πληθυσμούς και των διακυμάνσεων πραγματοποιήθηκαν οι έλεγχοι καλής εφαρμογής (Shapiro-Wilk) και ίσων διακυμάνσεων (F-test) αντίστοιχα.

Στην περίπτωση της παραγοντικής ανάλυσης διασποράς για τον έλεγχο των προϋποθέσεων εφαρμόστηκαν έλεγχοι κανονικότητας των σφαλμάτων με βάση τα υπόλοιπα και έλεγχοι ισότητας διακυμάνσεων (Levene's test).

2.4 Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε χειρωνακτικά κατά την πλήρη άνθιση τους από τα πειραματικά πεδία. Τοποθετήθηκαν σε χάρτινες καθαρές σακούλες για την αποφυγή αλλοιώσεων και στην συνέχεια απλώθηκαν για περίπου 30 μέρες, σε καθαρές επιφάνειες σε σκοτεινό, καλά αεριζόμενο και δροσερό χώρο με σκοπό την ήπια ξήρανση τους.

2.5 Χαρακτηρισμός πληθυσμών

Για τον χαρακτηρισμό των πληθυσμών του συγκεκριμένου υποείδους, ελήφθησαν υπόψιν τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν από τις ερευνητικές αποστολές στους πειραματικούς αγρούς, από τις μορφολογικές εργαστηριακές μετρήσεις και από τον χημειοτυπικό χαρακτηρισμό μέσω χημικών αναλύσεων, τα οποία συγκρίθηκαν από δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας του γένους *Sideritis*.

2.6 Παραλαβή αιθέριου ελαίου

Για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου των υπομελέτη δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υδροαπόσταξης με συσκευή Clevenger. Η διαδικασία ξεκίνησε κορνιτοποιώντας φύλλα και άνθη των δειγμάτων και στην συνέχεια με την τοποθέτηση του κονιοροποιημένου αυτού φυτικού υλικού σε σφαιρική γυάλινη φιάλη του 1L γνώστη ως φιάλη ζέσεως μαζί με ποσότητα απιονισμένου νερού τέτοια ώστε να καλύπτει το φυτικό υλικό. Στην συνέχεια, ξεκίνησε η θέρμανση της φιάλης και του περιεχομένου της με την βοήθεια του θερμομανδύα πάνω στο οποίο ήταν τοποθετημένη. Η διαδικασία της απόσταξης γινόταν με την δημιουργία πλήθους υδρατμών που παρέσερναν τα αιθέρια έλαια από τους ιστούς λόγω υψηλής θερμοκρασίας και άρχιζαν να συμπυκνώνονται στο ψυκτήρα με αποτέλεσμα να συγκεντρώνονται σταγόνες αιθέριου ελαίου και υδρολύματος στο δοχείο διαχωρισμού. Το αιθέριο έλαιο λόγω της διαφορετικής πυκνότητας του και του χαμηλού ειδικού βάρους του αποτελούσε την υποκείμενη φάση στο δοχείο διαχωρισμού έναντι του νερού, όμως για λόγους ακριβείας και αποφυγής λάθους συλλέχθηκαν και οι δύο φάσεις σε ποτήρι ζέσεως και η παραλαβή των πτητικών συστατικών από το μείγμα αιθέριου ελαίου και υδρολύματος πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο εκχύλισης υγρού-υγρού. Πιο συγκεκριμένα, έγινε χρήση ανάλογης ποσότητας διαλύτη (διμεθυλαιθέρα) με την ποσότητα του μείγματος υδρόλυμα-αιθέριο έλαιο και τοποθέτηση όλων σε εκχυλιστική χοάνη. Ακολούθησε ανάδευση και πρώτα συλλογή της υδατικής φάσης και έπειτα της οργανικής η οποία περιείχε διμεθυλαιθέρα και



Εικόνα 7 Υδρο- απόσταξη με συσκευή Clevenger

πητικα συστατικα. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές με την δεύτερη φορά να εκχυλίζεται η υδατική φάση της πρώτης με την χρήση ανάλογης ποσότητας διαλύτη. Τέλος, η οργανική φάση που συλλέχθηκε από τις δύο εκχυλίσεις συμπυκνώθηκε με υγρό άζωτο μέχρι περίπου τα 10ml, με άνυδρο μαγνήσιο απομακρύνθηκε η περίσσεια υγρασία, φιλτραρίστηκε με σύριγγα και φιλτράκι (EconofiltrPTFE 25m, 0,45nm), συμπυκνώθηκε ξανά σε έναν τελικό όγκο 2ml και αποθηκεύτηκε σε σηματοδοτούμενα με ετικέτες φιαλίδια, στην κατάψυξη σταθερής θερμοκρασίας στους -18°C.

2.7 Ποιοτικός προσδιορισμός με Αέρια Χρωματογραφική Ανάλυση (GC/MS)

Για τον διαχωρισμό των συστατικών των παραληφθέντων αιθέριων ελαίων εφαρμόστηκε η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας ενώ για την ταυτοποίηση τους χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία μαζών.

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αέριος χρωματογράφος (SCION) συζευγμένος με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών, που φέρει αυτόματο δειγματολήπτη CP-8400, της εταιρίας Brucker. Η τριχοειδής στήλη του χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε ήταν OptiMA-5 MS (30m x 0,25 mm, ID, πάχος φιλμ, 0.25 μm) ενώ το φέρον αέριο ήταν το ήλιο (He) με ταχύτητα ροής 1ml/min σε σταθερή πίεση. Η πηγή λειτούργησε με ηλεκτρική τάση 70Ev. Η θερμοκρασία στο σύστημα εισαγωγής του δείγματος ήταν 220°C και το πρόγραμμα ανάλυσης, το οποίο είχε διάρκεια 73,33 min, περιλάμβανε την άνοδο της θερμοκρασίας της στήλης, η οποία ήταν αρχικά στους 60°C και τελικά αυξανόταν βαθμιαία μέχρι τους 250°C με ρυθμό 3°C/min και μέχρι τους 300°C με ρυθμό 5°C/min. Ο όγκος του προς ανάλυση δείγματος ήταν 1μl. Τέλος η θερμοκρασία της πηγής ιόντων καθορίστηκε στους 230°C.

Η ταυτοποίηση των πητικών συστατικών έγινε με την σύγκριση των χρόνων συγκράτησης και των φασμάτων μαζών με αυτών των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών NIST που υπάρχουν στο λογισμικό του οργάνου και με δεδομένα της βιβλιογραφίας.



Εικόνα 8 Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία μαζών

2.8 Παραλαβή υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων

Η Εκχύλιση των φυτικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με μηχανική ανάδευση 5g με 500mL μεθανόλη/νερό σε αναλογία 70:30 για ένα τέταρτο. Στην συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της συμπύκνωσης στο Rotary Evaporator στους 50°C και 90rpm για 4ώρες με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύτη. Τέλος, έγινε η μεταφορά του υδατινού εκχυλίσματος σε φυάλη λυοφιλίωσης 600ml και με την χρήση της συσκευής Virtis 25 EL Freemobile



Εικόνα 9 Εκχύλιση υγρού-στερεού

επιτεύχθηκε η απομάκρυνση της υγρασίας με συνέπεια την αποθήκευση του υλικού σε στερεή μορφή.

2.9 Παραλαβή υδατικών εκχυλισμάτων

Η παραλαβή των υδατικών εκχυλισμάτων έγινε με την διαδικασία της υδροαπόσταξης που χρησιμοποιήθηκε με σκοπό και την παραλαβή των πτητικών συστατικών των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα το υδατικό εκχύλισμα που παρέμεινε στην φιάλη ζέσεως μετά την υδροαπόσταξη των δειγμάτων συλλέχθηκε, διαχωρίστηκε από το φυτικό υλικό, γνωστό και ως φυτικό απόβλητο, που περιείχε και αποθηκεύτηκε σε στερεή μορφή μετά την διαδικασία της λυοφιλίωσης στην κατάψυξη σταθερής θερμοκρασίας -18°C.

2.10 Ποιοτικός προσδιορισμός με Υγρή Χρωματογραφία (HPLC)

Πίνακας 3 Χαρακτηριστικά μεθόδου υγρής χρωματογραφίας HPLC

	Μέθοδος		
Στατική φάση	Supelco Discovery HS C18 25cmX4.6mm, 5um		
Κινητή φάση	B: Μεθανόλη A: Νερό + 0.25% φορμικό οξύ		
Πρόγραμμα έκλουσης	T (min)	% B	% A
	0	25	75
	2	25	75
	40	90	10
	45	90	10
	50	25	75
	60	25	75
Ροή (mL/min)	0.4		
Θερμοκρασία Στήλης (°C)	30		
Όγκος ένεσης (μ L)	20		

Τα τέσσερα εκχυλίσματα στην λυοφυλιωμένη τους μορφή, αναλύθηκαν με το σύστημα 1100 Agilent HPLC εφοδιασμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους UV-Vis (Diode Array Detector-DAD) και συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος περιείχε το λογισμικό HP Chemstation για την επεξεργασία των χρωματογραμμάτων.

Για την ανάλυση παρασκευάστηκαν μεθανολικά εκχυλίσματα από τα υπό μελέτη δείγματα 4mg/mL και διηθήθηκαν με φίλτρο πορώδους 0,20μm και διάμετρο 15mm (Chromafil Xtra PET-

20/15) και οξυνισμένη μεθανόλη που προέκυψε από φιλτραρισμένη μεθανόλη HPLC με την χρήση Nylon Membrane Filter με μέγεθος πορώδους 0,45μm και διάμετρο 47mm..

Παράλληλα έγινε παραλαβή ποσότητας 500mL υπερκάθαρου νερού από Rephile Genie A32 και προστέθηκε φορμικό οξύ με σκοπό την οξίνιση του κάτω από συνθήκες απαγωγού.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή της ανεστραμμένης φάσης (HPLC-EF). Πιο συγκεκριμένα η κινητή φάση αποτελούνταν από τον συνδυασμό δύο διαλυτών A και B με τον A να είναι το υπερκάθαρο νερό οξινισμένο με 0,25% φορμικό οξύ και ο B να είναι η οξυνισμένη μεθανόλη. Η ροή της ρυθμίστηκε στα 0,4 ml/min και η πίεση κυμαινόταν 80-120 barr. Η εισαγωγή του κάθε δείγματος στο όργανο όγκου 20μl έγινε με σύριγγα και η διαδικασία διήκρησε 60min/ δείγμα.

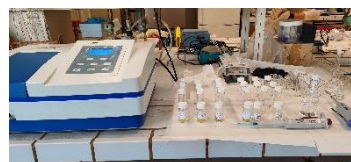
Εφαρμόστηκε η τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution) , όπου γίνεται βαθμιαία μεταβολή της κινητικής φάσης.

Η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με την σύγκριση των χρωματογραφημάτων με αυτά των μεμονωμένων πρότυπων ουσιών που λήφθηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους. Η σύγκριση των φασμάτων UV-Vis στον ίδιο χρόνο έκλουσης καθώς και η σχετική βιβλιογραφία βοήθησαν στη προσπάθεια ταυτοποίησης.

2.11 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αιθέριων ελαίων και των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων

2.11.1 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή DPPH

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρασκευάστηκε διάλυμα DPPH, ζυγίζοντας 4mg από το εμπορικό σκεύασμα DPPH και διαλύοντας τα σε μεθανόλη όγκου 100mL. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε vials 30μL δείγματος και 3mL διαλύματος DPPH με εξαίρεση την περίπτωση του Blank που προστέθηκε μόνο το διάλυμα DPPH.



Εικόνα 10 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού UV-Vis

Για όλα τα δείγματα δημιουργήθηκαν τρεις επαναλήψεις και επωάστηκαν σε σκοτεινό περιβάλλον. Μετά το πέρας μίας ώρας, μηδενίστηκε το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο V-1200 και ακολούθησαν οι μετρήσεις της απορρόφησης στα 515nm.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox (6- υδροξυ- 2,5,7,8- τετραμεθυλωχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ) που είναι υδατοδιαλυτό, ισχυρό αντιοξειδωτικό, ανάλογο της Βιταμίνης E.

2.11.2 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή ABTS

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρασκευάστηκε διάλυμα αμμωνιακού άλατος ABTS 7mM, ζυγίζοντας 38,4mg ABTS σε 10mL απεσταγμένο νερό. Η ρίζα ABTS* παρασκευάστηκε από την αντίδραση 7mM αμμωνιακού άλατος ABTS με 2,45mM υπερθειικού καλίου ($K_2S_2O_8$). Η οξείδωση του ABTS άρχισε αμέσως αλλά σταθεροποιήθηκε μετά από 12 ώρες. Το διάλυμα της ρίζας που φτιάχτηκε παρέμεινε για 16-18 ώρες στο σκοτάδι και μετά αραιώθηκε με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης, ώστε η απορρόφηση του στα 734nm να είναι στα $0,700 \pm 0,005$ σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο V-1200 (VWR Spectrophotometer). Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε μπουκαλάκια, 30μl δείγματος και 3ml του διαλύματος της ρίζας και έπειτα από επώαση 6 min σε σκοτεινό περιβάλλον ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης στα 734nm το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού UV-Vis και ο προσδιορισμός του ποσοστού παρεμπόδισης (I%). Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν τρεις φορές.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλωχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ) όπως και στην δοκιμή DPPH.

2.12 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών των αιθέριων ελαίων και των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων

2.12.1 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά με την δοκιμή Folin-Ciocalteu

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά συστατικά παρασκευάζεται διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 για την δημιουργία αλκαλικού περιβάλλοντος κατά την αντίδραση των δειγμάτων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Για την παρασκευή του ζυγίζονται 20g Na_2CO_3 και διαλύονται σε 100mL απιονισμένο νερό με την βοήθεια του λουτρού υπερήχων. Στην συνέχεια σε αριθμημένα vials τοποθετούνται 1,5mL απιονισμένο νερό, 25μL δείγματος και 125μL αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Έπειτα από τρία λεπτά προστίθενται 375μL Na_2CO_3 και 475μL απιονισμένο νερό. Τα vials τοποθετούνται στο σκοτάδι για επώαση και μετά το πέρας δύο ωρών πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 725nm στο φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο V-1200 (VWR Spectrophotometer).

Όλα τα δείγματα μετρούνται τρεις φορές και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

2.13 Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων της απόσταξης έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών με την μέθοδο της διάχυσης σε τρυβλία.

Τα υπό μελέτη υδατικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από την διαδικασία της υδροαπόσταξης μελετήθηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι τροφιμογενών (+) και (-) κατά Gram βακτηρίων. Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής τους δράσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης σε τρυβλία. Τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:



Εικόνα 11 Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης υπό ασηπτικές συνθήκες

Θρεπτικά υποστρώματα

Προετοιμασία:

- Tryptone Soy Broth (30g/1L απιονισμένο νερό, ήπια ανάδευση και καθόλου θέρμανση)
- Σωληνάκια με 9ml Tryptone Soy Broth (TSB)
- Tryptone Soy Agar (TSA, 18,4g/500mL απιονισμένο νερό, ήπια ανάδευση και καθόλου θέρμανση)

Αποστείρωση:

121°C / 15min

Αραιωτικά υγρά

Προετοιμασία:

- Ringer Solution (2 ταμπλέτες/ 1L απιονισμένο νερό)
- Σωληνάκια με 9mL Ringer

Αποστείρωση: 121°C / 15min

Κατόπιν καλλιέργειας και οπτικού ελέγχου της ζωτικότητας τους, επιλέχθηκαν τα (+) κατά Gram στελέχη βακτηρίων: *Staphylococcus aureus* B134 & *Bacillus subtilis* B109 και τα (-) κατά Gram στελέχη βακτηρίων: *Escherichia coli* B16 & *Pseudomonas fluorescens* B29.

Πίνακας 4 Υπό μελέτη Βακτηριακά στελέχη

(+) Gram βακτήρια	<i>Staphylococcus aureus</i> B134	<i>Bacillus subtilis</i> B109
(-) Gram βακτήρια	<i>Escherichia coli</i> B16	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B29

Τα μικροβιακά στελέχη προέρχονται από την συλλογή απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών, που διατηρεί το EMBT. Οι μικροοργανισμοί συντηρούνται στους -20°C σε Nutrient both, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 50% του συνολικού όγκου για την προστασία της κυτταρικής μεμβράνης του μικροοργανισμού.

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε κάτω από ασηπτικές συνθήκες ενώ για λόγους επαναληψιμότητας πραγματοποιήθηκε διπλή επανάληψη.

Ανανέωση μικροοργανισμών

Η ανανέωση των μικροοργανισμών πραγματοποιείται πριν τον ενοφθαλμισμό τους σε κάποιο υπόστρωμα, διαρκεί 18-24 ώρες έπειτα από επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία για κάθε μικροοργανισμό και επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά με σκοπό την επίτευξη των καλύτερων δυνατών αποτελεσμάτων από πλευράς ζωτικότητας. Πιο αναλυτικά, για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης έγιναν δύο διαδοχικές αραιώσεις υπό ασηπτικές συνθήκες.

Πίνακας 5 Υπό μελέτη μικροοργανισμοί, χρόνος και θερμοκρασία επώασης

Μικροοργανισμοί	Χρόνος Επώασης (ώρες)	Θερμοκρασία Επώασης (°C)
<i>E. coli</i> B16	24	37
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B29	48	25
<i>Bacillus subtilis</i> B109	24-48	30-35
<i>Staphylococcus aureus</i> B134	24	37

Η πρώτη πραγματοποιήθηκε με την λήψη ποσότητας 1ml από το stock κυττάρων και την προσθήκη τους σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10ml TSB. Ακολούθησε η επώαση στις κατάλληλες συνθήκες και στους κατάλληλους χρόνους ανάπτυξης για τον κάθε μικροοργανισμό ενώ παράλληλα έγινε χρήση της τεχνικής της γραμμικής επίστρωσης σε τρυβλία TSA, με δύο επαναλήψεις ανά μικροοργανισμό, με σκοπό τον σχηματισμό μεμονωμένων αποικιών του μικροοργανισμού και ελέγχου ζωτικότητας του, και στην συνέχεια ακολούθησε ξανά επώαση στις ίδιες συνθήκες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την δεύτερη ανανέωση όπου μετά το πέρα της πραγματοποιήθηκαν δύο-τρεις διαδοχικές αραιώσεις με σκοπό τον εύκολο υπολογισμό του αριθμού αποικιών.

Διαδοχικές αραιώσεις

Οι διαδοχικές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη ποσότητας 1ml κυττάρων του μικροοργανισμού από την προηγούμενη αραιώση σε σωληνάκια ringier των 9ml ώστε οι αραιώσεις να έχουν δεκαδική διαφορά. Ακολουθεί η επίστρωση 0,1ml από τα σωληνάκια των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε τρυβλία υποστρώματος TSA και επώαση στις κατάλληλες συνθήκες για κάθε μικροοργανισμό. Μετά το πέρας των 18-24 ωρών έγινε ο έλεγχος πληθυσμών και η καταμέτρηση τους.

Έλεγχος παρεμποδιστικής ικανότητας των υδατικών εκχυλισμάτων του υποείδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*

Η εκτίμηση της παρεμποδιστικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε με άμεση μακροσκοπική μέθοδο παρατηρώντας τις παρεμποδιστικές ζώνες που σχηματίζονται στα βοθρία (πηγαδάκια) των τρυβλίων λόγω του υδατικού εκχυλίσματος που προστέθηκε σε αυτά. Για τον σκοπό αυτό, επιστρώθηκαν με μικροοργανισμούς 16 τρυβλία με TSA, 4 για κάθε μικροοργανισμό και στην συνέχεια αφού στέγνωσαν σχεδιάστηκαν πέντε βοθρία σε κάθε τρυβλίο.

Παράλληλα, προετοιμάστηκαν τα υδατικά διαλύματα των εκχυλισμάτων τα οποία αρχικά ήταν σε λυοφιλωμένη μορφή για λόγους συντήρησης. Πιο συγκεκριμένα, προστέθηκε αποστειρωμένο νερό στο λυοφιλωμένο υλικό και τοποθετήθηκε σε ήπια θέρμανση και ανάδευση μέχρι να διαλυθεί εντελώς το στερεό υλικό.

Τέλος, τοποθετήθηκαν 20μl από κάθε δείγμα στα βοθρία των τρυβλίων που περιέχουν τους μικροοργανισμούς και στην συνέχεια επώαστηκαν στις κατάλληλες θερμοκρασίες για 24 ώρες.

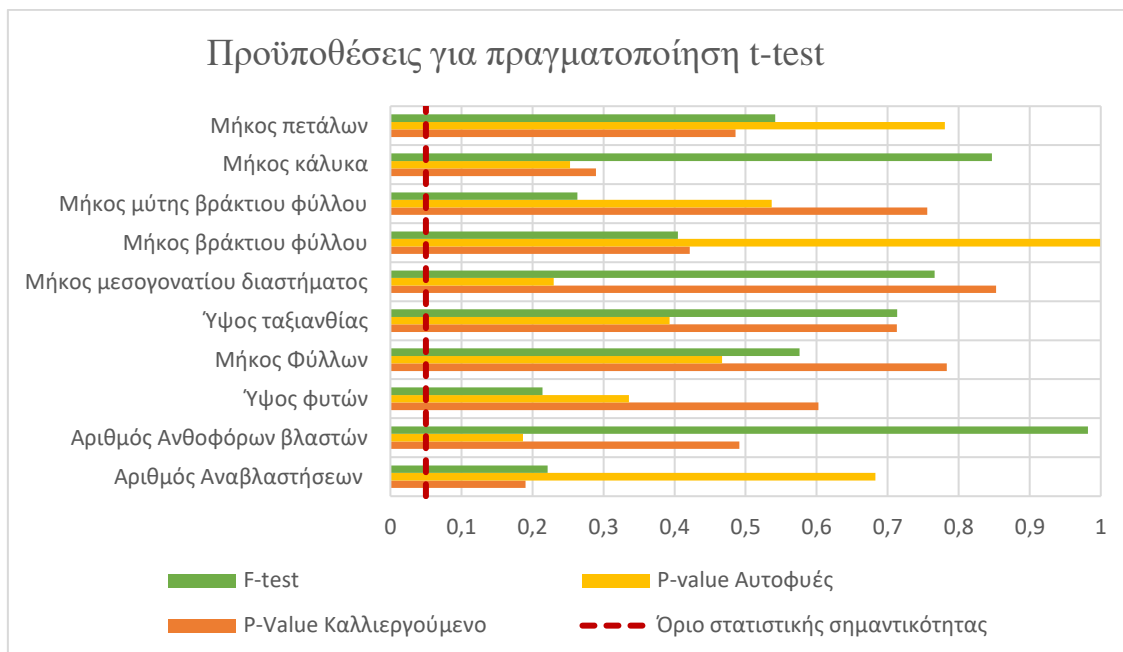
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Έλεγχος σημαντικότητας των διαφορών που παρουσιάζονται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά μεταξύ του καλλιεργούμενου και αυτοφυούς πληθυσμού και μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων του καλλιεργούμενου πληθυσμού

3.1.1 Έλεγχοι κανονικότητας, ισότητας διακυμάνσεων και μέσων μεταξύ του καλλιεργούμενου και αυτοφυούς πληθυσμού

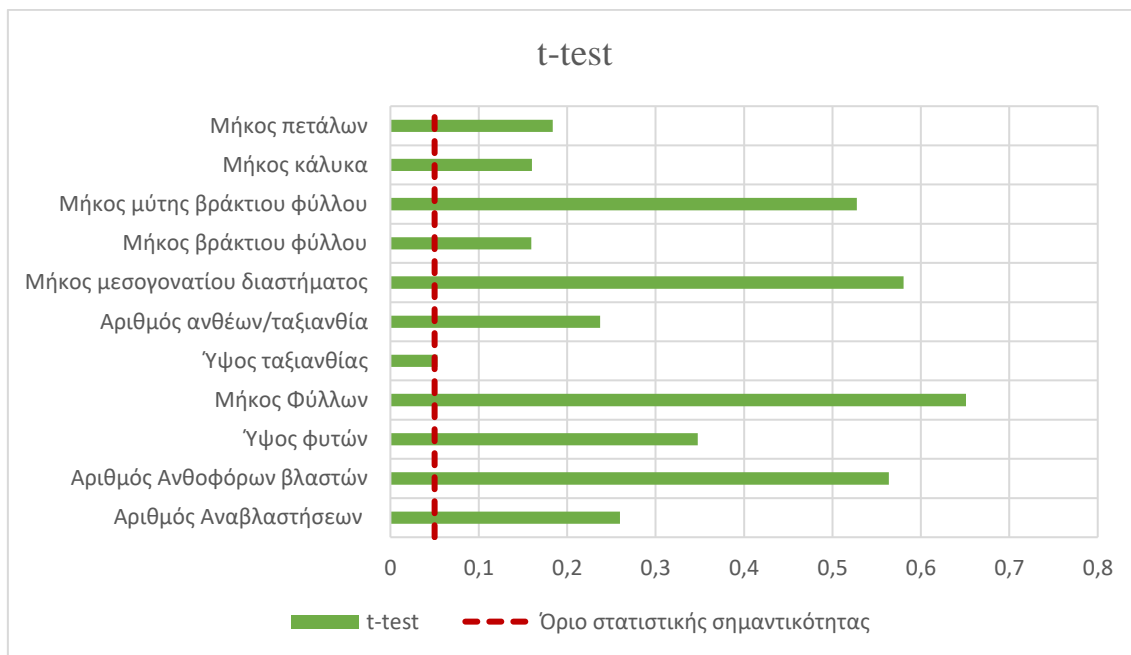
Πίνακας 6 Αποτελέσματα ελέγχων προϋποθέσεων και της παραγοντικής ανάλυσης των μέσων

Test Shapiro-Wilk			F-test	T-test	
No	Μορφολογικά Χαρακτηριστικά	Δείγμα	P-Value		
1	Αριθμός Αναβλαστήσεων	Καλλιεργούμενο	0,19	0,22	0,26
		Αυτοφυές	0,68		
2	Αριθμός Ανθοφόρων βλαστών	Καλλιεργούμενο	0,49	0,98	0,56
		Αυτοφυές	0,19		
3	Ύψος φυτών	Καλλιεργούμενο	0,60	0,21	0,35
		Αυτοφυές	0,34		
4	Μήκος Φύλλων	Καλλιεργούμενο	0,78	0,58	0,65
		Αυτοφυές	0,47		
5	Ύψος ταξιανθίας	Καλλιεργούμενο	0,71	0,71	0,05
		Αυτοφυές	0,39		
6	Μήκος μεσογονατίου διαστήματος	Καλλιεργούμενο	0,85	0,77	0,58
		Αυτοφυές	0,23		
7	Μήκος βρακτίου φύλλου	Καλλιεργούμενο	0,42	0,16	0,40
		Αυτοφυές	0,99		
8	Μήκος μύτης βρακτίου φύλλου	Καλλιεργούμενο	0,76	0,53	0,26
		Αυτοφυές	0,54		
9	Μήκος κάλυκα	Καλλιεργούμενο	0,29	0,16	0,85
		Αυτοφυές	0,25		
10	Μήκος πετάλων	Καλλιεργούμενο	0,49	0,18	0,54
		Αυτοφυές	0,78		



Διάγραμμα 1 Αποτελέσματα προϋποθέσεων για πραγματοποίηση παραγοντικής ανάλυσης των μέσων

Από την παραγοντική ανάλυση των μέσων (t-test) που πραγματοποιήθηκε μεταξύ των δύο πληθυσμών καλλιεργούμενης και αυτοφυούς χλωρίδας *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*, προέκυψε ότι οι πληθυσμοί δεν εμφάνισαν μεταξύ τους, στατιστικά σημαντικές διαφορές στα χαρακτηριστικά που αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα. Πιο συγκεκριμένα, όπως παρουσιάζεται και στα δυο διαγράμματα οι έλεγχοι που πραγματοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της κανονικότητας των πληθυσμών (Shapiro-Wilk test) όπως επίσης και της ισότητας των διακυμάνσεων τους (F-test) έδειξαν ότι σε ποσοστό σημαντικότητας 5%, δεν μπορούν να απορριφθούν οι υποθέσεις ότι ο καλλιεργούμενος και ο αυτοφυής πληθυσμός προέρχονται από κανονικούς πληθυσμούς και με ίσες διακυμάνσεις. Τα αποτελέσματα των δύο παραπάνω ελέγχων οδήγησαν στην πραγματοποίηση της παραγοντικής ανάλυσης των μέσων (t-test) όπου όπως φαίνεται και στο διάγραμμα σε ποσοστό σημαντικότητας 5% δεν μπορεί να απορριφθεί η υπόθεση ότι οι δύο πληθυσμοί δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα χαρακτηριστικά τους.



Διάγραμμα 2 Αποτελέσματα παραγοντικής ανάλυσης μέσω



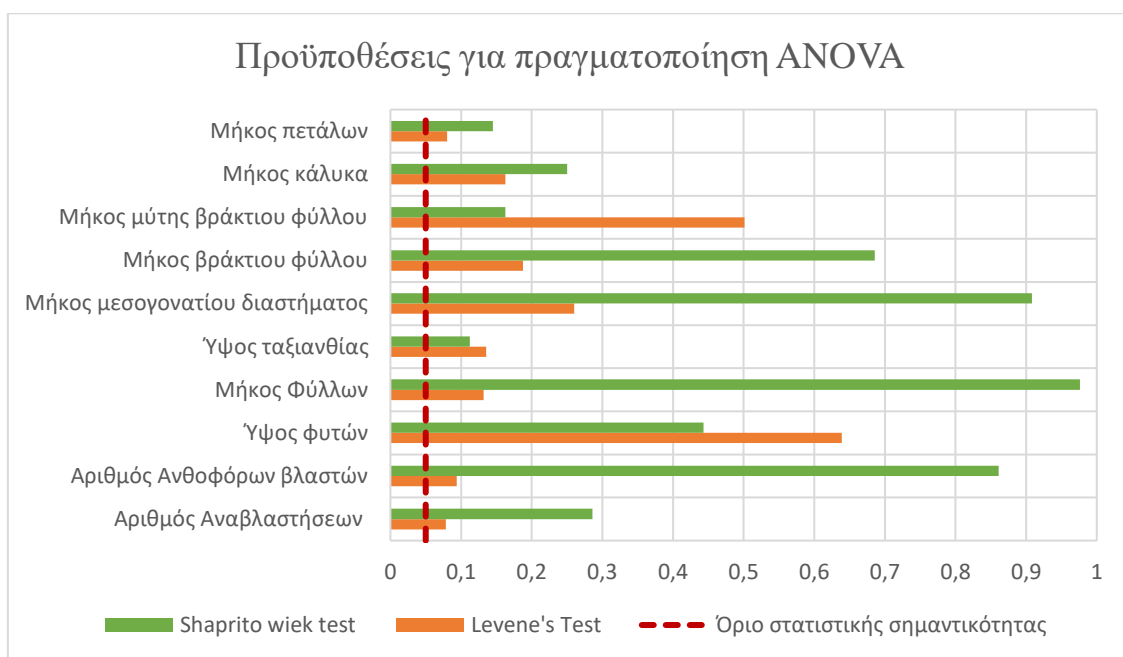
Εικόνα 12 Καλλιεργούμενο και αυτοφυές φυτό

3.1.2 Έλεγχοι κανονικότητας των σφαλμάτων με βάση τα υπόλοιπα, ισότητας διακυμάνσεων και παραγοντική ανάλυση διασποράς ANOVA μεταξύ θέσεων καλλιεργούμενου πληθυσμού.

Πίνακας 7 Αποτελέσματα προϋποθέσεων και της παραγοντικής ανάλυσης διασποράς

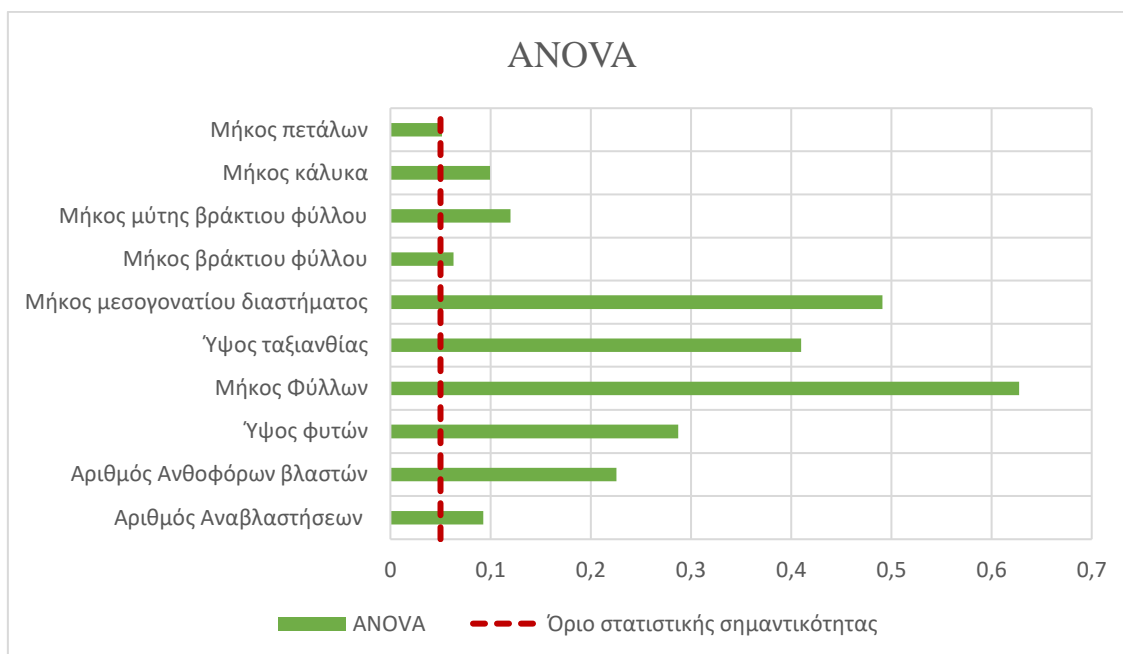
Test Shapiro-Wilk			Levene's test		ANOVA
No	Μορφολογικά Χαρακτηριστικά	Δείγμα	P-Value		
1	Αριθμός Αναβλαστήσεων	Καλλιεργούμενο	0,08	0,29	0,09
2	Αριθμός Ανθοφόρων βλαστών	Καλλιεργούμενο	0,86	0,09	0,23
3	Ύψος φυτών	Καλλιεργούμενο	0,44	0,64	0,29
4	Μήκος Φύλλων	Καλλιεργούμενο	0,98	0,13	0,63
5	Ύψος ταξιανθίας	Καλλιεργούμενο	0,11	0,14	0,41

6	Μήκος μεσογονατίου διαστήματος	Καλλιεργούμενο	0,91	0,26	0,49
7	Μήκος βρακτίου φύλλου	Καλλιεργούμενο	0,69	0,19	0,06
8	Μήκος μύτης βρακτίου φύλλου	Καλλιεργούμενο	0,16	0,50	0,12
9	Μήκος κάλυκα	Καλλιεργούμενο	0,25	0,16	0,10
10	Μήκος πετάλων	Καλλιεργούμενο	0,15	0,08	0,051



Διάγραμμα 3 Αποτελέσματα προϋποθέσεων για πραγματοποίηση παραγοντικής ανάλυσης διασποράς

Από την παραγοντική ανάλυση της διασποράς ANOVA μεταξύ των θέσεων του καλλιεργούμενου πληθυσμού προέκυψε ότι σε ποσοστό σημαντικότητας 5% δεν απορρίπτεται η υπόθεση ότι τα φυτά στις διάφορες θέσεις του καλλιεργούμενου πληθυσμού δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα μορφολογικά χαρακτηριστικά που αναγράφονται στον πίνακα. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με το διάγραμμα τα αποτελέσματα των ελέγχων ισότητας διακυμάνσεων και κανονικότητας των σφαλμάτων με βάση τα υπόλοιπα υπολογίζονται με χρήση του στατιστικού πακέτου Statgraphics πάνω από το όριο στατιστικής σημαντικότητας (0,05) με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η εφαρμογή της παραγοντικής ανάλυσης διασποράς ANOVA με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στο διάγραμμα.



Διάγραμμα 4 Αποτελέσματα παραγοντικής ανάλυσης διασποράς

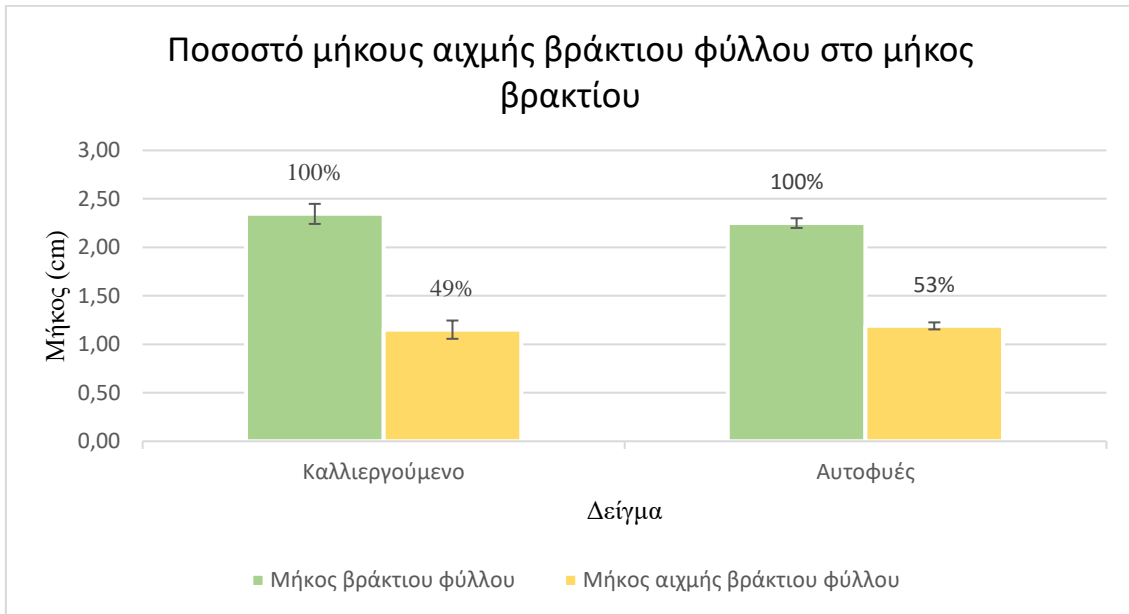


Εικόνα 13 Φυτά από διαφορετικές θέσεις του καλλιεργούμενου πληθυσμού

3.1.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*

Σύμφωνα με τους Strid & Tan (1991) και Tan & Iatrou (2001) το είδος *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* παρουσιάζει κάποια μοναδικά μορφολογικά χαρακτηριστικά που το καθιστούν διαφορετικό από τα υπόλοιπα είδη του γένους *Sideritis* και υποείδη του είδους *Sideritis clandestina*. Μερικά από αυτά αναφέρονται παρακάτω:

Οξεία μακριά αιχμή βρακτίου φύλλου



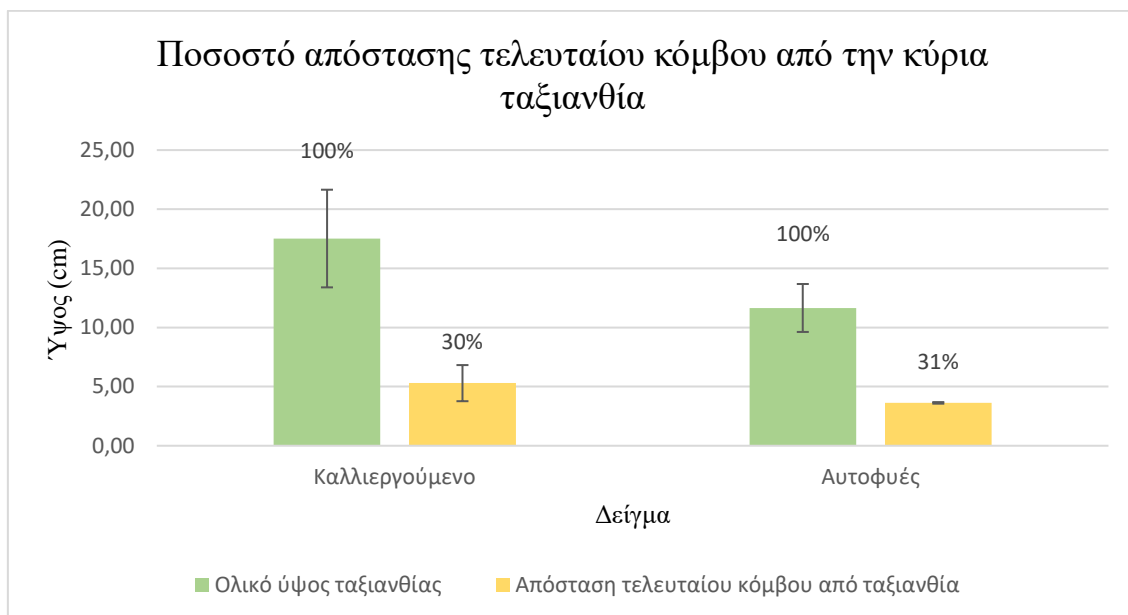
Διάγραμμα 5 Ποσοστό μήκους αιχμής βρακτίου φύλλου στο ολικό μήκος βρακτίου φύλλου

Το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζει το ποσοστό που κατέχει το μήκος της αιχμής του βρακτίου φύλλου στο συνολικό μήκος τους. Πιο συγκεκριμένα, στο καλλιεργούμενο πληθυσμό η αιχμή του βρακτίου φύλλου καταλαμβάνει το 49% του συνολικού μήκους του βρακτίου φύλλου ενώ στο αυτοφυές πληθυσμό το ποσοστό ανέρχεται στο 53%. Σύμφωνα με τους Strid & Tan (1991) το είδος *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* χαρακτηρίζεται από την απότομα οξεία αιχμή που σχηματίζεται στην κορυφή του βρακτίου φύλλου και καταλαμβάνει μέχρι και το 50% του συνολικού μήκους του.



Εικόνα 14 Απεικόνιση αιχμής βρακτίου φύλλου

Τελευταίος κόμβος της ταξιανθίας αισθητά απομακρυσμένος από την υπόλοιπη ταξιανθία



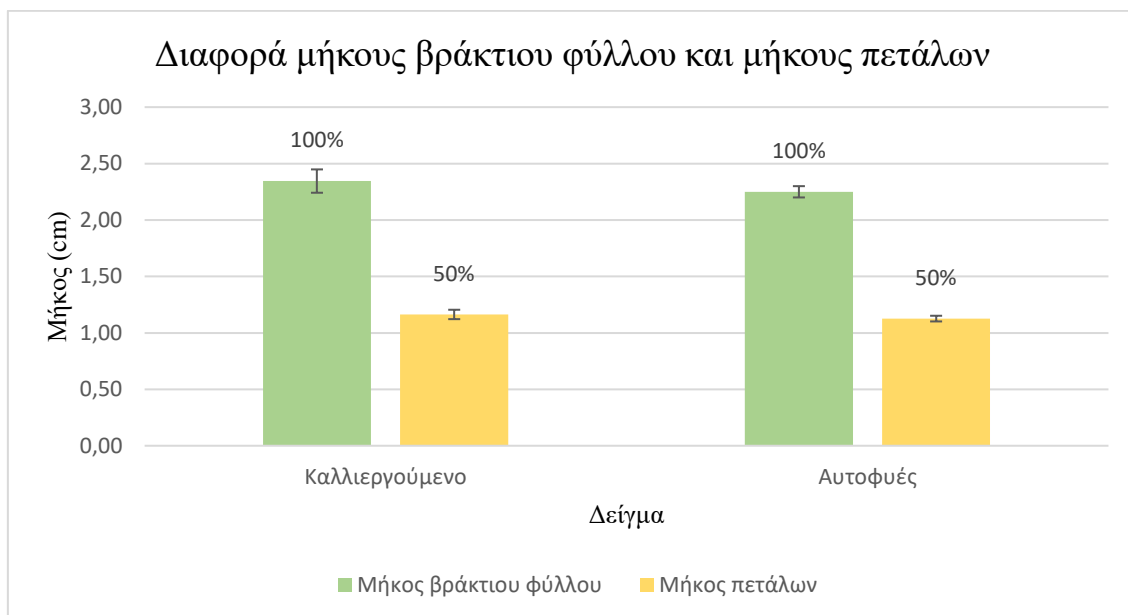
Διάγραμμα 6 Ποσοστό απόστασης τελευταίου κόμβου από την κύρια ταξιανθία

Το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζει το ποσοστό της απόστασης του τελευταίου κόμβου της ταξιανθίας από το ολικό της ύψος. Πιο συγκεκριμένα, στο καλλιεργούμενο πληθυσμό το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 30% ενώ στο αυτοφυές στο 31%, εκφράζοντας κατά συνέπεια το πόσο απέχει ο τελευταίος κόμβος από την υπόλοιπη ταξιανθία. Σύμφωνα με τους Tan & Iatrou (2001) το είδος *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* χαρακτηρίζεται από συμπαγής ακιδωτή ταξιανθία με τον χαμηλότερο κόμβο να είναι απομακρυσμένος.



Εικόνα 15 Απεικόνιση τελευταίου κόμβου εμφανώς απομακρυσμένο από την υπόλοιπη ταξιανθία

Βράκτιο φύλλο 1-3 φορές μεγαλύτερο από το μήκος των πετάλων του άνθους



Διάγραμμα 7 Διαφορά μήκους βρακτίου φύλλου και μήκους πετάλων του άνθους

Το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζει την διαφορά που υπάρχει μεταξύ του μήκους του βρακτίου φύλλου και του μήκους των πετάλων του άνθους. Όπως είναι εμφανές, και στους δύο πληθυσμούς του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη, η διαφορά των δύο μορφολογικών χαρακτηριστικών ανέρχεται στο 50%. Σύμφωνα με τους Strid & Tan (1991) το υποείδος χαρακτηρίζεται από το μήκος του βρακτίου φύλλου που είναι 1-3 φορές μεγαλύτερο από τα πέταλα του άνθους.



Εικόνα 16 Απεικόνιση διαφοράς μήκους βράκτιου φύλλου και μήκους ανθέων

3.2 Περιγραφή του υποείδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*

Στο Παράρτημα 1 παρουσιάζονται όλα τα χαρακτηριστικά του καλλιεργούμενου και αυτοφυούς πληθυσμού του υποείδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρονται και συγκρίνονται τα μορφολογικά, φυσιολογικά και χημικά χαρακτηριστικά των δύο πληθυσμών που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη.

3.3 Αποτελέσματα Ποιοτικού και Ποσοτικού Προσδιορισμού με Αέρια Χρωματογραφική Ανάλυση (GC/MS)

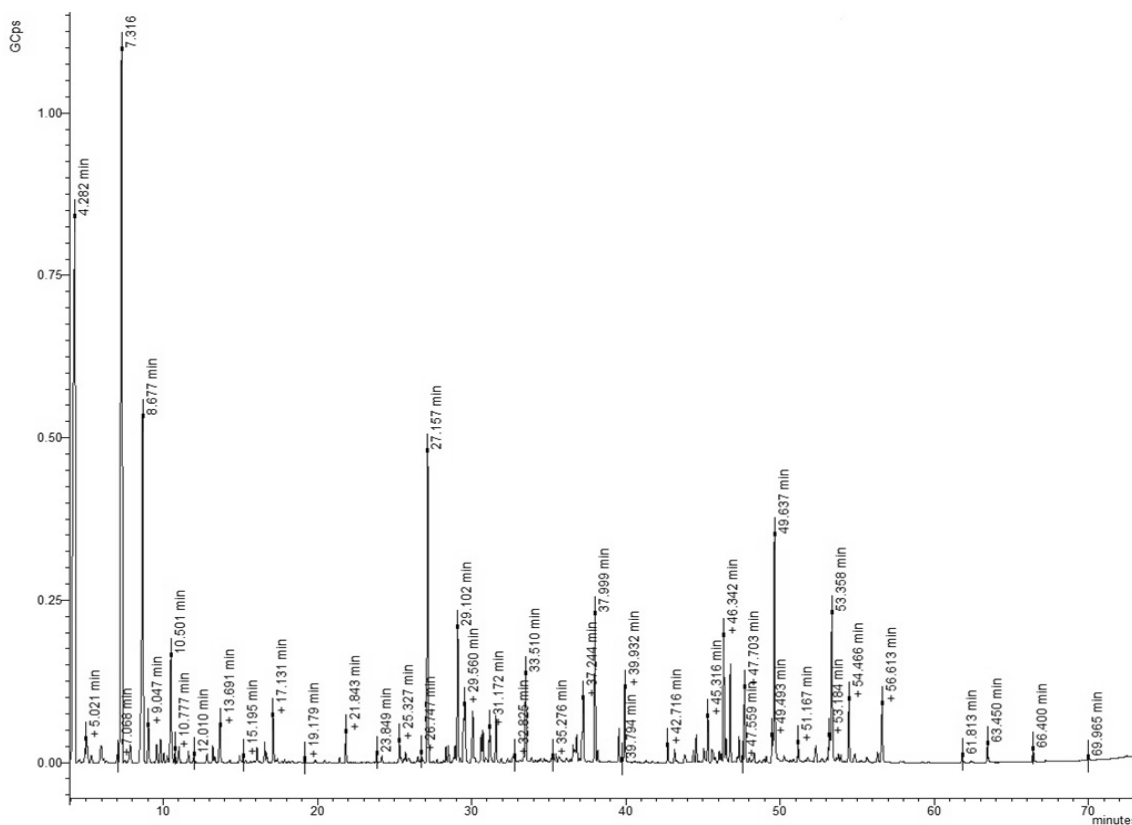
3.3.1. Χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου του αυτοφυούς δείγματος

Πίνακας 8 Αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του αιθέριου ελαίου αυτοφυούς πληθυσμού με την χρήση της αέριας χρωματογραφίας

No	Rt (χρόνος έκλυσης) min	Ποσοστό %	Ονομασία κατά IUPAC	Εμπειρική Ονομασία (EN)	Εμπειρική Ονομασία (EL)	Χημικός Τύπος
1	7,32	22,64	2,6,6-trimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-ene	α - pinene	α - πινένιο	C ₁₀ H ₁₆
2	8,67	10,00	6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo [3.1.1] heptane	β - pinene	β - πινένιο	C ₁₀ H ₁₆
3	10,50	2,39	(4R)-1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene	d-limonene	δ - λεμονένιο	C ₁₀ H ₁₆
4	27,16	6,06	(1R,4Z,9S)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo [7.2.0] undec-4-ene	isocaryophyllene	ισοκαρυοφυλλένιο	C ₁₅ H ₂₄
5	29,10	2,55	(1R,4E,9S)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo [7.2.0] undec-4-ene	β - caryophyllene	β - καρυοφυλλένιο	C ₁₅ H ₂₄
6	29,56	1,71	(1E,6E,8S)-1-methyl-5-methylidene-8-propan-2-ylcyclodeca-1,6-diene	d- germacrene	δ - γερμακρένιο	C ₁₅ H ₂₄
7	30,08	1,38	(5R)-2-methyl-5-[(2S)-6-methylhept-5-en-2-yl] cyclohexa-1,3-diene	zingiberene	-	C ₁₅ H ₂₄
8	33,51	1,73	(1R,4R,6R,10S)-4,12,12-trimethyl-9-methylidene-5-oxatricyclo [8.2.0.0 ^{4,6}] dodecane	Caryophyllene oxide	Οξειδίο καρυοφυλλένιου	C ₁₅ H ₂₄ O
9	37,24	1,28	6-methyl-2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl) hept-5-en-2-ol	α - bisabolol	α - μπισαμπολόλη	C ₁₅ H ₂₆ O
10	38,00	2,92	[(1S,2R,6R,7S)-2,6-dimethyl-8-methylidene-6-tricyclo [5.3.1.0 ^{1,5}] undecanyl] methyl acetate	8-cedren-13-ol	-	C ₁₇ H ₂₆ O
11	39,93	1,41	(2E)-2-methyl-6-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl) hepta-2,6-dien-1-ol	cis-lanceol	-	C ₁₅ H ₂₄ O
12	46,34	2,47	(E)-1-(6,10- Dimethylundec-5-en-2-yl)-4-methylbenzene	-	-	C ₂₀ H ₃₀
13	46,77	1,89	5-(6-methylhepta-1,5-dien-2-yl)-1-(4-methylpent-3-enyl) cyclohexene	m- camphorene	μ - καμφορένιο	C ₂₀ H ₃₂

14	47,70	1,63	(4S,9S,10R,13R)-5,5,9,14-tetramethyltetracyclo [11.2.1.0 ^{1,10} .0 ^{4,9}] hexadec-14-ene	kaur-15-ene	-	C ₂₀ H ₃₂
15	49,64	4,45	(Z)-9-Octadecen-1-ol	-	(Z)-9,1-οκταδεκενόλη	C₁₈H₃₆O
16	53,36	3,11	-	oleyl alcohol, acetate	--	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
17	54,47	1,23	(4E,8E,13Z)-1,5,9-trimethyl-12-propan-2-ylcyclo-tetradeca-4,8,13-triene-1,3-diol	4,8,13- divatriene-1.3- diol	-	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
18	56,61	1,36	methyl (1S,4S,5R,9S,10R,13S)-5,9-dimethyl-14-methylidene-tetracyclo [11.2.1.0 ^{1,10} .0 ^{4,9}]hexadecane-5-carboxylate	(4β)-kaur-16-en-18-oic acid, methyl ester	-	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
Συνολική ποσοστό αναγνωρισμένων ουσιών: 70,21%						

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του αιθέριου ελαίου του αυτοφυούς πληθυσμού *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* δηλαδή τα συστατικά που βρέθηκαν καθώς και οι ποσότητες τους εκφρασμένες επί της εκατό. Στο αιθέριο έλαιο των δειγμάτων ταυτοποιήθηκαν 18 πτητικά συστατικά. Όπως φαίνεται και στον πίνακα, το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου είναι το α-πινένιο με ποσοστό 22,64%. Ακολουθούν το β-πινένιο σε ποσοστό 10%, το ισοκαρνοφυλλένιο με ποσοστό 6,06% και η (Z),9,1- οκταδεκενόλη σε ποσοστό 4,45% ενώ σε μικρότερα ποσοστά υπάρχουν συστατικά όπως το 8-cedren-13-ol (2,92%) και το β-καρνοφυλλένιο (2,55%).



Χρωματογράφημα 1 Αέριο χρωματογράφημα των πηθικών συστατικών του αιθέριου ελαίου του αυτοφυούς πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina subsp. clandestina*

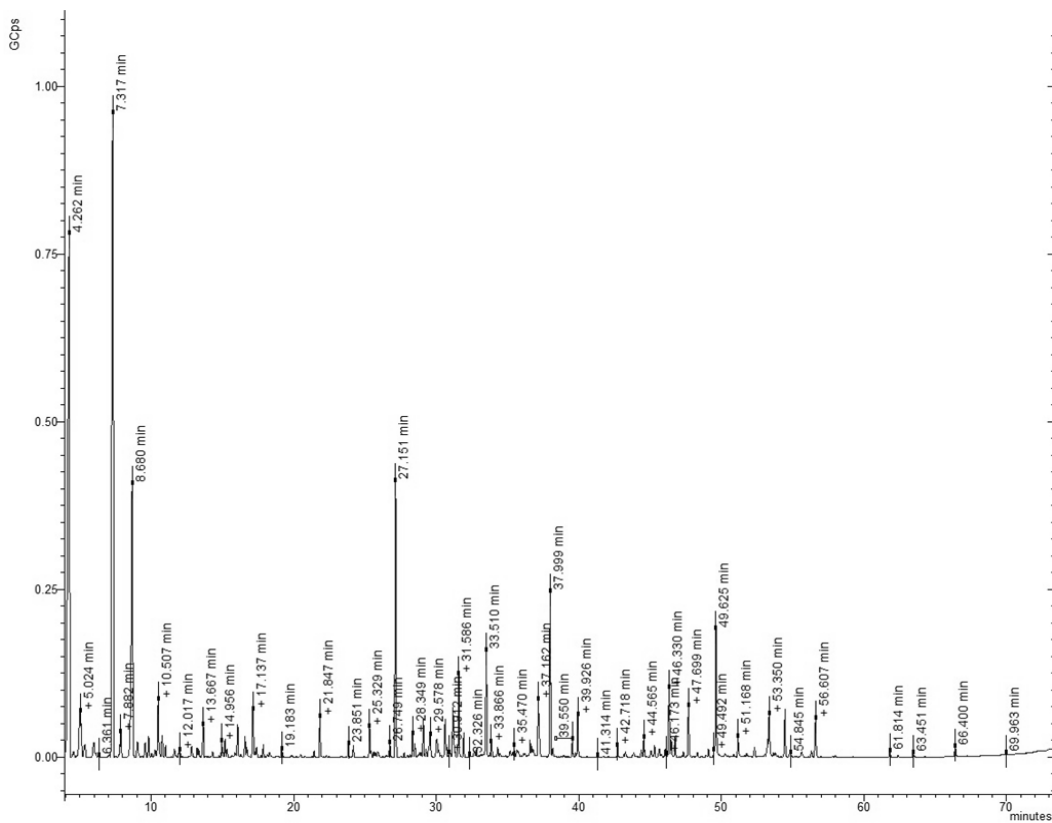
3.3.2. Χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου του καλλιεργούμενου δείγματος

Πίνακας 9 Αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του αιθέριου ελαίου καλλιεργούμενου πληθυσμού με την χρήση της αέριας χρωματογραφίας

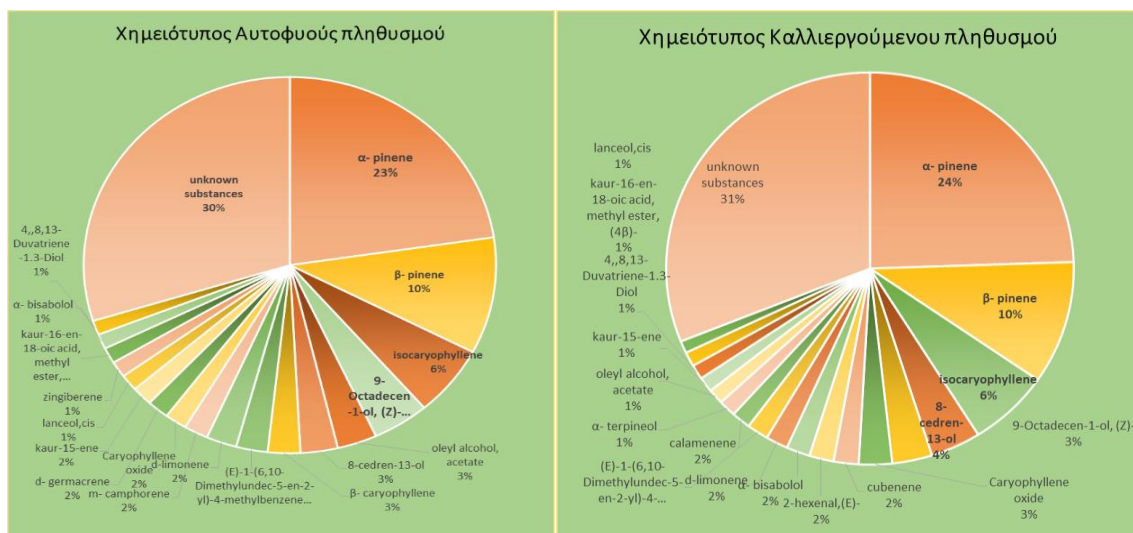
No	Rt (χρόνος έκλουσης) min	Ποσοστό %	Ονομασία κατά IUPAC	Εμπειρική ονομασία (EN)	Εμπειρική Ονομασία (EL)	Χημικός Τύπος
1	5,02	1,94	(E)-hex-2-enal	trans-2-hexenal	(E)-2-εξενάλη	C ₆ H ₁₀ O
2	7,32	24,47	2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1] hept-2-ene	α- pinene	α- πινένιο	C₁₀H₁₆
3	8,68	10,14	6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1] heptane	β- pinene	β- πινένιο	C₁₀H₁₆
4	10,51	1,76	(4R)-1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene	d-limonene	δ- λεμονένιο	C ₁₀ H ₁₆
5	17,14	1,38	2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl) propan-2-ol	α- terpineol	α- τερπινεόλη	C ₁₀ H ₁₈ O
6	27,15	6,48	(1R,4Z,9S)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo [7.2.0] undec-4-ene	isocaryophyllene	ισοκαρυοφυλλένιο	C₁₅H₂₄
7	31,18	1,52	(1S,4S)-1,6-dimethyl-4-propan-2-yl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene	calamenene	καλαμένιο	C ₁₅ H ₂₂
8	31,59	1,98	(1S,4R,4aS)-1,6-dimethyl-4-propan-2-yl-1,2,3,4,4a,7-hexahydronaphthalene	cubenene	κουμπενένιο	C ₁₅ H ₂₄

9	33,51	2,64	(1R,4R,6R,10S)-4,12,12-trimethyl-9-methylidene-5-oxatricyclo [8.2.0.0 ^{4,6}] dodecane	caryophyllene oxide	Οξείδιο καρνοφυλλένιου	C ₁₅ H ₂₄ O
10	37,16	1,88	6-methyl-2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)hept-5-en-2-ol	α-bisabolol	α-μπισαμπολόλη	C ₁₅ H ₂₆ O
11	38,00	3,99	[(1S,2R,6R,7S)-2,6-dimethyl-8-methylidene-6-tricyclo [5.3.1.01,5] undecanyl] methyl acetate	8-cedren-13-ol	-	C ₁₇ H ₂₆ O
12	39,93	1,01	(2E)-2-methyl-6-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)hepta-2,6-dien-1-ol	cis-lanceol	-	C ₁₅ H ₂₄ O
13	46,33	1,71	(E)-1-(6,10-Dimethylundec-5-en-2-yl)-4-methylbenzene	-	-	C ₂₀ H ₃₀
14	47,70	1,24	(4S,9S,10R,13R)-5,5,9,14-tetramethyltetracyclo [11.2.1.0 ^{1,10} .0 ^{4,9}] hexadec-14-ene	kaur-15-ene	-	C ₂₀ H ₃₂
15	49,63	3,17	(Z)-9-Octadecen-1-ol	-	(Z),9,1-οκταδεκενόλη	C ₁₈ H ₃₆ O
16	53,35	1,25	-	oleyl alcohol, acetate	-	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
17	54,46	1,20	(4E,8E,13Z)-1,5,9-trimethyl-12-propan-2-ylcyclohexadeca-4,8,13-triene-1,3-diol	4,8,13-Duvatriene-1,3-diol	-	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
18	56,61	1,19	methyl (1S,4S,5R,9S,10R,13S)-5,9-dimethyl-14-methylidene-tetracyclo [11.2.1.0 ^{1,10} .0 ^{4,9}] hexadecane-5-carboxylate	(4β)-kaur-16-en-18-oic acid, methyl ester	-	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
Συνολικό ποσοστό αναγνωρισμένων ουσιών: 68,95%						

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του αιθέριου ελαίου του καλλιεργούμενου πληθυσμού *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*, δηλαδή τα συστατικά που βρέθηκαν καθώς και οι ποσότητες τους εκφρασμένες επί της εκατό. Στο αιθέριο έλαιο των δειγμάτων ταυτοποιήθηκαν 18 πτητικά συστατικά. Όπως φαίνεται και στον πίνακα το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου είναι το α-πινένιο με ποσοστό 24,47%. Ακολουθούν το β-πινένιο σε ποσοστό 10,14%, το ισοκαρνοφυλλένιο με ποσοστό 6,48% και το 8-cedren-13-ol σε ποσοστό 3,99% ενώ σε μικρότερα ποσοστά υπάρχουν συστατικά όπως η (Z),9,1- οκταδεκενόλη (3,17%) και το οξείδιο καρνοφυλλένιου (2,64%).



Χρωματογράφημα 2 Αέριο χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του αιθέριου ελαίου του καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina subsp. Clandestine*



Διάγραμμα 8 Απεικόνιση χημειοτύπων αιθερίων ελαίων, αυτοφυούς και καλλιεργούμενου πληθυσμού σε πύλα

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων από τους δύο πληθυσμούς συμπεραίνεται ότι οι δύο πληθυσμοί δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στον χημειότυπο των αιθερίων ελαίων τους. Πιο συγκεκριμένα, από τους πίνακες 7 και 8 καθώς και από τα παραπάνω γραφήματα, είναι εμφανές ότι υπάρχει συμφωνία στα συστατικά που συνθέτουν τον πλούσιο πτητικών συστατικών χημειότυπο τους. Πιο αναλυτικά, παρατηρείται ότι τα τρία

κυριότερα συστατικά, το α-πινένιο, β-πινένιο και ισοκαρυοφυλλένιο, είναι κοινά και στους δύο πληθυσμούς σε παρόμοια ποσοστά, καθώς επίσης τα υπόλοιπα συστατικά που συνθέτουν τα χημειοτυπικά προφίλ παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες.

Επιπλέον τα αποτελέσματα συμφωνούν αρκετά και με την βιβλιογραφία αφού και σε άλλες μελέτες το κύριο συστατικό του *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* είναι το α-πινένιο σε ποσοστό από 12,4% έως 20,11%. Πιο συγκεκριμένα, οι Aligiannis *et al.* (2001) στην μελέτη τους αναφέρουν ότι το κύριο συστατικό του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* είναι το α-πινένιο και ακολουθεί το β-πινένιο αλλά και οι Koutsaviti *et al.* (2013) στην δική τους μελέτη ταυτοποίησαν σαν κύρια ουσία το α-πινένιο ,έπειτα το 9-epi (e)-καρυοφυλλένιο και το β-Phyllandrene. Ο Koedam (1986) ανίχνευσε στο είδος *Sideritis clandestina* σαν κύριο συστατικό το β-κοπαένιο και μετά ακολούθησε το α-πινένιο σε αρκετά μεγάλο ποσοστό και το β-πινένιο ενώ και οι Dimaki *et al.* (2017) μελετώντας βέβαια το υποείδος *peloponnesiaca* του είδους *Sideritis clandestina* εντόπισαν το α-πινένιο, το β-καρυοφυλλένιο και το β-πινένιο ως κύρια συστατικά .Στο υπόλοιπο χημικό προφίλ του αιθέριου ελαίου ανιχνεύονται πολλές κοινές ουσίες σε παρόμοια ποσοστά με αποτέλεσμα να μην διαφέρει σημαντικά από την βιβλιογραφία.

3.4 Αποτελέσματα Ποιοτικού Προσδιορισμού με Υγρή Χρωματογραφική Ανάλυση (HPLC)

3.4.1. Χημική σύσταση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του αυτοφυούς δείγματος

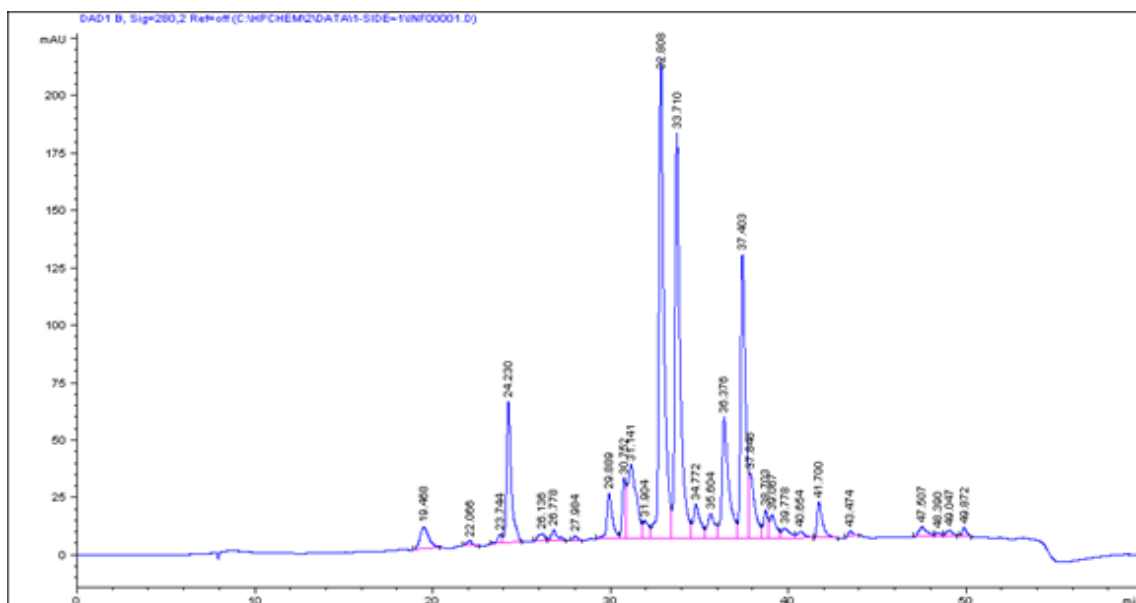
Πίνακας 10 Αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος αυτοφυούς πληθυσμού με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας

No	RT (Χρόνος έκλουσης) min	Ποσοστό %	Όνομασία κατά IUPAC	Εμπειρική Ονομασία (EN)	Εμπειρική Ονομασία (EL)	Χημικός Τύπος
1	19.468	1,82	[(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate	Epigallocatechin gallate	Γαλλική επιγαλλοκατεχίνη	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁
2	22.066	0,26	(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol	Epicatechin	Επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
3	23.744	0,46	4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid	Vanillic acid	Βανιλικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄
4	24.230	6,23	[(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate	Epicatechin gallate	Γαλλική επικατεχίνη	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀
5	27.984	0,20		p-coumaric acid	π-κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃
6	29.889	2,45	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-7-	Luteolin-7-o-glucoside	7-ο-γλυκοζίτης λουτεολίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁

			[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one			
7	31.141	6,05	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enyl]oxypropanoic acid	Rosmarinic acid	Ροσμαρινικό οξύ	C ₁₈ H ₁₆ O ₈
8	31.904	1,04	5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one	Apigenin-7-o-glucoside	7-ο-γλυκοζίτης απιγενίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
9	32.808	22,74	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one	Kaempferol-3-o-glucoside	3-ο-γλυκοζίτης καεμφερόλης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
10	37.403	13,09	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one	Quercetin	Κερκετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
11	37.846	3,22	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-one	Luteolin	Λουτεολίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
12	39.778	0,77	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	Apigenin	Απιγενίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
13	40.654	0,48	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	Kaempferol	Καεμφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
14	47.507	0,82	5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxychromen-4-one	Genkwanin	-	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
Συνολικό ποσοστό αναγνωρισμένων ουσιών: 67,22%						

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του αυτοφυούς πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*. Στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα ταυτοποιήθηκαν 14

ουσίες με κύριο συστατικό του εκχυλίσματος σε ποσοστό 22,74% να είναι ο 3-ο-γλυκοζίτης καμφορόλης. Ακολουθούν η κερκετίνη και η γαλλική επικατεχίνη 13,09% και 6,23 αντίστοιχα.



Χρωματογράφημα 3 Υγρό χρωματογράφημα των μη πτητικών συστατικών του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του αυτοφυούς πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina subsp. clandestina*

3.4.2 Χημική σύσταση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του καλλιεργούμενου δείγματος

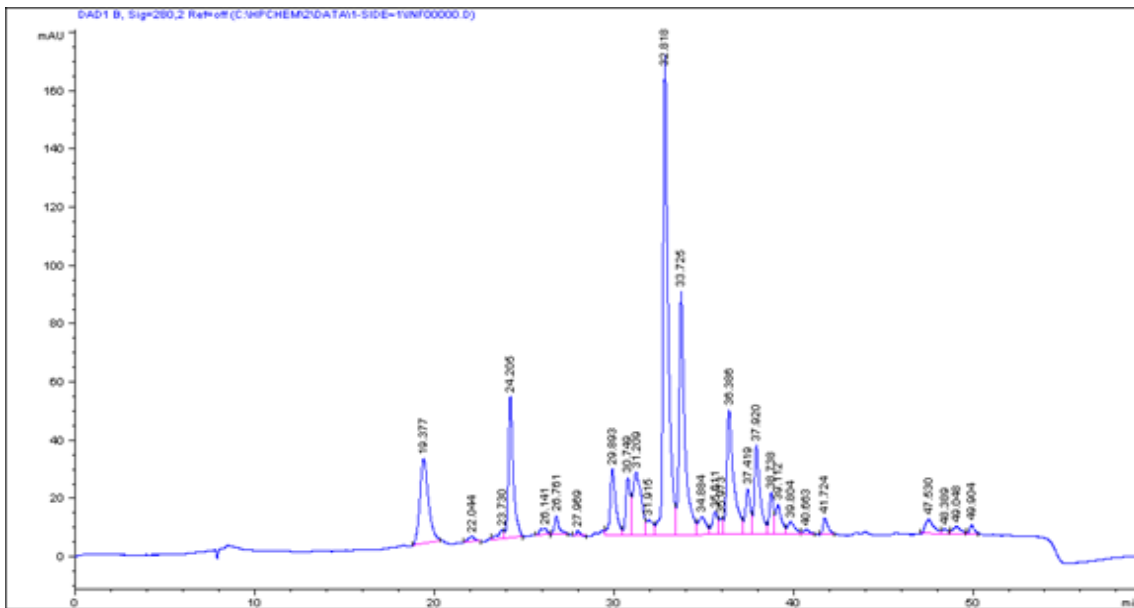
Πίνακας 11 Αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος καλλιεργούμενου πληθυσμού με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας

No	RT(Χρόνος έκλουσης)min	Ποσοστό %	Ονοματολογία κατά IUPAC	Εμπειρική Ονομασία (EN)	Εμπειρική Ονομασία (EL)	Χημική Τύπος
1	19.377	7,74	[(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate	Epigallocatechin gallate	Γαλλική επιγαλλοκατεχίνη	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁
2	22.044	0,42	(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol	Epicatechin	Επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
3	23.730	0,63	4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid	Vanillic acid	Βανιλικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄
4	24.205	7,15	[(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate	Epicatechin gallate	Γαλλική επικατεχίνη	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀
5	27.969	0,21		p-coumaric acid	π-κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃

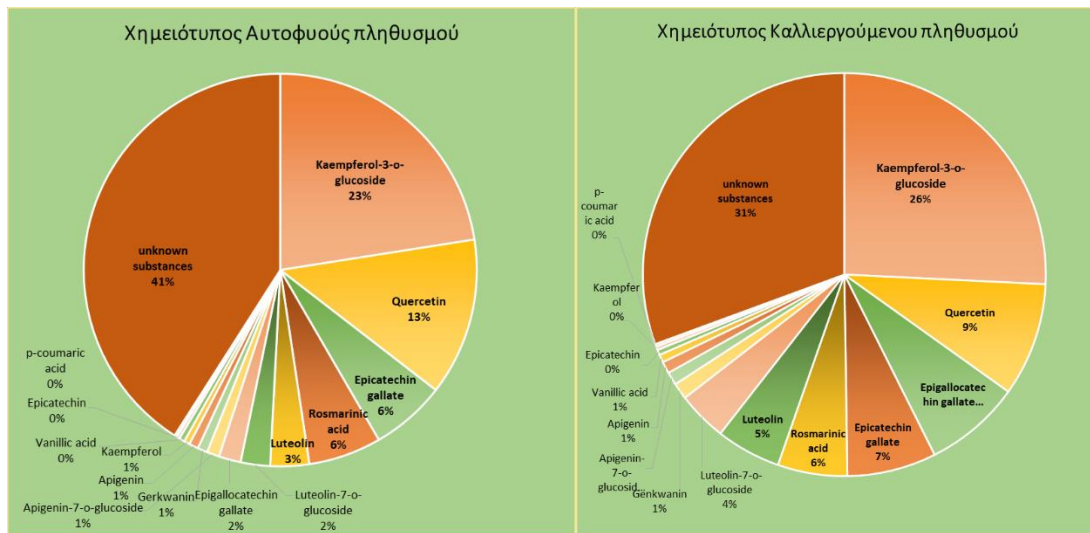
6	29.893	3,98	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one	Luteolin-7-o-glucoside	7-ο- γλυκοζίτης λουτεολίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
7	31.209	5,59	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxypropanoic acid	Rosmarinic acid	Ροσμαρινικό οξύ	C ₁₈ H ₁₆ O ₈
8	31.915	1,05	5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one	Apigenin-7-o-glucoside	7-ο-γλυκοζίτης απιγενίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
9	32.818	25,76	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one	Kaempferol-3-o-glucoside	3-ο-γλυκοζίτης καεμφερόλης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
10	36.386	9,11	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one	Quercetin	Κερκετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
11	37.920	5,20	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-one	Luteolin	Λουτεολίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
12	39.804	0,95	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	Apigenin	Απιγενίνη	C ₁₅ H ₉ O ₅
13	40.663	0,29	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	Kaempferol	Καεμφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
14	47.530	1,32	5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxychromen-4-one	Genkwanin	-	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
Συνολικό ποσοστό αναγνωρισμένων ουσιών: 71,82%						

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*. Στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα ταυτοποιήθηκαν 14 ουσίες με κύριο συστατικό του εκχυλίσματος σε ποσοστό 25,76% να είναι ο 3-ο-γλυκοζίτης

καμφερόλης. Ακολουθούν η κερκετίνη και η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη σε ποσοστά 9,11% και 7,74 αντίστοιχα.



Χρωματογράφημα 4 Υγρό χρωματογράφημα των μη πτητικών συστατικών του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος του καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina subsp. Clandestine*



Διάγραμμα 9 Απεικόνιση χημειοτύπων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων, καλλιεργούμενου και αυτοφούς πληθυσμού σε πύλα

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων από τους δύο πληθυσμούς συμπεραίνεται ότι οι δύο πληθυσμοί δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στον χημειότυπο των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων τους. Πιο συγκεκριμένα, από τους πίνακες 9 και 10 καθώς και από τα παραπάνω γραφήματα, είναι εμφανές ότι υπάρχει συμφωνία στα συστατικά που

συνθέτουν τον πλούσιο μη πτητικών συστατικών χημείοτυπο τους. Πιο αναλυτικά, παρατηρείται ότι τα κυριότερα συστατικά, 3-ο-γλυκοζίτης καεμφερόλης, κερκετίνη, γαλλική επικατεχίνη, ροσμαρινικό οξύ, λουτεολίνη είναι κοινά και στους δύο πληθυσμούς σε παρόμοια ποσοστά, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα συστατικά του χημικού προφίλ παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι αδύνατον να συγκριθούν με την βιβλιογραφία καθώς το είδος του φυτικού υλικού, οι μέθοδοι εκχύλισης καθώς και του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού που χρησιμοποιούνται, διαφέρουν. Εντούτοις, τα περισσότερα συστατικά όπως για παράδειγμα ο 3-ο-γλυκοζίτης καεμφερόλης, η κερκετίνη, η λουτεολίνη, η απιγενίνη και άλλα, που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και αναφέρονται τους πίνακες 11 και 12 έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία ως συστατικά των διάφορων ειδών του γένους *Sideritis*. (Pljevljakušić *et al.* 2011, Giacomo *et al.*, 2022, Bilgin *et al.*, 2018).

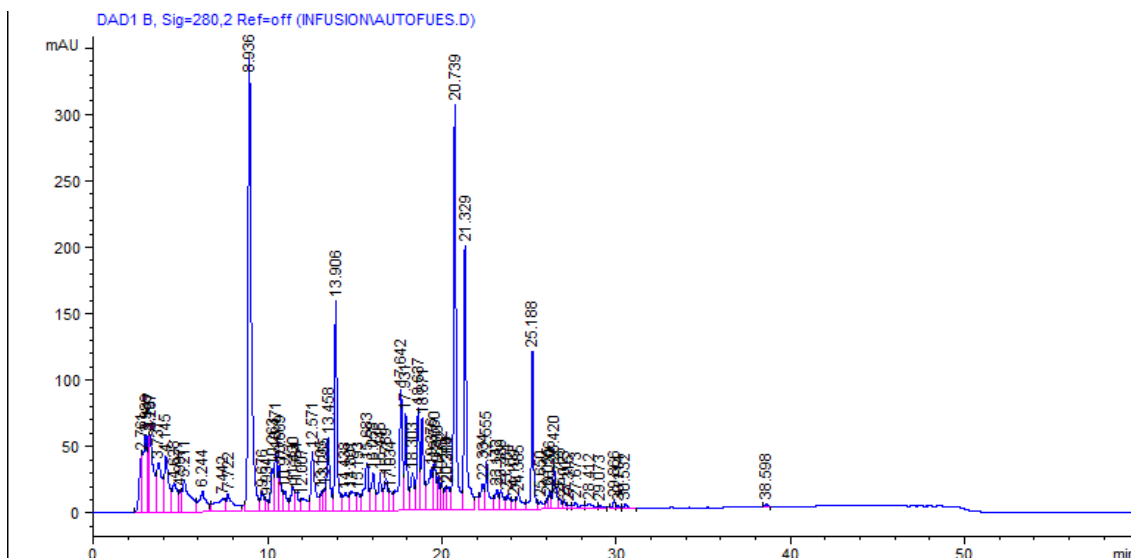
3.4.3 Χημική σύσταση του υδατικού εκχυλίσματος του αυτοφυούς δείγματος

Πίνακας 12 Αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του υδατικού εκχυλίσματος αυτοφυούς πληθυσμού με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας

No	RT(Χρόνος έκλουσης) min	Ποσοστό %	Ονομασία κατά IUPAC	Χημική Ένωση (EN)	Χημική Ένωση (EL)	Χημικός Τύπος
1	2.989	2,43	-	Unknown	Άγνωστη	-
2	8.936	13,58	3,4,5-trihydroxybenzoic	Galic acid	Γαλλικό οξύ	C₇H₆O₅
3	13.906	4,33	-	Unknown	Άγνωστη	-
4	18.637	2,23	[(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl]3,4,5-trihydroxybenzoate	Epigallocatechin gallate	Γαλλική επιγαλλοκατεχίνη	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁
5	18.871	2,12	-	Unknown	Άγνωστη	-
6	20.739	8,51	(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol	Epicatechin	Επικατεχίνη	C₁₅H₁₄O₆
7	21.329	6,07	-	Unknown	Άγνωστη	-
8	25.188	3,32	5,7-dihydroxy-2-[3-hydroxy-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-[2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-	Quercetin-3,4-di-o-glucoside	3,4-διογλυκοσίδιο κερκετίνης	C₂₇H₃₀O₁₇

			(hydroxymethyl) oxan-2-yl] oxychromen-4-one			
Συνολικό ποσοστό αναγνωρισμένων ουσιών: 27,64%						

Στο παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του υδατικού εκχυλίσματος του αυτοφυούς πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*. Στο υδατικό εκχύλισμα ταυτοποιήθηκαν 6 ουσίες από τις 70 με κύριο συστατικό του εκχυλίσματος σε ποσοστό 13,58 % να είναι το γαλλικό οξύ. Το δεύτερο σημαντικό συστατικό είναι η επικατεχίνη και στην συνέχεια ακολουθούν άλλα άγνωστα συστατικά. Η ταυτοποίηση των αγνώστων αλλά σημαντικών σε ποσοστό ουσιών δεν ήταν εύκολα πραγματοποιήσιμη λόγω της μεθόδου που ακολουθήθηκε και τις έλλειψης βιβλιογραφικού υλικού.



Χρωματογράφημα 5 Υγρό χρωματογράφημα των μη πτητικών συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος του αυτοφυούς πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*

3.4.4 Χημική σύσταση του υδατικού εκχυλίσματος του καλλιεργούμενου δείγματος

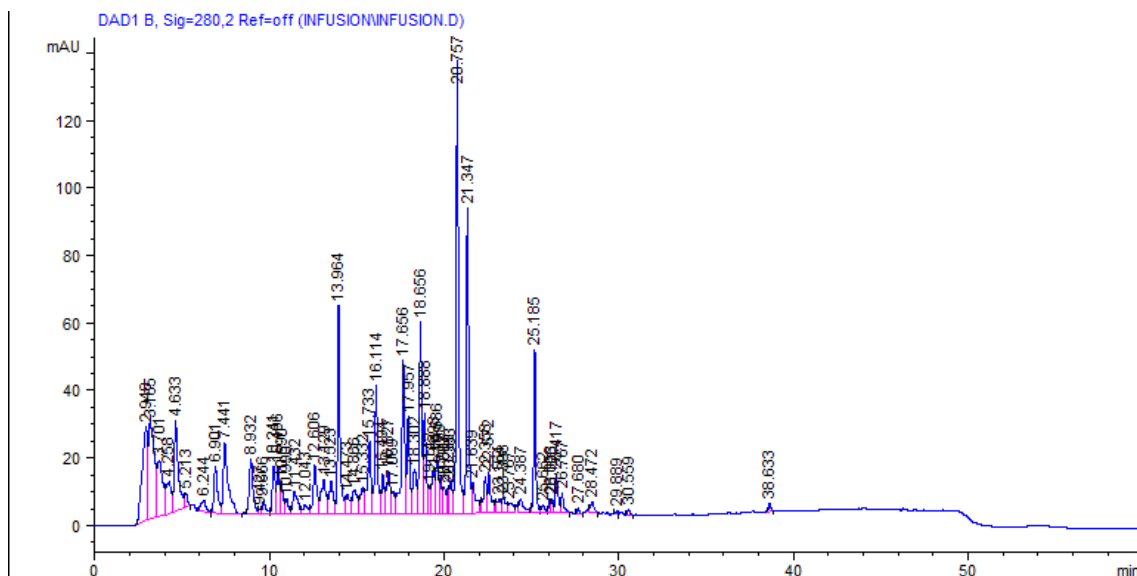
Πίνακας 13 Αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του υδατικού εκχυλίσματος καλλιεργούμενου πληθυσμού με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας

No	RT(Χρόνος έκλουσης) min	Ποσοστό %	Ονομασία κατά IUPAC	Χημική Ένωση (EN)	Χημική Ένωση (EL)	Χημικός Τύπος
1	2.948	4,86	-	Unknown	Άγνωστη	-
2	3.165	5,09	-	Unknown	Άγνωστη	-

3	4.633	3,24	-	Unknown	Άγνωστη	-
4	13.964	4,54	-	Unknown	Άγνωστη	-
5	15.733	2,50	(1S,3R,4R,5R)-3-[(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-1,4,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid	Chlorogenic acid	Χλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
6	16.114	3,22	(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol	Catechin	Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
7	17.656	4,53	-	Unknown	Άγνωστη	-
8	18.656	4,20	[(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl]3,4,5-trihydroxybenzoate	Epigallocatechin gallate	Γαλλική επιγαλλοκατεχίνη	C₂₂H₁₈O₁₁
9	18.888	2,41	-	Unknown	Άγνωστη	-
10	20.757	9,89	(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol	Epicatechin	Επικατεχίνη	C₁₅H₁₄O₆
11	21.347	6,54	-	Unknown	Άγνωστη	-
12	25.185	3,33	5,7-dihydroxy-2-[3-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one	Quercetin-3,4-di-o-glucoside	3,4-διογλυκοσίδιο κερκετίνης	C₂₇H₃₀O₁₇
Συνολικό ποσοστό αναγνωρισμένων ουσιών: 23,14%						

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού του υδατικού εκχυλίσματος του καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*. Στο υδατικό εκχύλισμα ταυτοποιήθηκαν 5 ουσίες από τις 62, με κύριο συστατικό του εκχυλίσματος σε ποσοστό 9,89 % να είναι μια άγνωστη ουσία στην συνέχεια ακολουθεί η επικατεχίνη με ποσοστό 6,54 και άγνωστες ουσίες σε μικρότερα ποσοστά. Η ταυτοποίηση των αγνώστων αλλά σημαντικών σε ποσοστό ουσιών δεν ήταν εύκολα

πραγματοποιήσιμη λόγω της μεθόδου που ακολουθήθηκε και τις έλλειψης βιβλιογραφικού υλικού.



Χρωματογράφημα 6 Υγρό χρωματογράφημα των μη πτητικών συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος του καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *Clandestina*

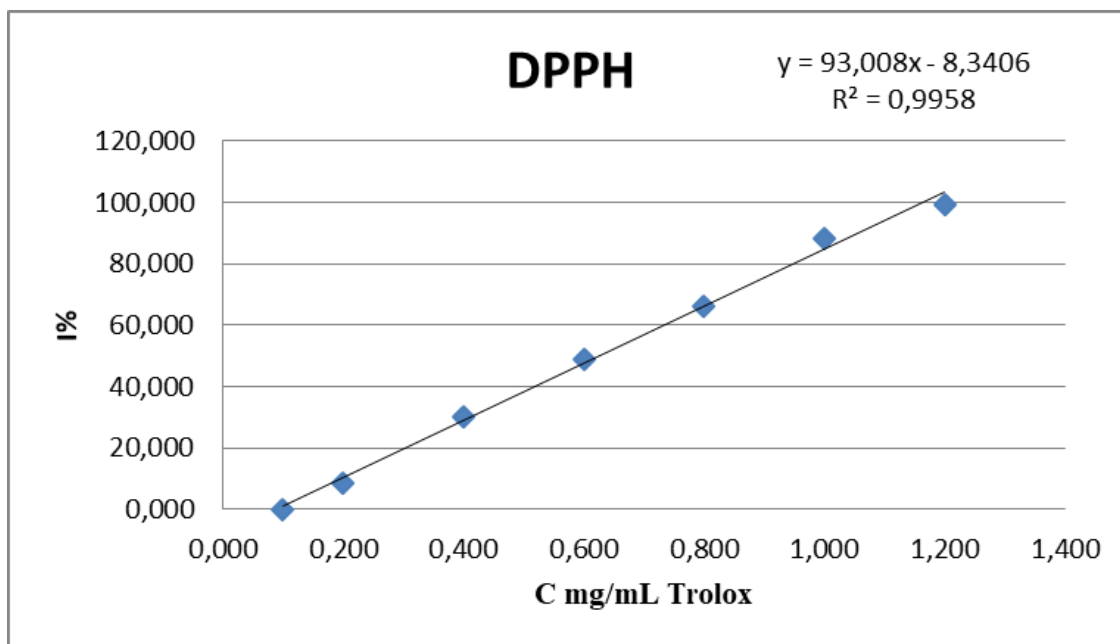
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων από τους δύο πληθυσμούς συμπεραίνεται ότι οι δύο πληθυσμοί αν και παρουσιάζουν ομοιότητες στον χημείοτυπο των υδατικών εκχυλισμάτων τους, όπως για παράδειγμα από τους πίνακες 11 και 12, είναι εμφανές ότι υπάρχει συμφωνία στο συστατικό επικατεχίνη και erigalocatechin gallate, η σύγκριση μεταξύ των δύο πληθυσμών είναι αδύνατη λόγω ελλιπής ταυτοποίησης μεγάλου ποσοστού της χημικής τους σύστασης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι αδύνατον να συγκριθούν με την βιβλιογραφία καθώς δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που να μελετούν το υδατικό εκχύλισμα, παραπροϊόν της απόσταξης του συγκεκριμένου είδους *Sideritis*. Η μόνη βιβλιογραφική αναφορά που βρέθηκε αναφέρεται στο είδος *Sideritis raeseri* στο οποίο ταυτοποιήθηκαν τέσσερις φλαβονοειδής γλυκοζίτες, isoscutellarein 7-O-[6''' -O-acetyl-β-D-allopyranosyl (1→2)]-β-D-glucopyranoside, 4' -O-methylhypolaetin 7-O-[6''' -O-acetyl-β-D-allopyranosyl (1→2)]-β-D-glucopyranoside, 4' -O-methylisoscutellarein 7-O-[6''' -O-acetyl-β-D-allopyranosyl(1→2)]-β-D-glucopyranoside και 4' -O-methylhypolaetin 7-O-[6''' -O-acetyl-β-D-allopyranosyl(1→2)]-β-D-6'' -O-acetyl-glucopyranoside.

3.5 Αποτελέσματα προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας

3.5.1 Αποτελέσματα Δοκιμής DPPH

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων με την δοκιμή DPPH, εκφρασμένα σε ισοδύναμα Trolox. Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν και η αναγωγή τους σε mg/mL Trolox έγινε με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης που παρουσιάζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 10 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς του Trolox- Δοκιμή DPPH

Πίνακας 14 Αποτελέσματα προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων των υπό μελέτη πληθυσμών με την χρήση της δοκιμής DPPH

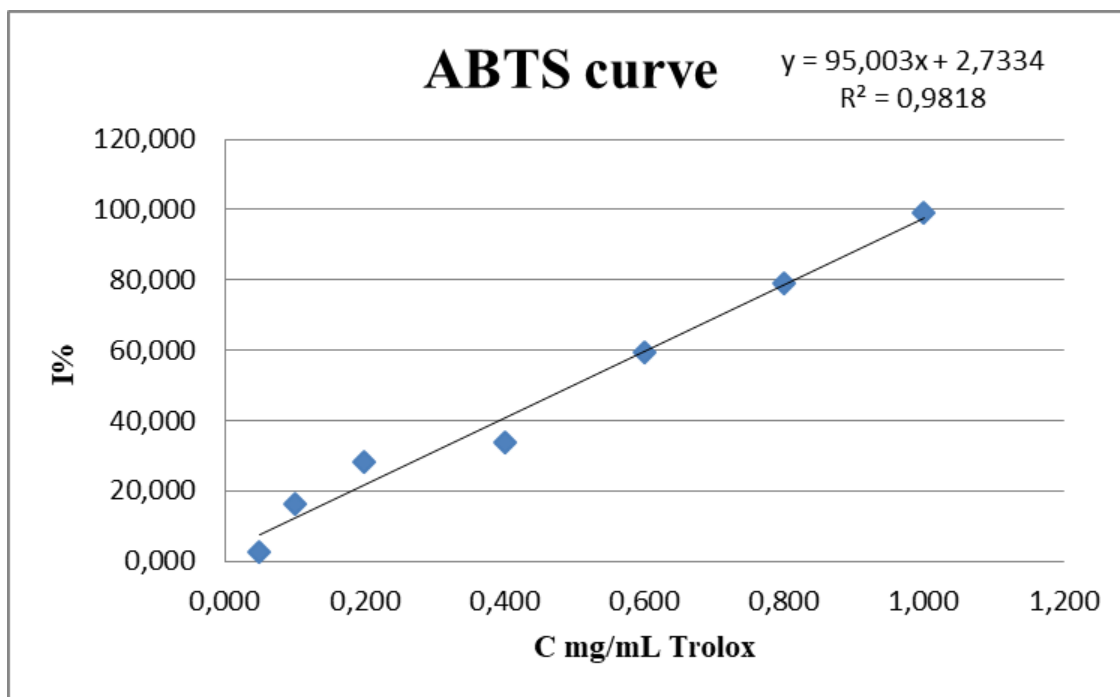
Δείγμα	Παρεμπόδιση (%)	Trolox (mg/ml)
<i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>		
Υδατικό εκχύλισμα Καλλιεργούμενου	14,38	0,24
Υδατικό εκχύλισμα Αυτοφυούς	28,62	0,40
Αιθέριο έλαιο Καλλιεργούμενου	2,57	0,12
Αιθέριο έλαιο Αυτοφυούς	4,25	0,14
Υδρομεθανολικό εκχύλισμα Καλλιεργούμενου	19,38	0,30
Υδρομεθανολικό εκχύλισμα Αυτοφυούς	19,81	0,30

Παρατηρείται ότι το υδατικό εκχύλισμα του αυτοφυούς πληθυσμού *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση έναντι των υπολοίπων δειγμάτων. Επίσης, παρατηρείται ότι τα εκχυλίσματα είτε υδατικά είτε υδρομεθανολικά παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα αιθέρια έλαια των δειγμάτων.

Παράλληλα συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο πληθυσμών, δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια σε αντίθεση με τα υδατικά εκχυλίσματα στα οποία τα δείγματα του αυτοφυούς πληθυσμού εμφανίζει διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των δειγμάτων του καλλιεργούμενου πληθυσμού.

3.5.2 Αποτελέσματα Δοκιμής ABTS

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* με την δοκιμή Abts. Και σε αυτή την μέθοδο, οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν και το πρότυπο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Trolox. Η αναγωγή των αποτελεσμάτων σε ισοδύναμα Trolox έγινε με την χρήση της πρότυπης καμπύλης που παρουσιάζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 11 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς του Trolox- Δοκιμή ABTS

Πίνακας 15 Αποτελέσματα του προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υπό μελέτη δειγμάτων των δύο πληθυσμών με την χρήση της δοκιμής ABTS

Δείγματα <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	Παρεμπόδιση (%)	Trolox (mg/mL)
Υδατικό εκχύλισμα Καλλιεργούμενου	25,74	0,24
Υδατικό εκχύλισμα Αυτοφυούς	46,22	0,46
Αιθέριο έλαιο Καλλιεργούμενου	60,32	0,61
Αιθέριο έλαιο Αυτοφυούς	19,75	0,18
Υδρομεθανολικό εκχύλισμα Καλλιεργούμενου	27,98	0,27
Υδρομεθανολικό εκχύλισμα Αυτοφυούς	34,20	0,33

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα. Φαίνεται ότι τα δείγματα αιθέριου ελαίου του καλλιεργούμενου *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* παρουσιάζουν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έναντι των υπολοίπων υπό εξέταση δειγμάτων. Ακολουθεί το υδατικό εκχύλισμα και το υδρομεθανολικό εκχύλισμα του αυτοφυούς πληθυσμού και έπειτα του καλλιεργούμενου με το αιθέριο έλαιο του αυτοφυούς πληθυσμού να παρουσιάζει την χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο πληθυσμών σε κάθε δείγμα δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην αντιοξειδωτική δράση που διαθέτουν τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα, σε αντίθεση με τα υδατικά και τα αιθέρια έλαια που οι διαφορές είναι μεγάλες. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον πίνακα 15, το αιθέριο έλαιο του καλλιεργούμενου πληθυσμού παρουσιάζει τριπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με το αιθέριο έλαιο του αυτοφυούς πληθυσμού ενώ το υδατικό εκχύλισμα του αυτοφυούς παρουσιάζει σχεδόν διπλάσια δράση έναντι του αντίστοιχου καλλιεργούμενου πληθυσμού.

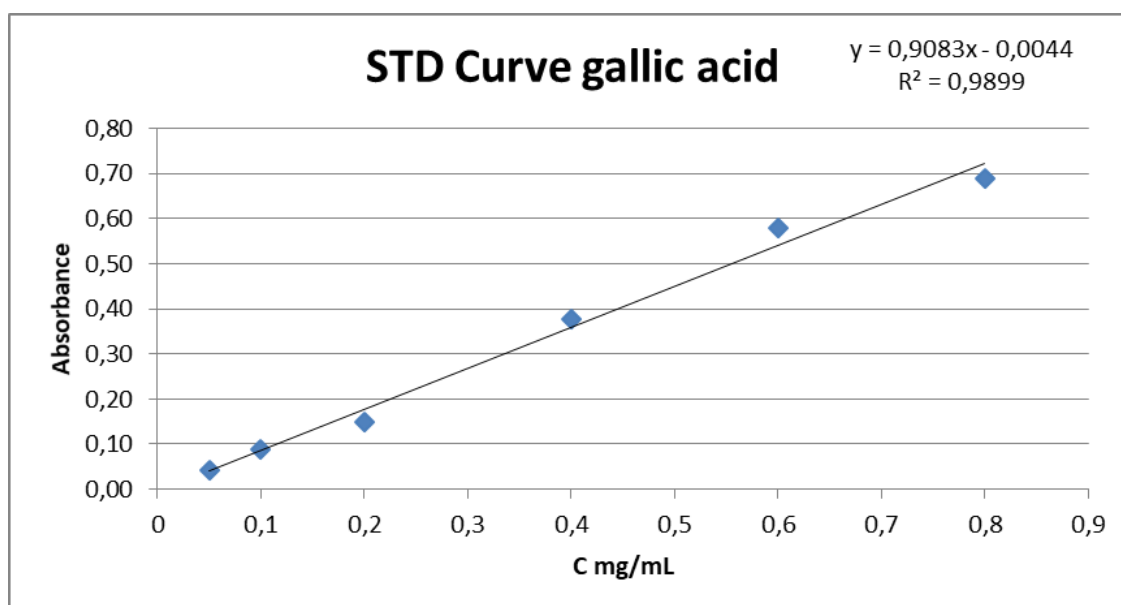
Οι διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων μεταξύ των δύο πληθυσμών που παρουσιάζονται στα αποτελέσματα και των δυο δοκιμών μπορούν να αποδοθούν σε πολλούς παράγοντες, όπως οι κλιματικές συνθήκες που επικρατούν στην κάθε περιοχή, οι καλλιεργητικές παρεμβάσεις, φροντίδες, η επιτυχία εγκατάστασης της καλλιεργούμενης περιοχής, που το στάδιο

ανάπτυξης κατά το οποίο συλλέχθηκε το φυτικό υλικό καθώς επίσης και οι συνθήκες μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης.

Τέλος, μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το αποτέλεσμα του αιθέριου ελαίου του καλλιεργούμενου πληθυσμού στις δύο δοκιμές. Πιο αναλυτικά, σύμφωνα με τους πίνακες 14 και 15, το αιθέριο αυτό της δοκιμής DPPH παρουσιάζει την χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της δοκιμής ABTS όπου φαίνεται να διαθέτει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Η μεγάλη απόκλιση των αποτελεσμάτων μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι το DPPH, σε αντίθεση με το ABTS, είναι πιο επιλεκτικό.

3.6 Αποτελέσματα της περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών με την Μέθοδο Folin-Ciocalteu

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού της περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών των δειγμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Στον πίνακα αναγράφονται οι περιεκτικότητες των ολικών φαινολικών συστατικών των δειγμάτων εκφρασμένες σε mg/mL γαλλικού οξέος, το οποίο αποτέλεσε το πρότυπο διάλυμα με πρότυπη καμπύλη την παρακάτω.



Διάγραμμα 12 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος- Δοκιμή Folin-Ciocalteu

Πίνακας 16 Αποτελέσματα προσδιορισμού της περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών στα υπό μελέτη δείγματα των δύο πληθυσμών με την χρήση της μεθόδου *Folin-Ciocalteu*

Δείγματα <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	Ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg/mL)
Υδατικό εκχύλισμα Καλλιεργούμενου	0,13
Υδατικό εκχύλισμα Αυτοφυούς	0,28
Αιθέριο έλαιο Καλλιεργούμενου	0,32
Αιθέριο έλαιο Αυτοφυούς	0,13
Υδρομεθανολικό εκχύλισμα Καλλιεργούμενου	0,25
Υδρομεθανολικό εκχύλισμα Αυτοφυούς	0,23

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 16, φαίνεται πως το αιθέριο έλαιο του καλλιεργούμενου πληθυσμού παρουσιάζει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα ολικών φαινολικών συστατικών. Ακολουθούν το υδατικό εκχύλισμα του αυτοφυούς πληθυσμού, τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα του καλλιεργούμενου και αυτοφυούς πληθυσμού και τέλος το υδατικό εκχύλισμα του καλλιεργούμενου και το αιθέριο έλαιο του αυτοφυούς πληθυσμού.

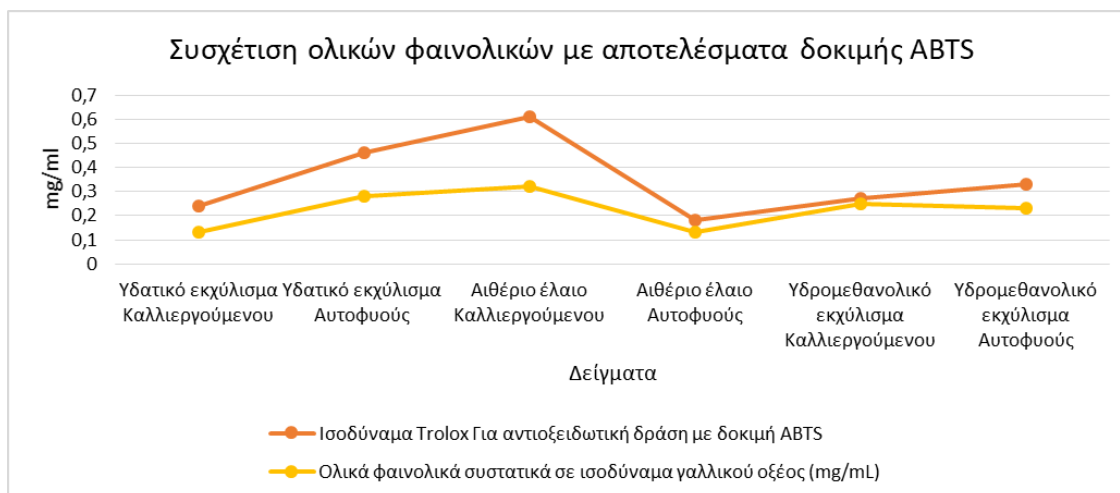
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο πληθυσμών σε κάθε δείγμα δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα ολικών φαινολικών συστατικών των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων, σε αντίθεση με τα υδατικά και τα αιθέρια έλαια που οι διαφορές είναι μεγάλες. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον πίνακα 16, το αιθέριο έλαιο του καλλιεργούμενου πληθυσμού παρουσιάζει δύομιση φορές μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε σχέση με το αιθέριο έλαιο του αυτοφυούς πληθυσμού ενώ το υδατικό εκχύλισμα του αυτοφυούς παρουσιάζει σχεδόν διπλάσια έναντι του αντίστοιχου καλλιεργούμενου πληθυσμού.

3.7 Συσχέτιση των ολικών φαινολικών συστατικών με την αντιοξειδωτική ικανότητα

Πίνακας 17 Συσχέτιση περιεκτικότητας ολικών φαινολικών συστατικών με τα αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας

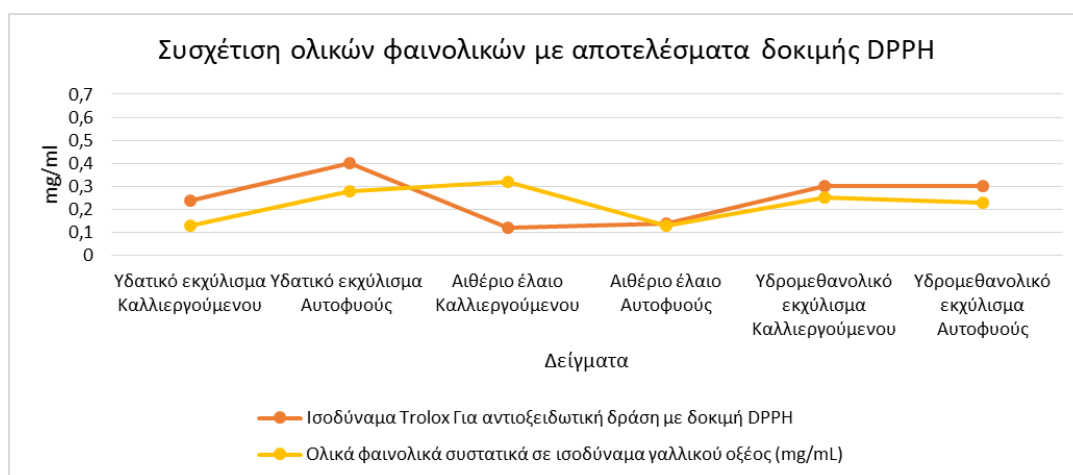
Δείγματα <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>clandestina</i>	Ολικά φαινολικά συστατικά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg/mL)	Ισοδύναμα Trolox Για αντιοξειδωτική δράση με δοκιμή DPPH	Ισοδύναμα Trolox Για αντιοξειδωτική δράση με δοκιμή ABTS
Υδατικό εκχύλισμα Καλλιεργούμενου	0,13	0,24	0,24
Υδατικό εκχύλισμα Αυτοφυούς	0,28	0,40	0,46
Αιθέριο έλαιο Καλλιεργούμενου	0,32	0,12	0,61

Αιθέριο έλαιο Αυτοφυούς	0,13	0,14	0,18
Υδρομεθανολικό εκχύλισμα Καλλιεργούμενου	0,25	0,30	0,27
Υδρομεθανολικό εκχύλισμα Αυτοφυούς	0,23	0,30	0,33



Διάγραμμα 13 Απεικόνιση της συσχέτισης των ολικών φαινολικών συστατικών με τα αποτελέσματα της δοκιμής ABTS

Σύμφωνα με τον πίνακα 17 και το διάγραμμα 13 προκύπτει ότι υπάρχει υψηλή συσχέτιση μεταξύ των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων δύο πληθυσμών και της αντιοξειδωτικής δράσης της δοκιμής ABTS.

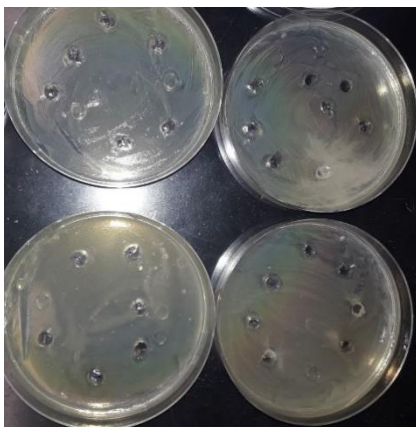


Διάγραμμα 14 Απεικόνιση της συσχέτισης των ολικών φαινολικών συστατικών με τα αποτελέσματα της δοκιμής DPPH

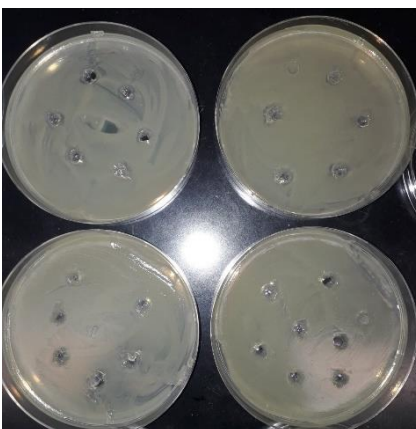
Σύμφωνα με το πίνακα 17 και το διάγραμμα 14 προκύπτει ότι υπάρχει υψηλή συσχέτιση μεταξύ των φαινολικών συστατικών των υδατικών, υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων των δύο πληθυσμών και του αιθέριου ελαίου του αυτοφυούς πληθυσμού με την αντιοξειδωτική δράση της δοκιμής DPPH. Ενδιαφέρον προκαλεί το αιθέριο έλαιο του καλλιεργούμενου πληθυσμού, το οποίο παρουσιάζει χαμηλή συσχέτιση. Το γεγονός αυτό μπορεί να προκύπτει από την επιλεκτικότητα που διαθέτει η ρίζα DPPH να μην αλληλεπιδρά με ορισμένες χημικές ουσίες.

3.8 Αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων της απόσταξης έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών με την μέθοδο της διάχυσης σε τρυβλία

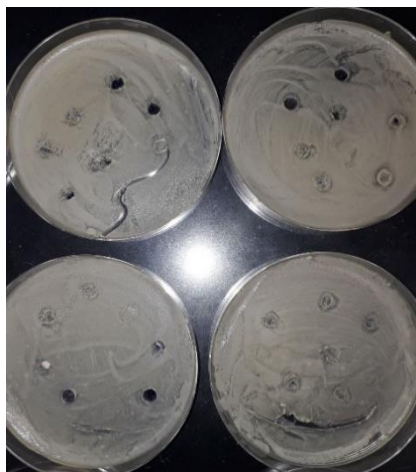
Τα αποτελέσματα των δοκιμών των δυο δειγμάτων υδατικού εκχυλίσματος που προέκυψε έπειτα από την απόσταξη του αυτοφυούς και καλλιεργούμενου είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες. Όπως είναι εμφανές δεν παρατηρούνται ζώνες παρεμπόδισης από τα υδατικά εκχυλίσματα των δύο πληθυσμών έναντι των τεσσάρων μικροοργανισμών.



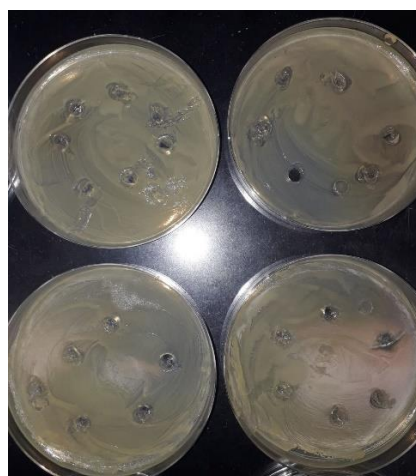
Εικόνα 17 Αποτελέσματα δοκιμής αυτοφυούς και καλλιεργούμενου υδατικού εκχυλίσματος έναντι του βακτηρίου *Escherichia coli* B16



Εικόνα 18 Αποτελέσματα δοκιμής αυτοφυούς και καλλιεργούμενου υδατικού εκχυλίσματος έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* B29



Εικόνα 19 Αποτελέσματα δοκιμής αυτοφούσ και καλλιεργούμενου υδατικού εκχυλίσματος έναντι του βακτηρίου *Bacillus subtilis* B109



Εικόνα 20 Αποτελέσματα δοκιμής αυτοφούσ και καλλιεργούμενου υδατικού εκχυλίσματος έναντι του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* B134

Βιβλιογραφικά δεν έχει μελετηθεί ξανά η παρεμποδιστική δράση έναντι μικροοργανισμών, του υδατικού εκχυλίσματος της απόσταξης του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina*.

Το υδατικό εκχύλισμα της απόσταξης άλλων ειδών της οικογένειας *Lamiaceae* έχει μελετηθεί για την παρεμποδιστική του ικανότητα έναντι μικροοργανισμών από διάφορους ερευνητές. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τους Zaccardelli *et al.* (2015) στην μελέτη τους για την αντιμικροβιακή δράση που μπορεί να διαθέτει το υδατικό εκχύλισμα που αποτελεί παραπροϊόν της απόσταξης διάφορων αρωματικών φυτών εξέτασαν και απέδειξαν ότι το υδατικό εκχύλισμα φασκόμηλου και θυμαριού παρουσιάζει αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Sclerotinia minor*. Επίσης, οι González & Marioli (2010) εξετάζοντας την αντιμικροβιακή δράση των υδατικών εκχυλισμάτων πολλών αρωματικών φυτών έναντι του βακτηρίου *Paenibacillus larvae*, παρουσίασαν την παρεμποδιστική δράση που

διαθέτει το παραπροϊόν αυτό, πολλών ειδών της οικογένειας *Lamiaceae* όπως για παράδειγμα τα είδη *Origanum vulgare* και *Thymus vulgaris*.

Παράλληλα, βιβλιογραφικές πηγές αναφέρουν ότι διάφορα είδη του γένους *Sideritis* έχουν μελετηθεί για την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, με θετικά αποτελέσματα, εξετάζοντας το αιθέριο έλαιο του φυτικού υλικού ή εκχυλίσματα που έχουν παραληφθεί με την χρήση κάποιου διαλύτη. Για παράδειγμα, οι Aligiannis *et al.* (2001) εξετάζοντας την σύσταση και την αντιμικροβιακή δράση πέντε ειδών *Sideritis* που αναπτύσσονται στην Ελλάδα ανάμεσα τους και το υπό μελέτη υποείδος της παρούσας μελέτης, με την χρήση της μεθόδου αραίωσης, αναφέρουν ότι το αιθέριο έλαιο του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* όπως επίσης και των ειδών *S. raeseri* subsp. *attica*, *S. sipylea* και *S. syriaca* subsp. *syriaca* παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι των βακτηρίων *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 227853) και των μυκήτων *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, και *Torulopsis glabrata*. Επιπλέον, οι Kostadinova *et al.* (2008) εξετάζοντας την επιρροή της καλλιέργειας στην χημική σύσταση και την αντιμικροβιακή δράση των ειδών του γένους *Sideritis*, απέδειξαν με την μέθοδο agar cup ότι το εξανικό εκχύλισμα του είδους *Sideritis scardica* παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* 209.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό την ανάλυση και την συγκριτική μελέτη αυτοφύους και καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους *Sideritis clandestina* όσον αφορά τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, την χημική τους σύσταση και την βιοδραστικότητα τους. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά με σκοπό τον χαρακτηρισμό των δύο πληθυσμών, την περιγραφή του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* και την αξιολόγηση της παραλλακτικότητας του υποείδους ανάλογα με τον βióτοπο που αναπτύσσεται. Παράλληλα παραλήφθηκαν και αναλύθηκαν τα αιθέρια έλαια, τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα καθώς και τα υδατικά εκχυλίσματα, ένα παραπροϊόν της απόσταξης, κάθε πληθυσμού με σκοπό τον προσδιορισμό της χημικής τους σύστασης και της βιοδραστικότητας τους. Επιπλέον σκοπός της μελέτης των υδατικών εκχυλισμάτων ήταν και η ανακάλυψη τρόπων εκμετάλλευσης του παραπροϊόντος αυτού με σκοπό την μείωση σπατάλης του φυτικού υλικού, την απόρριψη πολύτιμων μεταβολιτών στα απορρίμματα και την ανάπτυξη ενός πιο οικολογικού χαρακτήρα στον βιομηχανικό χώρο.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ο εντοπισμός του αυτοφύους και καλλιεργούμενου πληθυσμού στον ορεινό όγκο του όρους Πάρνωνα και στην συνέχεια ακολούθησε η μελέτη, η συλλογή και η πραγματοποίηση μετρήσεων των μορφολογικών χαρακτηριστικών του φυτικού υλικού. Η καταγραφή των χαρακτηριστικών του φυτικού υλικού των δύο πληθυσμών μαζί με την βοήθεια κλειδών, βιογραφικών πηγών, μικροσκοπικών και μακροσκοπικών αναλύσεων οδήγησε στην βοτανική ταξινόμηση του φυτικού υλικού ως το είδος *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* και στην ανακάλυψη των μοναδικών μορφολογικών χαρακτηριστικών που διαθέτει έναντι άλλων υποειδών και ειδών του γένους. Παράλληλα, τα αποτελέσματα των μετρήσεων έπειτα από επεξεργασία και συγκριτική μελέτη, με την χρήση του στατιστικού πακέτου Statgraphics, έδειξαν ότι ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, ένα αποτέλεσμα που μαρτυρά την μη στατιστικά σημαντική παραλλακτικότητα, επομένως σταθερότητα που παρουσιάζει το συγκεκριμένο υποείδος κατά την ανάπτυξη του σε διαφορετική περιοχή και συνθήκες από τον βióτοπο που αυτοφύεται.

Επόμενα στάδια της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν η συλλογή, η ήπια αποξήρανση του φυτικού υλικού με σκοπό την παραλαβή των υπό μελέτη αιθέριων ελαίων και εκχυλισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδο της υδροαπόσταξης με την χρήση της συσκευής Clevenger, με σκοπό την παραλαβή των αιθέριων ελαίων των δύο πληθυσμών, που μπορεί να χαρακτηριστεί μικρής απόδοσης, ένα χαρακτηριστικό που παρατηρείται στο συγκεκριμένο γένος. Ενώ επιπλέον προϊόν της διαδικασίας αυτής αποτέλεσαν τα υδατικά εκχυλίσματα τα οποία διαχωρίστηκαν από τα στερεά απόβλητα και παραλήφθηκαν με σκοπό την μελέτη τους.

Παράλληλα, με την μέθοδο της απλής εκχύλισης υγρού-στερεού έγινε και η παραλαβή των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων.

Όσον αφορά τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των έξι αυτών δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε με την χρήση της Αέριας Χρωματογραφίας συζευγμένη με Φασματομετρία Μαζών στην περίπτωση των αιθερίων ελαίων ενώ ο προσδιορισμός των εκχυλισμάτων έγινε με την χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας και την χρήση καταλόγου πρότυπων ουσιών. Τα αποτελέσματα χαρακτηρίστηκαν από σημαντικές ομοιότητες μεταξύ των πληθυσμών. Πιο αναλυτικά, στο αιθέριο έλαιο του αυτοφυούς πληθυσμού όπως και του καλλιεργούμενου ταυτοποιήθηκαν 18 συστατικά, από τα οποία σημαντικότερα ποσοστά κατέχουν το α-πινένιο με ποσοστό 22,64% και 24,47% αντίστοιχα, το β-πινένιο σε ποσοστό 10% και 10,14%, το ισοκαρνοφυλλένιο με ποσοστό 6.06% και 6,48% και η (Z),9,1- οκταδεκενόλη σε ποσοστό 4,45% και 3,17% και τέλος το 8-cedren-13-ol σε ποσοστό 2,92% και 3,99%. Όπως είναι εμφανές τα κυριότερα συστατικά είναι ίδια με παρόμοια ποσοστά όπως ίδιο είναι και η υπόλοιπη χημική τους σύσταση, αφού αποτελείται από ίδια συστατικά και στους δύο πληθυσμούς.

Όσον αφορά τα χημικά προφίλ των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων παρατηρήθηκαν και εκεί ομοιότητες μεταξύ των πληθυσμών. Πιο συγκεκριμένα η σύσταση τους αποτελείται από τα ίδια συστατικά με παρόμοιες ποσοτικές κατανομές, με σημαντικότερες θέσεις να κατέχουν ο 3-ο-γλυκοζίτης καεμφερόλης με ποσοστά 22,74 % στο αυτοφυή και 25,76 για τον καλλιεργούμενο πληθυσμό και η κερκετίνη σε ποσοστό 13,09% και 9,11% αντίστοιχα.

Η χημική σύσταση των υδατικών εκχυλισμάτων αποτέλεσε πρόκληση για την συγκεκριμένη εργασία καθώς δεν βρέθηκαν βιβλιογραφικές αναφορές για το συγκεκριμένο εκχύλισμα του είδους ενώ οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το συγκεκριμένο προϊόν της απόσταξης άλλων φυτικών ειδών είναι ελάχιστες. Κάποιες από τις ουσίες που ταυτοποιήθηκαν είναι κοινές για τους δύο πληθυσμούς παρόλα' αυτά, η σύγκριση των δύο εκχυλισμάτων είναι αδύνατη λόγω αδύνατης ταυτοποίησης πάνω από το 50% των συστατικών του χημικού προφίλ.

Τέλος, τελευταίο στάδιο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε ο προσδιορισμός της βιοδραστικότητας των έξι δειγμάτων και η μεταξύ των πληθυσμών σύγκριση. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση με την χρήση της δοκιμής DPPH με το αυτοφύες υδατικό εκχύλισμα να παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα απ' όλα τα δείγματα. Επίσης, τα εκχυλίσματα παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα αιθέρια έλαια των δειγμάτων με τα υδρομεθανολικά να μην έχουν σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών ενώ τα καλλιεργούμενα υδατικά και αιθέρια έλαια να έχουν διπλάσια από τα αντίστοιχα αυτοφύη.

Παράλληλα η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων αξιολογήθηκε και με την δοκιμή ABTS όπου τα αποτελέσματα που προέκυψαν συμφωνούν με τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-

Ciocalteu για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε ολικά φαινολικά συστατικά. Πιο αναλυτικά, το αιθέριο έλαιο του καλλιεργούμενου πληθυσμού βρέθηκε να διαθέτει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα έξι δείγματα, ένα αποτέλεσμα που προκαλεί ενδιαφέροντες προβληματισμούς με βάση τα αποτελέσματα της δοκιμής DPPH και εξηγείται λόγω της επιλεκτικότητας που παρουσιάζει η ρίζα DPPH* να αλληλοεπιδρά με τα αντιοξειδωτικά μόρια. Επιπλέον, η χρήση της ρίζας ABTS* για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υπόλοιπων δειγμάτων έδειξε ότι το υδατικό εκχύλισμα του αυτοφυούς πληθυσμού παρουσιάζει σχεδόν διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι του καλλιεργούμενου πληθυσμού, τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα παρουσίασαν όμοια μεταξύ τους δράση ενώ τέλος, το αιθέριο έλαιο του αυτοφυούς πληθυσμού παρουσίασε τρεις φορές χαμηλότερη δράση από αυτό του καλλιεργούμενου, αποτελέσματα τα οποία δικαιολογούνται λόγω των διαφορετικών βιοτόπων που αναπτύχθηκαν τα υπό μελέτη φυτά και τα οποία έρχονται σε συμφωνία με την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ολικά φαινολικά συστατικά.

Το πειραματικό κομμάτι της παρούσας μελέτης ολοκληρώθηκε με τον έλεγχο της παρεμποδιστικής δράσης των δύο υδατικών εκχυλισμάτων με την χρήση της μεθόδου Well Diffusion Assay έναντι στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus* B134, *Bacillus subtilis* B109, *Escherichia coli* B16 και *Pseudomonas fluorescens* B29, όπου έδειξε αρνητικά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα μπορούν να αποδοθούν στο γεγονός ότι βιβλιογραφικά, οι περισσότερες δοκιμές με θετικά αποτελέσματα στον έλεγχο της παρεμποδιστικής δράσης του γένους *Sideritis* έναντι διάφορων μικροοργανισμών, έχουν πραγματοποιηθεί με την χρήση του αιθέριου ελαίου των φυτών, δημιουργώντας τον προβληματισμό ότι τα μη υδατοδιαλυτά πτητικά συστατικά που συνθέτουν το αιθέριο έλαιο και δεν περνούν στο υδατικό διάλυμα, είναι αυτά που διαθέτουν την δράση αυτή. Οι Aligiannis *et al.* (2001) στο πείραμα τους επιβεβαιώνουν την θεωρία αυτή και αποδεικνύουν ότι η παρεμποδιστική δράση του γένους *Sideritis* έναντι κάποιων συγκεκριμένων βακτηρίων και μυκήτων, μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή συγκέντρωση πτητικών συστατικών όπως της καρβακρόλης και του α -πινένιου. Από την άλλη πλευρά, βιβλιογραφικές αναφορές (Sagdic & Ozcan 2003, Bellahsene *et al.* 2015) κάνουν λόγο για αντιβακτηριακή και μυκητοτοξική δράση υδρολυμάτων, παραπροϊόντων απόσταξης διάφορων φυτικών ειδών, θέτοντας την θεωρία ότι τα αρνητικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορεί να οφείλονται σε άλλους παράγοντες, όπως για παράδειγμα στους μικροοργανισμούς που επιλέχθηκαν, στις συνθήκες ανάπτυξης του φυτικού υλικού και στο τρόπο συντήρησης του υδατικού εκχυλίσματος.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι το φυτικό υλικό του είδους *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* του αυτοφυούς με το αντίστοιχο φυτικό υλικό

του καλλιεργούμενου πληθυσμού παρουσιάζουν ομοιότητες στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, στην χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων, των υδρομεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων, αποδεικνύοντας την σταθερότητα που παρουσιάζει το συγκεκριμένο υποείδος χημικά και μορφολογικά σε οποιοδήποτε βιότοπο κι αν αναπτυχθεί. Όσον αφορά την βιοδραστικότητα του συγκεκριμένου είδους συμπεραίνεται ότι το υδατικό εκχύλισμα και το αιθέριο έλαιο επηρεάζεται από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής που αναπτύσσεται το φυτικό υλικό, παράγοντες που καθορίζουν τη περιεκτικότητά τους σε φαινολικά συστατικά και συνεπώς και την αντιοξειδωτική τους δράση. Τέλος, το υδατικό εκχύλισμα δεν παρουσιάζει παρεμποδιστική δράση έναντι των τεσσάρων μικροοργανισμών που εξετάστηκαν, επομένως δεν μπορεί να αξιοποιηθεί γι' αυτό το σκοπό. Το αποτέλεσμα αυτό όμως δεν οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι το συγκεκριμένο υδατικό εκχύλισμα δεν έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες ή άλλου είδους χρήσεις αφού η περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά και η αντιοξειδωτική του δράση φαίνεται να είναι υποσχόμενη.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1. Ξενογλώσση Βιβλιογραφία

Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Chinou, I. B., Mitakou, S., Gikas, E., & Tsarbopoulos, A. (2001). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Five Taxa of Sideritis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Aneva I.; Zhelev P., Kozuharova E., Danova K., Nabavi S. F., Behzad S. (2019). Genus Sideritis, section Empedoclia in southeastern Europe and Turkey – studies in ethnopharmacology and recent progress of biological activities. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Axiotis E., Petrakis E. A., Halabalaki M., Mitakou S. (2020). Phytochemical Profile and Biological Activity of Endemic Sideritis sipylea Boiss. in North Aegean Greek Islands. *Molecules*

Balouirin M., Sadiki M., Ibsouda S. K. (2016). Methods for invitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6.

Bellahsene, C., Bendahou, M., Khadir, A., Zenati, F., Bendelaïd, F., Aissaoui, N., Muselli, A., Costa, J., (2015). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil and hydrosol extract of *Nepeta nepetella* subsp. *Amethystina* (Poir.) Briq. From Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science Research article* 5, 21–25.

Bilgin M., Elhousseina E.A.A., Özyürek M., Güclü K., Sahin S., (2018) Optimizing the extraction of polyphenols from *Sideritis Montana* L. using response surface methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

Christaki E.; Bonos E.; Giannenas I.; Florou-Paneri P. (2012). Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture* 2(4), 228–243.

Christaki E., Giannenas I., Bonos E., Florou-Paneri P. (2020) Innovative uses of aromatic plants as natural supplements in nutrition. *Agriculture, Elsevier Inc*.

Dimaki V. D., Iatrou G., & Lamari F. N. (2017). Effect of acidic and enzymatic pretreatment on the analysis of mountain tea (*Sideritis* spp.) volatiles via distillation and ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*.

Dimaki V.D., Zeliou K., Nakka F., Stavreli M., Bakratsas I., Papaioannou L., Iatrou G., Lamari F.N., (2022). Characterization of *Sideritis clandestina* subsp. *peloponnesiaca* Polar Glycosides and Phytochemical Comparison to Other Mountain Tea Populations. *Molecules*.

Drinić Z., Pljevljakušić D., Janković T., Zdunić G., Bigović D., Savikin K. (2021) Hydro-distillation and microwave-assisted distillation of *Sideritis raeseri*: Comparison of the composition of the essential oil, hydrolat and residual water extract. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 24.

Ghoumari H., Benajiba M-H, Azmani A., Garcia-Granados A., Martinez A., Parra A., Rivas F., Socorro O. (2005). Ent-Kauranoid derivatives from *Sideritis moorei*. *Phytochemistry* 66.

González-Burgos E., Carretero M.E., Gómez-Serranillos M.P. (2011) *Sideritis* spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities—A review. *Journal of Ethnopharmacology* 135.

González M.J., Marioli J.M. (2010). Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American Foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*.

Góra, J., Lis, A., Kula, J., Staniszewska, M., & Wołoszyn, A. (2002). Chemical composition variability of essential oils in the ontogenesis of some plants. *Flavour and Fragrance Journal*.

Grigoriadou K., Nikos Krigas N., Lazari D., Maloupa E. (2020). Sustainable use of mediterranean medicinal-aromatic plants. *Elsevier Inc*.

Hamilton R.J., Sewell P.A. (1982). Introduction to high performance liquid chromatography.

Joshi D. D. (2012). FTIR Spectroscopy: Herbal Drugs and Fingerprints. *Herbal Drugs and Fingerprints*, 121–146.

Koedam, A. (1986). Volatile oil composition of Greek mountain tea (*Sideritis* spp.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*

Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., Lanaras, T., (1997). Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry*.

Kostadinova E., Alipieva K., Stefova M., Antonova D., Evstatieva L., Stefkov4 G., Tsvetkova I., Naydenski H. and Bankova V. (2008). Influence of cultivation on the chemical composition and antimicrobial activity of *Sideritis* spp. *Pharmacognosy Magazine*.

Koutsaviti A., Bazos I., Milenković M., Pavlović-Drobac M. and Tzakou O., (2013) Antimicrobial Activity and Essential Oil Composition of Five *Sideritis* taxa of Empedoclia and Hesiodia Sect. from Greece.

Lafranchis T. & Sfikas G. (2009), Flowers of Greece, volume 2.

- Lubbe, A., Verpoorte, R., (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials.
- Pandey, Amit Kumar (2020). Feed Additives, Distribution of aromatic plants in the world and their properties.
- Pljevljakušić D., Šavikin K., Janković T., Zdunić G., Ristić M., Godjevac D., Konić-Ristić A. (2011). Chemical properties of the cultivated *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. subsp. *raeseri*. *Food Chemistry* 124.
- Piozzi F., Bruno M., Rosseli S., Maggio A. (2006). The diterpenoids from the genus *Sideritis*. Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 33*.
- Sagdiç, O., Özcan, M., 2003. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control* 14, 141–143.
- Sahaa A., Basaka B.B. (2020). Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops & Products* 145.
- Strid A. (2016). Atlas of the Aegean Flora, *Part 1: Texts & Plates*.
- Strid A. & Tan K., (1991) Mountain flora of Greece, volume 2, *Edinburgh University Press*.
- Tan K. & Iatrou G., (2001) Endemic plants of Greece, The Peloponnese.
- Vasilopoulou C.G., Kontogianni V.G., Linardaki Z.I., Iatrou G., Lamari F.N., Nerantzaki A.A., Gerothanassis I.P., Tzakos A.G., Margaritis M. (2013). Phytochemical composition of “mountain tea” from *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* and evaluation of its behavioral and oxidant/antioxidant effects on adult mice. *European Journal of Nutrition* 52.
- Wolfender, J.-L. (2009). HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue. *Planta Medica*, 75(07), 719–734.
- Zaccardelli M., Roscigno G., Pane C. (2015). Antifungal activity of residues from aromatic waters distilled from thyme and sage. *Multidisciplinary Approaches for Studying and Combating Microbial Pathogens* 31.

5.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

Απόφαση υπ' αριθμό 133581/3471/10 / 7 / 2013 του ειδικού Γραμματέα Δασών του ΥΠΕΝ με θέμα: Προστασία αρωματικών-μελισσοτροφικών φυτών και φαρμακευτικών βοτάνων της χώρας.

Απόφαση υπ' αριθμό 131571/1608/27/6/2013 του προϊστάμενου γενικής διεύθυνσης διαχείρισης δασών του ΥΠΕΝ με θέμα: Έκδοση αδειών συλλογής αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών από δάση και δασικές εκτάσεις.

Δόρδας Χ. (2012) Αρωματικά και Φαρμακευτικά φυτά.

Κάλλφας, Η. (2018) Αρωματικά Φυτά.

Κατσιώτης Θ. Σ., Χατζοπούλου Σ. Π. (2010) Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά και αιθέρια έλαια

Κ.Υ.Α. υπ' αριθμό. 33999/03.08.2010 Καθορισμός χρήσεων όρων και περιορισμών δόμησης για την προστασία χερσαίων και υδάτινων εκτάσεων των Δήμων Βόρειας Κυνουρίας, Λεωνιδίου, Σκιρίτιδας και Τυρού του Ν. Αρκαδίας, των Δήμων Θεραπνών, Οινούντος και Γερώνθρων του Ν. Λακωνίας και των κοινοτήτων Κοσμά (Ν. Αρκαδίας) και Καρυών (Ν. Λακωνίας) της περιοχής όρους Πάρνωνα-υγροτόπου Μουστου (ΦΕΚ 353/ΑΑΠ/6-9-2010) και τροποποίηση αυτής (ΦΕΚ 160/ΑΑΠΘ/16-6-2011 και ΦΕΚ 126/ΑΑΠ/15.4.2013).

Κωνσταντινίδης Θ. & Καλπουτζάκης Ε. (2015) Οδηγός Χλωρίδας Προστατευόμενης περιοχής όρους Πάρνωνα και υγρότοπου Μουστου. Ενδημικά, σπάνια και απειλούμενα είδη. Φορέας διαχείρισης όρους Πάρνωνα υγρότοπου Μουστου.

Παππά Κ., Παπαθεοδώρου Φ, Σφήκας Γ. (2001), Οικολογικό Πάρκο Πάρνωνα- Μουστου

Προεδρικό Διάταγμα 67/1981 (ΦΕΚ Α' 23/30.1.1981) Περί προστασίας της αυτοφυούς Χλωρίδος και Αγρίας Πανίδος και καθορισμού διαδικασίας συντονισμού και Ελέγχου της Ερεύνης επ' αυτών.

Ρυθμιστική Δασική Αστυνομική Διάταξη Υπ' αριθ. 1/2013 (ΑΔΑ:ΒΕΥ8ΟΡ1Φ-06Ξ) Περί Απαγόρευσης και ρύθμισης υλοτομιών και μεταφοράς δασικών προϊόντων.

Σαρχής Γ., (1994) Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σκουμπής Β. Γ., (1985). Αρωματικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια.

Φορέας Διαχείρισης Πάρνωνα, (2015). Επτά Λόφος Α.Β.Ε.Ε.

5.3 Άδειες Έρευνας

Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας:

Α.Π.:ΥΠΕΝ/ΔΠΔ/53086/2379/20, ΑΔΑ:Ω16Ζ4653Π8-6ΚΒ

Φορέας Διαχείρισης Πάρωνα, Μουστού, Μαινάλου & Μονεμβασίας:

Α.Π: 471/20

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

	<u>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ</u>	Καλλιεργούμενο	Αυτοφυές
A	<u>ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ</u>		
	<u>Φυτό</u>		
1	Τύπος ανάπτυξης φυτού: 1.έρπον, 2.πλάγιος, 3.όρθιος	2	2
2	Ύψος φυτού: 1.κοντό, 2.μέτριο, 3.ψηλό	2	2
3	Αριθμός στελεχών ανά φυτό:	50	68
4	Αριθμός ανθοφόρων βλαστών:	38	44
	<u>Στέλεχος</u>		
5	Πυκνότητα διακλάδωσης: 1.αραιή, 2.μέτρια, 3.πυκνή	1	1
6	Τρίχωμα στελέχους: 1.απουσία ή πολύ αδύνατο, 2.αδύνατο, 3.μέσο, 4.ισχυρό	4	4
7	Χρώμα στελέχους: 1.ανοιχτό πράσινο, 2.σκούρο πράσινο 3.γκριζωπό , 4.άλλο	3	3
	<u>Φύλλο</u>		
8	Πυκνότητα φύλλων: 1. αραιή, 2. μέση, 3.πυκνή	2	2
9	Χρώμα άνω επιφάνειας : 1.ανοιχτό πράσινο,, 2.πράσινο, 3.σκούρο πράσινο, 4.πράσινο με γκρι απόχρωση, 5. κιτρινωπό	4	4
10	Αναλογία μήκους/πλάτους του φύλλου (cm) :	5,30	5,06
11	Μήκος μίσχου κατώτερων φύλλων: 1.απουσία 2. κοντός 3. μέτριος 4.μακρύς	3	3
12	Μήκος μίσχου φύλλων βλαστού:1. απουσία 2. κοντός 3. μέτριος 4.μακρύς	1	1

13	Σχήμα ελάσματος κατώτερων φύλλων: 1.ωοειδές, 2.στρογγυλό, 3.στενό-επίμηκες, 4.ελλειπτικό-σπατολοειδές, 5.άλλο	4	4
14	Σχήμα ελάσματος φύλλων βλαστού: 1.ωοειδές, 2.στρογγυλό, 3.στενό-επίμηκες, 4.ελλειπτικό-επίμηκες, 5.άλλο	3	3
15	Περιφέρεια φύλλου : 1.ολόκληρη, χωρίς εγκοιλώσεις, 2.δαντελωτή,3.οδοντωτή, 4.άλλο	1	1
16	Πυκνότητα τριχώματος: 1.αραιή 2.μέτρια 3.υψηλή	3	3
17	Τρίχωμα στην άνω επιφάνεια: 1.απουσία ή πολύ αδύνατο, 2.αδύνατο, 3.μέσο, 4.ισχυρό	4	4
18	Τρίχωμα στην κάτω επιφάνεια: 1.απουσία ή πολύ αδύνατο, 2.αδύνατο, 3.μέσο, 4.ισχυρό	4	4
19	Αναλογία μήκους φύλλου/ μήκους μεσογονατίου διαστήματος στο βλαστητικό στάδιο: 1. Μεγαλύτερο ή ίσο από το μεσογονάτιο διάστημα, 2. Μικρότερο από το μεσογονάτιο διάστημα.	1	1
	<u>Ταξιανθία</u>		
20	Μήκος ταξιανθίας (μέσος όρος cm):	16,80	11,60
21	Πυκνότητα ταξιανθίας (μέσος όρος μήκους ταξιανθίας/μέσος όρος αριθμών κόμβων ταξιανθίας):	1,7	1,50
22	Χρώμα στεφάνης 1.κίτρινη με καφέ λωρίδες στο άνω χείλος, 2.κίτρινη χωρίς καφέ λωρίδες στο άνω χείλος, 3.υποκίτρινα, 4.λευκά	1	1
23	Αναλογία μήκους πετάλων/ μήκος κάλυκα: 1.πέταλα ελαφρώς υπερβαίνουν τον κάλυκα, 2.πέταλα διπλάσια του μήκους του κάλυκα, 3.πέταλα τριπλάσια του μήκους του κάλυκα, 4.πέταλα τετραπλάσια του μήκους του κάλυκα	1	1
24	Σχήμα κάλυκα: 1. κωδωνοειδής, 2. στροβιλόμορφος	1	1
25	Τύπος κάλυκα: 1.ομοιόμορφα οδοντωτός, 2.χωρίς οδοντώσεις, 3.μονόχειλος και με βαθιά σχισμή στην μία πλευρά, 4.δίχειλος	1	1

26	Χρώμα κάλυκα: 1. υποκίτρινο 2.ανοιχτό πράσινο 3. πράσινο	2	2
27	Αριθμός κόμβων / ταξιανθία (μέσος όρος):	9,80	7,75
28	Μήκος βρακτίου φύλλου: 1.10-20mm, 2.20-30mm, 3.>30mm	2	2
29	Αναλογία μήκους βρακτίων/μήκος ανθέων: 1.μικρότερο από το άνθος, 2.ίσο με το άνθος ,3. ελάχιστα μεγαλύτερο από το άνθος, 4.1-3 φορές πιο μεγάλο από το άνθος	4	4
30	Σχήμα βρακτίων: 1.ωοειδές- καρδιοειδή, 2.λογχοειδές, 3.ανεστραμμένο ωοειδές, 4.ελλειπτικό, 5.άλλο	1	1
31	Σχήμα κορυφής βρακτίου φύλλου: 1.απότομα οξεία, 2.οξεία, 3.στρογγυλή, 4.αμβλεία, 5.με εσοχή	1	1
32	Μήκος κορυφής βράκτιο φύλλο (acumen):1.< 4mm, 2. 4-6mm, 3.>6mm	3	3
33	Υφή βρακτίων: 1.μεμβρανοειδής, 2.ποώδης, φυλλώδης 3.εριώδης	3	3
34	Χρώμα βρακτίων: 1.γκιζωπό, 2.ανοιχτό πράσινο 3.σκούρο πράσινο	2	2
35	Ημερομηνία έναρξης άνθησης(το 10% των φυτών να έχουν τουλάχιστον ένα άνθος): 1.πρώιμη, 2.μέση, 3.όψιμη	11/06/2022	14/06/2022
36	Ημερομηνία πλήρης άνθισης (όταν το 50% των ανθέων είναι πλήρως ανοικτά): 1. πρώιμη 2.μέση 3. όψιμη	21/06/2022	24/06/2022
B	<u>ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ</u>		
39	Ξηρό βάρος βιομάζας ανά φυτό (gr):	64,60	62,10
	<u>Χημικοί χαρακτήρες (Μετρήσιμοι κατά την πλήρη άνθιση)</u>		
40	Περιεκτικότητα αιθέριου ελαίου (%DW)	0,07	0,10

	<u>Σύνθεση αιθέριου ελαίου</u>		
41	Χημειότυπος: Μικτός (%)	52,87	51,73
42	Αναλογία α-πινενίου στο αιθέριο έλαιο (%)	24,47	22,64
43	Αναλογία β-πινενίου στο αιθέριο έλαιο(%)	10,14	10,00
44	Αναλογία ισοκαρνοφυλλένιου στο αιθέριο έλαιο (%)	6,48	6.06
45	Αναλογία 8-cedren-13-ol στο αιθέριο έλαιο (%)	3,99	4,45
46	Αναλογία (Z),9,1-οκταδεκενόλης στο αιθέριο έλαιο (%)	3,17	3,11
47	Αναλογία οξειδίου καρνοφυλλένιου στο αιθέριο έλαιο (%)	2,64	2,92
48	Αναλογία κιουμπενένιου στο αιθέριο έλαιο (%)	1,98	2,55