



# Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Επιστημών των Φυτών

Εργαστήριο Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου

Π.Μ.Σ. Επιστήμες & Συστήματα Φυτικής Παραγωγής

<< Κηπευτικές Καλλιέργειες και Ανθοκομία >>

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Διερεύνηση της *in vitro* καλλιέργειας σε υγρό υπόστρωμα και του προβλήματος της υπερενυδάτωσης στο είδος *Ballota acetabulosa*

Δήμητρα Α. Τσιάμα

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Μαρία Παπαφωτίου

ΑΘΗΝΑ 2019







## Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Επιστημών των Φυτών

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου

Π.Μ.Σ. Επιστήμες & Συστήματα Φυτικής Παραγωγής

<< Κηπευτικές Καλλιέργειες και Ανθοκομία >>

Μεταπτυχιακή Μελέτη

**Διερεύνηση της *in vitro* καλλιέργειας σε υγρό υπόστρωμα και του προβλήματος της υπερευδάτωσης στο είδος *Ballota acetabulosa***

***In vitro* propagation in liquid culture and the problem of vitrification in *Ballota acetabulosa*.**

Δήμητρα Α. Τσιάμα

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Μαρία Παπαφωτίου

Εξεταστική Επιτροπή:

Παπαφωτίου Μαρία - Καθηγήτρια

Ακουμιανάκη - Ιωαννίδου Αναστασία – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Παρασκευοπούλου Αγγελική – Επίκουρη Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ 2019



Στον αδερφό μου,  
Νικόλα



## **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν για την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου για την διεξαγωγή της μεταπτυχιακής μου μελέτης Δρ. Μ. Παπαφωτίου, Καθηγήτρια, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α., για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση και τις πολύτιμες υποδείξεις που μου παρείχε, καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού σταδίου, της συγγραφής και της διόρθωσης της πτυχιακής μου μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Δρ. Α. Ακουμιανάκη-Ιωαννίδου, Αναπλ. Καθηγήτρια και στην Δρ. Α. Παρασκευοπούλου Επικ. Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, μέλη της τριμελούς επιτροπής, για τον χρόνο που διέθεσαν για την εξέταση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά την Δρ. Αικ. Μαρτίνη για τις συμβουλές που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου που είναι πάντα δίπλα μου για να με βοηθήνε, να με υποστηρίζουν και να με παροτρύνουν να συνεχίζω τις σπουδές μου, καθώς επίσης το φίλο μου Θανάση και τη φίλη μου Μαρία που με την όμορφη παρέα τους ήταν συνοδοιπόροι σε όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.





## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	7
Συνομογραφίες.....	13
Περίληψη.....	15
Abstract .....	17
Σκοπός της μελέτης.....	19
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	21
1.1 Η λεκάνη της Μεσογείου .....	21
1.1.1 Φρύγανα .....	23
1.1.2 Πολλαπλασιασμός αυτοφυών της Μεσογειακής βλάστησης <i>in vitro</i> .....	25
1.1.3 Οικογένεια Lamiaceae (Labiatae, Mint family, Χειλανθή) .....	28
1.1.4 Το γένος <i>Ballota</i> .....	30
1.1.5 Το είδος <i>Ballota acetabulosa</i> .....	36
1.1.5.1 Ιστορικά στοιχεία του είδους <i>Ballota acetabulosa</i> .....	38
1.1.5.2 Βοτανική ταξινόμηση του <i>Ballota acetabulosa</i> .....	39
1.1.5.3 Μορφολογία- ανατομία του <i>Ballota acetabulosa</i> .....	40
1.1.5.4 Θεραπευτικές χρήσεις του <i>Ballota acetabulosa</i> .....	43
1.1.5.5 Άλλες χρήσεις.....	44
1.2 Στοιχεία περί μικροπολλαπλασιασμού .....	45
1.2.1 Φάσεις μικροπολλαπλασιασμού.....	46
1.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμό.....	48
1.2.2.1 Έκφυτο και υπόστρωμα καλλιέργειας.....	48
1.2.2.2 Περιβάλλον καλλιέργειας .....	59
1.2.3 Θρεπτικό υπόστρωμα .....	62
1.2.3.1 Σύνθεση θρεπτικού υποστρώματος .....	66
1.2.4 Η χρήση του ενεργού άνθρακα σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια .....	73
1.2.5 Το πρόβλημα της υπερενυδάτωσης (υάλωση) .....	76
1.2.5.1 Αιτίες υπερενυδάτωσης.....	79
1.2.5.2 Έλεγχος υπερενυδάτωσης.....	80
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	85
2.1 Μητρικό υλικό.....	85

2.2 Υπόστρωμα <i>in vitro</i> καλλιέργειας .....	85
2.2.1 Υλικά των θρεπτικών υποστρωμάτων <i>in vitro</i> καλλιέργειας .....	85
2.2.2 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικού υποστρώματος .....	86
2.3 Δοχεία και υλικά κάλυψης.....	88
2.3.1 Δοχεία <i>in vitro</i> καλλιέργειας και υλικά κάλυψης.....	88
2.3.2 Δοχεία εγκλιματισμού φυταρίων.....	88
2.4 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας .....	88
2.5 Συνθήκες καλλιέργειας.....	89
2.5.1 Συνθήκες <i>in vitro</i> καλλιέργειας .....	89
2.5.2 Συνθήκες εγκλιματισμού <i>ex vitro</i> .....	89
2.6 Υποκαλλιέργεια <i>in vitro</i> καλλιιεργειών .....	90
2.7 Ριζοβολία μικροβλαστών.....	91
2.8 Εγκλιματισμός φυταρίων.....	91
2.9 Εκτίμηση αποτελεσμάτων .....	92
2.10 Σκοπός της μελέτης και πειραματική προσέγγιση .....	93
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	94
3.1 Σύγκριση υγρής – στερεής καλλιέργειας.....	94
3.2 Σύγκριση υγρής καλλιέργειας και στερεής διαφόρων συγκεντρώσεων άγαρ.....	97
3.3 Στερεή καλλιέργεια σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 και 12 gL <sup>-1</sup> .....	103
3.4 Στερεή καλλιέργεια σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 και 12 gL <sup>-1</sup> και MS/2 με 8 gL <sup>-1</sup> άγαρ και μελέτη της επίδρασης της αλατότητας του υποστρώματος στην αντίδραση των εκφύτων. ....	108
3.5 Επίδραση ενεργού άνθρακα και διαφορετικών περιεκτικότητων άγαρ και σουκρόζης στο φυτό <i>B. acetabulosa</i> . ....	113
3.6 Σύγκριση πέντε υποκαλλιεργειών στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 gL <sup>-1</sup> .....	118
3.7 Ριζοβολία.....	120
3.8 Εγκλιματισμός φυταρίων.....	122
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	125
4.1 <i>In vitro</i> καλλιέργεια του είδους <i>Ballota acetabulosa</i> .....	125
4.2 Ριζοβολία του είδους <i>Ballota acetabulosa</i> .....	127
4.3 Εγκλιματισμός του είδους <i>Ballota acetabulosa</i> .....	128

4.4 Γενικό Συμπέρασμα .....	128
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	131
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	155



### **Συντομογραφίες**

**BA** 6-benzyladenine

**KIN** kinetin, 6-(furfurylamino) – purine

**ZiP** 6-γ-γ-(dimethylallylamino)-purine

**IBA** indole-3-butyric acid

**B5** Gamborg's B-5 basal salt mixture

**MS** Murashige and Skoog Medium

**NAA** 1-naphthelene acetic acid

**TDZ** thidiazuron

**WPM** McCown's Woody Plant Medium

**ZEA** trans-zeatin



## Περίληψη

Το γένος *Ballota* της οικογένειας Lamiaceae είναι ένα γένος με περίπου 25 είδη. Το είδος *Ballota acetabulosa* είναι πολυετής πόα με ξυλώδη βάση, φρύγανο, ύψους έως 60 cm. και χαρακτηρίζεται ως αρωματικό φυτό και είναι γνωστό με διάφορες ονομασίες ανά περιοχή. Πολύ ανθεκτικό στη ξηρασία, ευδοκιμεί τόσο στον ήλιο όσο και σε ημισκιερά μέρη, σε πετρώδεις και βραχώδεις πλαγιές, ξέφωτα δασών έως τα 1700 μέτρα. Οι αποξηραμένοι κάλυκες του φυτού χρησιμοποιούνται ανεστραμμένοι στο λάδι ως φιτίλι ενώ έχουν και ιδιαίτερη καλλωπιστική αξία αφού παραμένουν επί μακρόν στα ανθικά στελέχη και δίνουν μια ασυνήθιστη μορφή στο φυτό. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κηποτεχνία, ιδανικό για θεματικούς Μεσογειακούς κήπους, φυτεμένο με άλλα παρόμοια φυτά. Με μαζική φύτευση δημιουργεί ασυνήθιστα παρτέρια, λόγω της μορφής του. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως φυτό εδαφοκάλυψης σε περισσότερο ή λιγότερο χαλικώδη εδάφη. Το φυτό παρουσιάζει ενδιαφέρον για τη φαρμακοβιομηχανία διότι έχει αντισπασμωδικές ιδιότητες δρα ως αντιλυσσικό αντιβακτηριδιακό, τονωτικό, στυπτικό, διουρητικό, εμμηναγωγό, αποχρεμπτικό, αντιοξειδωτικό και αντισπασμωδικό. Με στόχο τη διάδοση του είδους στην παρούσα εργασία μελετήθηκε αρχικά ο *in vitro* πολλαπλασιασμός του είδους σε στερεή και υγρή καλλιέργεια και έγινε διερεύνηση στην καταπολέμηση του προβλήματος της υπερενυδάτωσης. Ως βασικό υπόστρωμα όλων των *in vitro* καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε το MS. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων περιεκτικοτήτων άγαρ σε υπόστρωμα MS τόσο στη βλαστογένεση και τη ριζοβολία όσο και στο πρόβλημα της υπερενυδάτωσης. Οι περιεκτικότητες άγαρ που δοκιμάστηκαν ήταν 5, 8 και 12 gL<sup>-1</sup>. Το αποτέλεσμα ήταν όσο χαμηλότερη ήταν η περιεκτικότητα σε άγαρ τόσο πιο εμφανές ήταν το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης με κορύφωση την υγρή καλλιέργεια όπου το φαινόμενο έφτανε στο 100%. Ακόμα δοκιμάστηκε η αντοχή της *Ballota acetabulosa* στο άλας (10 gL<sup>-1</sup>) σε υπόστρωμα MS με δύο δοσολογίες άγαρ 8 και 12 gL<sup>-1</sup>. Το φυτό δεν είχε καμία αντοχή στο άλας και τόσο ο αριθμός όσο και το μήκος των βλαστών κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα. Ωστόσο παρουσία άλατος το φυτό είχε μηδενικό ποσοστό υπερενυδάτωσης. Έγινε επίσης πείραμα με ενεργό άνθρακα σε δοσολογία

2 gL<sup>-1</sup> και διαφορετικές δοσολογίες σακχαρόζης σε υπόστρωμα MS. Η επίδραση του ενεργού άνθρακα φάνηκε στην μείωση του μέσου αριθμού και του μέσου μήκους των βλαστών. Το ποσοστό υπερενυδάτωσης παρουσία άνθρακα κυμάνθηκε από 14- 19%. Η διαφορετική δοσολογία σακχαρόζης δεν φάνηκε να επηρεάζει ιδιαίτερα το φυτό. Τέλος έγινε πείραμα ριζοβολίας σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS. Το ποσοστό ριζοβολίας ήταν 89,2%. Ο εγκλιματισμός του φυτού *Ballota acetabulosa* σε *ex vitro* συνθήκες ήταν 100% επιτυχής σε μίγμα 1 τύρφη: 1 περλίτη (v/v).

**Λέξεις-κλειδιά:** *Ballotta acetabulosa*, υγρή, *in vitro*, καλλιέργεια, υπερενυδάτωση, βλαστογένεση, ριζοβολία, *ex vitro* εγκλιματισμός, συγκέντρωση άγαρ.



## Abstract

The *Ballota* genus of the Lamiacea family is a genus of about 25 species. *Ballota acetabulosa* is a perennial moss with a woody, ruthenium base, up to 60 cm high and is characterized as an aromatic plant, known by various names per region. Very resistant to drought, it thrives both in the sun and semi-shady places, on rocky and rocky slopes, clearing forests up to 1700 meters. Dried cocoons of the plant are used inverted in the oil as a wick and have a particular ornamental value since they remain for a long time in the flower stems and give an unusual form to the plant. Can be used in gardening, ideal for thematic Mediterranean gardens, planted with other similar plants. With massive planting creates unusual flower beds due to its shape. It can also be used as a soil cover in more or less gravelly soils. The plant is of interest to the pharmaceutical industry having anticonvulsant properties acting as anti-lytic antibacterial, tonic, astringent, diuretic, meningoid, expectorant, antioxidant and antispasmodic. In order to propagate the species in the present study, the *in vitro* proliferation of the species in solid and wet culture was studied and investigated to combat the problem of vitrification. The basic substrate of all *in vitro* cultures was MS. More specifically, the effect of various content of agar in MS substrates on both proliferation and rooting and on the problem of vitrification was studied. The agar contents tested were 5, 8 and 12 gL<sup>-1</sup>. The result was the lower agar content, the more evident the vitrified effect was, except for the liquid culture, where the phenomenon reached 100%. Still, the resistance of *Ballota acetabulosa* to the salt (10 gL<sup>-1</sup>) was tested on an MS substrate with two agar contents of 8 and 12 gL<sup>-1</sup>. The plant had no salt resistance and both the number and length of the shoots were low. However, in the presence of salt the plant had a zero degree of vitrification. An experiment was also carried out with charcoal at a content of 2 gL<sup>-1</sup> and different content of sugar on an MS substrate. The influence of activated carbon appeared to reduce the average number and mean length of the shoots. The rate of vitrifying the presence of activated carbon ranged from 14 to 19%. The different content of sugar did not appear to affect the plant. Finally a rooting experiment was performed on a

half strength substrate MS. The rooting percentage was 89.2%. The acclimatization of the *Ballota acetabulosa* plant at *ex vitro* conditions was 100% successful on a mix of 1peat: 1perlite (v/v).

**Keywords:** *Ballotta acetabulosa*, *in vitro* liquid tissueculture, hyherhydration, shooting, rooting, *ex vitro* acclimatization, agar concentration.

## Σκοπός της μελέτης

Η *Ballota acetabulosa* είναι πολυετής πόα με ξυλώδη βάση, φρύγανο, ύψους έως 60 cm. και χαρακτηρίζεται ως αρωματικό φυτό της οικογένειας Lamiaceae που φύεται στην Ελλάδα και τα δυτικά παράλια της Τουρκίας.

Η ιδιαίτερη καλλωπιστική του αξία και το ενδιαφέρον για τη φαρμακοβιομηχανία λόγω των φαρμακευτικών του ιδιοτήτων καθιστούν χρήσιμη την *in vitro* μελέτη του είδους. Πολύ ανθεκτικό στη ξηρασία, ευδοκimeί τόσο στον ήλιο όσο και σε ημισκιερά μέρη, σε πετρώδεις και βραχώδεις πλαγιές, ξέφωτα δασών έως τα 1700 μέτρα. Οι αποξηραμένοι κάλυκες του φυτού χρησιμοποιούνται ανεστραμμένοι στο λάδι ως φτιίλι ενώ έχουν και ιδιαίτερη καλλωπιστική αξία αφού παραμένουν επί μακρόν στα ανθικά στελέχη και δίνουν μια ασυνήθιστη μορφή στο φυτό.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κηποτεχνία, ιδανικό για θεματικούς Μεσογειακούς κήπους, φυτεμένο με άλλα παρόμοια φυτά. Με μαζική φύτευση δημιουργεί ασυνήθιστα παρτέρια, λόγω της μορφής του.

Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως φυτό εδαφοκάλυψης σε περισσότερο ή λιγότερο χαλικώδη εδάφη.

Γνωστό από την αρχαιότητα ο Διοσκουρίδης το αποκαλούσε «Γνωτέρα». Τόσο αυτός όσο και άλλοι γιατροί συνιστούσαν τα φύλλα του φυτού κοπανισμένα με αλάτι με μορφή καταπλάσματος ως αντίδοτο σε δαγκώματα σκύλων.

Το φυτό παρουσιάζει αντισπασμωδικές ιδιότητες και χορηγείται κυρίως στις περιπτώσεις κοκίτη των παιδιών και κατά των ψυχονευρώσεων.

Τα κυριότερα συστατικά του είναι φλαβονικά γλυκοσίδια, χλωρογενικό οξύ, ίχνη αιθέριου ελαίου και διτερπενλακτόνες και δρα ως αντιλυσσικό, αντιβακτηριδιακό, τονωτικό, στυπτικό, διουρητικό, εμμηναγωγό, αποχρεμπτικό, αντιοξειδωτικό και αντισπασμωδικό.

Με στόχο τη διάδοση του είδους ως καλλωπιστικό, αλλά και των φαρμακευτικών ιδιοτήτων που κατέχει το είδος, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε αρχικά ο *in vitro* πολλαπλασιασμός σε υγρό και στερεό υπόστρωμα και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη επίλυσης του προβλήματος της υπερενυδάτωσης.



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Η λεκάνη της Μεσογείου

Το κλίμα είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση ειδών μιας περιοχής. Οι περιοχές που απαντάται μεσογειακού τύπου κλίμα στον πλανήτη βρίσκονται μεταξύ 30<sup>ου</sup> και 40<sup>ου</sup> παραλλήλου βόρεια και νότια του Ισημερινού (Δ1 ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018).

Το μεσογειακού τύπου κλίμα χαρακτηρίζεται από μακρά άνυδρα καλοκαίρια με έντονη ηλιακή ακτινοβολία, ήπιους χειμώνες και βροχοπτώσεις που παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση από χρόνο σε χρόνο (Δ1 ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018).

Γενικά πάντως οι βροχοπτώσεις κυμαίνονται από 275 μέχρι 925 χιλιοστά βροχής σε ετήσια βάση και ο κύριος όγκος τους (65%) αντιστοιχεί στην περίοδο Νοεμβρίου - Απριλίου για το βόρειο ημισφαίριο και Μαΐου - Οκτωβρίου για το νότιο ημισφαίριο. Η ομοιότητα των κλιματικών συνθηκών στις διάφορες περιοχές της γης που απαντάται μεσογειακού τύπου κλίμα (μεσογειακή λεκάνη, νότια Καλιφόρνια, νοτιοδυτική Χιλή, νοτιοδυτική Αυστραλία, Ακρωτήριο Καλής Ελπίδας στη Νότιο Αφρική) οδήγησε και στην ομοιότητα των βιολογικών δομών (ζώων, φυτών και συστημάτων), προσαρμοσμένων στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου κλίματος. Το φαινόμενο είναι γνωστό ως συγκλίνουσα εξέλιξη και αναφέρεται στην περίπτωση ομοιότητας των οργανισμών λόγω κλιματικής ομοιότητας του περιβάλλοντος και όχι λόγω φυλογενετικής συγγένειας (Δ1 ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018).

Στα όρια του βροχομετρικού εύρους του μεσογειακού κλίματος έχουν αναπτυχθεί δύο ομάδες μεσογειακών οικοσυστημάτων με διαφορετικούς μηχανισμούς προσαρμογής στην καλοκαιρινή ξηρασία (Δ1 ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018).

Στο υγρό άκρο εμφανίζονται τα συστήματα αείφυλλων σκληρόφυλλων ειδών, ψηλοί, πυκνοί θαμνώνες, που ονομάζονται μακί και στο ξηρό άκρο συστήματα χαμηλών αραιών θάμνων που ονομάζονται φρύγανα (Δ1 ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018).

Επίσης στη χώρα μας εκτός από τους παραπάνω σχηματισμούς, που είναι χαρακτηριστικοί της μεσογειακής βλάστησης, παρουσιάζονται και τα συστήματα των μεσογειακών κωνοφόρων που συνδέονται περισσότερο με τις συνθήκες του εδάφους και την ανθρώπινη επέμβαση (Δ1 ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018).

Ξεκινώντας από τις θερμότερες προς τις ψυχρότερες περιοχές και από τα χαμηλά προς τα ψηλά αναπτύσσονται οι φυτικοί σχηματισμοί ή διαπλάσεις (Εικ. 1).



Εικ. 1. Χάρτης της λεκάνης της Μεσογείου

Πηγή:

<https://piotita.gr/2018/03/09/%CE%B1%CE%BD%CF%84%CF%8E%CE%BD%CE%B9%CE%BF%CF%82-%CF%86%CF%8E%CF%83%CE%BA%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CF%82-%CE%BF-%CE%B1%CE%BC%CF%8D%CE%B8%CE%B7%CF%84%CE%BF%CF%82-%CE%B8%CE%B7%CF%83%CE%B1%CF%85%CF%81%CF%8C/>

Η Μεσογειακή Λεκάνη είναι ένα από τα 34 hotspots βιο-ποικιλότητας της Γης (Myers *et al.*, 2000) που χαρακτηρίζονται, μεταξύ αυτών και η Ελλάδα (Stearn 1976), από την ύπαρξη πολλών ενδημικών φυτικών ειδών (Georghiou & Delipetrou 2010). Ένα ποσοστό περίπου 10% των φυτικών ειδών της Κρήτης είναι ενδημικά, αλλά ορισμένα εξ' αυτών –όπως το ακανθώδες φυτό *Ebenus cretica* με τα χαρακτηριστικά ροδόχρωα άνθη– είναι εξέχοντα χαρακτηριστικά της χλωρίδας της Κρήτης. Πέρα από την πλούσια βιοποικιλότητα και τα ενδημικά είδη, η χλωρίδα των Μεσογειακών περιοχών αποκαλύπτει προσαρμοστικούς μηχανισμούς, με τους οποίους αποκρίνεται στην παρατεταμένη περίοδο της ξηρασίας (Rhizoroulou 1997, Meletiou-Christou & Rhizoroulou 2012, Lopez-Iglesias *et al.*, 2014). Επίσης, πρέπει να ληφθεί υπ' όψη πως η ανθρώπινη δραστηριότητα έχει επηρεάσει τη χλωρίδα και

τη βλάστηση της Ανατολικής Μεσογείου, από την αρχαιότητα (Blonder *et al.*, 2015). Τα φρύγανα σχηματίζουν μια άλλη χαρακτηριστική διάπλαση φυτών σε Μεσογειακές περιοχές που δημιουργούν ένα φυσικό ανάγλυφο από χαμηλά, αρωματικά, ακανθώδη φυτά, που συνήθως δεν ξεπερνούν σε ύψος τα 60 cm (Margaris, 1981).

### 1.1.1 Φρύγανα

Αναπτύσσονται στις ξηρότερες περιοχές της χώρας και μέχρι υψόμετρο 300 περίπου μέτρων κι ακόμη σε περιοχές όπου η φωτιά και η βόσκηση έχουν υποβαθμίσει την προϋπάρχουσα βλάστηση. Απαρτίζονται από αραιούς και χαμηλούς θάμνους με μικρά και συχνά χνουδωτά φύλλα, αγκαθωτά κλαδιά και είναι προσαρμοσμένοι στη θερινή ξηρασία. Το όνομα τους προέρχεται από το Θεόφραστο με καταγωγή από την Ερεσό της Λέσβου (372-287 π.Χ), που θεωρείται ο πατέρας της Βοτανικής. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ο εποχικός διμορφισμός (μικρά φύλλα το καλοκαίρι, μεγάλα το χειμώνα), τον οποίο εμφανίζουν για τη ρύθμιση της ταχύτητας απώλειας του νερού μέσω της διαπνοής. Καλύπτοντας το έδαφος σε εξαιρετικά δυσμενείς συνθήκες παρέχουν προστασία από τη διάβρωση εξαιτίας του εκτεταμένου (για το μέγεθος τους) ριζικού συστήματος που διαθέτουν. Ανθίζουν την άνοιξη δημιουργώντας ένα πολύχρωμο και ελκυστικό περιβάλλον με ιδιαίτερα ευχάριστο άρωμα (Δ2 ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018).

Η μυρωδιά στα φρύγανα γίνεται ακόμη πιο έντονη το καλοκαίρι, όταν κάτω από την επίδραση των υψηλών θερμοκρασιών απελευθερώνουν αιθέρια έλαια. Κυρίαρχα είδη στα φρύγανα είναι: το θυμάρι (*Corydothymus capitatus*), η αστοιβή (*Sarcopoterium spinosum*), η γαλαστοιβή (*Euphorbia acanthothamnos*), το θρούμπι (*Satureja thymbra*), η ασφάκα (*Phlomis fruticosa*), η λαδανιά (είδη *Cistus*), η λεβάντα (*Lavandula stoechas*), η αφάνα (*Genista acanthoclada*), η ρίγανη (είδη *Origanum*), ο αμάραντος (*Helichrysum ciculum*), το λυχναράκι (*Ballota acetabulosa*), η ασμυριά (*Anthyllis hermaniae*), το ασπροθύμαρο (*Phagnalon graecum*) κ.ά. Από τα βολβώδη θερόφυτα, συνηθέστερα απαντώνται

ο ασφόδελος (*Asphodelus* sp.) και η σκυλοκρεμμύδα (*Urginea maritima*) (Δ2 ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018).

Τα φρύγανα καταλαμβάνουν το 12,5% της έκτασης της Ελλάδας και αναπτύσσονται κυρίως στην Αττική (Υμητός), στις Κυκλάδες (Εικ.2), στα Δωδεκάνησα, στην Κρήτη, στη Λήμνο, στην Κεφαλονιά και στη δυτική Αιτωλοακαρνανία. Στα βόρεια της χώρας η εξάπλωσή τους είναι μικρή και παρατηρούνται μόνο σε θέσεις όπου η βλάστηση έχει υποβαθμιστεί (Δ2 ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018).

Οι μεσογειακοί ξηροφυτικοί θάμνοι θα μπορούσαν να αναπτυχθούν επιτυχώς σε αστικά εκτατικού τύπου φυτοδώματα σε ημι-άνυδρες ή άνυδρες μεσογειακές περιοχές. Τα τοπικά προϊόντα, όπως το κομπόστ και ο περλίτης, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια καλή λύση για την κατασκευή ενός φυτοδώματος με φρύγανα στη Μεσόγειο (Parafotiou *et al.*, 2018).



Εικ. 2. Φυτό Λυχνάρακι, *Ballota acetabulosa*, ανθισμένο, σε τοίχο στην Αμοργό, Ελλάδα. Τα χνουδωτά φύλλα του φυτού, του επιτρέπουν να εξοικονομεί νερό, καταφέροντας έτσι να επιβιώνει στο άνυδρο μεσογειακό καλοκαίρι

Πηγή:

<http://www.nhmc.uoc.gr/el/museum/photoarchive/selection/images/nhmc.image.60285>



### 1.1.2 Πολλαπλασιασμός αυτοφυών της Μεσογειακής βλάστησης *in vitro*

Η βιοποικιλότητα της Ελλάδας σε φυτικά είδη, είναι μεταξύ των υψηλότερων της Ευρώπης και της Μεσογείου. Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα, η χλωρίδα της Ελλάδας συντίθεται από 6.600 ταξινομικές μονάδες (taxa), στις οποίες περιλαμβάνονται 5.752 αυτοφυή ή επιγενή είδη (Dimopoulos *et al.*, 2016). Οι αριθμοί αυτοί, όπως και το ποσοστό ενδημισμού που ανέρχεται σε 22% (αντιστοιχεί σε 1.462 taxa) είναι ιδιαίτερα υψηλοί για τη χλωρίδα μιας σχετικά μικρής σε έκταση χώρας της Ευρώπης και της Μεσογείου (Κοράκης, 2015). Η περιοχή των Βαλκανίων περιλαμβάνει 6.500-7.000 αυτοφυή είδη, εκ των οποίων τα 1.500 είναι ενδημικά (Polunin, 1980). Στην περιοχή της Πάρνηθας αναφέρεται η ύπαρξη 1.096 taxa (Arlada *et al.*, 2007) και του Τατοΐου 434 taxa (Paranikolaou and Sarlis, 1991). Η Ελλάδα χαρακτηρίζεται επίσης και από τη μεγάλη της βιοποικιλότητα σε επίπεδο γενετικό, τοπίων και φυτοκοινωνιών-οικοσυστημάτων.

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η εμπορική απαίτηση για τη χρήση αυτοφυών ειδών στο αστικό Μεσογειακό τοπίο, όπως υιοθετήθηκε για να διατηρήσει τον τοπικό χαρακτήρα του τοπίου και να ενισχύσει την βιοποικιλότητα (Parafotiou *et al.*, 2013). Τα τελευταία 20 χρόνια, ο μικροπολλαπλασιασμός ενός αριθμού ξυλωδών και μη ειδών που αυτοφύονται στην Ελλάδα έχει μελετηθεί στο εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής τοπίου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, ως ένα πρώτο βήμα για την εισαγωγή τους για εμπορική χρήση ως καλλωπιστικά φυτά. Είδη όπως το *Arbutus andrachne*, *Arbutus unedo*, *Dianthus fruticosus*, *Euphorbia characias*, *Globularia alypum*, *Lithodora zahnii*, x *Malosorbus florentina*, *Quercus euboica*, *Sideritis athoa* και *Thymelaea hirsute*, *Anthyllis barba-jovis* L., *A. Hermanniae* L., *Atriplex halimus* L., *Balota acetabulosa* L., *Calamintha cretica* L., *C. Nepeta* L., *Limoniastrum monopetalum* L., *Lomelosia cretica* L., *L. hymettia*, *Teucrium capitatum* L., *Thymelaea hirsuta* L., και *T. tartonraira*. Ένα αποτελεσματικό πρωτόκολλο πολλαπλασιασμού είναι το πρώτο βήμα για την εισαγωγή νέων ειδών στην παραγωγή. Ο μικροπολλαπλασιασμός δίνει σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα μεγάλες ποσότητες υγιούς και αξιόπιστου

πολλαπλασιαστικού υλικού και αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο διάδοσης και διατήρησης σπάνιων και απειλούμενων ειδών. Υπάρχουν επίσης αναφορές σχετικά με το μικροπολλαπλασιασμό σπάνιων και ενδημικών ειδών του είδους *Dianthus* (Cristea *et al.*, 2006, Berardi *et al.*, 2006, Prolic *et al.*, 2002, Kovac, 1995) και *E. characias calli*. (Fernandes-Ferreira, 1992). Για την *in vitro* καλλιέργεια των *Quercus euboica*, *Sideritis athoa* και *Thymelaea hirsute*, *Arbutus andrachne*, *Arbutus unedo*, *Dianthus fruticosus*, *Euphorbia characias*, *Globularia alypum*, *Lithodora zahnii*, χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα κορυφές βλαστών ή κόμβοι από νεαρούς βλαστούς, με εξαίρεση το  $\times$  *M. florentina* όπου χρησιμοποιήθηκαν οφθαλμοί από ξυλώδεις βλαστούς. Οι *in vitro* καλλιέργειες *A. andrachne*, *A. unedo*,  $\times$  *M. florentina* και *Q. euboica* εγκαταστάθηκαν επιτυχώς από έκφυτα ενηλίκων φυτών που αναπτύσσονται στο φυσικό περιβάλλον, ενώ των *D. fruticosus*, *E. characias*, *G. alypum*, *L. zahnii*, *S. athoa* και *Th. hirsuta* δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας σπορόφυτα ως μητρικά φυτά. Μια εποχική επίδραση στην εγκατάσταση των καλλιεργειών βρέθηκε στο *A. andrachne*,  $\times$  *M. florentina* και *Q. euboica*. Τα δύο είδη *A. andrachne* και το *Q. euboica* καλλιεργήθηκαν επιτυχώς σε στερεό υπόστρωμα WPM συμπληρωμένο με 100 mg /L μισοϊνσιτόλη, 1 mg /L θειαμίνη, 0,5 mg /L νικοτινικό οξύ και 0,5 mg /L πυριδοξίνη, τα υπόλοιπα είδη καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS. Το υπόστρωμα συμπληρώθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις με μια κυτοκινίνη συνδυασμένη σε μερικές περιπτώσεις με μία αυξίνη για παραγωγή βλαστών. Μικροβλαστοί όλων των ειδών εγκλιματίστηκαν επιτυχώς (70 - 100%) και εγκαταστάθηκαν *ex vitro* σε τύρφη-περλίτη, εκτός του *Q. euboica* που χρειάστηκε έδαφος του φυσικού του περιβάλλοντος για επιτυχή εγκλιματισμό εξαιτίας της παρουσίας μυκόριζας. Οι καλλιέργειες *in vitro* των *A. andrachne*, *A. unedo* και *Q. euboica* ξεκίνησαν με επιτυχία με έκφυτα που είχαν αποκοπεί από ενήλικα φυτά που αναπτύσσονταν στη φύση (Bertsouklis and Papafotiou, 2009, Limiatis *et al.*, 2001, Papafotiou and Martini, 2009, Kartsonas και Papafotiou, 2009, αντίστοιχα). Τα έκφυτα από τα νεαρά φυτά των *A. andrachne* και *Q. euboica* είχαν παρόμοια αντίδραση (Bertsouklis and Papafotiou, 2009, Kartsonas and Papafotiou, 2009). Τα *A. andrachne* και *Q. euboica* ανταποκρίθηκαν καλύτερα κατά τη διάρκεια της άνοιξης (Μάιος) από ό, τι αργότερα κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής

περιόδου, καθώς το 80 και 75% αντίστοιχα των εκφύτων που τοποθετήθηκαν σε καλλιέργεια κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου παρήγαγαν βλαστούς.

Το *Atriplex halimus* L. είναι ένα αυτοφυές φυτό, αείφυλος, πολυετής θάμνος, ευρέως ευρισκόμενος στις παράκτιες περιοχές της Μεσογείου. Διεξήχθησαν επιτυχώς καλλιέργειες *in vitro* από έκφυτα κορυφής βλαστών που αποκόπηκαν την άνοιξη από φυτά θερμοκηπίου. Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν είτε σε υπόστρωμα MS άνευ ορμονών είτε σε συμπληρωμένο με 1,0 mg L<sup>-1</sup> BA, ZEA, 2iP, KIN ή TDZ (Parafotiou *et al.*, 2016).

Στο *Globularia alypum* L., ένα αειθαλή μικρό θάμνο, που απαντάται σε ξηρές και βραχώδεις περιοχές των μεσογειακών χωρών (Polunin, 1987) και ανθίζει από τον Νοέμβριο έως τον Μάιο, εξετάστηκε η επίδραση των ρυθμιστών ανάπτυξης *in vitro* για βλαστογένεση. Μία ικανοποιητική *in vitro* εγκατάσταση (80-100%) ελήφθη με την χρησιμοποίηση εκφύτων κόμβου από νεαρά φυτά. Μεγαλύτερο ποσοστό των ειδών *Quercus euboica*, *Sideritis athoa* και *Thymelaea hirsute*, *Arbutus andrachne*, *Arbutus unedo*, *Dianthus fruticosus*, *Euphorbia characias*, *Globularia alypum* και *Lithodora zahnii*, (80%) εγκαταστάθηκε επιτυχώς σε υπόστρωμα MS χωρίς προσθήκη φυτορρυθμιστικής ουσίας, αλλά τα περισσότερα είδη εμφάνισαν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε μέσα συμπληρωμένα με βενζυλαδενίνη (BA), κιζετίνη (KIN) και ζεατίνη (ZEA). Η ριζοβολία, επηρεάστηκε από το γονότυπο και σχεδόν το ήμισυ των ειδών ριζοβόλησε με επιτυχία (80-100%), ενώ το *A. halimus* έδειξε κακή ριζοβολία και ο *T. hirsuta* και ο *T. tartonraira* απέτυχαν να ριζοβολήσουν. Αν και το 50% των ειδών είχαν ριζοβολήσει αποτελεσματικά σε μισής δύναμης υπόστρωμα MS, το 3-ινδολοβουτυρικό οξύ (IBA) αύξησε το ποσοστό των ριζοβολημένων ειδών. Το υψηλότερο ποσοστό των ριζοβολημένων ειδών (80%) παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα με 1,0 mg L<sup>-1</sup> IBA. Ο εγκλιματισμός *ex vitro* σε μίγμα τύρφης: περλίτη (1: 1, v / v) ήταν εξαιρετικά επιτυχής (90- 100%) για όλα τα είδη που ριζοβόλησαν (Parafotiou, 2010).

### 1.1.3 Οικογένεια Lamiaceae (Labiatae, Mint family, Χειλανθή)

Η οικογένεια Lamiaceae περιλαμβάνει ποώδη ή ημιθαμνώδη φυτά των ξηρών και θερμών περιοχών της Γης και ιδιαίτερα, λόγω εδαφοκλιματικών συνθηκών, των παραμεσογειακών περιοχών. Χαρακτηρίζονται από **i)** τον τετράγωνο βλαστό, **ii)** τα αντίθετα και ανά ζεύγος σταυροειδώς τοποθετημένα φύλλα, **iii)** τα ισχυρώς ζυγόμορφα άνθη με τη δίχειλη στεφάνη (εξού και Χειλανθή ή Χειλοστέφανα), **iv)** τον ξηρό καρπό που διασπάται σε τέσσερα μονόσπερμα καρπίδια (κάρυα) και **v)** την αρωματική οσμή που αναδύεται από τα ελαιοφόρα τριχώματα των φύλλων και των βλαστών, όταν αυτά τρίβονται ή τραυματίζονται. Η οικογένεια των Χειλανθών αποτελεί ενιαίο φυσικό άθροισμα με σαφείς φυλογενετικές σχέσεις προς την οικογένεια Verbenaceae. Τα άνθη φύονται στις μασχάλες των φύλλων κατά βότρυ ή κατά ψευδοσπόνδυλο μονοχάσιο ή διχάσιο. Η ωθήκη αποτελείται από δύο συμφυή καρπόφυλλα και χωρίζεται με ψευδοδιάφραγμα σε τέσσερις χώρους, στους οποίους περιέχεται ανά μια ανάτροπη σπερματική βλάστη. Ο στύλος είναι απλός και καταλήγει σε δισχιδές στίγμα. Ο καρπός είναι σχιζοκάρπιο, σπανίως δρύπη και κάθε καρπίδιο ή μικροπύλη και το ριζίδιο είναι στραμμένο προς τα κάτω. Τα σπέρματα περιέχουν ευθύ έμβρυο και μικρή ποσότητα ενδοσπερμίου. Τα Χειλανθή χαρακτηρίζονται από ποικιλία προσαρμογών, τόσο ως προς τον τρόπο επικονιάσεως (εντομόφιλα, πτηνόφιλα), όσο και προς τα μέσα διασποράς των καρπιδίων (ανεμόχωρα, ζωόχωρα ή και υδρόχωρα). Στην οικογένεια των Χειλανθών περιλαμβάνονται περίπου 3500 είδη ευρύτατης εξαπλώσεως, χρήσιμα και πολύτιμα ως αρωματικά, φαρμακευτικά, αρτυματικά, μελισσοτροφικά και καλλωπιστικά (Σαρλής, 1999).

Η οικογένεια Lamiaceae διαθέτει πολλά φαρμακευτικά φυτά και βότανα, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών ζώων και ανθρώπων. Για αυτό το λόγο έγιναν έρευνες πάνω στα φυτά αυτής της οικογένειας και μελετήθηκαν οι αντιμικροβιακές δράσεις τριών αιθέριων ελαίων σε πέντε βακτηριακά είδη (*Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) που ελήφθησαν από την American

Type Culture Collection. Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ρίγανη (*Origanum vulgare* L.), θυμάρι (*Thymus vulgaris* L.) και άγριο θυμάρι (*Thymus serpyllum* L.), όλα μέλη της οικογένειας Lamiaceae. Για την επίτευξη του στόχου αυτού χρησιμοποιήθηκε ο *in vitro* πολλαπλασιασμός. Όλα τα έλαια έδειξαν αντιμικροβιακή δράση στα χρησιμοποιούμενα βακτηριακά στελέχη. Το ισχυρότερο αντιβακτηριδιακό αποτέλεσμα επετεύχθη από αιθέριο έλαιο ρίγανης, ενώ το έλαιο που εξήχθη από το άγριο θυμάρι ήταν λιγότερο δραστικό. Η αντιβακτηριδιακή δράση των αιθέριων ελαίων μειώθηκε με τη μείωση της συγκέντρωσης, ανεξάρτητα από τα βακτήρια που ελέγχθηκαν (Levic Jovanka *et al.*, 2011). Μια ακόμα μελέτη έγινε σε φυτά της οικογένειας Lamiaceae στην Τουρκία, όπου σχεδιάστηκε για να αξιολογήσει την *in vitro* αντιμικροβακτηριακή δραστηριότητα δεκαοκτώ ακατέργαστων εκχυλισμάτων από έξι φυτά (Lamiaceae) και να χαρακτηρίσει τα φαινολικά και τις φαλινοειδείς τους ενώσεις. Χρησιμοποιήθηκαν έξι τουρκικά φαρμακευτικά φυτά της οικογένειας Lamiaceae (*Stachys tmolea* Boiss., *Stachys thirkei* C. Koch, *Ballota acetabulosa* (L.) Benth. (Εικ. 3), *Thymus siphthorpii* Benth., *Satureja aintabensis* P.H. Davis και *Micromeria juliana* (L.) Benth. Πρώην Reich). Ξηραμένα και θρυμματισμένα φυτικά δείγματα υποβλήθηκαν σε διαδοχική εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα και μεθανόλη. Η μέθοδος μικροδιέλευσης ζωμού χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση εκχυλισμάτων έναντι τεσσάρων μυκοβακτηριακών στελεχών του *Mycobacterium tuberculosis*. Το αποτέλεσμα ήταν ότι τα είδη *S. aintabensis*, *T. Sibthorpii* και *M. Juliana* βρέθηκαν να αναπτύσσουν σημαντική δραστηριότητα έναντι των τεσσάρων στελεχών του *M. tuberculosis* (Tulin Askun *et al.*, 2013). Άλλη μια πειραματική έρευνα *in vitro* έγινε για να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική δράση ορισμένων ειδών *Teucrium*. Η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται κυρίως σε φαινολικά συστατικά, όπως φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και φαινολικά διτερπένια. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται κυρίως στις οξειδοαναγωγικές ιδιότητές, οι οποίες μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση και εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών, στην εξουδετέρωση του απλού και τριπλού οξυγόνου ή στην αποδόμηση των υπεροξειδίων. Διερευνήθηκε η χημική σύνθεση και η αντιοξειδωτική δράση διαφόρων εκχυλισμάτων (διαιθυλαιθέρας, οξικός αιθυλεστέρας και η-βουτανόλη) που ελήφθησαν από είδη *Teucrium* (*T.*

*Chamaedrys*, *T. Montanum*, *T. Polium*) και η φυτοχημική διαλογή των φυτικών εκχυλισμάτων απέδειξε την παρουσία φλαβονοειδών λουτεολίνης, απιγενίνης και / ή διοσμετίνης. Η χημική σύνθεση των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε με HPLC και φασματοφωτομετρία. Οι αντιοξειδωτικές δραστηριότητες των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας τρεις συμπληρωματικές *in vitro* δοκιμασίες: αναστολή DPPH (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλ) και υδροξυλ ριζών και προστασία του μοντέλου συστήματος α-καροτενίου-λινολεϊκού οξέος. Αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι τα είδη *Teucrium* έχουν δυνατότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών και ριζών υδροξυλίου καθώς και αντιοξειδωτική δράση *in vitro* (Tatjana Kadifkova Pavoska *et al.*, 2005).

#### 1.1.4 Το γένος *Ballota*

Το γένος *Ballota* L. περιλαμβάνει 33 έως 35 είδη που ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae, φυλή Stachydae, υποφυλή Ballotae (Didry *et al.*, 1999, Hassanzadeh *et al.*, 2011, Majdi, 2017). Το γένος *Ballota* αποτελείται από πολυετή βότανα και θάμνους χαμηλής ανάπτυξης που προέρχονται από εύκρατες περιοχές της Ασίας, της Αφρικής και της Ευρώπης, με την υψηλότερη ποικιλομορφία στην περιοχή της Μεσογείου (Savona *et al.*, 1977a, b, c, 1982, De Lerma *et al.*, 1980, Rechinger, 1982, Davies-Coleman and Rivett, 1990, Zargari, 1990, Ψάρας και Ριζοπούλου, 1995, Mozaffarian, 1996, Seidel *et al.*, 1996a, 1997, 2000, Cullen, 2001, Tenenbaum, 2003, Ahmad *et al.*, 2004a, b, Çitoğlu *et al.*, 2004a, Hussein *et al.*, 2007, Tóth *et al.*, 2007, Vrchovska *et al.*, 2007, Vukovic *et al.*, 2009, Abdelshafeek *et al.*, 2010, El-Deen Osman, 2012, Kheira *et al.*, 2015, Đorđević *et al.*, 2016). Βρίσκεται σε βραχώδη εδάφη. Το γένος *Ballota* περιέχει επτά είδη στην Ευρώπη (Couladis *et al.*, 2002). Το *B. nigra* (Κοινή ονομασία: Black horehound) έχει ευρεία κατανομή στην Ευρώπη και αποτελείται από διάφορα υποείδη (Tóth *et al.*, 2007, Majdi *et al.*, 2017). Το *B. nigra* έχει διασπαρεί στις περισσότερες περιοχές του κόσμου (Majdi *et al.*, 2017). Τα είδη *Ballota* χρησιμοποιούνται ως τροφή από τις προνύμφες κάποιων λεπιδοπτέρων, συμπεριλαμβανομένων των κολεοφόρων Coleophora: *C. ballotella*, *C. lineolea* (που

έχει καταγραφεί επί του *B. nigra*) και *C. ochripennella*. Τα είδη του γένους *Ballota* είναι:

1. *Ballota acetabulosa* (L.) Benth. - Ελλάδα, Τουρκία
2. *Ballota adenophora* Hedge - Σαουδική Αραβία
3. *Ballota africana* (L.) Benth. - Νότια Αφρική, Ναμίμπια
4. *Ballota andreuzziana* Pamp. - Λιβύη
5. *Ballota antilibanotica* Post - Συρία, Λίβανο
6. *Ballota aucheri* Boiss. - Ιράν, Ιράκ
7. *Ballota bullata* Pomel. - Αλγερία, Τυνησία
8. *Ballota byblensis* Semaan & R.M.Haber - Λίβανο
9. *Ballota cristata* P.H. Davis - Αττάλεια της Τουρκίας
10. *Ballota damascena* Boiss. - Συρία, Αίγυπτος
11. *Ballota deserti* (de Noé) Jury, Rejdali & A.J.K.Griffiths - Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία, Λιβύη, Μαυριτανία
12. *Ballota glandulosissima* Hub.-Mor. & Patzak - Τουρκία
13. *Ballota grisea* Pojark. - Καύκασος
14. *Ballota hirsuta* Benth. - Ισπανία, Πορτογαλία, Βαlearίδες Νήσους, Αλγερία, Μαρόκο, Τυνησία, Τσαντ
15. *Ballota hispanica* (L.) Benth- Ιταλία, Σικελία, Αλβανία, Γιουγκοσλαβία
16. *Ballota inaequidens* Hub.-Mor. & Patzak - Αττάλεια της Τουρκίας
17. *Ballota kaiseri* Täckh.- Σινά
18. *Ballota larendana* Boiss. & Heldr. – Τουρκία
19. *Ballota latibracteolata* P.H. Davis & Doroszenko - Αττάλεια της Τουρκίας
20. *Ballota luteola* Velen - Σαουδική Αραβία
21. *Ballota macedonica* Vandas - Αλβανία, Γιουγκοσλαβία, Ελλάδα
22. *Ballota macrodonta* Boiss. & Balansa - Τουρκία
23. *Ballota nigra* (L.) - Ευρώπη, Βόρεια Αφρική, Μέση Ανατολή, Ιράν, Νέα Ζηλανδία, Αργεντινή, Βόρεια Αμερική
24. *Ballota philistaea* Bornm. - Ισραήλ
25. *Ballota platyloma* Rech. F. - Ιράν

26. *Ballota pseudodictamnus* (L.) Benth. - Ελλάδα, Τουρκία, Αίγυπτος, Λιβύη, Ιταλία
27. *Ballota rotundifolia* K. Koch - Τουρκία
28. *Ballota saxatilis* Sieber ex C. Presl - Μέση Ανατολή από την Τουρκία προς τη Σαουδική Αραβία
29. *Ballota sechmenii* Gemici & Leblebici - Τουρκία
30. *Ballota undulata* (Sieber ex Fresen.) Benth. - Μέση Ανατολή από τη Συρία στη Σαουδική Αραβία
31. *Ballota vellerea* Maire, Weiller & Wilczek – Μαρόκο

Το γένος *Ballota* είναι δικοτυλήδονο της οικογένειας Λαμπιατών ή Χειλωδών με 25 είδη ενδημικά της Ευρώπης, της εύκρατης Ασίας και της Βόρειας και Νότιας Αφρικής. Το είδος *Ballota acetabulosa* είναι πολυετής πόα, τριχωτή, εριώδης με πολύκλαδο βλαστό, έμφυλλο. Τα άνθη της είναι λευκά η ερυθρά. Διαθέτει σωληνωειδή κάλυκα με μεμβρανώδη ακέραια χείλη ή κολπωτά ή οδοντωτά με 5 δόντια, σχεδόν ισομήκη, διαθέτει δίχειλη στεφάνη με ισομήκη σωλήνα, ωθηήκη επιφυή τετράλοβη με απλό στύλο φυόμενο από το κέντρο αυτής με σχήμα δισχιδές (Καββάδας, 1956). Οι μικρομορφολογικοί χαρακτήρες των τριχιδίων είναι πολύτιμοι για τον διαχωρισμό των ειδών *Ballota* (Osman, 2012).



Εικ. 3. Άνθος του φυτού *Ballota acetabulosa* της οικογενείας Lamiales



Πηγή: <https://kentromeletisarxaiasthourias.wordpress.com/2016/06/21/ballota-acetabulosa-%CE%B2%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CF%89%CF%84%CE%AE-%CE%B7-%CE%BA%CF%81%CE%B1%CF%84%CE%B7%CF%81%CE%BF%CE%B5%CE%B9%CE%B4%CE%AE%CF%82%CE%BB%CF%85%CF%87%CE%BD%CE%B1%CF%81%CE%AC%CE%BA%CE%B9/>

Πολλά είδη φυτών χρησιμοποιούνται στη λαϊκή ιατρική για διαφορετικούς σκοπούς. Το αυτόχθον σύστημα λαϊκών φαρμάκων από τους ντόπιους έχει ασκηθεί εδώ και αιώνες και εξαπλώνεται (Ahmad *et al.*, 2014). Τα φαρμακευτικά φυτά αποτελούν ένα από τα κύρια ερευνητικά ενδιαφέροντα της εθνοβοτανικής και η μελέτη των πόρων αυτών έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία για τις επιστημονικές κοινότητες (Heinrich, 2000, Heinrich and Gibbons, 2001). Ορισμένα είδη *Ballota* έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για τη θεραπεία της ναυτίας, του εμετού, της νευρικής δυσπεψίας, των τραυμάτων και της φλεγμονής του ανώτερου αναπνευστικού. Επίσης έχουν αντιβακτηριακές, αντιπηκτικές, αντισπασμωδικές, διουρητικές, χολερετικές, ήπια στυπτικές, καταπραϋντικές ουσίες και αντιαμοροϊδικές (Vural *et al.*, 1996, Çitoğlu *et al.*, 1998, 2004a, Tóth, 2009, Dulger and Sener, 2010, Yazgan *et al.*, 2010, Dulger και Kilcik, 2011, Dulger and Dulger, 2012, 2017, Đorđević, 2016). Τα εναέρια μέρη του *B. nigra* χρησιμοποιούνται στην ιατρική εσωτερικά σε μορφή υγρών εκχυλισμάτων και βάμματα. Αυτό το φυτό χρησιμοποιείται επίσης εξωτερικά (Fleming *et al.*, 2000). Ο Ibn al-Baytar, ένας επιστήμονας του 13ου αιώνα, περιέγραψε τον *B. Nigra* (για τη θεραπεία αιμορροΐδων, δαγκωμάτων ζώων, τραυμάτων, έλκη και πληγές (El-Gharbaoui *et al.*, 2017). Το *B. Nigra* έχει αντιεμετικά, νευρικά, στυπτικά και αποχρεμπτικά αποτελέσματα (Hoffmann, 2003, Al-Snafi, 2015). Ο τρόπος δράσης των διεγερτικών, αντιεμετικών και αντισπασμωδικών ενεργειών του *B. nigra* δεν έχει εξηγηθεί ικανοποιητικά (Fleming *et al.*, 2000).

Τα είδη *Ballota* περιέχουν μεγάλη ποικιλία φυτοχημικών κατηγοριών (Erdogan-Orhan *et al.*, 2010). Τα τερπενοειδή, τα φλαβονοειδή, τα φαινυλοπροπανοειδή, τα φαινολικά οξέα, τα ιριδοειδή, τα σεκοϊριδοειδή, τα αιθέρια έλαια, οι τανίνες, οι σαπωνίνες, τα οργανικά οξέα, τα λιπαρά οξέα, τα παράγωγα βεταΐνης και οι φυτοστερόλες απομονώθηκαν από τα είδη *Ballota* (Tanker *et al.*, 1986, Blunden *et*

*al.*, 1996, Yilmaz and Çitoğlu, 2003b, Scott *et al.*, 2004, Siciliano *et al.*, 2005, Vrchovská *et al.*, 2007, Abdelshafeek *et al.*, 2010, Erdogan Orhan *et al.*, 2010, Askun *et al.*, 2013). Τα τερπενοειδή και τα φλαβονοειδή αναγνωρίστηκαν ως οι κύριες φυτοχημικές κατηγορίες του γένους *Ballota* (Merikli *et al.*, 1988, Couladis *et al.*, 2002, Çitoğlu *et al.*, 2005b, Siciliano *et al.*, 2005, Erdogan-Orhan *et al.*, 2010, Rustaiyan *et al.*, 2017).

#### ➤ Τερπενοειδή

Τα διατερπενοειδή Labdane είναι τα πιο κοινά τερπενοειδή που απομονώνονται από τα εκχυλίσματα των ειδών *Ballota*. Οι φυτοχημικές έρευνες των ειδών *Ballota* έδειξαν ότι το γένος είναι πλούσια πηγή διτερπενοειδών φουρανολαμπτανίου (Bruno *et al.*, 2001, Gray *et al.*, 2003, Rustaiyan *et al.*, 2017). Τα διτερπενοειδή της φουρανολαβδάνης, π.χ. η βαλλονιγρίνη, η δεϋδρο-ισπανολόνη και η ισπανολόνη βρέθηκαν ως τα πλέον κοινά διτερπενοειδή φουρανολαβδάνης που απομονώθηκαν από τα εκχυλίσματα των ειδών *Ballota* (Través *et al.*, 2013, Endringer *et al.*, 2014).

#### ➤ Φλαβονοειδή, φαινυλοπροπανοειδικές γλυκοσίδες και άλλες φαινολικές ενώσεις

Το γένος *Ballota* είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, όπως φλαβονοειδή, φαινυλοπροπανοειδή και φαινολικά οξέα (Seidel *et al.*, 2000, Abdelshafeek *et al.*, 2010, Makowczykńska *et al.*, 2015). Σε μία μελέτη σε 16 είδη *Ballota*, το *B. glandulosissima* περιείχε το μεγαλύτερο ποσοστό φλαβονοειδών και το *B. nigra subsp.* είχε την μεγαλύτερη ποσότητα παραγώγων ορθο-διυδροξυκιναμικού οξέος (Yilmaz *et al.*, 2015). Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν ποικίλες βιολογικές δραστηριότητες, όπως αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιπρωτοζωικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές δραστηριότητες (Kim *et al.*, 2004, Cushnie and Lamb 2005, Tasdemir *et al.*, 2006, Chahar *et al.*, 2011). Οι φαινυλοπροπανοειδείς γλυκοσίδες παρουσιάζουν έναν αριθμό βιολογικών δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, αντι-πολλαπλασιαστικών, αντιβακτηριακών, αντι-ιικών, αντιφλεγμονωδών και ηπατοπροστατευτικών

δραστικότητων (Didry *et al.*, 1999, Daels-Rakotoarison *et al.*, 2000, Pieroni 2000, Seidel *et al.*, 2000, Khong and Judeh, 2017).

➤ **Λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες και άλλες φυτοχημικές κατηγορίες**

Συνθέσεις λιπαρών οξέων του *Ballota spp.* μπορεί να είναι χρήσιμες στην ταξονομία αυτού του γένους. Οι σπόροι *B. cristata* που συλλέχθηκαν στην Τουρκία περιείχαν 20% ολικού λιπαρού οξέος μεταξύ των οποίων το 14,24% ήταν κορεσμένα και το 85,87% ήταν ακόρεστα. Τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα ήταν το λινελαϊκό οξύ, το ελαϊκό οξύ και το τρινικό οξύ (Tirirdamaz and Guvenc, 2004).

Τα λιπαρά οξέα ( 35,28% κορεσμένα και 4,72% ακόρεστα) βρέθηκαν στο *B. andreuzziana* που συλλέχθηκε από τη Λιβύη, το παλαμικό οξύ (27,28%) και το λινελαϊκό οξύ (57,05%) ήταν οι κύριες ενώσεις αυτού του φυτού (Abdelshafeek *et al.*, 2010). Παλμιτικά (36,0%) και λινελαϊκά οξέα (14,3%) ταυτοποιήθηκαν επίσης ως οι κύριες ενώσεις στο εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα του *B. nigra* subsp. (Ertaş *et al.*, 2014). Οι κύριες λιπαρές αλκοόλες του *B. andreuzziana* που συλλέχθηκαν από τη Λιβύη ήταν οκταδεκανόλη (46,07%), τετρακοσανόλη (16,31%), οκτακοσανόλη (13,30%), νονακοσανόλη (12,47%) και εξακοσανόλη (11,85%) (Abdelshafeek *et al.*, 2010). Οι φυτοστερόλες, οι σαπωνίνες και οι ταννίνες βρέθηκαν σε μέγιστες ποσότητες στο εκχύλισμα μεθανόλης των φύλλων του *B. nigra* που συλλέχθηκε στην Ινδία, το υδατικό εκχύλισμα έδειξε καλή ποσότητα κουμαρινών (Nishandhini *et al.*, 2017). Υπάρχουν πολύ λίγες αναφορές σχετικά με την παρουσία αλκαλοειδών στο γένος *Ballota*, συμπεριλαμβανομένης της μέτριας παρουσίας αλκαλοειδών στο εκχύλισμα μεθανόλης, το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα, το κλάσμα η-βουτανόλης, η ασθενής παρουσία αλκαλοειδών στο κλάσμα χλωροφορμίου και το υδατικό κλάσμα του *B. limbata* που συλλέχθηκαν στο Πακιστάν (Waheed *et al.*, 2014).

➤ **Συνθέσεις αιθέριων ελαίων**

Το όνομα *Ballota* προέκυψε από την ελληνική λέξη "μπαλο", λόγω της έντονης οσμής τους. Το *B. nigra* έχει μια δυσάρεστη οσμή αιθέριου ελαίου (Fleming *et al.*, 2000). Είδη *Ballota* διαφορετικής προέλευσης έδωσαν 0,02-0,5% (w / w) αιθέριο έλαιο.

Από μελέτες που έχουν γίνει, ορισμένα εκχυλίσματα, αιθέρια έλαια και ενώσεις που απομονώθηκαν από τα είδη *Ballota* έδειξαν ποικίλες φαρμακευτικές ιδιότητες. Κάποιες από αυτές είναι: δραστηριότητα αντιβιοφίλμ, δραστηριότητα αντιχολινεστεράσης, αντιφλεγμονώδης δράση, αντιμικροβιακή δράση, αντιοξειδωτική δραστηριότητα, αντιοξειδωτική δράση, δραστηριότητες κατά του πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας, αντιπρωτοζωική δραστηριότητα, αντιβηχική δραστηριότητα, αγχολυτική δράση, προστατευτική δραστηριότητα, υπογλυκαιμική δράση, υπογλυκαιμική δράση, ανασταλτική δραστηριότητα λιποξυγενάσης, κατασταλτική-υπνωτική δραστηριότητα (Ghanbarimasir Z. and Morteza-Semnania K., 2018).

Το 2003 πραγματοποιήθηκε πείραμα σχετικά με τις αντιμικροβιακές δραστηριότητες 16 taxa *Ballota* που αναπτύσσονται στην Τουρκία. Χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστο αιθανολικό εκχύλισμα έναντι θετικών και αρνητικών κατά gram βακτηριακών στελεχών σε μελέτη *in vitro*. Το ακατέργαστο αιθανολικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε επίσης έναντι διαφορετικών μυκητικών στελεχών (*C. krusei*, *C. Glabrata* και *C. albicans*). Οι αντιμικροβιακές δραστηριότητες πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα είδη *Ballota* ήταν καλά αντιμικροβιακά και εξαιρετικά αντιφλεγμονώδη (Ullah *et al.*, 2014).

Για όλες αυτές τις φαρμακευτικές χρήσεις που παρουσιάζει το γένος *Ballota* καθώς και μια σειρά από φυτοχημικές κατηγορίες που εμφανίζει κρίνεται απαραίτητη η μελέτη του τρόπου πολλαπλασιασμού των διαφόρων ειδών του και ιδιαίτερα ο *in vitro* πολλαπλασιασμός του.

### **1.1.5 Το είδος *Ballota acetabulosa***

Το φυτό *Ballota acetabulosa* L., γνωστό ως βαλλωτή, είναι πολυετής πόα με ξυλώδη βάση, φρύγανο, ύψους έως 60 cm και χαρακτηρίζεται ως αρωματικό φυτό (Εικ. 4). Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae (Labiatae) και άλλες ονομασίες του είναι: Λυχνάρακι, Φουφουλιά (Τήνος), Φάσσα (Αίγινα), Νεροβαμβακιά (Πελοπόννησος), Μαυρομάργο (Αττική), Μαυρομάρκος (Κύθνος), Αποπουλιά, Οικονομία,

Καντηλαναούτρα. Πολύ ανθεκτικό στη ξηρασία, ευδοκίμει τόσο στον ήλιο όσο και σε ημισκιερά μέρη, σε πετρώδεις και βραχώδεις πλαγιές, ξέφωτα δασών έως τα 1.700 m. Είναι ενδημικό είδος της Ελλάδας και των δυτικών παραλίων της Τουρκίας (Εικ. 5) (Ζαχαράκη Σ., 2012).

Το όνομα του είδους προέρχεται από το λατινικό *Acetabulum* που ονόμαζαν οι Ρωμαίοι ένα μικρό δοχείο για το ξύδι. Οι αποξηραμένοι κάλυκες του φυτού χρησιμοποιούνται ανεστραμμένοι στο λάδι ως φιτίλι ενώ έχουν και ιδιαίτερη καλλωπιστική αξία αφού παραμένουν επί μακρόν στα ανθικά στελέχη και δίνουν μια ασυνήθιστη μορφή στο φυτό. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κηποτεχνία, ιδανικό για θεματικούς μεσογειακούς κήπους, φυτεμένο με άλλα παρόμοια φυτά. Με μαζική φύτευση δημιουργεί ασυνήθιστα παρτέρια, λόγω της μορφής του. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως φυτό εδαφοκάλυψης σε περισσότερο ή λιγότερο χαλικώδη εδάφη (Ζαχαράκη Σ., 2012).



Εικ. 4. Φυτό *Ballota acetabulosa*

<https://kentromeletisarxaiasthourias.wordpress.com/2016/06/21/ballota-acetabulosa-%CE%B2%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CF%89%CF%84%CE%AE-%CE%B7-%CE%BA%CF%81%CE%B1%CF%84%CE%B7%CF%81%CE%BF%CE%B5%CE%B9%CE%B4%CE%AE%CF%82-%CE%BB%CF%85%CF%87%CE%BD%CE%B1%CF%81%CE%AC%CE%BA%CE%B9/>

### 1.1.5.1 Ιστορικά στοιχεία του είδους *Ballota acetabulosa*

Είναι βότανο γνωστό από την αρχαιότητα και ο Διοσκουρίδης το αποκαλούσε «Γνωτέρα». Τόσο αυτός όσο και άλλοι γιατροί συνιστούσαν τα φύλλα του φυτού κοπανισμένα με αλάτι με μορφή καταπλάσματος ως αντίδοτο σε δαγκώματα σκύλων. Τη χρησιμοποιούσαν ακόμα για την αντιμετώπιση των κονδυλωμάτων και των ελκών κάθε είδους και μορφής. Μετά τα μέσα της Βυζαντινής Αυτοκρατορίας, χρησιμοποιούσαν το βότανο στην εμπειρική ιατρική. Επίσης, θεωρείται άριστο ανθελμινθικό φάρμακο και ιδίως κατά των ασκαρίδων και των οξουόρων κατά των οποίων μάλιστα χρησιμοποιήθηκε και ο πυκνός χυμός του φυτού σε υπόθετα. Στον μεσαίωνα το θεωρούσαν ακόμα ως ένα από τα καλύτερα φάρμακα για την επούλωση των πληγών. Ο Λεκλέρκ, ένας φυτοθεραπευτής, χρησιμοποίησε με επιτυχία το φυτό κατά των νευρώσεων, των νευρασθενειών και των ψυχώσεων (απαθικών καταστάσεων κ.α.) καθώς επίσης το χρησιμοποιούσαν και κατά της εμμηνοπαύσεως και κατά του κοκίτη. Η οσμή του φυτού είναι δυσάρεστη. Αυτός ήταν ο λόγος που ο μεγάλος βοτανολόγος Μπαουχίν το αποκαλούσε «*foetidum*» δηλαδή, δύσοσμο (Ζαχαράκη Σ., 2012).



Εικ. 5. Γεωγραφική εξάπλωση του είδους *Ballota acetabulosa*.

Πηγή: [https://en.wikipedia.org/wiki/Mediterranean\\_Sea](https://en.wikipedia.org/wiki/Mediterranean_Sea)

### 1.1.5.2 Βοτανική ταξινόμηση του *Ballota acetabulosa*

<b>Βασίλειο</b>	<b>Plantae- Haeckel,1866-Plants</b>
<b>Υποβασίλειο</b>	<b>Viridaeplantae- Cavalier- Smith, 1981</b>
<b>Φύλο</b>	<b>Tracheophyta-Sinnott, 1935 Ex Cavalier-Smith, 1998- Vascular Plants</b>
<b>Υποφύλο</b>	<b>Euphyllophytina-(Auct.) Cavalier- Smith, 1998</b>
<b>Κλάση</b>	<b>Spermatopsida- Brongniart, 1843</b>
<b>Υποκλάση</b>	<b>Asteridae- Takhtajan, 1967</b>
<b>Υπερτάξη</b>	<b>Lamianae- Takhtajan, 1967</b>
<b>Τάξη</b>	<b>Lamiales- Bromhead, 1838</b>
<b>Υποτάξη</b>	<b>Lamianae- Takhtajan, 1967</b>
<b>Οικογένεια</b>	<b>Labiatae(Lamiaceae)-A.L.de Jussieu, 1789, nom. cons.,nom. alt.</b>
<b>Υπο-οικογένεια</b>	<b>Lamioideae Τριπτύς: Lamieae</b>
<b>Γένος</b>	<b><i>Ballota</i>- Linnaeus, 1753</b>
<b>Είδος</b>	<b><i>acetabulosa</i>- Benth</b>
<b>Botanical name</b>	<b><i>Ballota acetabulosa</i> (L.) Benth.</b>



Εικ. 6. Στελέχη *Ballota acetabulosa*

Πηγή: <https://kentromeletisarxaiasthourias.wordpress.com/2016/06/21/ballota-acetabulosa-%CE%B2%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CF%89%CF%84%CE%AE-%CE%B7-%CE%BA%CF%81%CE%B1%CF%84%CE%B7%CF%81%CE%BF%CE%B5%CE%B9%CE%B4%CE%AE%CF%82%CE%BB%CF%85%CF%87%CE%BD%CE%B1%CF%81%CE%AC%CE%BA%CE%B9/>

### 1.1.5.3 Μορφολογία- ανατομία του *Ballota acetabulosa*

Τα φύλλα του είναι καρδιόσχημα, χνουδωτά, αντίθετα, απαλά, με χρώμα ανοιχτό πράσινο, όμοια με εκείνα των άλλων ειδών που ανήκουν στην ίδια οικογένεια. Τα άνθη του είναι κοκκινωπά με διάρκεια άνθισης από τον Ιούνιο έως τον Ιούλιο. Οι καρποί του είναι μαύροι, μικροσκοπικοί, κρυμμένοι στη βάση ενός κάλυκα που μοιάζει με χωνί. Τα φύλλα του φυτού καλύπτονται από ένα πλούσιο τρίχωμα που καλύπτει και τις δύο πλευρές των φύλλων και αποτελείται από πολυάριθμες αδενώδεις και μη αδενώδεις τρίχες. Ένας μεγάλος αριθμός μακριών πολυκύτταρων δενδρωδών μη αδενωδών τριχών συνιστούν ένα παχύ χνούδι που καλύπτει τα φύλλα, δημιουργεί ενιαίο φράγμα προστασίας και αποτελεί την εξωτερική στρώση, ενώ εκείνο που βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια της επιδερμίδας και αποτελεί την εσωτερική στρώση σχηματίζεται από



αδενώδη τριχίδια. Τα μη αδενώδη τριχώματα του φυτού ποικίλουν ως προς τη μορφολογία και την ανατομία τους και κατηγοριοποιούνται με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους σε πέντε τύπους. Τα αδενώδη τα οποία απαντώνται στα φύλλα του φυτού ανήκουν σε δύο κατηγορίες: τα ασπιδοειδή και τα κεφαλοειδή αδενώδη τριχώματα, που είναι κατανεμημένα στα φύλλα και τους βλαστούς. Οι ασπιδοειδείς αδένες συναντώνται στα φύλλα όλων των εποχών, όπου ανάλογα την εποχή και την επιφάνεια του φύλλου που βρίσκονται αλλάζει και η συχνότητα που συναντώνται. Οι κεφαλοειδείς αδένες οι οποίοι εντοπίστηκαν στα φύλλα του φυτού κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες κατά Werker (1985 a,b). Μοιάζουν όμως πολύ με τους τύπους των κεφαλοειδών τριχωμάτων, όπως περιγράφονται από τον Μποζαμπαλίδη (2008). Η ανατομία των φύλλων του φυτού *Ballota acetabulosa* παρουσιάζει αρκετές εποχικές διαφορές. Αυτές οι διαφορές πιθανά αποτελούν ένα μέρος της αμυντικής αντίδρασης του φύλλου έναντι στο ξηρό, ζεστό και με υψηλή ακτινοβολία περιβάλλον της Μεσογείου. Έτσι, τους ανοιξιάτικους και καλοκαιρινούς μήνες ενισχύονται χαρακτηριστικά που μπορούν να βοηθούν στον περιορισμό των απωλειών νερού. Τέτοια είναι η αύξηση του πάχους του ελάσματος των φύλλων, η αύξηση του πάχους των κυτταρικών τοιχωμάτων της εφυμενίδας, η μείωση της στρώσης του σπογγώδους παρεγχύματος. Επίσης, κατά τους ζεστούς μήνες παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά στο μέγεθος και το βάθος των κρυπτών καθώς και στο μέγεθος και το μήκος των μη αδενωδών και αδενωδών τριχωμάτων, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την απώλεια νερού. Η αρχιτεκτονική του φύλλου με την ύπαρξη των κρυπτών συμβάλλει στη στήριξη του φύλλου υποκαθιστώντας την ανάγκη για την ανάπτυξη σκληρογυμναστικού ιστού. Τα κύτταρα του μεσόφυλλου φαίνεται να συσσωρεύουν ελαιοσταγονίδια των οποίων ο αριθμός αυξάνεται κατά τους θερινούς μήνες. Τα αποτελέσματα των ιστοχημικών μεθόδων έδειξαν ότι τα τερπένια και οι τανίνες παράγονται κυρίως στις αδενώδεις τρίχες, ενώ οι φλαβόνες και φλαβανόλες στα αδενώδη και μη αδενώδη τριχώματα. Η παραγωγή των ενώσεων αυτών φαίνεται ότι συμβάλλει στην άμυνα του φύλλου έναντι των καταπονήσεων που προκύπτουν λόγω του μεσογειακού οικοσυστήματος και εξηγεί και την ευρεία χρήση του φυτού για φαρμακευτικούς σκοπούς (Δ3 (ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018)).

Μέσα από έρευνες σχετικά με την ανατομία του φύλλου του φυτού *Ballota acetabulosa* επιβεβαιώθηκε το γεγονός ότι οι δομικές ιδιαιτερότητες είναι κοινές

ανάμεσα σε καλοκαιρινά και χειμερινά φύλλα. Τα πολύ ξηρομορφικά καλοκαιρινά φύλλα με τις μεγάλες ποσότητες των δευτερογενών μεταβολιτών αντικαθίστανται από περισσότερα μεσομορφικά φύλλα που έχουν έλλειψη αυτών των ενώσεων. Ο εποχιακός διμορφισμός που συναντάται, κυρίως σε μεσογειακές περιοχές υπήρξε αντικείμενο μελέτης των (Margaris and Papadopoulou, 1975, Arianoutsou-Faraggitaki and Margarris, 1981, Westman, 1981,1985, Psaras 1986, Christodoulakis *et al.*, 1986, Psaras and Christodoulakis, 1987) και η δομή των φύλλων και οι διαφορές ανάμεσα σε καλοκαιρινά και χειμερινά φύλλα μελετήθηκαν λεπτομερώς σε εποχικά διμορφικά είδη (Christodoulakis, 1989). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ακόμα και σε επίπεδο υποδομής θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως ένδειξη της λειτουργικής ποικιλομορφίας ανάμεσα σε δύο τύπους φύλλων. Οι εποχικές διαφορές ανάμεσα στη δομή των φύλλων θεωρούνται φυσιολογικές, εφόσον το φυτό πρέπει να ξεπεράσει τις δυσκολίες που προκύπτουν από ένα ζεστό και ξηρό καλοκαίρι και να υποδεχτεί ένα μέτριο κρύο χειμώνα (Christodoulakis, 1989). Οι Christodoulakis and Bazos (1990), εντόπισαν και μελέτησαν τις μορφολογικές και φυσιολογικές διαφορές των φύλλων του φυτού *B. acetabulosa* και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα χειμερινά φύλλα είναι λιγότερο ξηρομορφικά από ότι τα καλοκαιρινά (Εικ. 7.).



Εικ. 7. Φύλλα *Ballota acetabulosa*.

Πηγή: <https://kentromeletisarxaiasthourias.wordpress.com/2016/06/21/ballota-acetabulosa-%CE%B2%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CF%89%CF%84%CE%AE-%CE%B7-%CE%BA%CF%81%CE%B1%CF%84%CE%B7%CF%81%CE%BF%CE%B5%CE%B9%CE%B4%CE%AE%CF%82%CE%BB%CF%85%CF%87%CE%BD%CE%B1%CF%81%CE%AC%CE%BA%CE%B9/>

#### **1.1.5.4 Θεραπευτικές χρήσεις του *Ballota acetabulosa***

Τα κυριότερα συστατικά του είναι φλαβονικά γλυκοσίδια, χλωρογενικό οξύ, ίχνη αιθέριου ελαίου και διτερπενλακτόνες και δρα ως αντλυσσικό αντιβακτηριδιακό, τονωτικό, στυπτικό, διουρητικό, εμμηναγωγό, αποχρεμπτικό, αντιοξειδωτικό και αντισπασμωδικό. Χρησιμοποιείται στην κατάθλιψη, την ανησυχία και την υστερία ενώ είναι κατάλληλο ίαμα για την ναυτία και τον εμετό, όταν το αίτιο εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα και όχι στο στομάχι. Ανακουφίζει ακόμα και τους εμετούς της εγκυμοσύνης. Στην ομοιοπαθητική χρησιμοποιείται για βήχα, αϋπνία και διαταραχές του νευρικού συστήματος. Μειώνει και τα επίπεδα της χοληστερίνης και καθαρίζει το αίμα ενώ ταυτόχρονα ανακουφίζει τον κνησμό από τσιμπήματα

κουνουπιών. Για θεραπευτικούς σκοπούς χρησιμοποιούνται συνήθως τα φύλλα και οι ανθισμένες κορυφές του φυτού και για τις αντισπασμωδικές ιδιότητες χορηγείται κυρίως στις περιπτώσεις κοκίτη των παιδιών και κατά των ψυχονευρώσεων. Η αντιμικροβιακή δράση του φυτού τεκμηριώθηκε από το Πανεπιστήμιο: Çanakkale, Çanakkale, Turkey. Οι αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντι-ιικές, και κυτταροτοξικές ιδιότητες του φυτού μελετήθηκαν και τεκμηριώθηκαν από τα Πανεπιστήμια: Université du Droit et de la Santé Lille της Γαλλίας και Catholic University of Louvain, Wallonia, του Βελγίου. Η μεγάλη περιεκτικότητα του φυτού σε флаβονοειδή τεκμηριώθηκε από το Πανεπιστήμιο Near East University της Κύπρου. Τα флаβονοειδή έχουν σπασμολυτικές, αντιαλλεργικές, διουρητικές και ανθελμινθικές δράσεις. Η συμβολή τους στην ανθρώπινη υγεία έχει αποδειχθεί σε πολλές περιπτώσεις ευεργετική, καθώς ενεργοποιούν ένζυμα τα οποία μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης συγκεκριμένων τύπων καρκίνου, καρδιακών παθήσεων και εκφυλιστικών παθήσεων που σχετίζονται με τη γήρανση (Δ3 (ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018)).

#### 1.1.5.5 Άλλες χρήσεις

Οι αποξηραμένοι κάλυκες του φυτού, όπου έχουν σχήμα που μοιάζει με χωνάκι τοποθετούνταν ανά δύο, αφού πρώτα αφαιρείτο ο σπόρος από τον ένα, μέσα στο λάδι του καντηλιού και τους άναβαν. Η φλόγα κρατούσε αναμμένη όλη τη νύχτα και δεν δημιουργούσε κάπνα (Εικ. 8.) (Δ3 (ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018)).



Εικ. 8. Χρήση φυτού *Ballota acetabulosa* για το άναμμα του καντηλιού.

## 1.2 Στοιχεία περί μικροπολλαπλασιασμού

Ο μικροπολλαπλασιασμός είναι τεχνική της ιστοκαλλιέργειας που χρησιμοποιείται για την παραγωγή φυτών και υποδηλώνει την καλλιέργεια μικρών τμημάτων ιστών και οργάνων σε δοχεία με καθορισμένο μέσο καλλιέργειας και ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Έχει καταστεί ένα όλο και πιο σημαντικό εργαλείο τόσο για τις επιστήμες όσο και για εμπορικές εφαρμογές τα τελευταία χρόνια. Είναι το θεμέλιο στο οποίο στηρίζονται όλες οι βιοτεχνολογικές έρευνες, επειδή σχεδόν όλες οι χρήσεις της φυτοβιοτεχνολογίας απαιτούν τελικά την επιτυχή καλλιέργεια φυτικών κυττάρων, ιστών ή οργάνων. Αυτή η τεχνική παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι του συμβατικού φυτικού πολλαπλασιασμού, όπως είναι η παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών απαλλαγμένων από παθογόνους παράγοντες, φυτά που παράγονται σε σύντομο χρονικό διάστημα και με μεγάλη ομοιομορφία. Η επιτυχία του μικροπολλαπλασιασμού περιλαμβάνει διάφορους παράγοντες, όπως η σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, το περιβάλλον καλλιέργειας και του γονότυπου. Η ανάπτυξη των διαδικασιών για την ταχεία ένταξη της *in vitro* κλωνική παραγωγής οποιονδήποτε φυτών μπορεί να έχει μεγάλη εμπορική αξία για τη βιομηχανία (Kumar N. and Reddy M. P., 2011).

Ο μικροπολλαπλασιασμός των φυτών είναι μια ολοκληρωμένη διαδικασία στην οποία απομονώνονται κύτταρα, ιστοί ή όργανα επιλεγμένων φυτών, απολυμαίνονται επιφανειακά και επωάζονται σε ασηπτικό περιβάλλον που προάγει την ανάπτυξη για να παραχθούν πολλά κλωνικά φυτά (Altman, 2000). Η τεχνική της κλωνοποίησης απομονωμένων μεμονωμένων κυττάρων *in vitro* έδειξε ότι τα σωματικά κύτταρα, υπό τις κατάλληλες συνθήκες, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ένα ολόκληρο φυτό. Αυτό το δυναμικό ενός κυττάρου να αναπτύσσεται σε ένα πολυκύτταρο οργανισμό ονομάζεται κυτταρική παντοδυναμία. Το δυναμικό κυττάρων ή ιστών για τον σχηματισμό όλων των κυτταρικών τύπων και την αναγέννηση ενός φυτού είναι η βασική αρχή της ιστοκαλλιέργειας. Η καλλιέργεια *in vitro* είναι ένα από τα βασικά εργαλεία της φυτοβιοτεχνολογίας που εκμεταλλεύεται τη φύση της παντοδυναμίας των φυτικών κυττάρων, μια έννοια που προτάθηκε από τον Haberlandt (1902) και απέδειξαν για πρώτη φορά, οι Steward *et al.*, (1958).

### 1.2.1 Φάσεις μικροπολλαπλασιασμού

Η ιστοκαλλιέργεια εναλλακτικά καλείται καλλιέργεια κυττάρων, ιστών και οργάνων σε *in vitro* συνθήκες (Debergh and Read, 1991). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεγάλης κλίμακας διάδοση πολλαπλασιασμού κλώνων απαλλαγμένων από ασθένειες και αποτελεί διατήρηση γονιδιακής δεξαμενής. Εκατοντάδες εργαστήρια καλλιέργειας φυτικών ιστών έχουν προκύψει παγκοσμίως, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες λόγω του φθηνού κόστους εργασίας. Ωστόσο, η τεχνολογία μικροπολλαπλασιασμού είναι πιο δαπανηρή από τις συμβατικές μεθόδους πολλαπλασιασμού. Η διαδικασία μικροπολλαπλασιασμού μπορεί να χωριστεί σε πέντε διαφορετικά στάδια:

**Φάση 0:** Αναπτυσσόμενα μητρικά φυτά υπό υγιεινές συνθήκες.

Περιλαμβάνει την παραγωγή φυτικών αποθεμάτων στο θερμοκήπιο.

**Φάση I:** Έναρξη της καλλιέργειας. Περιλαμβάνει την επιλογή των εκφύτων, των απολυμαντικών και την καλλιέργεια υπό ασηπτικές συνθήκες (Εικ.9.).

**Φάση II:** Ταχεία αναγέννηση και πολλαπλασιασμός πολυάριθμων βλαστών (φάση πολλαπλασιασμού). Οι μάζες των ιστών επανειλημμένα υποκαλλιεργούνται υπό ασηπτικές συνθήκες σε νέα υποστρώματα καλλιέργειας που προωθούν τον πολλαπλασιασμό. Η καλλιέργεια μπορεί να δίνει βλαστούς για τις επόμενες φάσεις πολλαπλασιασμού, καθώς και υλικό που απαιτείται για τη διατήρηση του αποθέματος.

**Φάση III:** Επαγωγή ή Επιμήκυνση ή ανάπτυξη ρίζας (φάση ριζοβολίας). Αυτή η φάση οδηγεί στη δημιουργία πλήρως ανεπτυγμένων φυτών. Είναι η τελευταία περίοδος *in vitro* πριν από τη μεταφορά των φυτών σε περιβάλλον *ex vitro*.

**Φάση IV:** Μεταφορά σε κατάσταση *ex vitro* (εγκλιματισμός). Ο εγκλιματισμός ορίζεται ως η κλιματική ή περιβαλλοντική προσαρμογή ενός οργανισμού, ειδικά ενός φυτού που έχει μεταφερθεί σε ένα νέο περιβάλλον (Zobayed *et al.*, 2000) (Εικ. 10.).



Εικ. 9. Εμφύτευση εκφύτων κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό, σε τράπεζα νηματικής ροής στο εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής τοπίου ΓΠΑ.

Πολλά εμπορικά φυτά πολλαπλασιάζονται με *in vitro* καλλιέργεια σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει αυξίνες και κυτοκινίνες (Preil, 2003, Rout and Jain, 2004). Διαφορετικά έκφυτα έχουν χρησιμοποιηθεί για άμεσο σχηματισμό βλαστών. Επιπλέον, φυτά έχουν αναγεννηθεί από ιστούς των φύλλων και τα πεπτιδικά

τμήματα του *Jatropha curcas* (αυτοφυές φυτό της Αμερικής) (Kumar και Reddy, 2010, Kumar *et al.*, 2010a, Kumar *et al.*, 2010b, Kumar *et al.*, 2010c, Kumar *et al.*, 2011a, Kumar *et al.*, 2011b). Η Preil (2003) σημείωσε ότι το δυναμικό αναγέννησης απομονωμένων κυττάρων, ιστών ή οργάνων και των καλλιεργειών κάλων είναι πολύ μεταβλητό. Περαιτέρω, οι εγκάρσιες τομές μίσχων που καλλιεργούνται σε υπόστρωμα που περιέχει αυξίνη και κυτοκίνη προκαλούν τυχαίους βλαστούς από επιδερμικά κύτταρα και κύτταρα υποεπιδερμικού φλοιού, ποτέ από κύτταρα του πυρήνα των κεντρικών περιοχών του μίσχου.



Εικ. 10. Φυτικό τμήμα με οργανωμένη ανάπτυξη (Μετζάκης, 2005).

## 1.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον *in vitro* πολλαπλασιασμό

### 1.2.2.1 Έκφυτο και υπόστρωμα καλλιέργειας

Σημαντική επίδραση του υποστρώματος καλλιέργειας έχει παρατηρηθεί στην αναγέννηση των φυτών από διάφορα μέρη του φυτού (Sharswat and Chand, 2004). Διάφορα θεμελιώδη υποστρώματα όπως το White medium, το υπόστρωμα Nitsch



και Nitsch και το υπόστρωμα B5 Gamborg έχουν χρησιμοποιηθεί για το μικροπολλαπλασιασμό (Khan *et al.*, 1988, Prakash and Gurumurthi, 2005, Diallo *et al.*, 2008) αλλά το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα καλλιέργειας είναι τα Murashige και Skoog (1962) (υπόστρωμα MS), επειδή τα περισσότερα φυτά ανταποκρίνονται ευνοϊκά στο υπόστρωμα MS, καθώς περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των φυτών *in vitro*. Η επιλογή, η ισχύς και ο συνδυασμός των υποστρωμάτων είναι επίσης σημαντική παράμετρος για τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου αναγέννησης (Khan *et al.*, 1988, Zukar *et al.*, 1997, Prakash and Gurumurthi, 2005, Diallo *et al.*, 2008).

### **Είδος εκφύτου**

Ο τύπος του εκφύτου είναι επίσης ένας από τους σημαντικούς παράγοντες βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου ιστοκαλλιέργειας. Ο τύπος των εκφύτων όπως φύλλα, μίσχος, κοτυληδόνα, υποκοτύλιο, επιτοπύλιο, έμβρυο, επηρεάζουν σημαντικά τη διαδικασία ιστοκαλλιέργειας των φυτών (Khan *et al.*, 1988, Sujatha and Mukta, 1996, Tyagi *et al.*, Gubis *et al.*, 2003, Alagumanian *et al.*, 2004, Ali και Mirza, 2006, Kumar *et al.*, 2011b). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό επίπεδο των ενδογενών φυτικών ορμονών που υπάρχουν στα μέρη των φυτών. Το φύλλο είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο έκφυτο για αναγέννηση λόγω της μεγαλύτερης διαθέσιμης επιφάνειας (Sujatha and Muktha, 1996, Tyagi *et al.*, 2001). Οι Tyagi *et al.*, (2001) χρησιμοποίησαν εκφύσεις ριζών, βλαστών και φύλλων και η μέγιστη αποτελεσματικότητα αναγέννησης παρατηρήθηκε από τα φύλλα του *Cajanus cajan*. Οι Sujatha και Mukta (1996) χρησιμοποίησαν διαφορετικά μέρη όπως φύλλα, μίσχο, υποκοτύλιο και μέγιστη συχνότητα αναγέννησης παρατηρήθηκαν από φύλλα του *Jatropha curcas*. Οι Alagumanian *et al.*, (2004) χρησιμοποίησαν έκφυτα φύλλων και στελεχών και μέγιστη αποτελεσματικότητα αναγέννησης παρατηρήθηκε από έκφυτα στελέχους στο *Solanum trilobotam*. Οι Gubis *et al.*, (2003) χρησιμοποίησαν υποκοτύλιο, επικοτύλιο, κοτυληδόνες, φύλλα, μίσχο, και μέγιστη απόκριση παρατήρησαν από το υποκοτύλιο στην τομάτα. Οι Ali και Mirza (2006) χρησιμοποίησαν ρίζες, στελέχη, φύλλα και μίσχους, αλλά οι μέγιστες αποκρίσεις παρατηρήθηκαν από έκφυτα στελέχους στο *Citrus jambhiri Lush*.

### **Γονότυπος**

Ο γονότυπος είναι επίσης ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την αναγέννηση (Tyagi *et al.*, 2001, Gubis *et al.*, 2003, Gandonou *et al.*, 2005, Feyissa *et al.*, 2005, Chitra and Padmaja, 2005, Landi and Mezzeti, 2006, Reddy *et al.*, 2008, Kumar and Reddy, 2010). Η γονοτυπική επίδραση στην αναγέννηση και στην επιμήκυνση των βλαστών έχει περιγραφεί σε πολλά είδη και μπορεί να οφείλεται, εν μέρει, σε διαφορές στα επίπεδα των ενδογενών ορμονών, ιδιαίτερα των επιπέδων των κυτοκινινών κατά τη διάρκεια της περιόδου επαγωγής, παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός παραμένει ασαφής (Pellegrineschi, 1997, Schween και Schwenkel, 2003). Οι Henry *et al.*, (1994) ανέφεραν ότι οι γονοτυπικές διαφορές σε σχέση με την εμβρυογένεση και την αναγέννηση είναι αποτέλεσμα ποσοτικών ή ποιοτικών γενετικών διαφορών.

### **Πηγή εκφύτου**

Η πηγή εκφύτου *in vitro* και *in vivo*, είναι επίσης σημαντική για την αναγέννηση (Reddy *et al.*, 2008, Kumar *et al.*, 2010a). Το *in vitro* έκφυτο θεωρείται το πλέον κατάλληλο για οργανογένεση (Reddy *et al.*, 2008). Το γεγονός ότι η πηγή εκφύτου έχει διαφορετική ικανότητα αναγέννησης είναι καλά τεκμηριωμένη (Feyissa *et al.*, 2005). Η *in vitro* καλλιέργεια γενικά έχει καλύτερη δυνατότητα οργανογένεσης σε σύγκριση με την *in vivo* (Reddy *et al.*, 2008). Η διαφορά μπορεί να οφείλεται στο επίπεδο των ενδογενών ορμονών που υπάρχουν στο φυτικό έκφυτο. Έκφυτα από σπορόφυτα ή μεριστωματικό ιστό είναι πιο ευαίσθητα από ό, τι έκφυτα από ώριμα φυτά (Teng, 1999, Feyissa *et al.*, 2005) λόγω διαφορετικών επιπέδων φυτικών ορμονών.

### **Προσανατολισμός του εκφύτου**

Ο προσανατολισμός του εκφύτου στο υπόστρωμα καλλιέργειας επηρεάζει επίσης την αποτελεσματικότητα της αναγέννησης (Sharma and wakhlu, 2001, Arockiasamy *et al.*, 2002, Kumar and Reddy, 2010). Σε γενικές γραμμές, η απόδοση της αναγέννησης είναι υψηλότερη σε οριζόντια θέση σε σύγκριση με την κατακόρυφη κατάσταση του εκφύτου λόγω της μικρής επαφής του εκφύτου προς το υπόστρωμα.

Η θέση έναρξης, η πολικότητα και η αποδοτικότητα της αναγέννησης των εκφύτων μεταβάλλονται με τον προσανατολισμό του εκφύτου, είναι καλά τεκμηριωμένη στο είδος *Dionaea muscipula* (Teng, 1999). Οι κοτυληδόνες τοποθετημένες σε οριζόντιο προσανατολισμό (χαμηλότερη επιφάνεια προς τα κάτω) είχαν σταθερότερη αναγεννητική απόκριση και παράγαγαν μεγαλύτερο αριθμό και υψηλότερους βλαστούς σε σύγκριση με αυτές που τοποθετήθηκαν σε κατακόρυφο προσανατολισμό (Bhatia *et al.*, 2004, 2005).

### **Ανόργανα άλατα**

Τα ανόργανα άλατα είναι σημαντικά συστατικά του υποστρώματος καλλιέργειας. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία συνδυασμών μιγμάτων μακρο- και μικρο-στοιχείων. Το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα καλλιέργειας είναι αυτών των Murashige και Skoog (1962) (υπόστρωμα MS), επειδή τα περισσότερα φυτά αντιδρούν ευνοϊκά σε αυτό. Περιέχει όλα τα στοιχεία που έχουν αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη φυτών *in vitro*. Κατατάσσεται ως υπόστρωμα υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα σε σύγκριση με πολλά άλλα σκευάσματα, με υψηλά επίπεδα αζώτου, καλίου και μερικά μικροστοιχεία, ιδιαίτερα το βόριο και το μαγγάνιο (Cohen, 1995). Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα, ωστόσο, αυτό το θρεπτικό διάλυμα δεν είναι απαραίτητα πάντα βέλτιστο για ανάπτυξη και ανάπτυξη φυτών *in vitro* (Pierik, 1997). Για το λόγο αυτό, η χρήση μιγμάτων αραιωμένων υποστρωμάτων έχει γενικά προωθήσει τον καλύτερο σχηματισμό ριζών, δεδομένου ότι η υψηλή συγκέντρωση αλάτων μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη των ριζών, ακόμη και με την παρουσία αυξινών στο υπόστρωμα καλλιέργειας (Grattapaglia and Machado, 1998). Η ικανότητα των εκφύτων τριαντάφυλλου να παράγουν βλαστούς και να ριζοβολήσουν, μελετήθηκε από τους Kim *et al.*, (2003). Καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ο βέλτιστος πολλαπλασιασμός των βλαστών ελήφθη σε υπόστρωμα MS ολόκληρης δύναμης, ενώ η ριζοβολία βελτιώθηκε με 1/4 δύναμη. Οι Sauer *et al.*, (1985) ανέφεραν ότι το υπόστρωμα MS κατά 1/3 δύναμης αποδείχθηκε κατάλληλο για ριζοβολία τριαντάφυλλου. Για την αγκινάρα παγκοσμίως χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MS 1/2 δύναμης στο μέσο ριζοβολίας (Ancora, 1986, Lauzer and Vieth, 1990).

### Πηγή άνθρακα

Η σακχαρόζη είναι μακράν η πλέον χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα, για διάφορους λόγους. Είναι φτηνή, άμεσα διαθέσιμη, σχετικά σταθερή στο αυτόκλειστο και εύκολα αφομοιούμενη από τα φυτά. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλοι υδατάνθρακες, όπως η γλυκόζη, η μαλτόζη και η γαλακτόζη, καθώς και οι γλυκερόλες, η σορβιτόλη σακχαροαλκοολών (Fowler, 2000). Οι υδατάνθρακες προστίθενται στο υπόστρωμα καλλιέργειας για παροχή ενέργειας (Caldas *et al.*, 1998). Η προσθήκη πηγής άνθρακα σε οποιοδήποτε θρεπτικό υπόστρωμα είναι απαραίτητη για την *in vitro* ανάπτυξη πολλών ειδών, επειδή η φωτοσύνθεση είναι ανεπαρκής. Οι πράσινοι ιστοί δεν είναι επαρκώς αυτοτροφικοί υπό *in vitro* συνθήκες (Pierik, 1997) και εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα υδατανθράκων στο υπόστρωμα καλλιέργειας.

### Ρυθμιστές ανάπτυξης

Οι ρυθμιστές ανάπτυξης είναι οργανικές ενώσεις που συντίθενται φυσικά σε ανώτερα φυτά και οι οποίες επηρεάζουν την ανάπτυξη τους. Εκτός από τις φυσικές ενώσεις, έχουν αναπτυχθεί συνθετικά χημικές ενώσεις με παρόμοιες φυσιολογικές δραστηριότητες που αντιστοιχούν στα φυσικά συστατικά (Pierik, 1997). Υπάρχουν αρκετές κατηγορίες ρυθμιστών ανάπτυξης φυτών, όπως π.χ. οι κυτοκινίνες, οι αυξίνες, οι γιβερελίνες, το αιθυλένιο και το αμπισικό οξύ. Η ανάπτυξη και η μορφογένεση *in vitro* ρυθμίζονται από την αλληλεπίδραση και την ισορροπία μεταξύ των ρυθμιστών ανάπτυξης που παρέχονται στο υπόστρωμα και των αυξητικών ουσιών που παράγονται ενδογενώς (George, 1993). Μία ισορροπία μεταξύ της αυξίνης και της κυτοκινίνης απαιτείται συνήθως για το σχηματισμό τυχαίων βλαστών και ριζών. Στον καπνό που καλλιεργήθηκε *in vitro*, βρέθηκε ότι ο σχηματισμός ριζών και βλαστών εξαρτώνταν από την αναλογία της αυξίνης προς την κυτοκινίνη στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Υψηλά επίπεδα αυξίνης σε σχέση με την κυτοκινίνη διεγείρουν τον σχηματισμό ριζών, ενώ τα υψηλά επίπεδα κυτοκινίνης σε σχέση με την αυξίνη οδήγησαν στο σχηματισμό βλαστών (Taiz και Zeiger, 1991).

Η ισορροπία των ρυθμιστών ανάπτυξης εξαρτάται από τον στόχο της καλλιέργειας *in vitro* (όπως για παράδειγμα καλλιέργεια βλαστών, ρίζας, κάλων ή κυτταρικού εναιωρήματος) και στη θεωρούμενη φάση μικροπολλαπλασιασμού (έναρξη,

πολλαπλασιασμός ή ριζοβολία). Στη φάση πολλαπλασιασμού, το επίπεδο των κινολινικών θα πρέπει κανονικά να είναι υψηλότερο από τις αυξίνες.

Στη φάση της ριζοβολίας, η χρήση της κυτοκινίνης είναι στις περισσότερες περιπτώσεις μη απαραίτητη και μπορούν να συμπληρωθούν υψηλότερα επίπεδα αυξίνης στο υπόστρωμα καλλιέργειας (Torres *et al.*, 2001).

Οι κυτοκινίνες προέρχονται από την αδερίνη (αμινοπουρίνη) και παίζουν σημαντικό ρόλο στον *in vitro* χειρισμό φυτικών κυττάρων και ιστών (Torres *et al.*, 2001).

Οι κυτοκινίνες διεγείρουν τα φυτικά κύτταρα να διαιρεθούν και αποδείχθηκε ότι επηρεάζουν πολλές άλλες φυσιολογικές και αναπτυξιακές διεργασίες.

Αυτά τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν την καθυστέρηση της γήρανσης στα αποσπασμένα όργανα, την κινητοποίηση των θρεπτικών ουσιών, την ωρίμανση των χλωροπλαστών και τον έλεγχο της μορφογένεσης (Taiz and Zeiger, 1991). Προστίθενται στο υπόστρωμα καλλιέργειας και οι ενώσεις αυτές ξεπερνούν την κυριαρχία της κορυφής και απελευθερώνουν πλευρικούς οφθαλμούς (George, 1993).

Οι πιο συνηθισμένες κυτοκινίνες που χρησιμοποιούνται είναι η κινετίνη, η BA και η 2iP (Pierik, 1997).

Επίσης, στο υπόστρωμα καλλιέργειας προστίθενται συχνά αυξίνες (IAA, IBA, NAA ή 2,4-D) για την προώθηση της ανάπτυξης του κάλου, των κυτταρικών εναιωρημάτων ή οργάνων και για τη ρύθμιση της μορφογένεσης, ειδικά σε συνδυασμό με κυτοκινίνη (George, 1993).

Οι αυξίνες εμπλέκονται στη ρύθμιση αρκετών φυσιολογικών διεργασιών, όπως για παράδειγμα η κυριαρχία της κορυφής και ο σχηματισμός πλευρικών και τυχαίων ριζών. Αυτός ο ρυθμιστής ανάπτυξης γενικά προκαλεί επιμήκυνση και διόγκωση των ιστών, κυτταρική διαίρεση (σχηματισμός κάλου) και σχηματισμό τυχαίων ριζών καθώς και αναστολή τυχαίου και μασχαλιαίου σχηματισμού βλαστών (Pierik, 1997). Κανονικά, η συγκέντρωση της αυξίνης που χρησιμοποιείται στο υπόστρωμα καλλιέργειας κυμαίνεται μεταξύ 0,01 - 10 mg L<sup>-1</sup> (Torres *et al.*, 2001).

Το IAA είναι φυσική αυξίνη, ενώ τα 2,4-D και NAA παράγονται συνθετικά και έχουν παρόμοιο αποτέλεσμα σε σύγκριση με τις φυσικές αυξίνες.

Σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες που έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την επίδραση του τύπου αυξίνης και συγκέντρωσης σε τριαντάφυλλο, θα πρέπει να

χρησιμοποιούνται χαμηλές συγκεντρώσεις αυτού του ρυθμιστή ανάπτυξης στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Η ριζοβολία των βλαστών βελτιώθηκε με συμπλήρωση IAA (θεωρείται ασθενής αυξίνη) στα  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  (Kim *et al.*, 2003),  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  NAA (Rahman *et al.*, 1992, Leyhe and Horn 1994 ) ή ακόμη και απουσία της αυξίνης (Ibrahim and Debergh, 2001). Ο συνδυασμός δύο τύπων αυξίνης μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την αύξηση του σχηματισμού ριζών στο τριαντάφυλλο. Οι Kosh-Khui and Sink (1982) διαπίστωσαν ότι ο καλύτερος συνδυασμός για την παραγωγή φυτών με ρίζες ήταν  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  NAA με  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  είτε IAA είτε IBA. Ο συνδυασμός δύο αυξινών ήταν αποτελεσματικότερος για τον σχηματισμό ριζών από ό, τι μόνο μια αυξίνη. Στην αγκινάρα, η πιο αποτελεσματική αυξίνη για ριζοβολία ήταν η NAA ( $0,1-2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) σε συνδυασμό με IAA ( $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Kumar and Reddy, 2011).

Οι γιβερελλίνες είναι μια ομάδα ενώσεων που δεν χρησιμοποιούνται απαραίτητως στην *in vitro* καλλιέργεια ανώτερων φυτών. Σε ορισμένα είδη, αυτοί οι ρυθμιστές ανάπτυξης μπορεί να ενισχύσουν και σε άλλα να εμποδίσουν την ανάπτυξη (Razdan, 1993).

Το γιβερελλικό οξύ (GA3) είναι η πιο κοινή γιβερελλίνη που χρησιμοποιείται. Επάγει την επιμήκυνση των κυττάρων και την ανάπτυξη μεριστωμάτων ή οφθαλμών *in vitro* (Pierik, 1997). Επιπλέον, η χρήση των γιβερελλινών στο υπόστρωμα μπορεί να μειώσει ή να αποτρέψει τον σχηματισμό τυχαίων ριζών και βλαστών, αν και μπορεί να διεγείρει τον σχηματισμό των ριζών όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Οι Morzadec και Hourmant (1997) έδειξαν το ευεργετικό αποτέλεσμα για την αγκινάρα χρησιμοποιώντας γιβερελλίνες σε συγκέντρωση  $1,0$  ή  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  GA3 στο υπόστρωμα ριζοβολίας, με αποτέλεσμα την ταχεία εμφάνιση ρίζας και τον σχηματισμό υψηλής ποιότητας φυταρίων.

#### **Παράγοντες πήξης (στερεοποίησης)**

Τα υποστρώματα καλλιέργειας μπορούν να ταξινομηθούν ως υγρά ή στερεά. Τα υγρά υποστρώματα έχουν το πλεονέκτημα ταχύτερης (και φθηνότερης) προετοιμασίας από τα στερεά (Caldas *et al.*, 1998). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η αναλογία διάδοσης ορισμένων ειδών είναι υψηλότερη σε υγρό από ό, τι σε στερεά υποστρώματα (Debergh *et al.*, 1981, Pateli *et al.*, 2003). Ένα σοβαρό μειονέκτημα της χρήσης υγρών υποστρωμάτων για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των

βλαστών είναι ότι οι βλαστοί, οι οποίοι είναι συνεχώς βυθισμένοι σε υγρές καλλιέργειες, μπορεί να γίνουν υπερενυδατωμένοι και στη συνέχεια θα είναι ακατάλληλοι για μικροπολλαπλασιασμό (George, 1993, Debergh, 2000).

Το υγρό υπόστρωμα ( liquid culture medium ) είναι ουσιώδες για καλλιέργειες αιωρημάτων κυττάρων. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ελεγχόμενη καλλιέργεια φυτικών ιστών σε βιοαντιδραστήρες και την *in vitro* παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Το υγρό υπόστρωμα ευνοεί την ανάπτυξη, δεδομένου ότι μεγαλύτερη επιφάνεια του εκφύτου έρχεται σε επαφή με το θρεπτικό διάλυμα και η απορρόφηση των θρεπτικών στοιχείων και των ορμονών είναι ευκολότερη, ενώ τοξικοί μεταβολίτες, οι οποίοι είναι αποτέλεσμα εκκρίσεων των εκφύτων, διαχέονται και επομένως μειώνεται ο κίνδυνος επίδρασης στο φυτικό ιστό (Μετζάκης, 2005).

Όταν τα όργανα καλλιέργειας ή τα τμήματα των ιστών είναι πολύ μικρά, η υποστήριξη είναι απαραίτητη, για να κρατηθούν πάνω από το στατικό υγρό, διαφορετικά οι ιστοί θα νεκρωθούν από την έλλειψη οξυγόνου (Μετζάκης, 2005). Πολλές φορές τοποθετείται μια «χάρτινη γέφυρα» τύπου Heller (Heller support), ενός είδους στηρίγματος που επιτρέπει τη στήριξη του έκφυτου και τον καλό αερισμό του. Ως συστήματα στήριξης των ιστών σε υγρές καλλιέργειες έχουν ακόμα χρησιμοποιηθεί διάφορα υλικά, όπως διάτρητη σελοφάνη, γέφυρες ή πλατφόρμες από διηθητικό χαρτί, δίσκοι χαρτιού, αφρός πολυουρεθάνης, κύλινδρος από κυτταρίνη, τοποθέτηση πάνω σε απορροφητικό υπόστρωμα (δυνάμενο να αποστειρωθεί) ποτισμένο με θρεπτικό διάλυμα (π.χ. υδρόφιλο βαμβάκι) και φίλτρα από ίνες γυαλιού (Μετζάκης, 2005).

Ο κύλινδρος από κυτταρίνη και το απορροφητικό υπόστρωμα εμποτισμένο με θρεπτικό διάλυμα συγκεντρώνουν τις περισσότερες προτιμήσεις, διότι επιτρέπουν να πάρουμε ρίζες πολύ καλά αναπτυγμένες, με κανονική μορφολογία, οι οποίες προσαρμόζονται καλύτερα σε περίπτωση μεταφοράς σε εδαφικό υπόστρωμα. Ωστόσο ο βέλτιστος αερισμός της καλλιέργειας επιτυγχάνεται με δυναμική παροχή αέρα, όπως στους βιοαντιδραστήρες (Μετζάκης, 2005).

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές, με τις οποίες εξασφαλίζουμε την απαιτούμενη ανακίνηση του θρεπτικού υγρού, μεταξύ των οποίων οι σπουδαιότερες, που εφαρμόζονται περισσότερο στην πράξη, είναι:

#### **I. Με τη χρήση περιστρεφόμενων σωλήνων.**

Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται περιοδικός εμβαπτισμός του φυτικού υλικού στο θρεπτικό διάλυμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ειδικά δοχεία με πλευρικές θήκες, τα οποία περιστρέφονται, έτσι ώστε ο ιστός που υπάρχει σε κάθε θήκη να έρχεται εναλλακτικά σε επαφή με το θρεπτικό διάλυμα. Έτσι ο ιστός διαδοχικά εμποτίζεται με το θρεπτικό υγρό και στεγνώνει ή εκτίθεται απλώς στον αέρα. Το ίδιο μπορούμε να πετύχουμε με την τοποθέτηση των ιστών σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι συνεχώς αναποδογυρίζονται αργά ώστε το θρεπτικό υγρό να τρέχει από το ένα άκρο στο άλλο.

#### **II. Με ανατάραξη ή ανακίνηση.**

Φυτικοί ιστοί αναπτύσσονται ικανοποιητικά όταν ολόκληροι είναι βυθισμένοι μέσα στο θρεπτικό υγρό, με την προϋπόθεση ότι αυτό ανακινείται με ειδική μηχανή ή αναταράσσεται με τη χρήση μαγνητικής ράβδου, ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής οξυγόνωση.

#### **III. Με εισροή αέρος.**

Το θρεπτικό υγρό μπορεί να διαρρέεται και συγχρόνως να οξυγονώνεται με την εισροή αποστειρωμένου αέρος.

#### **IV. Με τροφοδοσία κατά σταγόνες.**

Αντί το φυτικό υλικό να εμβαπτίζεται στο θρεπτικό υγρό, το τελευταίο είναι δυνατόν να προστίθεται σε σταγόνες και στη συνέχεια να στραγγίζεται ή να αναρροφάται με κάποια αντλία (Μετζάκης, 2005).

Η τροφοδοσία του θρεπτικού υγρού με σταγόνες παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα γιατί:

1. Ο φυτικός ιστός αναπτύσσεται σε σταθερό, μη μετακινούμενο υπόστρωμα.
2. Τα θρεπτικά διαλύματα είναι δυνατόν να αντικαθίστανται συχνά και γρήγορα.
3. Η διαθεσιμότητα τους ρυθμίζεται αλλάζοντας είτε την πυκνότητα, είτε το ρυθμό ροής.
4. Οι τοξικοί μεταβολίτες, οι οποίοι σε κλειστό δοχείο δεν έχουν την δυνατότητα



να απομακρυνθούν και είναι δυνατόν να εμποδίσουν την ανάπτυξη, με τον τρόπο αυτό απομακρύνονται συνεχώς (Μετζάκης, 2005).

Τα **μειονεκτήματα** της μεθόδου είναι ότι για τη λειτουργία της απαιτούνται πολύπλοκες συσκευές και για το λόγο αυτό η χρήση της σήμερα είναι ακόμα περιορισμένη (Μετζάκης, 2005).

Απαραίτητη προϋπόθεση στην περίπτωση αυτή είναι η κυκλική ή η παράλληλη κίνηση του υποστρώματος, ώστε να εξασφαλιστεί ο καλύτερος αερισμός του (Εικ. 11).



Εικ. 11. Θάλαμος σταθερών συνθηκών με δυνατότητα ανατάραξης των καλλιεργειών (Εργαστήριο ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, ΓΠΑ) .

Οι Ebrahim και Ibrahim, (2000) ανέφεραν ότι το στερεό υπόστρωμα θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να ξεπεραστεί η παραγωγή υπερενυδατωμένων βλαστών της *Maranta leuconeura* και για να εξασφαλιστεί η λήψη ισχυρών φυτών με υψηλότερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη.

Το άγαρ χρησιμοποιείται παραδοσιακά ως ο προτιμώμενος παράγοντας πήξης για ιστοκαλλιέργεια και χρησιμοποιείται ευρέως για την παρασκευή ημι-στερεών και στερεών υποστρωμάτων καλλιέργειας (Torres *et al.*, 2001) είναι ένας

πολυσακχαρίτης που εξάγεται από είδη κόκκινων φυκών που συλλέγονται από τη θάλασσα (Torres, 1999).

Όσον αφορά τη βέλτιστη συγκέντρωση άγαρ στο υπόστρωμα καλλιέργειας, παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές μεταξύ δύο ποικιλιών τριαντάφυλλων από τους Acker και Scholten (1995). Το cv. "Motrea" προτιμούσε υψηλότερες συγκεντρώσεις άγαρ ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ) και σε αυτή τη συγκέντρωση σχηματίστηκαν πλήρως βλαστοί.

Το cv. «Sweet Promise», με τη σειρά του, έδειξε τα καλύτερα αποτελέσματα με εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ). Ο Raques (1991) επεσήμανε ότι υπάρχει ισχυρή σχέση μεταξύ της σκληρότητας του υποστρώματος καλλιέργειας, της αναλογίας πολλαπλασιασμού και της υπερενυδάτωσης.

Κανονικά, η αύξηση της συγκέντρωσης άγαρ προάγει τη μείωση της εμφάνισης συμπτωμάτων υπερενυδάτωσης στα φυτά. Ωστόσο, ο ρυθμός μετάδοσης των θρεπτικών στοιχείων μπορεί να μειωθεί δραστικά και κατά συνέπεια, η αποτελεσματικότητα του μικροπολλαπλασιασμού (Debergh, 2000).

Η συγκέντρωση άγαρ στο υπόστρωμα μπορεί επίσης να επηρεάσει τον σχηματισμό ριζών. Οι Rahman *et al.*, (1992) ανέφεραν ότι το ποσοστό ριζοβολίας αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης άγαρ (από 6 έως  $15 \text{ g L}^{-1}$ ) στο υπόστρωμα. Στα  $6 \text{ g L}^{-1}$ , επιτεύχθη βέλτιστο ποσοστό ριζοβολίας.

Μια εναλλακτική λύση για το άγαρ είναι η χρήση ενός παράγοντα πήξης που ονομάζεται πηκτή. Το Gerlite είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης που παράγεται από το βακτήριο *Pseudomonas elodea* (Kang *et al.*, 1982). Το Gerlite είναι μια ελκυστική εναλλακτική λύση του άγαρ για την καλλιέργεια φυτικών ιστών επειδή το κόστος του υποστρώματος ανά λίτρο είναι χαμηλότερο και παράγει ένα καθαρό τζελ που διευκολύνει την καλή παρατήρηση των καλλιεργειών για πιθανή μόλυνση τους (George, 1993). Οι Williams και Taji (1987) διαπίστωσαν ότι πολλά ξυλώδη φυτά της Αυστραλίας επιβίωσαν καλύτερα σε ένα υπόστρωμα πήξης με πηκτή και όχι άγαρ.

Επίσης, βρίσκει εφαρμογή το υπόστρωμα διπλής φάσης, το οποίο αποτελείται από ένα στρώμα στερεού υποστρώματος, πάνω στο οποίο βρίσκεται λεπτό υγρό στρώμα θρεπτικού διαλύματος. Το σύστημα αυτό εκμεταλλεύεται τα πλεονεκτήματα του υγρού θρεπτικού διαλύματος, ενώ μειώνει τον κίνδυνο υπερενυδάτωσης. Η τεχνική εφαρμόζεται κυρίως σε περίπτωση παρατεταμένης καλλιέργειας του εκφύτου,

οπότε έχουμε την δυνατότητα να αλλάξουμε το εξαντλημένο επιφανειακό υγρό διάλυμα με νέο χωρίς την ανάγκη υποκαλλιέργειας (Μετζάκης, 2005).

### 1.2.2.2 Περιβάλλον καλλιέργειας

#### Ανταλλαγή αερίων και σχετική υγρασία αέρα στο εσωτερικό του δοχείου

Η απόκριση της καλλιέργειας φυτικών ιστών *in vitro* μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από τα αέρια συστατικά εντός και γύρω από το δοχείο καλλιέργειας.

Το διοξείδιο του άνθρακα, το οξυγόνο και το αιθυλένιο είναι τα πιο συχνά μελετημένα συστατικά της ατμόσφαιρας καλλιέργειας (Read and Preece, 2003).

Το δοχείο καλλιέργειας είναι συνήθως ένα κλειστό σύστημα, αλλά μπορεί να υπάρξει κάποια ανταλλαγή αερίων ανάλογα με τον τύπο του δοχείου, το κάλυμα ή καπάκι και πόσο σφιχτά είναι σφραγισμένα μεταξύ τους. Η σφράγιση των δοχείων πρέπει να επιτρέπει επαρκή εξαερισμό για την πρόληψη της σημαντικής συσσώρευσης αιθυλενίου και της εξάντλησης του CO<sub>2</sub> (Buddendorf-Joosten and Woltering, 1994).

Οι συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα στο εσωτερικό των αγγείων μεταβάλλονται λόγω της αναπνοής και της φωτοσύνθεσης του φυτού. Στο σκοτάδι, οι συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> αυξάνονται λόγω της αναπνοής, ενώ κατά τη διάρκεια της φωτεινής περιόδου μειώνεται η συγκέντρωση (Buddendorf-Joosten and Woltering, 1994). Η χρήση σφραγισμένων δοχείων που μειώνουν την ανταλλαγή αερίων μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την κανονική ανάπτυξη των φυτών κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας *in vitro*.

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει τα πλεονεκτήματα της χρήσης κλεισίματος με φίλτρα ή αεριζόμενα δοχεία, τα οποία επιτρέπουν την ανταλλαγή αερίων, αυξάνοντας τη φωτοσυνθετική ικανότητα, τον ρυθμό πολλαπλασιασμού και την επιβίωση των φυτών μετά τη μεταφορά τους σε συνθήκες *ex vitro* (Chuo-Chun *et al.*, Murphy *et al.*, 1998, Zobayed *et al.*, 2000, Benzioni *et al.*, 2003).

Η αυξημένη διαθεσιμότητα του CO<sub>2</sub> με τη χρήση δοχείων με φίλτρο μπορεί επίσης να επηρεάσει την ποσότητα των φωτοσυνθετικών χρωστικών ουσιών.

Τα φυτά *Nicotiana tabacum* που αναπτύσσονται σε δοχεία με πώματα με μικροπορώδεις οπές εξαερισμού (που τροφοδοτούνται καλύτερα με CO<sub>2</sub>) είχαν υψηλότερες περιεκτικότητες χλωροφύλλης a, b και β-καροτένιο, υψηλότερη φωτοχημική δραστηριότητα του φωτοσυστήματος II και της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Επιπλέον, τα φυτά που αναπτύχθηκαν υπό αυτές τις συνθήκες είχαν υψηλότερο καθαρό ρυθμό φωτοσύνθεσης, χαμηλότερο ρυθμό διαπνοής και ατομική αγωγιμότητα υπό συνθήκες *ex vitro* από ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε γυάλινα δοχεία ερμητικά κλειστά (Haisel *et al.*, 1999).

Η κατάσταση της υγρασίας των καλλιεργειών επηρεάζεται από το υπόστρωμα ανάπτυξης που χρησιμοποιείται, το ίδιο το δοχείο καλλιέργειας και το φυσικό περιβάλλον. Το υπόστρωμα επηρεάζει την κατάσταση της υγρασίας με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα πήξης που χρησιμοποιείται (ή της απουσίας του), της οσμωτικής πίεσης (που επηρεάζεται για παράδειγμα από τη συγκέντρωση των αλάτων, την ποσότητα και τον τύπο του υδατάνθρακα και την ποσότητα και τον τύπο των άλλων συστατικών) (Zimmerman, 1995).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η σχετική υγρασία στο δοχείο είναι περίπου 98-100% (Altman, 2000).

Τα φυτά που αναπτύσσονται υπό υψηλότερη σχετική υγρασία *in vitro* έχουν περισσότερη διαπνοή από ότι υπό συνθήκες *ex vitro* και περισσότερες ανατομικές ανωμαλίες, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε υψηλό ποσοστό θνησιμότητας κατά τον εγκλιματισμό.

Ως εκ τούτου, δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι για τη μείωση της σχετικής υγρασίας του αέρα στο εσωτερικό του δοχείου, συμπεριλαμβανομένου του ανοίγματος των δοχείων καλλιέργειας για μερικές ημέρες πριν από τον εγκλιματισμό (Brainerd and Fuchigami, 1981, Kirdmanee *et al.*, 1996) (Gribaudo *et al.*, 2003) ή η ψύξη των πυθμένων των δοχείων, γεγονός που αυξάνει τη συμπύκνωση υδρατμών στην επιφάνεια του πηκτικού υλικού (Ghashghaie *et al.*, 1992). Ωστόσο, πρέπει να χρησιμοποιηθούν προσεκτικά μέθοδοι για τη βελτίωση της ανταλλαγής αερίων και τη μείωση της σχετικής υγρασίας μέσα στο δοχείο, προκειμένου να αποφευχθεί η υπερβολική απώλεια νερού κατά την καλλιέργεια. Μία μελέτη που διεξήχθη με βλαστούς αμπέλου όπου έλεγξαν διαφορετικές διαμέτρους οπών στο κάλυμα του δοχείου έδειξε ότι οι βλαστοί που καλλιεργούνται

σε αεριζόμενα δοχεία ήταν ψηλότεροι από τους βλαστούς που αναπτύχθηκαν σε μη αεριζόμενα και είχαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη. Από την άλλη πλευρά, οι μεγαλύτερες τρύπες (40 mm) προκάλεσαν υπερβολικό στρες λόγω έλλειψης νερού. Οι βλαστοί έγιναν πιο ανθεκτικοί στο μαρασμό, αλλά η ανάπτυξη των φυτών εμφάνισε έντονη επιβράδυνση (Gribaudo *et al.*, 2003).

### **Φως**

Το φως είναι ένας σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας που ελέγχει την ανάπτυξη των φυτών, καθώς σχετίζεται με τη φωτοσύνθεση, τον φωτοτροπισμό και τη μορφογένεση (Read and Preece, 2003).

Τα τρία χαρακτηριστικά του φωτός, τα οποία επηρεάζουν την ανάπτυξη *in vitro*, είναι το μήκος κύματος, η πυκνότητα ροής και η διάρκεια έκθεσης στο φως ή φωτοπερίοδος (George, 1993). Πολλές μελέτες έδειξαν ότι ο φωτισμός αύξησε τον σχηματισμό ριζών και την ανάπτυξη των βλαστών (Kumar *et al.*, 2003), ενώ σε άλλα είδη το σκοτάδι ευνόησε τον σχηματισμό ριζών (Hammerschlag, 1982).

Η μειωμένη ριζοβολία παρουσία φωτός οφείλεται στην υποβάθμιση του ενδογενούς IAA (George, 1993).

Το λιμόνιο που αναπτύχθηκε υπό φωτοαυτοτροφικές συνθήκες *in vitro* που σχετίζεται με μεγαλύτερη ένταση φωτός ( $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) είχε περισσότερα φύλλα, υψηλότερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη και ζάκχαρα, υψηλότερο καθαρό ρυθμό φωτοσύνθεσης και ποσοστό επιβίωσης των φυτών *ex vitro* από τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε χαμηλότερη ένταση φωτός ( $50$  και  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) (Lian *et al.*, 2002).

Υπό συνθήκες ετερότροφης ανάπτυξης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές με την αύξηση της έντασης του φωτός.

### **Θερμοκρασία**

Η επίδραση της θερμοκρασίας σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, όπως η αναπνοή και η φωτοσύνθεση, είναι γνωστή και δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι επηρεάζει βαθιά την ιστοκαλλιέργεια των φυτών και τον μικροπολλαπλασιασμό. Το πιο συνηθισμένο εύρος θερμοκρασιών καλλιέργειας είναι μεταξύ  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  και  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

αλλά οι βέλτιστες θερμοκρασίες ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό, ανάλογα με τον γονότυπο (Altman, 2000, Read and Preece, 2003).

Οι Horn *et al.* (1988) μελέτησαν την επίδραση διαφορετικών θερμοκρασιών στη φάση πολλαπλασιασμού 14 τριανταφυλλιών. Τα καλύτερα συνολικά αποτελέσματα ελήφθησαν στους 18 °C, αλλά ορισμένες "θερμοανταγωνιστικές" ποικιλίες έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα στους 12 °C, ενώ άλλες "θερμοευαίσθητες" ποικιλίες είχαν τη βέλτιστη τους στους 18 °C ή στους 24 °C.

Οι Alderson *et al.*, (1988) παρατήρησαν ότι η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της φάσης ριζοβολίας επηρέασε το χρόνο επιμήκυνσης της ρίζας, το τελικό ποσοστό ριζοβολίας και την υγιεινή κατάσταση των βλαστών. Για το cv. «Dicjana», οι ρίζες εμφανίστηκαν πρώτα στους 25 °C και περίπου 2 με 4 ημέρες αργότερα στους 20 °C και 15 °C, αντίστοιχα, αλλά στους 25 °C το τελικό ποσοστό ριζοβολίας ήταν χαμηλότερο. Οι βλαστοί παρέμειναν πράσινοι και φαίνονταν πιο υγιείς στους 20 °C.

### **1.2.3 Θρεπτικό υπόστρωμα**

Η σύνθεση του υποστρώματος είναι καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη. Σε πειράματα φυτικής ιστοκαλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν αρχικά υποστρώματα που σχεδιάστηκαν από τον White. Αυτά τα υποστρώματα περιείχαν τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται συνήθως από τα φυτικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται ευρέως ειδικά για καλλιέργειες ριζοβολίας. Ωστόσο, οι ποσότητες ιδιαίτερα του αζώτου και του καλίου έχουν βρεθεί από τότε ότι είναι ανεπαρκείς για να διατηρήσουν τη μέγιστη ανάπτυξη καλλιεργειών κάλου και κυτταρικών εναιωρημάτων. Η ανάγκη για πλουσιότερα μίγματα μεταλλικών αλάτων αντισταθμίστηκε με την προσθήκη εκχυλισμάτων ζύμης, υδρολυμάτων πρωτεϊνών, αμινοξέων, γάλακτος καρύδας ή άλλων οργανικών συμπληρωμάτων (Gamborg *et al.*, 1976).

Η επιτυχής καλλιέργεια φυτικών ιστών εξαρτάται από την επιλογή θρεπτικού υποστρώματος. Η ευρεία χρήση του υποστρώματος Murashige and Skoog (MS) ή τροποποιήσεις του είναι μια κατάλληλη επιλογή. Τέτοια υποστρώματα

αποτελούνται από μεταλλικά άλατα, μια πηγή άνθρακα (σουκρόζη), βιταμίνες και ρυθμιστές ανάπτυξης (Gamborg *et al.*, 1976).

Το υπόστρωμα MS σχεδιασμένο για κύτταρα καπνού χρησιμοποιείται πολύ εκτεταμένα και με προφανή επιτυχία για καλλιέργεια κάλου σε άγαρ, καλλιέργειες κυτταρικού αιωρήματος σε υγρά υποστρώματα και για μορφογένεση. Το υπόστρωμα περιέχει τις σωστές ποσότητες και αναλογία ανόργανων θρεπτικών ουσιών για την ικανοποίηση τόσο των θρεπτικών όσο και των φυσιολογικών αναγκών των φυτικών κυττάρων στην καλλιέργεια (Gamborg *et al.*, 1976).

Τα κύτταρα γενικά δεν έχουν ουσιώδη απαίτηση για οργανικά συμπληρώματα όπως αμινοξέα, υδρολυτικά καζεΐνης, εκχύλισμα ζύμης ή γάλα καρύδας. Ένα διακριτικό χαρακτηριστικό του υποστρώματος MS είναι η υψηλή περιεκτικότητα του σε νιτρικά, κάλιο και αμμώνιο σε σχέση με άλλα θρεπτικά υποστρώματα (Gamborg *et al.*, 1976).

Η σύνθεση αλάτων του υποστρώματος Linsmaier-Skoog είναι ίδιοι με αυτή του MS. Υπάρχουν πολλά άλλα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται. Η πλειοψηφία είναι τροποποιήσεις προηγούμενων υποστρωμάτων. Με διάφορα κριτήρια, έχουν αναφερθεί πολλά υποστρώματα, αλλά η βέλτιστη κυτταρική ανάπτυξη συχνά εξαρτάται από την προσθήκη ενός οργανικού συμπληρώματος. Η θετική απόκριση σε αυτές τις προσθήκες έδειξε μια απαίτηση από τα κύτταρα σε άζωτο και άλλα θρεπτικά συστατικά. Σε πολλές περιπτώσεις αυτές οι απαιτήσεις μπορούν να παρασχεθούν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ανόργανων αλάτων, ιδιαίτερα αζώτου, καθώς και σακχαρόζης και βιταμινών (Gamborg *et al.*, 1976).

Ένας αριθμός βασικών μιγμάτων αλάτων έχει ελεγχθεί και φαίνεται επαρκής για να ικανοποιήσει τις ανάγκες μιας ποικιλίας φυτικών κυττάρων καλλιέργειας. Τα πέντε υποστρώματα που Murashige and Skoog (MS), Eriksson (ER), Gamborg B5 medium, Schenk and Hildebrandt (SH), Heller (HE) περιέχουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις καλίου και νιτρικών (Gamborg *et al.*, 1976).

Οι βιταμίνες, οι ορμόνες και τα άλλα συμπληρώματα είναι προαιρετικά και οι απαιτήσεις για αυτές ποικίλλουν ανάλογα με τα φυτικά είδη και την προβλεπόμενη χρήση της ιστοκαλλιέργειας (Gamborg *et al.*, 1976).

Τα υποστρώματα MS και Eriksson (ER) είναι παρόμοια, αλλά το ER περιέχει διπλάσια ποσότητα φωσφορικών και πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροθρεπτικών συστατικών από το μέσο MS. Το τελευταίο μπορεί να είναι ένα πλεονέκτημα για ορισμένα κύτταρα (Gamborg *et al.*, 1976).

Το υπόστρωμα B5 έχει δοκιμαστεί σε ένα ευρύ φάσμα καλλιεργειών κάλου και κυτταρικού αιωρήματος. Η καλλιέργεια κάλου και οι κυτταροκαλλιέργειες ορισμένων ειδών προτιμούν το MS, ενώ άλλες καλλιέργειες αναπτύσσονται καλύτερα στο μέσο B5 ή ER. Το υπόστρωμα B5 περιέχει σχετικά χαμηλές ποσότητες αμμωνίου, ένα θρεπτικό συστατικό που μπορεί να καταστείλει την ανάπτυξη σε καλλιέργειες *in vitro* (Gamborg *et al.*, 1976).

Το υπόστρωμα Schenk και Hildebrandt (SH) μοιάζει με το B5. Οι ποσότητες των ανόργανων αλάτων είναι ελαφρώς υψηλότερες και το αμμώνιο και το φωσφορικό παρέχονται ως μία ένωση (Gamborg *et al.*, 1976).

Το υπόστρωμα Heller (HE) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην Ευρώπη. Η περιεκτικότητα σε άλατα είναι σχετικά χαμηλή και περιέχει κάποιες περιττές ενώσεις. Το κάλιο και τα νιτρικά προστίθενται μέσω χωριστών ενώσεων. Τα άλατα νικελίου και αλουμινίου είναι πιθανόν περιττά (Gamborg *et al.*, 1976).

Κατά καιρούς έχει γίνει χρήση σύνθετων οργανικών ουσιών απροσδιόριστης σύνθεσης σε υποστρώματα και έχει δώσει καλά αποτελέσματα, μια τέτοια ουσία είναι το γάλα καρύδας. Το γάλα καρύδας, συγκεκριμένα το υγρό ενδοσπέρμιο του *Cocos nucifera* L., χρησιμοποιήθηκε ως συστατικό μέσου σε πολλές μελέτες ιστοκαλλιέργειας (π.χ., Stewart & Carlin, 1951). Ωστόσο, το γάλα καρύδας έχει αντικατασταθεί από καθορισμένα υποστρώματα. Παρόλα αυτά, τα τελευταία δεν παρέχουν απαραίτητα βέλτιστη ανάπτυξη *in vitro* και η προσθήκη γάλακτος καρύδας είναι μια απλή τεχνική που μπορεί να αποφέρει βελτιωμένη ανάπτυξη (Boase *et al.*, 2010).

Στη βελτίωση της μεθόδου μικροπολλαπλασιασμού ακτινιδιών (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*) προστέθηκε 10% γάλα καρύδας στο υπόστρωμα καλλιέργειας πριν την εισαγωγή του στο αυτόκαυστο. Στη συνέχεια μετρήθηκε το μήκος των βλαστών, το βάρος, το μήκος των μίσχων, ο αριθμός των κόμβων, η φυλλική επιφάνεια και το μέσο βάρος των βλαστών. Η προσθήκη 10% γάλακτος καρύδας αύξησε σημαντικά



και τις έξι παραμέτρους μετά από 74 ημέρες επώασης. Ο αριθμός των μονών κόμβων που δημιουργήθηκαν, το μήκος βλαστών, το μήκος του μίσχου και η φυλλική επιφάνεια ήταν περίπου διπλάσιοι (Boase M. R. *et al.*, 1992).

Οι Al-Khaygi *et al.*, (1992) έχουν επίσης αναφέρει ότι η προσθήκη γάλακτος καρύδας (15%) βελτιώνει την καλλιέργεια κάλων και την αναγέννηση βλαστών του *Spinacia oleracea* L. (σπανάκι).

Το γάλα καρύδας 30% και η υδρολυμένη καζεΐνη 2.5g / L συνιστώνται για την *in vitro* καλλιέργεια της Barhi Date Palm (*Phoenix Dactylifera* L.)

Οι Overbeek *et al.*, (1941), πέτυχαν την καλλιέργεια μη ώριμων εμβρύων *Datura*, συμπεριλαμβάνοντας το υγρό ενδοσπέρμιο του *Cocos nucifera* (γάλα καρύδας) στο μέσο καλλιέργειας τους. Το γάλα καρύδας επίσης έδειξε ότι διεγείρει την κυτταρική διαίρεση σε άλλες ιστοκαλλιέργειες και η χρήση του ως συμπλήρωμα υιοθετήθηκε σε πολλά εργαστήρια (Duhamet και Gautheret, 1950, Morel, 1950, Nickell, 1950, Duhamet, 1951, Henderson *et al.*, De Ropp *et al.*, 1952, Archibald, 1954, Wiggans, 1954).

Άλλοι μικτοί χυμοί φυτών και τα υγρά ενδοσπέρμια έχουν αποδειχθεί ότι διαθέτουν διεγερτικές ιδιότητες λίγο πολύ παρόμοιες με αυτές του γάλακτος καρύδας. Αυτά περιλαμβάνουν υγρό ενδοσπέρμιο από ανώριμο καλαμπόκι (Nétien *et al.*, 1951), χυμό ντομάτας (Nitsch, 1951, Straus και La Rue, 1954), ανώριμα φρούτα και σπόρους (Steward and Carlin, 1952, Steward and Shantz, 1959) χυμός και εκχύλισμα βύνης, εκχύλισμα ζυμομυκήτων, υδρόλυμα καζεΐνης, εκχυλίσματα φύλλων και χυμό από ένα αριθμό φυτών (Butenko, 1968).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει επίσης συνδεθεί με την ταυτοποίηση των δραστικών συστατικών των φυσικών υγρών που χρησιμοποιούνται στο υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας. Έτσι, τα δραστικά συστατικά του γάλακτος καρύδας έχουν ταυτοποιηθεί από τους Pollard *et al.* (1961) και περιλαμβάνουν ένα αζωτούχο, ένα ουδέτερο συστατικό (τα πιο σημαντικά συστατικά είναι το m-ινοσιτόλη, η σκυλολινοσιτόλη και η σορβιτόλη) και ένα δραστικό συστατικό το οποίο έχει αναγνωριστεί ότι περιέχει ουσίες τύπου αυξίνες και γιββεριλίνες (Paris *et al.*, 1954, Radley and Dear, 1958, Dix and Van Staden, 1982).

Ομοίως, ο Straus, (1960) έδειξε ότι ο χυμός τομάτας, το εκχύλισμα ζύμης ή η λειτουργία υδρολύματος καζεΐνης παρέχουν μια μορφή οργανικού αζώτου (ένα

μείγμα αμινοξέων) ενώ το εκχύλισμα βύνης παρέχει μια αυξίνη, κινετίνη, μ-ινοσιτόλη, ουρία και αργινίνη σε *in vitro* καλλιέργεια (Steinhart *et al.*, 1961).

### 1.2.3.1 Σύνθεση θρεπτικού υποστρώματος

Το θρεπτικό υπόστρωμα για τις περισσότερες καλλιέργειες φυτικών ιστών αποτελείται από πέντε ομάδες συστατικών: ανόργανα θρεπτικά συστατικά, πηγή άνθρακα, βιταμίνες, ρυθμιστές ανάπτυξης και οργανικά συμπληρώματα

#### **Ανόργανα θρεπτικά συστατικά.**

Τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά αποτελούνται από ανόργανα άλατα τα οποία καλύπτουν τις απαιτήσεις για μακρο- και μικροθρεπτικά συστατικά.

Για τους περισσότερους σκοπούς το θρεπτικό υπόστρωμα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 25 mM νιτρικού καλίου. Για την κανονική καλλιέργεια κάλου και κυτταρικού αιωρήματος, οι συγκεντρώσεις νιτρικών και αμμωνίου πιθανώς θα πρέπει να αυξηθούν στα 60 mM. Το αμμώνιο μπορεί να είναι απαραίτητο για μερικές καλλιέργειες, αν και ποσότητες μεγαλύτερες από 8 mM μπορεί να είναι επιβλαβείς. Εντούτοις, θα πρέπει πάντοτε να υπενθυμίσουμε ότι η μεταφορά κυττάρων σε ένα νέο υπόστρωμα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα βραδύτερους ρυθμούς ανάπτυξης για μία ή δύο υποκαλλιέργειες μέχρι να προσαρμοστούν τα κύτταρα (Gamborg *et al.*, 1976).

Μια ασφαλής εκτίμηση της καταλληλότητας ενός υποστρώματος μπορεί να γίνει μόνο μετά από 2 έως 3 υποκαλλιέργειες. Μία συγκέντρωση 1-3 mM ασβεστίου, θειικού άλατος και μαγνησίου γενικά είναι επαρκής. Οποιαδήποτε ανάγκη για νάτριο και χλώριο μπορεί να παρέχεται από άλατα ασβεστίου, φωσφορικά άλατα ή μικροθρεπτικά συστατικά. Τα απαιτούμενα μικροθρεπτικά συστατικά περιλαμβάνουν I, B, Mn, Zn, Mo, Ου και Fe, αν και το ιώδιο μπορεί να μην είναι απαραίτητο (Gamborg *et al.*, 1976).

### **Άνθρακας και πηγή ενέργειας.**

Η σουκρόζη στο 2-4% προτιμάται από τα περισσότερα κύτταρα. Μπορεί να αντικατασταθεί από γλυκόζη. Επίσης χρησιμοποιείται η φρουκτόζη, όμως άλλα σάκχαρα αποτελούν φτωχές πηγές υδατανθράκων. Η μ-ινοσιτόλη δεν είναι απαραίτητη, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την ανάπτυξη των κάλων (Gamborg *et al.*, 1976).

### **Βιταμίνες**

Από τις βιταμίνες, μόνο η θειαμίνη μπορεί να απαιτείται. Νικοτινικό οξύ και πυριδοξίνη μπορούν να ενισχύσουν την ανάπτυξη (Gamborg *et al.*, 1976).

### **Αμινοξέα και οργανικά συμπληρώματα.**

Τα αμινοξέα δεν είναι απαραίτητα. Εάν τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά δεν φαίνονται επαρκή, η καλύτερη προσέγγιση είναι να προστεθεί 0.05-0.1% υδρολυμένο καζεϊνικό οξύ (ενζυματική πέψη) ή καζαμινοξέα για να δημιουργηθεί η κυτταρική καλλιέργεια. Αυτά τα υλικά αργότερα μπορούν να αντικατασταθούν από L-γλουταμίνη (2-10 mM), ή το οργανικό άζωτο μπορεί να παραληφθεί πλήρως. Τα κύτταρα χρειάζονται τουλάχιστον ένα μήνα και αρκετές μεταφορές για να προσαρμοστούν στη βαθμιαία εξάλειψη του οργανικού αζώτου (Gamborg *et al.*, 1976).

### **Φυτορυθμιστικές ουσίες**

Οι διεργασίες της ανάπτυξης και της αύξησης των φυτών εξαρτώνται από ειδικούς χημικούς παράγοντες αύξησης που παράγονται σε ειδικά κέντρα στο φυτό και ελέγχουν διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του. Οι παράγοντες αυτοί είναι γνωστοί ως φυτοορμόνες ή φυτικοί ρυθμιστές αύξησης (plant growth regulators—PGRs). Οι φυτοορμόνες είναι η σημαντικότερη κατηγορία ενώσεων που προστίθεται στο θρεπτικό διάλυμα και είναι αυτές που καθορίζουν την κατεύθυνση της καλλιέργειας, αφού διεγείρουν κάποιες λειτουργίες του φυτικού κυττάρου και αναστέλλουν άλλες. Είναι σύνθετες οργανικές ενώσεις και περιλαμβάνουν τους φυσικούς ρυθμιστές αύξησης που συναντώνται στους φυτικούς ιστούς (φυτικές

ορμόνες) και τους τεχνητούς που παρασκευάζονται εργαστηριακά (τεχνητές ορμόνες ή ρυθμιστές αύξησης) (Kintzios, 2015).

#### Κατηγορίες ρυθμιστών αύξησης

Οι ρυθμιστές αύξησης διακρίνονται σε πέντε μεγάλες ομάδες:

- Αυξίνες (auxins)
- Κυτοκινίνες (cytokinins)
- Γιββερελλίνες (gibberellins)
- Αμπισικό οξύ (abscisic acid)
- Ουσίες (εκχυλίσματα) απροσδιόριστης σύστασης

Ένας ξεχωριστός ρυθμιστής αύξησης είναι το αιθυλένιο (ethylene), το οποίο θεωρείται καταστροφικός παράγοντας στην ιστοκαλλιέργεια και για αυτό δεν προστίθεται ποτέ εξωγενώς. Αντίθετα υπάρχουν τρόποι για την απομάκρυνσή του από τις καλλιέργειες *in vitro* (Konstas and Kintzios, 2003).

#### Οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες επιδρούν στην κυτταρική διαίρεση

Ο τρόπος με τον οποίο πολλαπλασιάζονται τα κύτταρα, είναι γνωστός ως μίτωση. Οι δύο τύποι ορμονών (αυξίνες και κυτοκινίνες) τροποποιούν, μέσω φωσφορυλίωσης, την ενεργότητα των κυκλινών A και B, δηλαδή ενζύμων που επιδρούν στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, κυρίως τις φάσεις G1 και G2 (Kintzios, 2015).

Στις φάσεις αυτές καθορίζεται το εάν το κύτταρο θα προχωρήσει στη μίτωση (οπότε και θα πολλαπλασιαστεί) ή όχι. Οι αυξίνες επιδρούν σε όλο τον κυτταρικό κύκλο ενώ οι κυτοκινίνες επηρεάζουν κυρίως στη φάση G1. Ανάλογη δράση έχει και η α-φυτοθειοκίνη (α-phytosulfokine), μια ουσία η οποία έχει ανακαλυφθεί πρόσφατα και δεν έχει ακόμα ταξινομηθεί ως αυξίνη ή κυτοκίνη. Μάλιστα, ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα φυτικά κύτταρα δεν μπορούν να διαιρεθούν αν η συγκέντρωση της α-φυτοθειοκίνης δεν είναι μεγαλύτερη από μια ορισμένη τιμή (Kintzios, 2015).

Η συγκέντρωση των ορμονών καθορίζει τη μορφογενετική τους επίδραση.

Η δράση των αυξινών και των κυτοκινινών δεν περιορίζεται στην πρόκληση διεργασιών σε απλό κυτταρικό επίπεδο, αλλά αφορά γενικά την εξέλιξη της οντογένεσης των καλλιεργούμενων ιστών *in vitro*. Η δράση αυτή είναι ξεχωριστή για κάθε ένα από τους δύο τύπους ορμονών, και εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση αυτών. Στο σημείο αυτό πρέπει να διευκρινιστεί ότι μικρή θεωρείται γενικά κάθε συγκέντρωση φυτορρυθμιστικής ουσίας μικρότερη από 10  $\mu\text{M}$  (Kintzios, 2015).

Οι αυξίνες:

- σε μικρή συγκέντρωση προωθούν τη διαφοροποίηση των ιστών προς τον σχηματισμό ριζών και / ή σωματικών εμβρύων, ενώ σπανιότερα βλαστογένεσης (σε συνδυασμό με κυτοκινίνες).
- σε μεγάλη συγκέντρωση προωθούν την αποδιαφοροποίηση των ιστών προς τον σχηματισμό κάλου.

Οι κυτοκινίνες:

- σε μικρή συγκέντρωση προωθούν τόσο την αποδιαφοροποίηση των ιστών προς τον σχηματισμό κάλου όσο και τη διαφοροποίηση των ιστών προς τον σχηματισμό βλαστών και/ή σωματικών εμβρύων, και σπανιότερα ριζογένεσης και αυτό σε πολύ μικρή συγκέντρωση (σε συνδυασμό με αυξίνες).
- σε μεγάλη συγκέντρωση προωθούν μόνο τη διαφοροποίηση των ιστών προς το σχηματισμό βλαστών και σωματικών εμβρύων.

Σημαντικό ρόλο για την κατεύθυνση της μορφογένεσης παίζει όχι μόνο η συγκέντρωση αλλά και η αναλογία μεταξύ αυξίνης και κυτοκινίνης. Επαγωγή κάλου, ρίζας και εμβρυογένεσης συμβαίνει όταν η αναλογία αυξίνης προς κυτοκινίνη είναι υψηλή, ενώ η παραγωγή πλευρικών βλαστών συμβαίνει όταν η αναλογία είναι μικρή. Γενικότερα, όταν ο λόγος αυξίνης προς κυτοκινίνη είναι μεγαλύτερος της μονάδας ευνοείται η ριζογένεση, όταν είναι μικρότερος ευνοείται η βλαστογένεση, ενώ όταν είναι περίπου ίσος με την μονάδα ευνοείται η καλογένεση. Η

συγκέντρωση αυξινών και κυτοκινινών, καθώς και η αναλογία τους διαφέρει ανάμεσα στα γένη, στα είδη και ίσως και ανάμεσα στις ποικιλίες (Κίντζιος, 2015).

#### Οι ορμόνες δρουν συνεργιστικά με το φως

Τα φυτικά κύτταρα διαθέτουν τουλάχιστον τρία διαφορετικά συστήματα φωτοϋποδοχέων τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση της αύξησης και της ανάπτυξης και το καθένα από τα οποία είναι περισσότερο ευαίσθητο σε διαφορετικό μήκος κύματος: τα φυτοχρώματα, τους υποδοχείς μπλε φωτός/UV-A και τους υποδοχείς UVB. Έχει αποδειχθεί ότι το φως μπορεί να προκαλέσει μορφογενετικές και βιοχημικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των κυτοκινινών σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών φυτικών ειδών. Επιπρόσθετα, οι κυτοκινίνες προωθούν τη σύνθεση χρωστικών όπως οι μπετακυανίνες και οι ανθοκυανίνες, συνήθως συνεργικά με το φως (Ainaa *et al.*, 2015).

#### α. Αυξίνες

Η δράση των αυξινών στις φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού είναι πολύπλευρη και αυτό δυσκολεύει τη βιοχημική μελέτη του τρόπου δράσης τους. Οι αυξίνες συμβάλλουν στον γενικότερο μεταβολισμό των κυττάρων. Κύρια δραστηριότητά τους είναι η επιμήκυνση των κυττάρων στους βλαστούς και στις ρίζες, που είναι αποτέλεσμα της ικανότητας των ορμονών για σύνθεση πρωτεϊνών και RNA. Επίσης, προωθούν την αύξηση του όγκου των κυττάρων, διεγείρουν τη δραστηριότητα του καμβίου, αποτελούν παράγοντες νεανικότητας των φυτών και είναι θεμελιώδεις παράγοντες της διατήρησης της ενεργητικότητας των οργάνων του φυτού (Kintzios, 2015).

#### β. Κυτοκινίνες

Οι κυτοκινίνες είναι μια ομάδα ρυθμιστών ανάπτυξης καθολικής διάδοσης στα φυτά. Συντίθενται στις ρίζες και στα έμβρυα και συνδέονται με σάκχαρα. Ενισχύουν τις κυτταροδιαιρέσεις και τη βλαστογένεση, ενώ ανταγωνίζονται τη ριζογένεση. Σε συνδυασμό με το IAA (αυξίνη) αποτελούν θεμελιώδεις παράγοντες της οργανογένεσης σε καλλιέργειες φυτικών ιστών και επηρεάζουν τις διεργασίες της διαφοροποίησης οργάνων και ιστών. Ακόμη, αποτελούν παράγοντες

διαφοροποίησης πρωτογενών και δευτερογενών αγγειωδών ιστών (ενεργοποίηση καμβίου) και οντογένεσης, διατήρησης της νεανικότητας ή παρεμπόδισης του γήρατος όταν βρίσκονται σε συνδυασμό με άλλους ρυθμιστές ανάπτυξης. Βοηθούν επίσης στην άρση του λήθαργου των οφθαλμών και στη βλάστηση των σπερμάτων, διεγείρουν το άνοιγμα των στοματίων και κατά συνέπεια τη διαπνοή των φυτών (Cheng *et al.*, 2013).

#### γ. Γιββερελλίνες

Οι γιββερελλίνες είναι ρυθμιστές ανάπτυξης καθολικής διάδοσης, οι οποίες όμως χρησιμοποιούνται λιγότερο συχνά από τις άλλες, στην ιστοκαλλιέργεια διότι παρεμποδίζουν την οργανογένεση και ιδίως τη ριζογένεση. Η δράση τους δεν είναι καθορισμένη και μεταβάλλεται ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους και τον τύπο του έκφυτου. Έχει διαπιστωθεί ότι οι γιββερελλίνες προκαλούν αύξηση των μεσογονατίων, συμβάλλουν στην άρση του λήθαργου των οφθαλμών και των σπόρων, διεγείρουν τις κυτταροδιαίρέσεις στις περιοχές των κορυφαίων μεριστωμάτων και στο κάμβιο, συμβάλλουν στον σχηματισμό ανθικών καταβολών σε πολλά φυτά, αν και σε μερικά έχει διαπιστωθεί παρεμποδιστική δράση, συμβάλλουν στον καθορισμό του γένους στα δίοικα και μόνοικα φυτά και επηρεάζουν το δέσιμο, την ανάπτυξη και την ωρίμανση πολλών καρπών. Ακόμη, επιταχύνουν τη βλάστηση των σπερμάτων (στα σπέρματα των δημητριακών διεγείρουν τη σύνθεση του ενζύμου α-αμυλάση), προκαλούν αύξηση του μεγέθους των καρπών, υπεισέρχονται στην κυριαρχία του κορυφαίου οφθαλμού (θετικά ή αρνητικά) και επιβραδύνουν τις διεργασίες του γήρατος στα φύλλα ορισμένων φυτών. Η σύνθεση των φυσικών γιββερελινών γίνεται στα νεαρά φύλλα και στα ακρορίζια (Kintzios, 2015).

Η παραγωγή κάλου στις περισσότερες περιπτώσεις είναι επιτυχής χρησιμοποιώντας μόνο 2,4-D. Η προσθήκη μιας κυτοκινίνης (κινετίνη, ζεατίνη, ή βενζυλαδενίνη) μπορεί να είναι ευεργετική. Εάν η ιστοκαλλιέργεια είναι για μορφογένεση, το NAA και η βενζυλαδενίνη, η ζεατίνη ή η ισοπεντενυλο αδενίνη σε συνδυασμό πιθανόν να είναι καλύτερη. Ενώ το 2,4-D προκαλεί κυτταρική διαίρεση, η ένωση τείνει να καταστείλει τη μορφογένεση. Το NAA μπορεί να αντικατασταθεί από IAA, αλλά το τελευταίο θα πρέπει κατά προτίμηση να αποστειρωθεί με φίλτρο. Μία ένωση η

οποία προκαλεί αποτελεσματικά τον σχηματισμό κάλων στα δημητριακά είναι 2,4-5 τριχλωροφαινοξυοξικό οξύ (2,4-5-T) (Gamborg *et al.*, 1976).

Κατά την παρασκευή των υποστρωμάτων καλλιέργειας είναι απαραίτητη η παρασκευή stock διαλυμάτων που περιέχουν την κάθε φυτορρυθμιστική ουσία σε ποσοστό 10 % κ.β συνήθως.

### **Νερό και χημικά.**

Το νερό αποτελεί συστατικό όλων των θρεπτικών υποστρωμάτων. Χρησιμοποιείται, όμως, και για άλλες εργασίες που είναι απαραίτητες για την ιστοκαλλιέργεια. Όταν χρησιμοποιείται για την παρασκευή μέσου καλλιέργειας πρέπει να είναι διπλά αποσταγμένο ή απιονισμένο και αποσταγμένο. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στην περίπτωση της παρατεταμένης αποθήκευσης αποσταγμένου νερού σε δοχεία πολυαιθυλενίου, διότι τα δοχεία αυτά ελευθερώνουν ουσίες επιβλαβείς για τις καλλιέργειες. Ακόμη αποφεύγεται η αποθήκευση νερού σε φιάλες pyrex για μεγάλη περίοδο, επειδή μπορούν να αναπτυχθούν βακτήρια (Κίντζιος, 2015). Οι χημικές ουσίες πρέπει να είναι διαθέσιμες στον υψηλότερο βαθμό. Τα stock διαλύματα των ρυθμιστών ανάπτυξης μπορεί να υποστούν επανακρυσταλλοποίηση κάτι που δεν είναι επιθυμητό (Gamborg *et al.*, 1976).

### **Διαθέσιμα διαλύματα.**

Άλατα όπως  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ , P, Mg, Ca και  $\text{SO}_4$  μπορούν να παρασκευαστούν σε 10x τελική συγκέντρωση. Μπορούν να παρασκευαστούν άλατα ιχνοστοιχείων καθώς και βιταμίνες σε 1000x τελική συγκέντρωση και αποθηκεύονται σε καταψύκτη. Μπορεί να υπάρχουν ακόμα ξεχωριστά διαλύματα άλατος ασβεστίου και ιωδιούχου καλίου σε απόθεμα (stock). Το ναφθαλινοξικό οξύ, το 2,4-δichλωροφαινοξυοξικό οξύ και παρόμοιες ενώσεις διαλύονται σε μικρή ποσότητα αιθανόλης και συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τον επιθυμητό όγκο για να δώσουν συγκέντρωση 2-3 mM.

Οι κυτοκινίνες διαλύονται σε μικρή ποσότητα 0,5 N NaOH με ελαφρά θερμότητα και στη συνέχεια μπορεί να συμπληρώνεται ο όγκος με νερό (1-2 mM). Αυτές οι ενώσεις



επίσης μπορούν να διαλυθούν σε διμεθυλοσουλφοξείδιο. Σακχαρόζη, ορμόνες και άλλα συστατικά μπορούν κατόπιν να προστεθούν όταν παρασκευαστεί το επιθυμητό πλήρες μέσο.

Το pH ρυθμίζεται σε μια καθορισμένη τιμή μεταξύ 5,5 και 6,2 και το μέσο αυτόκλειστο στους 120 ° C για 15 έως 20 λεπτά.

Οι περισσότερες ορμόνες ανέχονται αποστείρωση σε αυτόκαυστο. Εξαιρέσεις μπορεί να είναι το ινδολοξικό οξύ και η γλουταμίνη, υπάρχει επίσης κάποια απώλεια της θειαμίνης και τα μέσα μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά προτιμάται η θερμοκρασία των 10 ° C (Gamborg *et al.*, 1976).

Οι γιβερελίνες επίσης δεν μπαίνουν σε κλίβανο (αυτόκαυστο) γιατί καταστρέφονται και για αυτό αποστειρώνονται με φίλτρο (Παπαφωτίου, 2008) .

#### **1.2.4 Η χρήση του ενεργού άνθρακα σε *in vitro* καλλιέργεια**

Ο άνθρακας έχει χρησιμοποιηθεί ως καθαριστικό και αποχρωματιστικό συστατικό για υγρά από τον 18ο αιώνα. Τα κάρβουνα που χρησιμοποιήθηκαν πριν από τον παρόντα αιώνα παρήχθησαν μόνο με πυρόλυση. Οξειδώνεται και κατόπιν καθαρίζεται για να παραχθεί ο ενεργός άνθρακας ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα. Ο άνθρακας σε οποιαδήποτε μορφή χαρακτηρίζεται από υψηλή απορροφητική ικανότητα για αέρια, ατμούς και κolloειδή στερεά (Pan & Staden, 1998).

Ο ενεργός άνθρακας χρησιμοποιείται συνήθως σε υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας. Η προσθήκη του σε υπόστρωμα καλλιέργειας μπορεί να προάγει ή να αναστέλλει την *in vitro* ανάπτυξη, ανάλογα με τα είδη και τους ιστούς που χρησιμοποιούνται. Οι επιδράσεις του ενεργού άνθρακα μπορούν να αποδοθούν στην δημιουργία ενός σκοτεινού περιβάλλοντος, στη προσρόφηση ανεπιθύμητων / ανασταλτικών ουσιών, στην προσρόφηση ρυθμιστών ανάπτυξης και άλλων οργανικών ενώσεων ή στην απελευθέρωση ουσιών που προάγουν την ανάπτυξη που υπάρχουν ή απορροφούνται από ενεργό άνθρακα (Pan & Staden, 1998).

Οι ενεργός άνθρακας χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλες ειδικές περιοχές κυμαινόμενες από 600 έως 2000 m<sup>2</sup> gL<sup>-1</sup> και κατανομές πόρων που κυμαίνονται από

10  $\mu\text{M}$  έως 500  $\mu\text{M}$ . Όλος ο ενεργός άνθρακας που παράγεται από ξύλο έχει ιδιαίτερα μεγάλη επιφάνεια (το μεγαλύτερο μέρος της είναι εσωτερική) (Pan & Staden, 1998).

Ο ενεργός άνθρακας που χρησιμοποιείται σε θρεπτικά υποστρώματα έχει μια προτίμηση προσρόφησης για μέτρια πολικά μάλλον, παρά για άπολα ή πολυπολικά οργανικά μέσα. Δείχνει μεγαλύτερη προσρόφηση για αρωματικούς από ότι για ολεφινικά ακόρεστα προϊόντα. Επομένως, αρωματικές ενώσεις όπως τα φαινολικά και τα οξειδωτικά, αυξίνες [ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA), ναφθαλινοξικό οξύ (NAA), ινδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA)], κυτοκινίνες] βενζυλαδενίνη που έχουν ετεροκυκλικές και ακόρεστες δομές δακτυλίου (π.χ. κινετίνη), θα μπορούσαν σε μεγάλο βαθμό να προσροφούνται απο ενεργό άνθρακα. Αντίθετα, τα πολυπολικά και εύκολα υδατοδιαλυτά σάκχαρα (γλυκόζη, σορβιτόλη, μαννιτόλη και ινοσιτόλη) να μην αφαιρούνται από το υπόστρωμα (Pan & Staden, 1998).

Ανόργανα άλατα μπορεί να επηρεάσουν την προσρόφηση του ενεργού άνθρακα. Οι Halhouli *et al.*, 1995 διαπίστωσαν ότι το pH και τα τρία ανόργανα άλατα (KCl, KI και NaCl) επηρέασαν τις ισοθερμικές προσρόφησης της φαινόλης (από αραιό υδατικό διάλυμα) με ενεργό άνθρακα. Οι συγγραφείς σημείωσαν ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε άλατος (0,1, 0,02 και 0,005 M) παρήγαγαν διαφορετικά αποτελέσματα. Η επίδραση του pH (στην περιοχή pH 3-11) παρουσία KI, KCl και NaCl ήταν επίσης διαφορετική (Pan & Staden, 1998).

Όπως στην περίπτωση του άγαρ, υπάρχουν διάφορες μάρκες ενεργού άνθρακα που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια των φυτών των δένδρων φρούτων και δασών, των αγρωστωδών, των φυτικών καλλιεργειών (Pan & Staden, 1998).

Οι επιδράσεις του ενεργού άνθρακα στην απόκριση των ιστών σε *in vitro* καλλιέργεια φαίνονται να εξαρτώνται όχι μόνο από το το είδος του ξυλάνθρακα και το βαθμό ενεργοποίησής τους, αλλά και το φυτικό είδος που καλλιεργείται. Η προσθήκη ενεργού άνθρακα σε υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας μπορεί να έχει είτε ευεργετικό είτε αρνητικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη, ανάλογα με το υπόστρωμα, τον ιστό που χρησιμοποιείται ή και το στόχο του ερευνητή. Η χρήση ενεργού άνθρακα μπορεί να κάνει μια σημαντική διαφορά στην επιτυχία ή την αποτυχία μιας δεδομένης προσπάθειας καλλιέργειας (Pan & Staden, 1998).

Σε γενικά πλαίσια, οι επιδράσεις του ενεργού άνθρακα σε καλλιέργειες *in vitro* είναι:

**α)** η παροχή ενός σκοτεινού περιβάλλοντος στο μέσο, **β)** η προσρόφηση ορισμένων ανασταλτικών ουσιών για την καλλιέργεια, που παράγονται είτε από τα μέσα είτε από τα έκφυτα, **γ)** η προσρόφηση ρυθμιστών ανάπτυξης φυτών και άλλων οργανικών ενώσεων και **δ)** η απελευθέρωση ουσιών που απαντώνται φυσικώς ή απορροφώνται από ενεργό άνθρακα, οι οποίες είναι ευεργετικές για την ανάπτυξη της *in vitro* καλλιέργειας (Pan & Staden, 1998).

Ο ενεργός άνθρακας δοκιμάζεται από τους ερευνητές όταν υπάρχει 'πρόβλημα' στην ιστοκαλλιέργεια, όπως π.χ. έκλυση φαινολικών ουσιών από το έκφυτο στο υπόστρωμα, που παρεμποδίζουν στην αντίδραση. Η χρήση ενεργού άνθρακα σε υπόστρωμα καλλιέργειας μπορεί είτε να προάγει είτε να αναστέλλει την ανάπτυξη *in vitro*, ανάλογα με διάφορους παράγοντες (Παπαφωτίου, 2008).

Η προσθήκη ενεργού άνθρακα σε υπόστρωμα καλλιέργειας μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη, ιδιαίτερα τη ριζοβολία, την επιμήκυνση των βλαστών και την εμβρυογένεση. Ο ενεργός άνθρακας μπορεί να παρέχει ένα σκοτεινό περιβάλλον και να απορροφά ουσίες που μπορεί να είναι επιβλαβείς και ανασταλτικές για την *in vitro* καλλιέργεια, αλλά ταυτόχρονα θα μπορούσε επίσης να γίνεται και προσρόφηση ρυθμιστών ανάπτυξης. Η μη εκλεκτική επίδραση απορρόφησης του ενεργού άνθρακα μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στα καλλιεργούμενα έκφυτα. Μερικοί ερευνητές σημείωσαν ότι ο ενεργός άνθρακας προσροφά τη θειαμίνη, το νικοτινικό οξύ, την πυριδοξίνη, το φολικό οξύ, τους ρυθμιστές ανάπτυξης, το χηλικό σίδηρο και το Zn. Τόσο ο Fe όσο και ο Zn απορροφήθηκαν ελάχιστα παρουσία της σακχαρόζης. Η προσρόφηση των ρυθμιστών του φυτού μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ανασταλτικές επιδράσεις στην ανάπτυξη *in vitro*.

Η προσθήκη ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερα ποσοστά βλάστησης και βραδύτερη ανάπτυξη, των ευρωπαϊκών ορχιδέων (Pan & Staden, 1998).

Ενώ αυξήθηκε το μήκος των βλαστών και το μέγεθος των φύλλων του ευκάλυπτου *E. citriodora*, όταν χρησιμοποιήθηκε ενεργός άνθρακας, αλλά ο αριθμός των βλαστών μειώθηκε. Οι Webb *et al.*, 1998 σημείωσαν ότι η επιμήκυνση των βλαστών

προήχθη από τον ενεργό άνθρακα, αλλά ο άνθρακας ανέστειλε την επαγωγή της βλάστησης όταν συμπεριελήφθη με το ΒΑ και ανέστειλε επίσης τη ριζογένεση όταν συμπεριελήφθη στο τελικό υπόστρωμα ριζοβολίας.

Ο ενεργός άνθρακας δεν είχε ευεργετικά αποτελέσματα στην ωρίμανση σωματικών εμβρύων κικωρίου ή στην ανάπτυξη απομονωμένων τυχαίων βλαστών του *Picea abies*. Επιπλέον στην *Picea abies*, οι μακρείς χρόνοι επώασης σε υπόστρωμα που περιέχει ενεργό άνθρακα προκαλούν μη φυσιολογικούς βλαστούς και μεγάλες βελόνες που περιστρέφονται. Ο ενεργός άνθρακας που χρησιμοποιήθηκε σε υπόστρωμα ριζοβολίας για το *Prunus silicina* είχε σημαντική αρνητική επίδραση στο ποσοστό ριζοβολίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίστηκε χλώρωση και σοβαρή πτώση των φύλλων (Pan & Staden, 1998).

### 1.2.5 Το πρόβλημα της υπερενουδάτωσης (υάλωση)

Η υπερενουδάτωση είναι μια τυχαία ανωμαλία που παρατηρείται σε μικροβλαστούς που καλλιεργούνται *in vitro* (Εικ.12.). Προκαλεί μεγάλες μεταβολές (έως και 60%) των φυτικών απωλειών και παρεμποδίζει σοβαρά κάθε μακροπρόθεσμο προγραμματισμό εμπορικών παραγωγών (Navatel, 1982).

Οι έρευνες που διεξήχθησαν επί του θέματος δεν επιτρέπουν ακόμη μια λεπτομερή κατανόηση των μηχανισμών που προκαλούν το φαινόμενο. Αυτό οφείλεται στον μεγάλο αριθμό και την ποικιλομορφία των εμπλεκόμενων παραγόντων, καθώς και στην σύγχυση για την περιγραφή των επηρεαζόμενων φυτών από υπερενουδάτωση.

Για μερικούς, η υπερενουδάτωση αναφέρεται μόνο στο φυσιολογικό πρόβλημα που είναι υπεύθυνο για την υπερενουδατωμένη όψη, στη μείωση της ικανότητας πολλαπλασιασμού και της περισσότερο ή λιγότερο βραχυπρόθεσμης νέκρωσης.

Για άλλους, η υπερενουδάτωση είναι μια φυσιολογική διαταραχή, μορφολογικά ανιχνεύσιμη ή όχι, μειώνοντας την ικανότητα πολλαπλασιασμού των φυτών και ενισχύοντας τις δυσκολίες που προκύπτουν κατά τη στιγμή του *in situ* εγκλιματισμού.

Ο Debergh θεωρεί ως επί το πλείστον τα προβλήματα που συναντώνται κατά την μεταφορά μικροβλαστών σε συνθήκες εδάφους ως έκφραση της υπερενυδάτωσης (Debergh and Maene, 1985).

Ο όρος υπερενυδάτωση αναφέρεται στις φυσιολογικές διεργασίες που οδηγούν στην υπερενυδατωμένη κατάσταση. Τα υπερενυδατωμένα φυτά παράγουν τυπικά μη φυσιολογικά φύλλα που περιγράφονται ως ημιδιαφανή και υαλώδη.

Η έννοια της υπερενυδάτωσης διαφέρει ελαφρώς ανάλογα με τον χρήστη.

Ο Beauchesne (1981) την χρησιμοποίησε για να περιγράψει τα φυτά που παρουσιάζουν υαλωμένες όψεις. Ο Gautheret (1981) αντί να χρησιμοποιήσει τον όρο υαλοποιημένο προτίμησε υπερενυδατομένο δεδομένου ότι η λεγόμενη υαλοποιημένη όψη προκύπτει ως αποτέλεσμα της παρουσίας νερού αντί του αέρα. Ωστόσο, αυτό το γεγονός δεν έχει τεκμηριωθεί με σαφήνεια στα μικροφυτά. Η διαφορά στην περιεκτικότητα σε νερό ( $\left[ \frac{\text{καθαρό βάρος} - \text{ξηρό βάρος}}{\text{καθαρό βάρος}} \right] * 100$ ) σε υπερενυδατωμένα και μη υπερενυδατωμένα φυτά δεν υπερβαίνει ποτέ το 6% (Kevers *et al.*, 1984, Leshem 1983, Raques and Boxus 1984, Singha 1982, Ziv *et al.*, 1983).

Οι Ziv *et al.*, 1983 έδειξαν ότι το υδατικό δυναμικό των υπερενυδατωμένων *Dianthus* ήταν δύο φορές υψηλότερο από ότι στα κανονικά φυτά.

Το ανοιχτότερο πράσινο που συχνά χαρακτηρίζει μη φυσιολογικά φύλλα μπορεί να είναι συνέπεια ανεπάρκειας της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη (a + b) (Phan and Letouze, 1983, Letouze and Daguin, 1983, Ziv *et al.*, 1983).

Στις συνθήκες καλλιέργειας τους, οι Von Arnold and Eriksson (1984) και Raques and Boxus (1984) παρατήρησαν συστροφές φύλλων που παρουσίαζαν ένα πράσινο χρώμα σκουρότερο από αυτό των φυσιολογικών (Raques and Boxus, 1984). Ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας, τα φυτά *Dianthus* αναπτύσσουν είτε υπερενυδατωμένα είτε μη υπερενυδατωμένα φύλλα. Η εμφάνιση των υπερενυδατωμένων φύλλων ποικίλλει ανάλογα με τη θέση του εκφύτου στο υπόστρωμα που εμφανίζεται χυμώδες ή ημιδιαφανές καθώς αναπτύσσεται αντίστοιχα κατακόρυφα ή οριζόντια στο υπόστρωμα (Ziv *et al.*, 1983).

Η μικροσκοπική μελέτη αποκαλύπτει περαιτέρω διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και υπερενυδατωμένων φύλλων, όπως λεπτή επιδερμίδα με προεξέχοντα στόματα,

απουσία ή ασυνεχές στρώμα, συχνά μεγαλύτερη δυσκαμψία (Debergh *et al.*, 1981, Vieth *et al.*, 1983, Vieitez *et al.*, 1985) συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ιστούς.

Χαρακτηριστική είναι η βλάβη που διακρίνεται σε επίπεδο μεριστώματος, η προμεριστωματική ζώνη, που περιλαμβάνει τα κεντρικά μητρικά κύτταρα, το μερίστωμα και την περιφεριακή περιοχή, έχει αναφερθεί ότι απουσιάζει από τους οφθαλμούς του γένους *Douglas*.

Περαιτέρω ανωμαλίες που εμφανίζονται σε κυτταρικό επίπεδο είναι η αποδιοργάνωση του κυτταροπλάσματος και η διάσπαση του πυρήνα (Bornman and Vogelmann, 1984).

Φυσιολογικές και βιοχημικές διαφορές εμφανίζονται σε υπερενυδατωμένα και μη υπερενυδατωμένα φυτά. Η φυσιολογική δραστηριότητα σε μη φυσιολογικά φυτά εξαρτάται τόσο από την κατάσταση προόδου όσο και από τον τύπο υπερενυδάτωσης.

Τα κανονικά φυτά που καλλιεργούνται σε υγρό υπόστρωμα πολλαπλασιασμού για 30 ημέρες υπερενυδατώνονται και παράγουν ξηρό βάρος σε μεγαλύτερες ποσότητες από αυτά που διατηρούνται σε παρόμοιο στερεό υπόστρωμα και δεν υπερενυδατώνονται.

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ήταν παρόμοια σε υπερενυδατωμένα και μη υπερενυδατωμένα φυτά μετά από 28 ημέρες καλλιέργειας αλλά εμφανίστηκε μειωμένη κατά το ήμισυ σε υπερενυδατωμένα φυτά που καλλιεργούνται για 70 ημέρες (Phan and Letouze, 1983).

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στα ημιδιαφανή φύλλα του *Dianthus* ήταν διπλάσια από αυτά των χυμωδών (Ziv *et al.*, 1983).

Λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με τη φωτοσύνθεση και την αναπνοή των φυτών με μικρό μέγεθος.

Έχει αναφερθεί φωτοσυνθετική δραστηριότητα μειωμένη στα υπερενυδατωμένα φυτά (Leshem, 1983).

Οι βιοχημικές αναλύσεις σε υπερενυδατωμένα φυτά αποκαλύπτουν στην υποκαλλιέργεια τα ελαττώματα στη διαδικασία σύνθεσης της λιγνίνης τα οποία μπορούν να αποκρυπτογραφηθούν 4 ημέρες μετά τη μεταφορά των φυτών *Dianthus* σε υγρό υπόστρωμα (Kevers and Gaspar, 1985).

Οι Letouze και Daguin (1983) έδειξαν ότι υψηλή συγκέντρωση αμμωνίου αύξησε την υπερενουδάτωση σε *Prunus avium* και *Salix babylonica* που αναπτύσσονταν σε στερεό υπόστρωμα. Η δράση της δεσιδρογονάσης γλουταμικού διπλασιάστηκε. Παρατήρησαν ότι μια υψηλή συγκέντρωση αμμωνίου προωθούσε τη μετατροπή των σακχάρων σε αμινοξέα και στη συνέχεια εξασθένισε την παραγωγή λιγνίνης και κυτταρίνης (Letouze and Daguin, 1983).

Η συγκέντρωση φαινόλης εξαρτάται άμεσα από τον λόγο C / N. Το φαινολικό επίπεδο αποδείχθηκε υψηλότερο σε υπερενουδατωμένα φυτά *Dianthus* και *Castanea* από ό, τι στα υγιή (Kevers *et al.*, 1984, Kevers and Gaspar, 1985 a, Vieithez *et al.*, 1985).

### 1.2.5.1 Αιτίες υπερενουδάτωσης

Ανεξάρτητα από την πηγή ή το φυσιολογικό στάδιο των εκφύτων η υπερενουδάτωση επηρεάζει την παραγωγή τόσο των μονοκοτυλήδων όσο και των δικοτυλήδων φυτών (Debergh *et al.*, 1981). Ωστόσο, η ευαισθησία των φυτών στην υπερενουδάτωση ποικίλλει από τον έναν κλώνο στον άλλον μιας ίδιας ποικιλίας.

Ως εκ τούτου, οι αιτίες του φαινομένου φαίνεται να αφορούν τους εργαστηριακούς χειρισμούς: - προετοιμασία και θέση των εκφύτων στο υπόστρωμα, - σύνθεση του υποστρώματος και -περιβαλλοντικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των ανταλλαγών αερίων.

Σημαντικός είναι επίσης ο τρόπος με τον οποίο τα φυτά κόβονται ή διαχωρίζονται πριν από τη μεταφορά τους, η τομή των φύλλων είναι πιθανό να προκαλέσει την ανωμαλία (Raques and Boxus, 1985).

Υπάρχει στενή σχέση μεταξύ της θέσης των φυτών στο υπόστρωμα, της διείδυσης κυτοκινίνης στον ιστό και του ρυθμού πολλαπλασιασμού (Bornman and Vogelmann, 1984). Τα φυτά που έχουν βυθιστεί στο θρεπτικό υπόστρωμα ή είναι αναλλοίωτα ή εμφανίζονται υπερενουδατωμένα και είναι χυμώδη και εύθραυστα (Ziv *et al.*, 1983, Raques and Boxus, 1984, Raques and Boxus, 1985). Οι ουσίες που περιέχονται στο υπόστρωμα είναι γενικά καλά ελεγχόμενες εκτός από το άγαρ, το οποίο εμφανίζει φυσικές και χημικές ιδιότητες που είναι δύσκολο να παραμείνουν υπό έλεγχο. Είναι

γενικά παραδεκτό ότι ο ρυθμός υπερενουδάτωσης μειώνεται καθώς η συγκέντρωση του άγαρ αυξάνεται (Hauzinska, 1974, Davis *et al.*, 1977, Sutter and Langmans, 1979, Debergh *et al.*, 1981, Debergh, 1983, Kakkaart and Versluijs, 1983, Ziv *et al.*, 1983, Raques and Boxus, 1984, Leshem, 1983 a). Το άγαρ μπορεί να περιέχει αναστολείς υπερενουδάτωσης που απορροφούν ουσίες που είναι πιθανό να ευνοήσουν το φαινόμενο και να σπάσουν ή να μειώσουν το μέσο υδατικό δυναμικό και στη συνέχεια να παρεμποδίσουν την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από το φυτό.

Οι Debergh *et al.*, (1981) σε σχετικά πειράματα στην αγκινάρα επεσήμαναν ότι με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις άγαρ ελέγχθηκε η διαδικασία της υπερενουδάτωσης. Από τους Bornaman and Vogelmann (1984) αποδείχθηκε ο ενεργός ρόλος που διαδραμάτισε η BAP στην υπερενουδάτωση του *Picea*. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις άγαρ παρεμπόδιζαν την προσληψη της BAP από το φυτό, τα συμπεράσματα επιβεβαιώνονται από τον Debergh (1983).

Οι Debergh *et al.*, (1981) ανέφεραν ότι οι η εισαγωγή αντιαυξινών στα υποστρώματα καλλιέργειας δεν πέτυχαν να αποφευχθεί η υπερενουδάτωση. Αυτά τα αποτελέσματα συνέπεσαν με των Boxus *et al.*, (1978), and Zuccherelli (1979) που προκειμένου να αποτρέψουν το φαινόμενο της υπερενουδάτωσης μετέφεραν τα έκφυτα σε υπόστρωμα απαλλαγμένο από κιτοκινίνες.

Πάντως το επίπεδο της υπερενουδάτωσης πάντα παρατηρείται σε υψηλότερα επίπεδα στα υγρά παρά στα στερεά υποστρώματα .

Ο Von Arnold (1982) πέτυχε να περιορίσει τα επίπεδα της υπερενουδάτωσης στο *Picea* μειώνοντας την φωτοπερίοδο.

### **1.2.5.2 Έλεγχος υπερενουδάτωσης**

Οι ποικίλες προτάσεις που έχουν προβληθεί για τον έλεγχο της υπερενουδάτωσης αφορούν τη σύνθεση του υποστρώματος καθώς και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και συντείνουν, στην αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ (Debergh *et al.*, 1981, Debergh, 1983, Hakkaart and Versluijs, 1983, Leshem, 1983 ab, Ziv *et al.*, 1983, Beauchesne, 1981, Letouze and Daguin, 1983) και στη χρήση μιας σύνθεσης που δεν περιέχει ιόντα χλωρίου.



Ακόμα μείωση της συγκέντρωσης του καλίου (Davis *et al.*, 1977), αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου (Kreutmeier, 1985), προσθήκη κοβάλτιου στο υπόστρωμα (Gaspar and Kevers, 1985), τροποποίηση της ορμονικής ισορροπίας, μείωση της συγκέντρωσης της αυξίνης ή της κυτοκινίνης (Beauchesne, 1981, Zuccherelli, 1979, Boxus *et al.*, 1978) καταστολή της υδρόλυσης καζεΐνης και θεικής αδενίνης (Davis *et al.*, 1977), χρήση πηκτίνης (Zuccherelli, 1979).

Σε μερικές περιπτώσεις η προσθήκη ενεργού άνθρακα σε δόση 100- 500 mg/ L μειώνει το ποσοστό της υπερενυδάτωσης, ίσως επειδή ο ενεργός άνθρακας απορροφά ορισμένες τοξικές ουσίες οι οποίες συγκεντρώνονται μέσα στο δοχείο καλλιέργειας. Σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές (Rugini *et al.*, 1985) η αντικατάσταση της ζαχαρόζης με 4,5% φρουκτόζη μειώνει δραστικά την υπερενυδάτωση.

Ακόμα η υποβολή των καλλιεργειών σε χαμηλή θερμοκρασία μπορεί να βελτιώσει την κατάσταση για τα έκφυτα οπωροφόρων. Επίσης προτείνονται τροποποιήσεις περιβαλλοντικών παραγόντων όπως: αγωγή με χαμηλή θερμοκρασία (Boxus *et al.*, 1978), αύξηση σκότους (Von Arnold, 1982), αύξηση ανταλλαγών φυσικού αέρα (Hakkaart and Versluijs, 1983), και η μείωση της σχετικής υγρασίας (Ziv *et al.*, 1983; Debergh and Maene, 1985). Πάντα αυτές οι τροποποιήσεις επιτυγχάνουν να ελαχιστοποιούν το επίπεδο της υπερενυδάτωσης.

Ο τύπος του δοχείου και συγκεκριμένα του πώματός του, φαίνεται να έχει κάποια σημασία στην εκδήλωση του φαινομένου. Φαίνεται ότι η συγκέντρωση του αιθυλενίου στο εσωτερικό του δοχείου επιτείνει την υπερενυδάτωση. Άρα το δοχείο δεν πρέπει να κλείνει αεροστεγώς, ώστε να επιτρέπει την ανταλλαγή αερίων μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού χώρου (Paoli *et al.*, 1994).

Περιορισμός της υπερενυδάτωσης μπορεί να επιτευχθεί με τη συνεχή μεταφορά σε νέο υπόστρωμα (υποκαλλιέργεια) το οποίο στερείται κυτοκινίνης και στο οποίο έχει προστεθεί πηκτίνη (Μετζάκης, 2005).

Αρκετά είναι και τα πειράματα *in vitro* που έγιναν στο εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου ΓΠΑ όπου παρατηρήθηκε το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης ωστόσο σε ορισμένα από τα είδη υπάρχουν προτάσεις αντιμετώπισης. Στο *Globularia alypum* L. η υπερενυδάτωση των *in vitro* αναγεννημένων βλαστών αποτρέπει τον εγκλιματισμό *ex vitro*. Για να εξουδετερωθεί η υπερενυδάτωση,

χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις άγαρ και σακχαρόζης, καθώς αυτές οι δύο παράμετροι έχουν αναφερθεί για τον έλεγχο του φαινομένου (Langford and Wainwright, 1988, Kitto and Mackay, 1992, Luckner and Diettrich, 1992). Μετά από δύο μήνες καλλιέργειας σε πλήρες MS, υψηλό ποσοστό φυταρίων (79%) αντέδρασε. Τα υπερενυδατωμένα σπορόφυτα δεν ήταν σε θέση να εγκλιματιστούν *ex vitro*. Υψηλή συγκέντρωση άγαρ ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) εξάλειψε την υπερενυδάτωση αλλά μείωσε τον μέσο αριθμό και το μήκος των αναγεννημένων βλαστών. Το υψηλότερο ποσοστό υπερενυδατωμένων φυτών παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με τις συνήθως χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις άγαρ και σακχαρόζης. Παρόμοια επίδραση της συγκέντρωσης άγαρ στην υπερενυδάτωση έχει αναφερθεί από τους Kitto και Mackay (1992) και Luckner and Diettrich (1992).

Οι Langford και Wainwright (1988) ανέφεραν ότι η υπερενυδάτωση μειώθηκε καθώς η συγκέντρωση σακχαρόζης στο μέσο αυξήθηκε από  $10 \text{ mg L}^{-1}$  έως  $40 \text{ mg L}^{-1}$ . Στην μελέτη του *Globularia alypum L.* η αύξηση της σακχαρόζης δεν μείωσε σημαντικά την υπερενυδάτωση (Bertsouklis *et al.*, 2003).

Η διερεύνηση της ισορροπίας του  $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$  στο υπόστρωμα θα μπορούσε να δώσει μία λύση καθώς οι Ziv and Ariel (1992), μείωσαν τα επίπεδα υπερενυδάτωσης της γαρυφαλλιάς με μείωση του επιπέδου  $\text{NH}_4^+$ .

Σε *in vitro* καλλιέργεια του *Anthyllis barba-jovis L.* σχεδόν όλα τα έκφυτα έδωσαν βλαστούς κατά τη διάρκεια της εγκατάστασης και της πρώτης υποκαλλιέργειας. Το 100% των καλλιεργηθέντων εκφύτων σε υπόστρωμα με  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  BA παρήγαγε βλαστούς κατά τη διάρκεια της φάσης εγκατάστασης, ωστόσο, στην επόμενη υποκαλλιέργεια, η υπερενυδάτωση παρουσιάστηκε σε ποσοστό 39%. Η χρήση του ZEA σε  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  δεν αύξησε τον δείκτη πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με το BA, στην ίδια συγκέντρωση και η ZEA προκάλεσε υψηλότερη υπερενυδάτωση σε σύγκριση με την BA. Η υπερενυδάτωση εξαλείφθηκε πλήρως στο υπόστρωμα χωρίς ορμόνες, αλλά ο δείκτης πολλαπλασιασμού ήταν περίπου 5 φορές χαμηλότερος από ό, τι στα υποστρώματα που παρέχονταν κυτοκίνη, επειδή ο αριθμός των βλαστών που παρήχθησαν στο υπόστρωμα χωρίς ορμόνες ήταν χαμηλός. Ο δείκτης πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερος στην υποκαλλιέργεια σε σύγκριση με τη φάση εγκατάστασης και θα ήταν ακόμη υψηλότερος αν δεν υπήρχε υπερενυδάτωση (Vlachou *et al.*, 2017). Έχουν παρατηρηθεί υψηλοί ρυθμοί υπερενυδατωμένων

βλαστών κατά τη διάρκεια *in vitro* καλλιέργειας σε άλλα ξηροφυτικά είδη όπως το *Anthyllis cytisoides* (Gavidia *et al.*, 1997), και *Lithodora zahnii* (Papafotiou and Kalantzis, 2009).

Η *Calamintha cretica* (Lamiaceae) είναι ένα πολυετές βότανο ενδημικό της Δυτικής Κρήτης που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διακοσμητικό φυτό. Στην *in vitro* μελέτη του είδους διαπιστώθηκε ότι στο υπόστρωμα με ZEA, πολλοί βλαστοί υπερενυδατώθηκαν (Vlachou *et al.*, 2017).

Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός του σπάνιου και απειλούμενου αυτοφυούς της ελληνικής χλωρίδας *x Malosorbus florentina* με στόχο την αξιοποίησή του ως καλλωπιστικό φυτό και συγχρόνως τη διατήρησή του έδειξε ότι το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης περιορίστηκε με κάλυψη των δοχείων καλλιέργειας με μεμβράνη sanitas, έναντι της χρήσης πλαστικού φιλμ ή πλαστικού καπακιού, ενώ ταυτόχρονα αύξησε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των εκφύτων (Μαρτίνη, 2013).

Σε *in vitro* καλλιέργεια των φυτών *Camellia sinensis*, *Gerbera jamesonii*, *Malus domestica* και του υβριδίου *Populus tremula x P. alba* οι κυριότεροι παράγοντες που οδήγησαν σε υπερενυδάτωση ήταν η υψηλή υγρασία στα δοχεία καλλιέργειας και η αύξηση της συγκέντρωσης του BA στο υπόστρωμα, ενώ οι αυξίνες είχαν ελάχιστη επίδραση. Το περιεχόμενο των υπερενυδατωμένων βλαστών σε κυτοκινίνες IPA, 2iP, zeatin, και zeatin riboside ήταν σημαντικά υψηλότερο από τους κανονικούς βλαστούς, το οποίο ενισχύει την υπόθεση ότι το πλεόνασμα κυτοκινίνης, προκαλώντας γρήγορη κυτταρική διαίρεση στα μεριστώματα σε ατμόσφαιρα υψηλής σχετικής υγρασίας, είναι υπεύθυνο για την υπερενυδάτωση (Kataeva *et al.*, 1991).

Η υπερενυδάτωση σε έκφυτα του *Pyrus pyrifolia* επηρεάστηκε από τον τύπο της κυτοκινίνης, ενώ η συγκέντρωση είχε μικρή επίδραση. Με τα συνθετικά παράγωγα φαινυλουρίας (CPPU και TDZ) παράχθηκαν περισσότεροι υπερενυδατωμένοι βλαστοί από ότι με τα παράγωγα αδενίνης (BA και κινετίνη) με το TDZ να έχει ισχυρότερη επίδραση (Kadota and Niimi, 2003).

Και στο *Gypsophila paniculata* παρατηρήθηκε το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης έπειτα από μακρά διάρκεια καλλιέργειας που είχε ως αποτέλεσμα την χαμηλή επιβίωση των φυταρίων. Ακόμα η ανάπτυξη φυσιολογικών φυταρίων της *Gypsophila paniculata* σε υγρό υπόστρωμα σε ένα περιβάλλον όπου τα φυτάρια

μπορούν να διαπνεύσουν ξεκαθάρισε ότι η απουσία της διαπνοής σε αντίθεση με την υψηλή διαθεσιμότητα νερού είναι η βασική αιτία για την προώθηση της υπερενυδατωμένης ανάπτυξης. Μείωση της σχετικής υγρασίας βρέθηκε αποτελεσματική για την αντιμετώπιση του φαινομένου (Gribble, 1999).

Υπερενυδατωμένοι βλαστοί του *Thapsia garganica*, σε περιβάλλον με βελτιωμένο αερισμό, με τη χρήση τροποποιημένων καπακιών εμφάνισαν μειωμένη υπερενυδάτωση και μπόρεσαν να εγκλιματιστούν (Makunga *et al.*, 2006).



Εικ. 12. Μικροβλαστοί *Ballota acetabulosa* που εμφανίζουν το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Μητρικό υλικό

Η αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών έγινε το Μάιο του 2013 από την Υποψήφια Διδάκτορα Γεωργία Βλάχου, η οποία χρησιμοποίησε έκφυτα κορυφής βλαστού ενηλίκων φυτών, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα *B. acetabulosa*. Η εγκατάσταση των εκφύτων έγινε σε στερεό (8 g L<sup>-1</sup> άγαρ) υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) με 30 g L<sup>-1</sup> σακχαρόζη είτε χωρίς, είτε με 1.0 mg L<sup>-1</sup> BA ή zeatin. Ακολούθησαν πολλές υποκαλλιέργειες και δοκιμάστηκαν αρκετές φυτορυθμιστικές ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις μέχρι τις 11 Μαΐου του 2018 όπου και ανέλαβα να ερευνήσω την *in vitro* καλλιέργεια του φυτού *B. acetabulosa*, σε υγρό υπόστρωμα, οι καλλιέργειες του οποίου για 5 μήνες πριν διατηρούντο με υποκαλλιέργειες ανα 30 – 35 ημέρες σε υπόστρωμα MS χωρίς προσθήκη κάποιας φυτορυθμιστικής ουσίας.

### 2.2 Υπόστρωμα *in vitro* καλλιέργειας

#### 2.2.1 Υλικά των θρεπτικών υποστρωμάτων *in vitro* καλλιέργειας

Για την παρασκευή των διάφορων θρεπτικών υποστρωμάτων, στα οποία τοποθετήθηκαν τα έκφυτα, χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις τα ακόλουθα συστατικά:

- i. Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog basal mixture της εταιρείας Sigma Aldrich) σε μορφή σκόνης (Murashige and Skoog, 1962)
- ii. Σακχαρόζη εμπορίου (Sucrose)
- iii. NaCl (Άλας εμπορίου ΚΑΛΑΣ)
- iv. Ενεργός άνθρακας (AC, activated charcoal), της εταιρείας SIGMA
- v. Άγαρ, της εταιρείας Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά
- vi. Αποσταγμένο νερό

### 2.2.2 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικού υποστρώματος

Για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος των καλλιεργειών έγινε προσθήκη, σε δοχείο ζέσεως, αποσταγμένου νερού με λιγότερο όγκο του τελικού, καθώς και οι ακριβείς ποσότητες υποστρώματος Murashige and Skoog (MS)  $4,4 \text{ g L}^{-1}$  ή  $2,2 \text{ g L}^{-1}$ , (Πίνακας 1), σακχαρόζης  $20 \text{ g L}^{-1}$  ή  $30 \text{ g L}^{-1}$  και ενεργού άνθρακα  $2 \text{ g L}^{-1}$ . Τέθηκαν υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια ενός μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι το στάδιο της πλήρους διάλυσής των και στη συνέχεια έγινε η ογκομέτρηση του διαλύματος. Έγινε συμπλήρωση του διαλύματος με αποσταγμένο νερό μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολούθησε μέτρηση και έπειτα ρύθμιση του pH στην τιμή 5,6 - 5,7 της κλίμακας με τη βοήθεια διαλυμάτων  $0,1$  ή  $1 \text{ N NaOH}$  και  $0,1$  ή  $1 \text{ N HCl}$ . Για το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα η διαδικασία σταμάτησε σε αυτό το σημείο και το υπόστρωμα μοιράστηκε στα γυάλινα δοχεία και αποστειρώθηκε, ή σε πλαστικά τρυβλία αφού προηγουμένως είχε αποστειρωθεί σε χύτρα υγρής αποστείρωσης.

Όμως για το στερεό υπόστρωμα η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την προσθήκη ακριβούς ποσότητας άγαρ  $5 \text{ g L}^{-1}$  ή  $8 \text{ g L}^{-1}$  ή  $12 \text{ g L}^{-1}$  και ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως και ομοιόμορφα το άγαρ (διαυγές διάλυμα). Τέλος, το διάλυμα μοιράστηκε σε γυάλινα δοχεία καλλιέργειας όγκου  $100 \text{ ml}$  με πλαστικό καπάκι (Magenta B-caps, Sigma) εκχύνοντας  $25 \text{ ml}$  υπόστρωμα στο καθένα από αυτά και έγινε τέλος τοποθέτηση των δοχείων σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης για την αποστείρωσή τους.

Συστατικά	Υποδιπλασιασμένης δύναμης MS (mg l <sup>-1</sup> )	MS (mg l <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	1.650
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O		332,2
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	220	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	185	370
KNO <sub>3</sub>	950	1.900
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	170
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1	6,2
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,013	0,025
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,013	0,025
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	19	37,3
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14	27,8
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O		1,69
KI	0,4	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,13	0,25
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4,3	8,6
Myo-inositol	50	100
Glycine	1,0	2,0
Nicotinic acid	0,25	0,5
Pyridoxine HCl	0,25	0,5
Thiamine HCl	0,05	0,1
L-Glutamine	125	250

Πίνακας 1. Συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος MS (Murashige and Skoog, 1962) με μακροστοιχεία - ιχνοστοιχεία – βιταμίνες

## 2.3 Δοχεία και υλικά κάλυψης

### 2.3.1 Δοχεία *in vitro* καλλιέργειας και υλικά κάλυψης

Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών *in vitro* καθώς και των ριζοβολιών χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα βάζα όγκου 100 mL, τα οποία περιείχαν 25 mL υποστρώματος το κάθε ένα. Η κάλυψη των βάζων τόσο πριν από την αποστείρωση τους όσο και κατά την τοποθέτηση των εκφύτων στην τράπεζα νηματικής ροής γινόταν με πλαστικό καπάκι (Sigma, magenta-B caps).

Στην υγρή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά τρυβλία petri διαμέτρου 9 cm, με 20 mL υπόστρωμα ανά τρυβλίο. Η πλήρωση των τρυβλίων με υπόστρωμα έγινε στην τράπεζα νηματικής ροής, αφού είχε προηγηθεί αποστείρωση του σε χύτρα μέσα σε γυάλινες φιάλες όγκου 500 mL.

### 2.3.2 Δοχεία εγκλιματισμού φυταρίων

Στο στάδιο του εγκλιματισμού τα ριζοβολημένα φυτά μεταφυτεύθηκαν για περαιτέρω ανάπτυξη σε πλαστικά φυτοδοχεία όγκου 2 L. Μετά την ολοκλήρωση του εγκλιματισμού (1 μήνα), ακολούθησε μεταφύτευση σε γλάστρα 10 cm σε υπόστρωμα τύρφης : περλίτη (1:1 v/v) και (2:1 v/v).

## 2.4 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας

Για την εκτέλεση όλων των πειραμάτων ιστοκαλλιέργειας απαιτείται η αποστείρωση όλων των εργαλείων και υλικών καλλιέργειας. Η αποστείρωση των εργαλείων και υλικών έγινε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης για χρονικό διάστημα 20 min, σε θερμοκρασία 121 °C και πίεση 1.1 atm ή σε χύτρα υγρής αποστείρωσης για χρονικό διάστημα 15 min, σε θερμοκρασία 125 °C και πίεση 1.1 atm. Τα γυάλινα βάζα που περιείχαν τα θρεπτικά υποστρώματα είχαν χαλαρά καλυμμένο το ελεύθερο στόμιό τους με τα πλαστικά καπάκια τους. Ακόμη, έγινε κάλυψη όλων των εργαλείων που θα χρησιμοποιούντο στην διαδικασία εμφύτευσης των εκφύτων ή στις



απολυμάνσεις με φύλλο αλουμινίου (κοινό αλουμινόχαρτο εμπορίου), όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκια πάνω στα οποία θα λάμβανε χώρα η κοπή των εκφύτων προκειμένου να εμφυτευτούν στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Τα γυάλινα βάζα με μολυσμένες καλλιέργειες πριν ανοιχτούν και πλυθούν αποστειρώνονταν για 40 min, σε θερμοκρασία 121 °C και σε πίεση 1,1 atm στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης.

## 2.5 Συνθήκες καλλιέργειας

### 2.5.1 Συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας

Για την ανάπτυξη των εκφύτων σε στερεό υπόστρωμα τα γυάλινα βάζα καλλιέργειας επωάζονταν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών σε θερμοκρασία 25°C, με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 37,5  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (4000 lx fluorescent light) που προέρχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού οι οποίοι βρίσκονταν στις πλευρές του θαλάμου και έτσι γίνονταν ο φωτισμός των φυταρίων από τα πλάγια. Για την ανάπτυξη των εκφύτων σε υγρό υπόστρωμα, τα γυάλινα βάζα καλλιέργειας και τα πλαστικά τρυβλία petri επωάζονταν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών σε θερμοκρασία 25°C, με ταυτόχρονη ανατάραξη των καλλιεργειών 70 rad/min. Η επώαση διαρκούσε 35 - 40 ημέρες, για τους βλαστούς που ήταν προς βλαστογένεση και προς ριζοβολία.

### 2.5.2 Συνθήκες εγκλιματισμού *ex vitro*

Τα ριζοβολημένα φυτάρια εγκλιματίζονταν αρχικά σε θάλαμο σταθερών συνθηκών του εργαστηρίου στους 20°C με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 37,5  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (4000 lx fluorescent light) που προέρχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού οι οποίοι βρίσκονταν στις πλευρές του θαλάμου και έτσι γίνονταν ο φωτισμός των φυταρίων από τα πλάγια για διάστημα επτά ημερών και ακολούθως μεταφέρονταν στο γυάλινο θερμοκήπιο σε πάγκους του εργαστηρίου Ανθοκομίας

και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για περαιτέρω ανάπτυξη από τον Οκτώβριο του 2018. Τα φυτοδοχεία περιείχαν υπόστρωμα που αποτελείτο από 1 τύρφη : 1 περλίτη (v/v) και 2 τύρφη: 1 περλίτη (v/ v) ενώ η κάλυψή τους έγινε με πλαστική μεμβράνη sanitas, κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας, με σκοπό την μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυταρίων.

## 2.6 Υποκαλλιέργεια *in vitro* καλλιεργειών

Στην τράπεζα νηματικής ροής του εργαστηρίου, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, το οποίο καθαριζόταν τακτικά με αιθανόλη 80 %, με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας, τα ενήλικα φυτά τεμαχίζονταν σε έκφυτα κόμβων και κορυφής (βλαστού) μήκους περίπου 8–10 mm (με 1–2 οφθαλμούς) από την κορυφή έως τη βάση των βλαστών. Γινόταν τοποθέτηση πέντε εκφύτων σε γυάλινο βάζο καλλιέργειας, που περιείχε το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα, κατακόρυφα σε αυτό και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα μόλις χιλιοστά μέσα στο υπόστρωμα. Έπειτα, τοποθετούνταν στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών.

Στην περίπτωση της υγρής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν τόσο τρυβλία στην αρχή όσο και γυάλινα βάζα, τοποθετούνταν έξι ή επτά έκφυτα ανα βάζο και στη συνέχεια έμπαιναν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με δυνατότητα ανατάραξης των καλλιεργειών. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβανόταν για κάθε υποκαλλιέργεια των μικροβλαστών του είδους *B. acetabulosa*.

Σε κάθε υποκαλλιέργεια του φυτού γίνονταν διατήρηση μητρικού υλικού σε στερεό υπόστρωμα MS χωρίς προσθήκη φυτορυθμιστικής ουσίας, σε γυάλινα βάζα καλλιέργειας τα οποία επωάζονταν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, σε θερμοκρασία 25 °C, με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 37,5  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (4000 lx fluorescent light) που προέρχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού.

## 2.7 Ριζοβολία μικροβλαστών

Βλαστοί που είχαν σχηματιστεί κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού και είχαν μήκος μεγαλύτερο από 1 cm προωθούντο για ριζοβολία. Όπως και στις υποκαλλιέργειες, η διαδικασία έγινε μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής του εργαστηρίου, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, το οποίο καθαριζόταν τακτικά με αιθανόλη 80 %. Με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας, οι βλαστοί αποκόπτονταν από την βάση τους και αφαιρούνταν τα κατώτερα φύλλα τους και έπειτα τοποθετούνταν τέσσερις βλαστοί σε κάθε γυάλινο βάζο καλλιέργειας, με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα ριζοβολίας, κατακόρυφα, και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό. Όλες οι καλλιέργειες τοποθετούντο σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε θερμοκρασία 25 °C και 16 h φωτοπερίοδο υπό 37,5  $\mu\text{mol m}^{-2}$  fluorescent φως.

## 2.8 Εγκλιματισμός φυταρίων

Ο εγκλιματισμός των φυταρίων ξεκίνησε τριάντα πέντε ημέρες μετά την εγκατάσταση στα υποστρώματα ριζοβολίας. Τα ριζοβολημένα φυτάρια απομακρύνονταν από το υπόστρωμα ριζοβολίας και στη συνέχεια γινόταν επιμελές πλύσιμο κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το θρεπτικό στερεό υπόστρωμα από τις ρίζες τους. Έπειτα, έγινε μεταφύτευση των καλά ριζοβολημένων φυταρίων σε ορθογώνια, διάφανα, πλαστικά δοχεία όγκου 2.000 mL (οκτώ φυτάρια ανά πλαστικό δοχείο), τα οποία περιείχαν υπόστρωμα τύρφης και περλίτη σε αναλογία 1:1 και 2:1. Στη συνέχεια τα δοχεία καλύπτονταν με πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος με το εμπορικό όνομα sanitas της εταιρείας Σαράντης Α.Ε., η οποία είχε τις εξής ιδιότητες: περατότητα σε οξυγόνο 8,5  $\text{cm}^3\text{m}^{-2}$  σε 24 h, περατότητα σε διοξείδιο του άνθρακα 55.000  $\text{cm}^3\text{m}^{-2}$  σε 24 h και περατότητα σε υδρατμούς 110  $\text{gm}^{-2}$  σε 24 h και ανοίγονταν οπές στην πλαστική μεμβράνη, μετά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας τους, επιδιώκοντας την μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια εγκατάστασης των φυταρίων καθώς και την ομαλή μετάβαση των νεαρών φυταρίων από το περιβάλλον της 100 % σχετικής

υγρασίας στο περιβάλλον του θερμοκηπίου. Τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 25 °C, με φωτοπερίοδο 16 h, και σε ένταση φωτισμού 37,5  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  από λαμπτήρες φθορισμού και 30 % υγρασία. Ανά δύο ημέρες τα δοχεία ανοίγονταν και εφαρμοζόταν ελαφρύ πότισμα. Μία βδομάδα μετά την έναρξη της δημιουργίας οπών στην μεμβράνη, αυτή αφερέθηκε εντελώς. Τα φυτάρια μεταφέρθηκαν στην υδρονέφωση του θερμαινόμενου θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για μία εβδομάδα και μετά στον πάγκο του θερμοκηπίου όπου τα πλαστικά δοχεία τοποθετήθηκαν σε σκιερό μέρος, ενώ εφαρμόζονταν περιοδική άρδευση.

## 2.9 Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιήθηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (ΕΤΣ) και εφαρμόστηκε μονοπαραγοντικό σχέδιο. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων των πειραμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα Jump 8.0 (SAS Institute Inc).

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Students σε επίπεδο σημαντικότητας  $P=0,05$ . Στα αποτελέσματα οι μέσοι όροι των επεμβάσεων που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Οι υποκαλλιεργείες του φυτού γίνονταν κάθε 35 μέρες. Πριν από κάθε υποκαλλιεργεία καταγράφηκε το ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν ως προς την έκπτυξη βλαστών (βλαστογένεση, %), ο μέσος αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκε ανά έκφυτο που αντέδρασε, το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν, ο αριθμός των φύλλων ανά βλαστό. Ακόμη εκτιμήθηκε και ο σχηματισμός κάλου και η παρουσία υπερενυδάτωσης στους βλαστούς.

Κατά το στάδιο της ριζοβολίας η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε 35 ημέρες μετά από την μεταφορά των μικροβλαστών στα υποστρώματα ριζοβολίας και καταγράφηκε το ποσοστό των μικροβλαστών που σχημάτισαν ρίζες, ο αριθμός και το μέσο μήκος των ριζών ανά βλαστό που ριζοβόλησε. Στο στάδιο του εγκλιματισμού *ex vitro* καταγράφηκε η επιτυχής εγκατάσταση των φυταρίων είκοσι μέρες μετά την μεταφορά τους *ex vitro*.

## 2.10 Σκοπός της μελέτης και πειραματική προσέγγιση

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού του *Ballota acetabulosa* με απώτερο σκοπό τη δημιουργία ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου πολλαπλασιασμού του είδους το οποίο θα μπορούσε να επιτρέψει την αξιοποίηση του ως καλλωπιστικό και ως φαρμακευτικό φυτό. Αρχικά δοκιμάστηκε η καλλιέργεια του φυτού σε υγρό και σε στερό υπόστρωμα MS αλλά εξαιτίας της παρουσίας του φαινομένου της υπερενυδάτωσης κυρίως στο υγρό υπόστρωμα, στη συνέχεια του πειράματος εφαρμόστηκαν μέθοδοι επίλυσης του φαινομένου αυτού, καθώς η παρουσία του φαινομένου δημιουργεί πρόβλημα στον εγκλιματισμό του φυτού. Έτσι δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις άγαρ, διάφορες συγκεντρώσεις σακχαρόζης, ενεργός άνθρακας, και NaCl.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Σύγκριση υγρής – στερεής καλλιέργειας

Στην αρχική καλλιέργεια του φυτού *Ballota acetabulosa* δοκιμάστηκε, η καλλιέργεια εκφύτων σε υγρό και στερεό υπόστρωμα MS με σκοπό να εξαχθούν συμπεράσματα για την πορεία της καλλιέργειας στα δύο υποστρώματα. Από βλαστούς *B. acetabulosa* που αναπτύσσονταν σε υπόστρωμα MS χωρίς προσθήκη φυτορρυθμιστικής ουσίας σε θάλαμο ανάπτυξης σταθερών συνθηκών σε θερμοκρασία 25°C, ελήφθησαν έκφυτα ενός κόμβου. Τα έκφυτα αυτά καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS σε γυάλινα βάζα καλλιέργειας όγκου 100 mL με πλαστικό καπάκι (Magenta B-caps, Sigma), 5 έκφυτα ανά δοχείο, με 25 mL υποστρώματος ανά δοχείο και σε υγρό υπόστρωμα MS σε πλαστικά τρυβλία Petri, διαμέτρου 9 cm, 7 έκφυτα ανά τρυβίο, με 20 mL υποστρώματος ανά τρυβλίο και σε γυάλινα βάζα καλλιέργειας (Magenta B-caps, Sigma), 6 έκφυτα ανά δοχείο με 25 mL υποστρώματος ανά δοχείο. Τα έκφυτα στερεής καλλιέργειας τοποθετούνταν σε θάλαμο ανάπτυξης σταθερών συνθηκών στους 25°C, 16 h φωτοπερίοδο, υπό 37,5  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fluorescent φως. Τα έκφυτα υγρής καλλιέργειας τοποθετούνταν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών 25°C με δυνατότητα ανατάραξης 70 rad/min. Μετά το πέρας των 15 ημερών παρατηρήθηκε απορρόφηση του υγρού υποστρώματος από τα έκφυτα και έτσι έγινε συμπλήρωση τόσο των τρυβλίων όσο και των γυάλινων βάζων με νέο υπόστρωμα ίδιας σύστασης. Στην υγρή καλλιέργεια παρατηρήθηκαν πολλές μολύνσεις, τα έκφυτα που καλλιεργήθηκαν στα τρυβλία μολύνθηκαν όλα, ενώ τα έκφυτα που καλλιεργήθηκαν στα γυάλινα βάζα είχαν 20 % μολύνσεις. Τα έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα δεν είχαν καμία μόλυνση.

Στον πίνακα 2 και στις εικόνες 13-15 φαίνονται τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος. Το ποσοστό αντίδρασης για παραγωγή βλαστών ήταν υψηλότερο (100 %) στο υγρό υπόστρωμα, ο αριθμός των βλαστών δεν διέφερε, αλλά το μήκος των βλαστών ήταν μεγαλύτερο στο στερεό υπόστρωμα. Επίσης, στην υγρή καλλιέργεια το ποσοστό υπερενυδάτωσης ήταν 100 %, έναντι 25 % στο στερεό υπόστρωμα με αποτέλεσμα τα φυτά να παρουσιάζουν μια μορφολογία διαφορετική- μη φυσιολογική σε σχέση με την γνωστή τους μορφή. Το ποσοστό ριζοβολίας για την

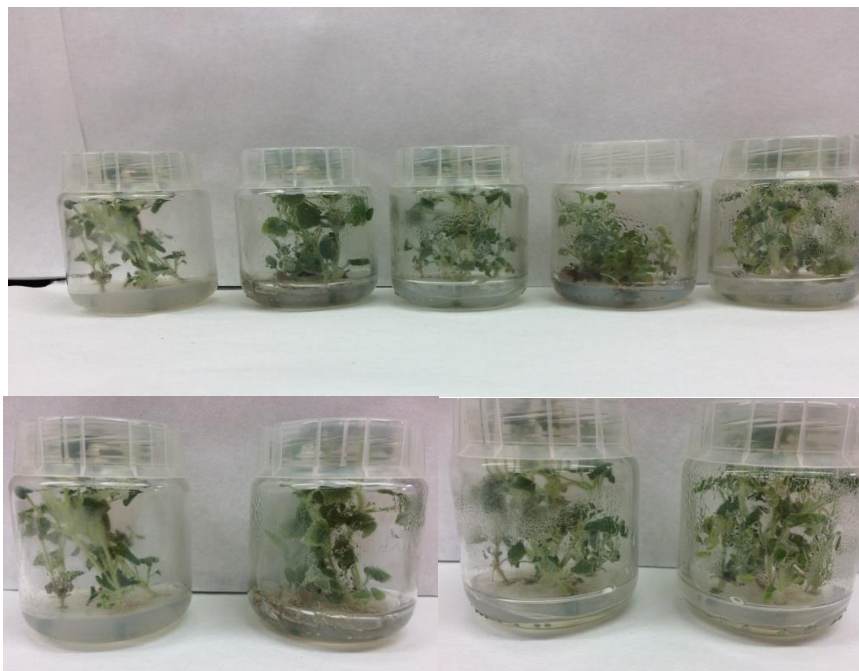
υγρή καλλιέργεια ήταν 0 % έναντι 57,8 % στο στερεό υπόστρωμα, ακόμα το ποσοστό καλογένεσης για το υγρό υπόστρωμα ήταν 100 % έναντι 69,2 % στο στερεό υπόστρωμα. Τέλος το δυναμικό πολλαπλασιασμού στο στερεό υπόστρωμα είναι 2,3 ενώ στο υγρό υπόστρωμα είναι μόνο 0,5.

**Πίνακας 2. Επίδραση του στερεού και υγρού θρεπτικού υποστρώματος MS στην αντίδραση εκφύτων κόμβου**

Τύπος υποστρώματος MS	Βλαστο γένεση( %)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός φύλλων ανα βλαστό	Καλογένεση (%)	Ριζοβολία (%)	Υπερευδ άτωση (%)	Δυναμικό πολλαπλασιασμού
Στερεό	87	4,17 a	3,92 a	17,3 a	69,2	57,8	25,2	2,3
Υγρό	100	2,16 a	1,45 b	20,5 a	100	0	100	0,5

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες, με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0.6

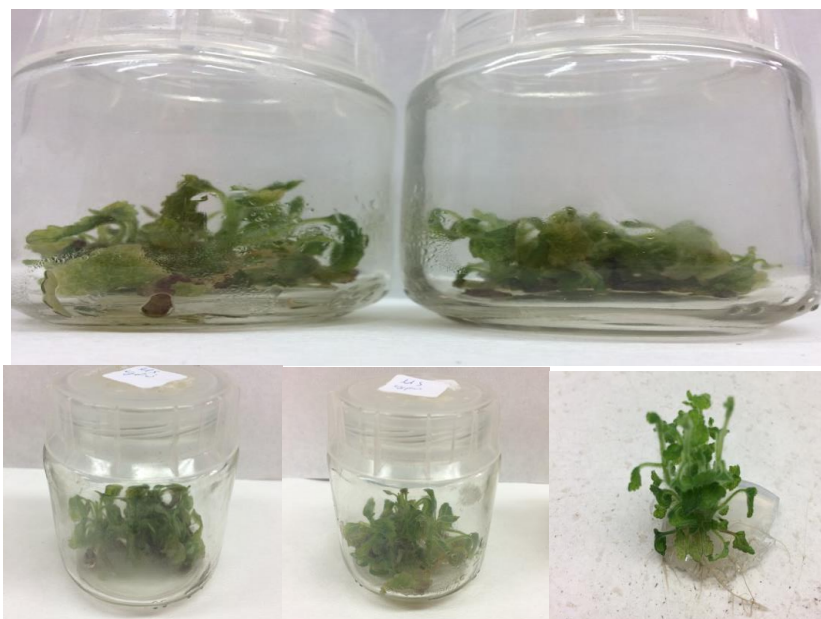


Εικ. 13. Καλλιέργεια εκφύτων κόμβου *Ballota acetabulosa* σε στερεό υπόστρωμα MS



Εικ.14. Καλλιέργεια εκφύτων κόμβου *Ballota acetabulosa* σε στερεό υπόστρωμα MS





Εικ.15. Καλλιέργεια εκφύτων κόμβου *Ballota acetabulosa* σε υγρό υπόστρωμα MS

### 3.2 Σύγκριση υγρής καλλιέργειας και στερεής διαφόρων συγκεντρώσεων άγαρ

Σκοπός αυτής της υποκαλλιέργειας ήταν η επανάληψη της καλλιέργειας εκφύτων σε υγρό υπόστρωμα προκειμένου να εξεταστεί ξανά αν εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης και η προσπάθεια επίλυσης αυτού μέσω διαφόρων συγκεντρώσεων άγαρ. Οι μικροβλαστοί που προέκυψαν από υγρή και στερεή καλλιέργεια κατά την πρώτη καλλιέργεια (3.1), υποκαλλιεργήθηκαν σε υγρό και στερεό υπόστρωμα MS, αντίστοιχα με το υπόστρωμα προέλευσης. Αν και από την πρώτη υποκαλλιέργεια διαπιστώθηκε ότι οι βλαστοί που προέκυπταν από την υγρή καλλιέργεια ήταν υπερενυδατωμένοι στο 100 %, ωστόσο το πείραμα επαναλήφθηκε για να επαληθευτούν τα αποτελέσματα.

Στη στερεή καλλιέργεια δοκιμάστηκαν διαφορετικές περιεκτικότητες σε άγαρ προκειμένου να διαπιστωθεί ποιες από αυτές τις περιεκτικότητες έδιναν καλύτερα αποτελέσματα στη μείωση του φαινομένου της υπερενυδάτωσης στη στερεή καλλιέργεια. Ακόμα βλαστοί που προήλθαν από υγρό υπόστρωμα κατά την πρώτη καλλιέργεια υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$ .

Οι περιεκτικότητες σε άγαρ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν  $5\text{ g L}^{-1}$ ,  $8\text{ g L}^{-1}$  και  $12\text{ g L}^{-1}$ .

Στα υποστρώματα αυτά υποκαλλιεργήθηκαν υπερενυδατωμένοι και μη-υπερενυδατωμένοι μικροβλαστοί. Τα έκφυτα στερεής καλλιέργειας τοποθετούνταν σε θάλαμο ανάπτυξης σταθερών συνθηκών στους  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 16 h φωτοπερίοδο, υπό  $37,5\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  fluorescent φως και τα έκφυτα υγρής καλλιέργειας τοποθετούνταν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , με δυνατότητα ανατάραξης  $70\text{ rad/min}$ , ομοίως με την πρώτη υποκαλλιέργεια.

Οι υπερενυδατωμένοι βλαστοί που προήλθαν από την υγρή καλλιέργεια και υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεή καλλιέργεια MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8\text{ g L}^{-1}$  έδωσαν υπερενυδατωμένους βλαστούς.

Σε ότι αφορά έκφυτα από μη υπερενυδατωμένους βλαστούς τα οποία προέρχονταν από στερεό υπόστρωμα και υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα με διάφορες συγκεντρώσεις άγαρ, το ποσοστό υπερενυδάτωσης διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα στο στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8\text{ g L}^{-1}$  και  $12\text{ g L}^{-1}$  με τα ποσοστά να είναι 10,6 % και 21,3 % αντίστοιχα. Στο  $5\text{ g L}^{-1}$  το ποσοστό υπερενυδάτωσης ήταν υψηλό, όπως και στα υγρά υποστρώματα (Πιν.3).

Ο μέσος αριθμός βλαστών ήταν υψηλότερος στο υγρό υπόστρωμα, στο στερεό υπόστρωμα με άγαρ  $5\text{ g L}^{-1}$  και στο στερεό υπόστρωμα με άγαρ  $8\text{ g L}^{-1}$  στο οποίο είχαν υποκαλλιεργηθεί υπερενυδατωμένοι βλαστοί από υγρό υπόστρωμα. Αυτό οφείλεται στο ότι στα υγρά ή ημιστερεά ( $5\text{ g L}^{-1}$ ) υποστρώματα τα έκφυτα απορροφούν καλύτερα τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος και δίνουν περισσότερους βλαστούς που όμως ατυχώς είναι υπερενυδατωμένοι ακριβώς λόγω της απορρόφησης περισσότερου αμμωνίου. Το ποσοστό ριζοβολίας παρουσιάζεται υψηλό στα στερεά υποστρώματα ιδίως στο υπόστρωμα με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8\text{ g L}^{-1}$  (Πιν.3). Το ποσοστό καλογένεσης ήταν υψηλό σε όλα τα υποστρώματα με εξαίρεση το στερεό υπόστρωμα με  $5\text{ g L}^{-1}$  άγαρ που παρουσιάζει το χαμηλότερο ποσοστό (69,8 %). Τέλος δεν παρουσιάστηκαν μολύνσεις ούτε στη στερεή αλλά ούτε και στην υγρή καλλιέργεια.

Συγκριτικά με τα αποτελέσματα της πρώτης καλλιέργειας το ποσοστό υπερενυδάτωσης στις υγρές καλλιέργειες παραμένει το ίδιο, ενώ στις στερεές καλλιέργειες με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8\text{ g L}^{-1}$  το ποσοστό φαίνεται μειωμένο στη δεύτερη υποκαλλιέργεια (Πιν.2, Πιν.3) και είναι χαμηλό όταν χρησιμοποιήθηκαν 8 ή

12 g L<sup>-1</sup> άγαρ (Πιν.3). Στις εικόνες 16-22 φαίνονται τα αποτελέσματα της υποκαλλιέργειας.

**Πίνακας 3. Επίδραση του υγρού και στερεού με διαφορετικές περιεκτικότητες σε άγαρ θρεπτικού υποστρώματος MS στην αντίδραση εκφύτων κόμβου και στο φαινόμενο της υπερενυδάτωσης.**

Τύπος υποστρώματος MS/ προέλευση εκφύτου	Ποσοστό Βλαστογένεσης (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός φύλλων ανα βλαστό	Ποσοστό Καλογένεσης (%)	Ποσοστό ριζοβολίας (%)	Ποσοστό υπερενυδάτωσης (%)	Δυναμικό πολλαπλασιασμού
(άγαρ 5 gL <sup>-1</sup> )/στ.	69,8	5,0 b	2,7b	29,3b	69,8	45,5	86,4	1,6
(άγαρ 8 gL <sup>-1</sup> )/στ.	95,7	2,4c	3,9a	21,1c	94,2	65,2	10,6	1,5
(άγαρ 12 gL <sup>-1</sup> )/στ.	85,9	2,5c	3,5a	21,7c	73,2	57,4	21,3	1,3
(άγαρ 8 gL <sup>-1</sup> )/ υγρ.	100	21,9a	2,3bc	40,7a	100	75	100	8,4
Υγρό/υγρ.	86,4	3,4c	1,3c	17,0d	86,4	23,5	100	0,6

στ: προέλευση εκφύτου από στερεό υπόστρωμα

υγρ: προέλευση εκφύτου από υγρό υπόστρωμα

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες, με Student's t test, P= 0,05, n= 100

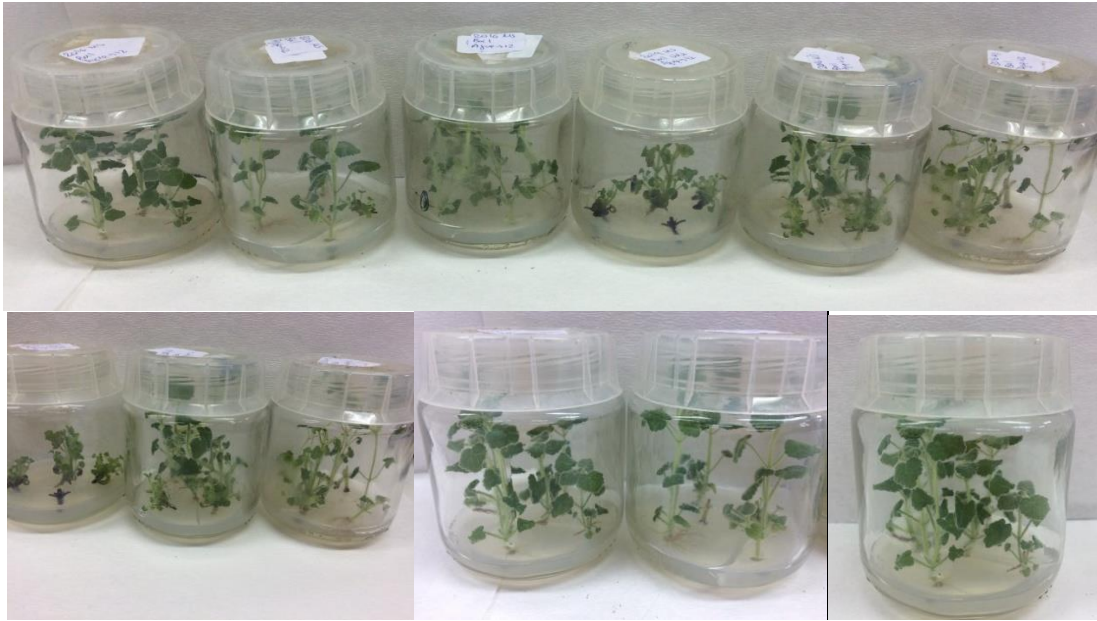
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0.6



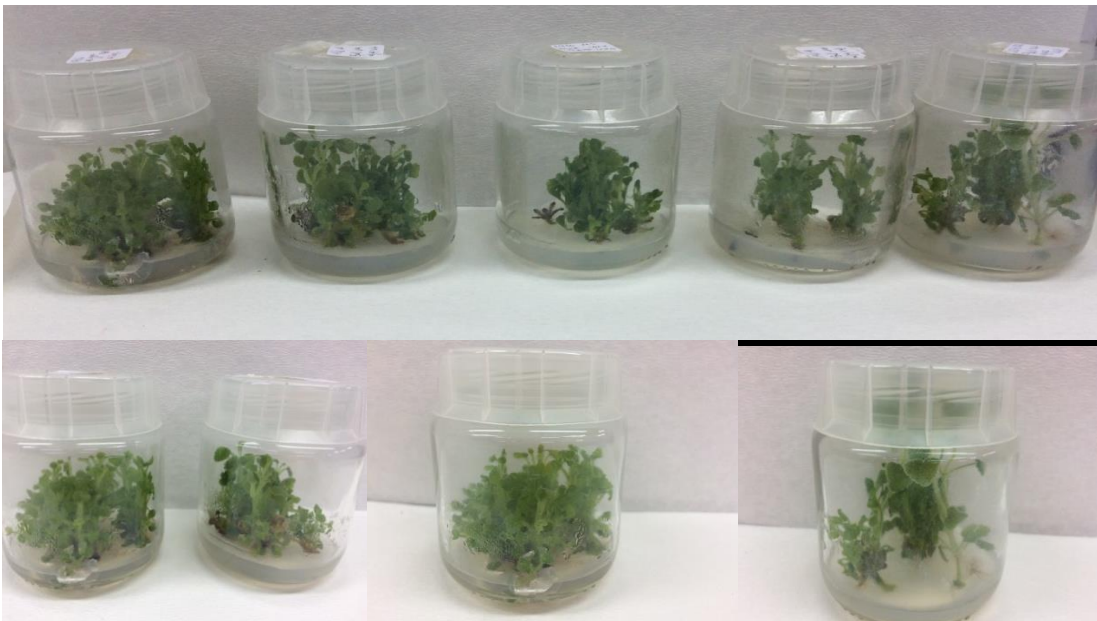
Εικ.16. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* προερχόμενων από στερό MS σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 5 g L<sup>-1</sup>.



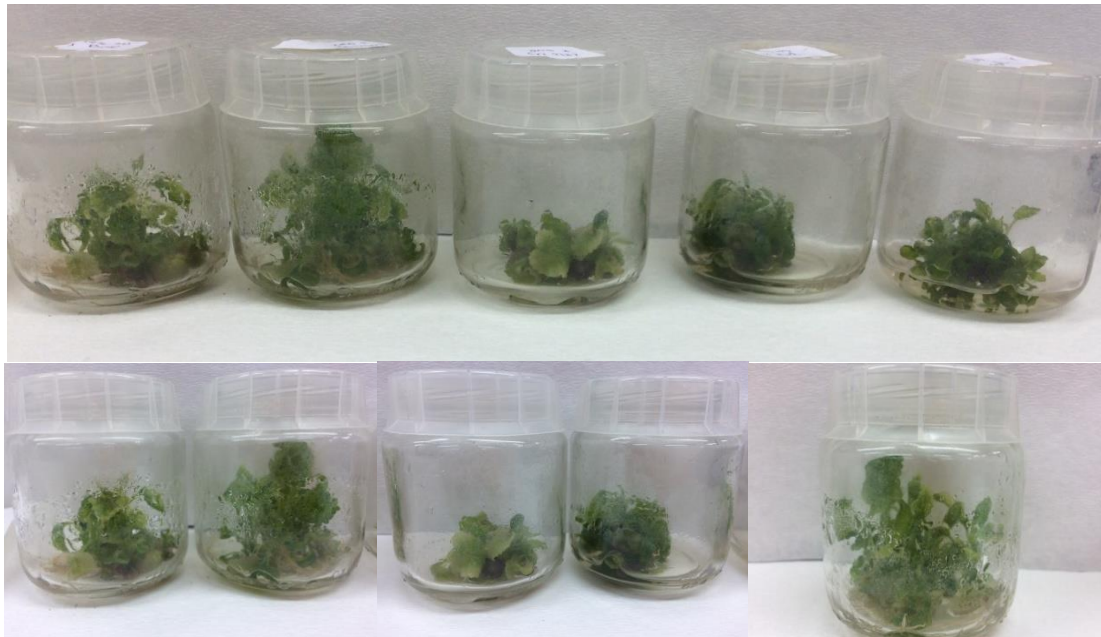
Εικ.17. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* προερχόμενων από στερό MS σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup>.



Εικ.18. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* προερχόμενων από στερεό MS σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup>.



Εικ.19. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup> προερχόμενοι από υγρό υπόστρωμα MS.



Εικ.20. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* προερχόμενων από υγρό MS σε υγρό υπόστρωμα MS με εμφανές το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης.



Εικ.21. Φυτά *Ballota acetabulosa* που έχουν προέλθει από στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$ .



Εικ.22. Υπερνευδατωμένοι βλαστοί και φυτάρια που έχουν προέλθει από υγρό υπόστρωμα MS.

### 3.3 Στερεή καλλιέργεια σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 και 12 g L<sup>-1</sup>

Στην δεύτερη υποκαλλιέργεια οι μικροβλαστοί που προέκυψαν από την στερεή και την υγρή καλλιέργεια υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 και 12 g L<sup>-1</sup>. Ο λόγος που επιλέχθηκαν τα δύο αυτά υποστρώματα ήταν τα καλά αποτελέσματα που έδειξαν ως προς το ποσοστό υπερνευδάτωσης στην πρώτη υποκαλλιέργεια. Έκφυτα που είχαν υποκαλλιεργηθεί σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup> μεταφέρθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup> και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας. Τα έκφυτα από όλα τα υπόλοιπα υποστρώματα υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup>. Πιο συγκεκριμένα βλαστοί μη υπερνευδατωμένοι που είχαν υποκαλλιεργηθεί σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 5 g L<sup>-1</sup> μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup>, βλαστοί που είχαν αναπτυχθεί σε στερεό

υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup> υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup>, βλαστοί που είχαν αναπτυχθεί σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup> ξανά υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup>. Τέλος βλαστοί από υγρή καλλιέργεια που ήταν όλοι υπερενυδατωμένοι, υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup>. Τα ποσοστά υπερενυδάτωσης κατά την υποκαλλιέργεια μικροβλαστών που προήλθαν από στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 5 g L<sup>-1</sup> και αυτών που προήλθαν από υγρό υπόστρωμα MS εξακολούθησαν να παραμένουν υψηλά με ποσοστό 72,9 % και 100 % αντίστοιχα, ωστόσο οι βλαστοί που υποκαλλιεργήθηκαν από υγρό σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup> έδειξαν στην όψη τους λιγότερο υπερενυδατωμένοι από τους υπόλοιπους υπερενυδατωμένους βλαστούς.

Ο μέσος αριθμός βλαστών ήταν υψηλότερος στην υποκαλλιέργεια βλαστών που προήλθαν από από την υγρή καλλιέργεια και την στερεή καλλιέργεια με περιεκτικότητα σε άγαρ 5 g L<sup>-1</sup> (Πιν.4).

Το ποσοστό ριζοβολίας ήταν υψηλό εκτός της καλλιέργειας όπου τα έκφυτα ελήφθησαν από μικροβλαστούς που αναπτύχθηκαν σε υγρό υπόστρωμα (Πιν.4).

Το ποσοστό καλογένεσης ήταν 100 % σε όλα τα υποστρώματα με εξαίρεση το στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup> που ήταν 92 %.

Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερο στο στερεό υπόστρωμα με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup> που είχε προέλθει από υγρό υπόστρωμα και ήταν 2,2. Η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ στα 12 g L<sup>-1</sup> δεν εξάλλειψε της υπερενυδάτωση, η οποία παρέμεινε στα ίδια χαμηλά επίπεδα με αυτή στο υπόστρωμα με 8 g L<sup>-1</sup> άγαρ, όταν τα έκφυτα προέρχονται από στερεά υποστρώματα (8 ή 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ), όταν όμως τα έκφυτα προέρχονταν από ημιστερεά (5 g L<sup>-1</sup> άγαρ) ή υγρά υποστρώματα η υπερενυδάτωση ήταν πολύ υψηλή και στο υπόστρωμα με υψηλή συγκέντρωση (12 g L<sup>-1</sup>) άγαρ (Πιν.4).

Στις εικόνες 23-27 φαίνονται τα αποτελέσματα.



**Πίνακας 4. Επίδραση του στερεού με διαφορετικές περιεκτικότητες άγαρ θρεπτικού υποστρώματος MS στην αντίδραση εκφύτων κόμβου μικροβλαστών διαφόρων προελεύσεων και στην υπερενυδάτωση.**

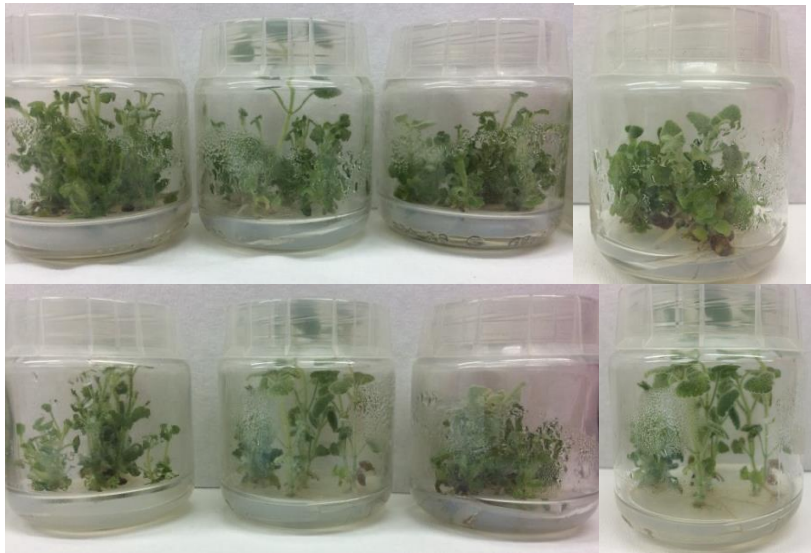
Συγκέντρωση άγαρ (gL <sup>-1</sup> ) Υπόστρωμα καλλιέργειας/ υπόστρωμα προέλευσης	Ποσοστό Βλαστογένεσης (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός φύλλων ανα βλαστό	Ποσοστό Καλογένεσης (%)	Ποσοστό ριζοβολίας (%)	Ποσοστό υπερενυδάτωσης (%)	Δυναμικό πολλαπλασιασμού
8/8	92	2,1 c	4,1 b	10,5 a	92	80	14,5	1,3
12/5	100	3,1 b	2,6 c	8,6 b	100	71,4	72,9	1,3
12/8	100	2,3 c	4,8 a	11,1 a	100	88,6	5,7	1,8
12/12	100	2,1 c	4,6 a	10,7 a	100	88,1	14,9	1,6
12/0	100	5,9 a	2,3 c	9,5 b	100	44	100	2,2

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες, με Student's t test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$

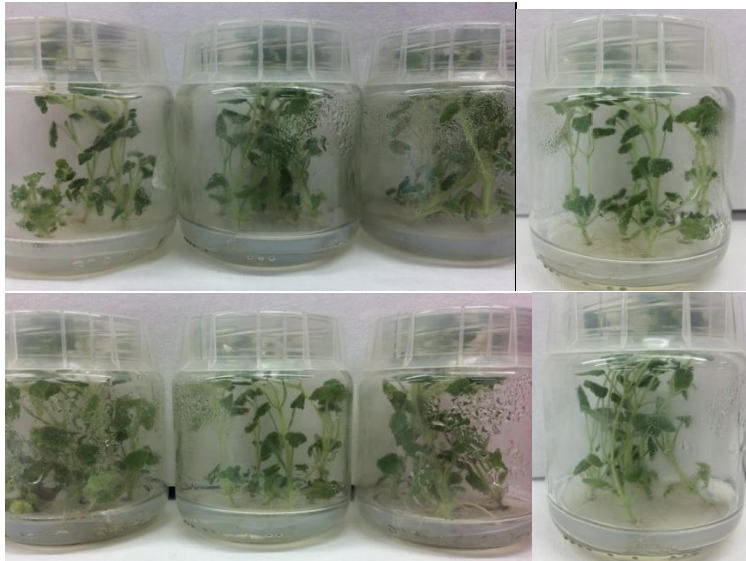
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0.6



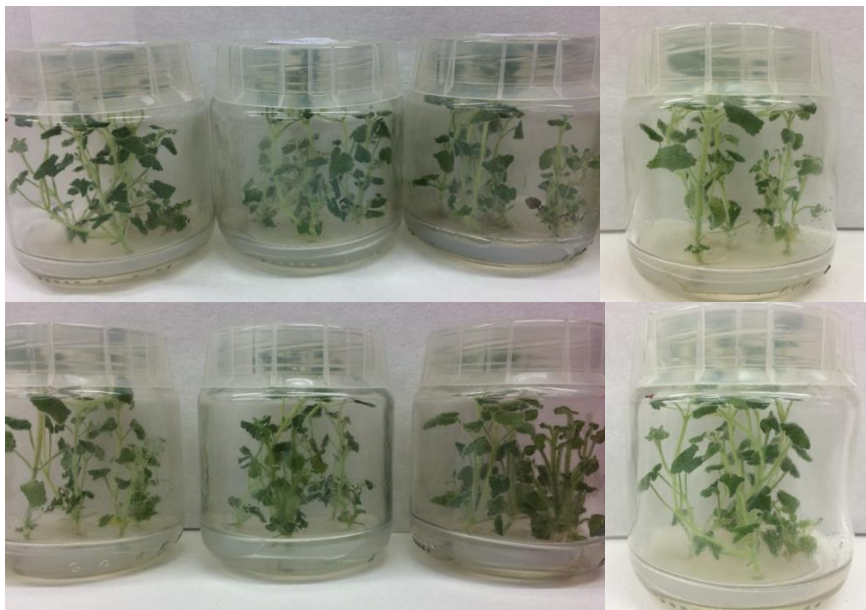
Εικ.23. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει και έχουν ξανά υποκαλλιεργηθεί σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup>.



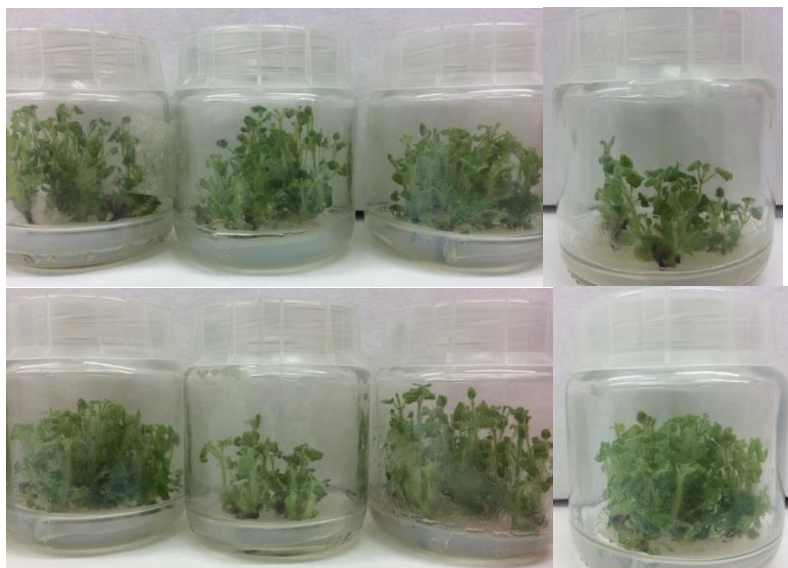
Εικ.24. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει από στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 5 g L<sup>-1</sup> και υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup>.



Εικ.25. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει από στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup> και υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup>.



Εικ.26. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει και έχουν υποκαλλιεργηθεί σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup>.



Εικ.27. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει από υγρό υπόστρωμα MS και υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $12 \text{ g L}^{-1}$ .

### **3.4 Στερεή καλλιέργεια σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 και $12 \text{ g L}^{-1}$ και MS/2 με $8 \text{ g L}^{-1}$ άγαρ και μελέτη της επίδρασης της αλατότητας του υπόστρωματος στην αντίδραση των εκφύτων.**

Στην τρίτη υποκαλλιέργεια συνεχίστηκε η μελέτη επίδρασης δύο διαφορετικών περιεκτικότητων άγαρ ( $8$  και  $12 \text{ g L}^{-1}$ ) στην αντίδραση των εκφύτων του φυτού *Ballota acetabulosa* καθώς και στην επίδραση που είχαν στο φαινόμενο της υπερενυδάτωσης. Τα έκφυτα κόμβου που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  είχαν προέλθει από υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  (μάρτυρας) ενώ τα έκφυτα που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $12 \text{ g L}^{-1}$  είχαν προέλθει από υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $12 \text{ g L}^{-1}$ .

Έκφυτα από υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  χρησιμοποιήθηκαν και για την εκτέλεση ακόμα δύο επεμβάσεων. Η πρώτη επέμβαση ήταν ο έλεγχος αντίδρασης σε υπόστρωμα MS/2, και η δεύτερη επέμβαση ήταν η αντοχή και η αντίδρασή του φυτού *Ballota acetabulosa* στην αλατότητα. Για τον έλεγχο αντοχής στην αλατότητα του φυτού χρησιμοποιήθηκε αλάτι εμπορίου (ΚΑΛΑΣ).

Για την μελέτη της αντίδρασης στο υπόστρωμα MS/2 χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα ενός κόμβου.

Χρησιμοποιήθηκε δόση  $10 \text{ g L}^{-1}$  NaCl σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 και  $12 \text{ g L}^{-1}$  και μελετήθηκε η επίδραση του στο ποσοστό βλαστογένεσης, ριζοβολίας, υπερενυδάτωσης και καλογένεσης.

Το ποσοστό υπερενυδάτωσης για τους μικροβλαστούς που υποκαλλιεργήθηκαν σε MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $12 \text{ g L}^{-1}$  ήταν 0 % ενώ στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  ήταν 9,3 %, ποσοστά πολύ ικανοποιητικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι και στο υπόστρωμα MS/2 το ποσοστό υπερενυδάτωσης ήταν 9,9 %.

Ο μέσος αριθμός βλαστών ήταν καλύτερος στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$ .

Το ψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας εμαφνίστηκε στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $12 \text{ g L}^{-1}$ .

Η αντίδραση του φυτού στο άλας ήταν αρνητική, καθώς μειώθηκε η βλαστογένεση και στα δύο υποστρώματα ( $10 \text{ g L}^{-1}$  NaCl σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 και  $12 \text{ g L}^{-1}$ ) καθώς και η επιμήκυνση των βλαστών (Πιν.5) Επίσης παρεμποδίστηκε παντελώς η ριζοβολία. Το ποσοστό υπερενυδάτωσης ήταν μηδενικό ομοίως και το ποσοστό καλογένεσης. Παρατηρήθηκε επίσης διαφορετική από τη συνηθισμένη απόχρωση στα φύλλα κιτρίνη- πράσινη.

Στις εικόνες 28-31 φαίνονται τα αποτελέσματα.

**Πίνακας 5. Επίδραση του στερεού σε διαφορετικές περιεκτικότητες σε άγαρ θρεπτικού υποστρώματος (MS), του υποστρώματος MS/2 και του άλατος στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβου και στο φαινόμενο της υπερενυδάτωσης.**

Τύπος υποστρώματος (στερεό)	Ποσοστό Βλαστογένεσης (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός φύλλων ανα βλαστό	Ποσοστό Καλογένεσης (%)	Ποσοστό ριζοβολίας (%)	Ποσοστό υπερενυδάτωσης (%)	Δυναμικό πολλαπλασιασμού
MS/2	96,8	2,1 ab	2,7 c	9,9 c	96,8	-	9,9	0,9
MS8 (από MS8)	100	2,3 a	3,2 b	11,6 b	100	72	9,3	1,2
MS12 (από MS12)	90	1,8 bc	4,5 a	13,3 a	90	95,2	0	1,2
MS8+ ΑΛΑΣ	65	1,7 c	0,2 d	3,7 d	0	0	0	3,6
MS12+ ΑΛΑΣ	66,2	1,9 bc	0,2 d	3,6 d	0	0	0	4,1

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες, με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0.6



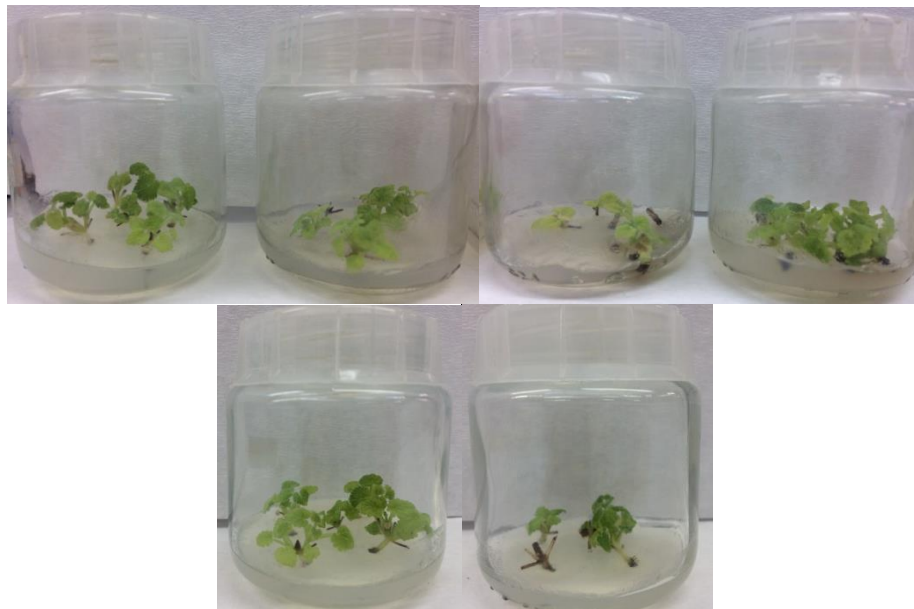
Εικ.28. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει και έχουν υποκαλλιεργηθεί σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup>.



Εικ.29. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει και έχουν υποκαλλιεργηθεί σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup>.



Εικ.30. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει από στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup> και υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup> και άλας 10 g L<sup>-1</sup>.



Εικ.31. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει από στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup> και υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup> και άλας 10 g L<sup>-1</sup>.



### 3.5 Επίδραση ενεργού άνθρακα και διαφορετικών περιεκτικότητας άγαρ και σουκρόζης στο φυτό *B. acetabulosa*.

Με στόχο τη μείωση της υπερενυδάτωσης δοκιμάστηκε η επίδραση του ενεργού άνθρακα καθώς και διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης και άγαρ σε διάφορους συνδυασμούς. Σύμφωνα με αναφορές ο ενεργός άνθρακας μπορεί να συμβάλει θετικά στην μείωση του φαινομένου της υπερενυδάτωσης, επιπλέον σε πειράματα που έχουν γίνει και στο εργαστήριο μας οι αλλαγές στην περιεκτικότητα του υποστρώματος σε σακχαρόζη φάνηκε να επηρεάζουν στην εμφάνιση του φαινομένου.

Οι επεμβάσεις που έγιναν ήταν οι εξής::

- Έκφυτα κόμβου σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  και  $30 \text{ g L}^{-1}$  σακχαρόζη (μάρτυρας).

- Έκφυτα κόμβου σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  και  $20 \text{ g L}^{-1}$  σακχαρόζη.

- Έκφυτα κόμβου σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$ ,  $2 \text{ g L}^{-1}$  ενεργό άνθρακα και  $30 \text{ g L}^{-1}$  σακχαρόζη.

- Έκφυτα κόμβου σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$ ,  $2 \text{ g L}^{-1}$  ενεργό άνθρακα και  $20 \text{ g L}^{-1}$  ζάχαρη.

- Έκφυτα κόμβου σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $12 \text{ g L}^{-1}$  και  $30 \text{ g L}^{-1}$  σακχαρόζη.

- Έκφυτα κόμβου σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $12 \text{ g L}^{-1}$  και  $20 \text{ g L}^{-1}$  ζάχαρη.

Όλα τα έκφυτα προήλθαν από υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$ .

Η προσθήκη ενεργού άνθρακα επέδρασε αρνητικά και στον αριθμό και στο μήκος των βλαστών, αλλά μείωσε το ποσοστό υπερενυδάτωσης. Αρνητικά συνέβαλε και στο ποσοστό ριζοβολίας. Η μείωση κατά δέκα γραμμάρια στην δοσολογία της σακχαρόζης αύξησε το μέσο μήκος των βλαστών και μείωσε την υπερενυδάτωση. Στην παρούσα υποκαλλιέργεια παρουσιάστηκε μια μεγάλη αύξηση του ποσοστού

υπερενυδάτωσης που στο υπόστρωμα μάρτυρας MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup> και 30 g L<sup>-1</sup> σακαχαρόζη έφτασε το 40,6 % (Πιν.6).

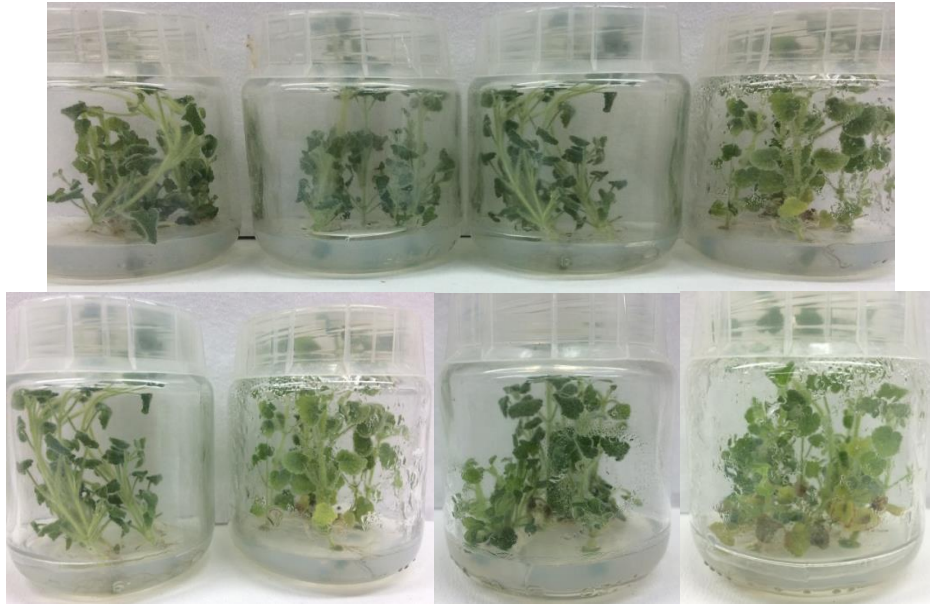
Στις εικόνες 32-37 φαίνονται τα αποτελέσματα.

**Πίνακας 6. Επίδραση της συγκέντρωσης του άγαρ, της σουκρόζης, καθώς και της παρουσίας ενεργού άνθρακα (C) στην αντίδραση των εκφύτων κόμβου και στην υπερενυδάτωση.**

Συγκέντρωση άγαρ/ σουκρόζη/ C	Ποσοστό Βλαστογένεσης (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός φύλλων	Ποσοστό Καλογένεσης (%)	Ποσοστό ριζοβολίας (%)	Ποσοστό υπερενυδάτωσης (%)	Δυναμικό πολλαπλασιασμού
8/30/0	98,5	3,1 a	3,8 c	13,8 b	98,5	54,7	40,6	1,9
12/30/0	98,2	2,4 bc	4,1 bc	16,6 a	98,2	92,6	13	1,6
8/20/0	98,5	2,7 ab	4,5 ab	14,8 b	98,5	60,1	28,1	1,9
12/20/0	98,2	2,1 c	4,9 a	17,1 a	98,2	70,4	5,6	1,6
8/30/2	95,3	1,9 c	1,6 d	10,0 c	95,3	57,4	19,7	0,5
8/20/2	98,5	2,2 c	2,1 d	10,8 c	98,5	46,9	14,1	0,8

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες, με Student's t test, P= 0,05, n= 100

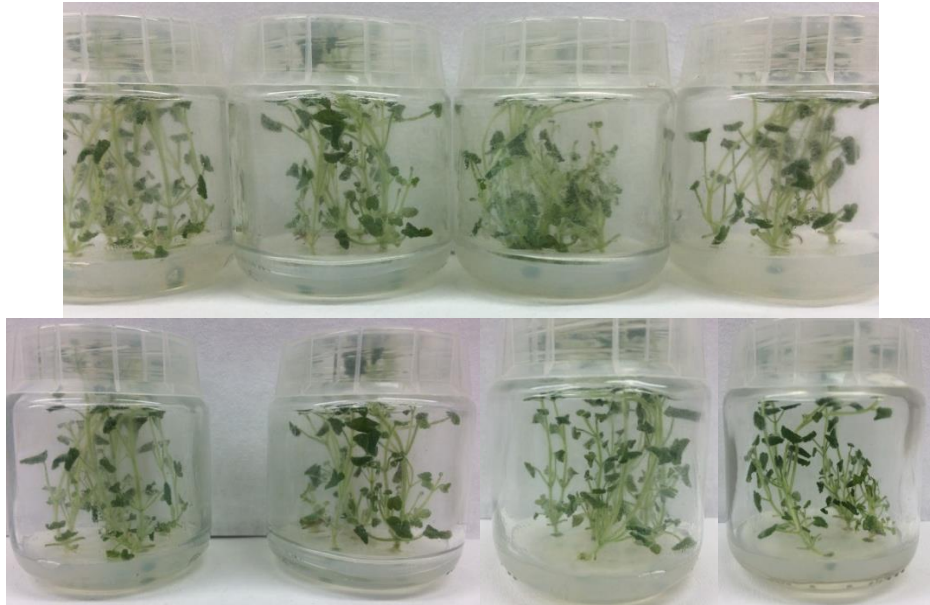
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0.6



Εικ.32. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει και έχουν υποκαλλιεργηθεί σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  και  $30 \text{ g L}^{-1}$  σακχαρόζη.



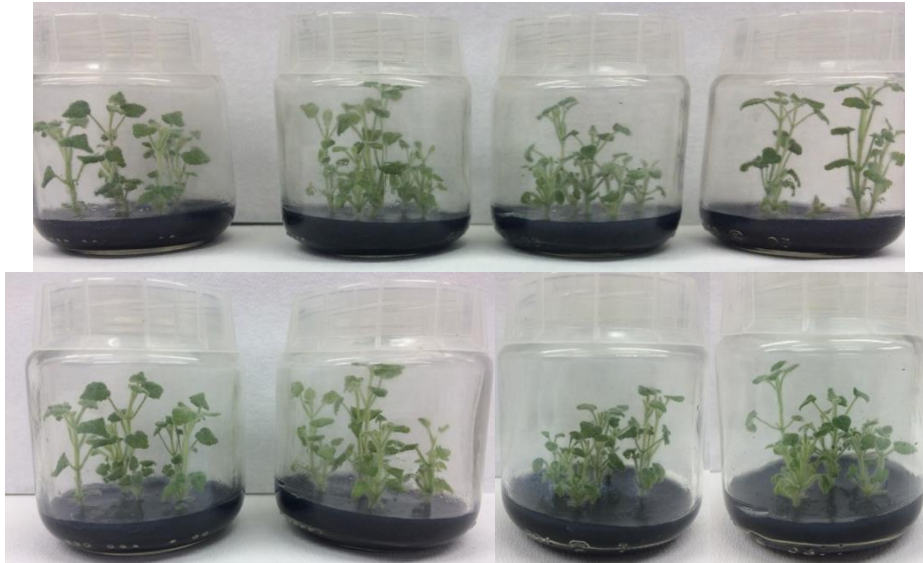
Εικ.33. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει από στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  και υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $12 \text{ g L}^{-1}$  στο φυτό *Ballota acetabulosa*.



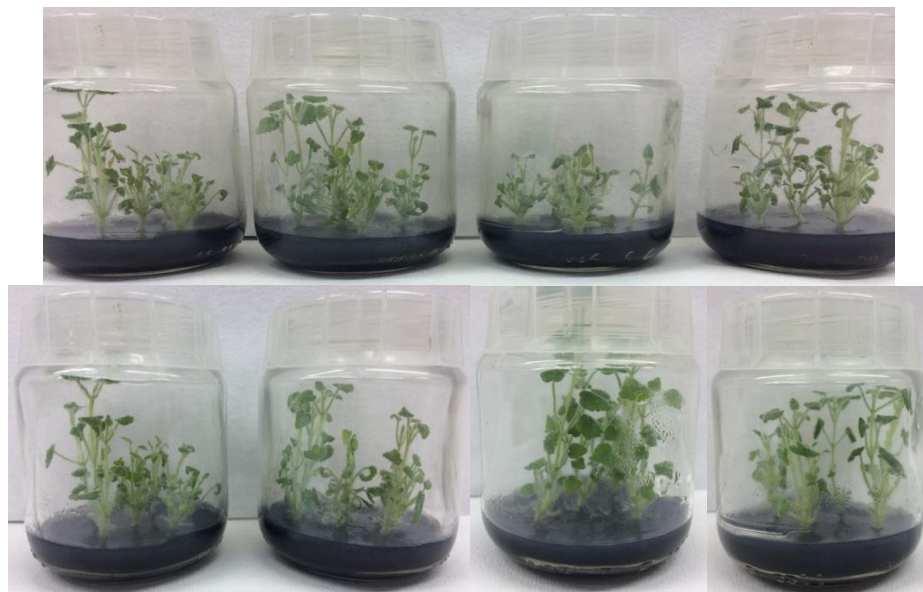
Εικ.34. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει από στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  και  $30 \text{ g L}^{-1}$  σακχαρόζη και υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  και  $20 \text{ g L}^{-1}$  σακχαρόζη.



Εικ.35. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει από στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  και  $30 \text{ g L}^{-1}$  σακχαρόζη και υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $12 \text{ g L}^{-1}$  και  $20 \text{ g L}^{-1}$  σακχαρόζη.



Εικ.36. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει από στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  και υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  και ενεργό άνθρακα  $2 \text{ g L}^{-1}$ .



Εικ.37. Καλλιέργεια κόμβων *B. acetabulosa* που έχουν προέλθει από στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  και  $30 \text{ g L}^{-1}$  σακαχρόζη και υποκαλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  και ενεργό άνθρακα  $2 \text{ g L}^{-1}$  και  $20 \text{ g L}^{-1}$  σακαχρόζη.

### 3.6 Σύγκριση πέντε υποκαλλιεργειών στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup>

Σε όλες τις υποκαλλιεργείες γινόταν διατήρηση υλικού στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup>. Το ποσοστό βλαστογένεσης βελτιώθηκε κατά μήκος των υποκαλλιεργειών ενώ ο αριθμός των βλαστών φάνηκε να φθίνει στην δεύτερη και τρίτη υποκαλλιεργεία ενώ από την τέταρτη υποκαλλιεργεία φάνηκε να ανακάμπτει και να αυξάνεται. Το μήκος των βλαστών κυμαινόταν σε παραπλήσια επίπεδα. Το μήκος των μεσογονατίων φαίνεται να αυξάνεται από την τρίτη υποκαλλιεργεία και πέρα. Τέλος για το ποσοστό της υπερενυδάτωσης δεν μπορεί να βγει συμπέρασμα καθώς ενώ στις ενδιάμεσες υποκαλλιεργείες φαίνεται να κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα στην πρώτη και ιδιαίτερα στην πέμπτη υποκαλλιεργεία είναι υψηλό (Πιν.7, Εικ.38).

**Πίνακας 7. Σύγκριση πέντε υποκαλλιεργειών στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup>.**

Υποκαλλιεργεία	Ποσοστό βλαστογένεσης (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός φύλλων	Ποσοστό Καλογένεσης (%)	Ποσοστό ριζοβολίας (%)	Ποσοστό υπερενυδάτωσης (%)	Δυναμικό πολλαπλασιασμού
1 <sup>η</sup>	87	4,2 a	3,9 a	17,3 b	69,2	57,8	25,2	2,4
2 <sup>η</sup>	95,7	2,4 b	3,8 ab	21,1 a	94,2	65,2	10,6	1,5
3 <sup>η</sup>	92	2,1 b	4,1 a	10,5 d	92	80	14,5	1,3
4 <sup>η</sup>	100	2,3 b	3,2 b	11,6 d	100	72	9,3	1,2
5 <sup>η</sup>	98,5	3,1 b	3,8 ab	13,8 c	98,5	54,7	40,6	1,9

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες, με Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0.6



Εικ.38. Μικροβλαστοί του φυτού *Ballota acetabulosa* σε υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$ .

### 3.7 Ριζοβολία

Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί μήκους 1 cm που προήλθαν από υπόστρωμα MS με 8 g L<sup>-1</sup> άγαρ, τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα μισής δύναμης, MS/2 χωρίς προσθήκη κάποιας φυτορρυθμιστικής ουσίας.

Το ποσοστό ριζοβολίας στο υπόστρωμα MS/2 ήταν 89,2 %. Το φυτό *Ballota acetabulosa* ριζοβολεί με μεγάλη ευκολία. Το ποσοστό ριζοβολίας και στα υπόλοιπα υποστρώματα που είχαν χρησιμοποιηθεί ήταν αρκετά ικανοποιητικό και ιδιαίτερα στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 12 g L<sup>-1</sup> κυμαινόταν σε όλες τις υποκαλλιέργειες σε υψηλά επίπεδα σε ποσοστό πάνω από 85 %.

Ο μέσος αριθμός των ριζών στο υπόστρωμα MS/2 ήταν 9,6 ενώ το μέσο μήκος ριζών είναι 1,4 cm.

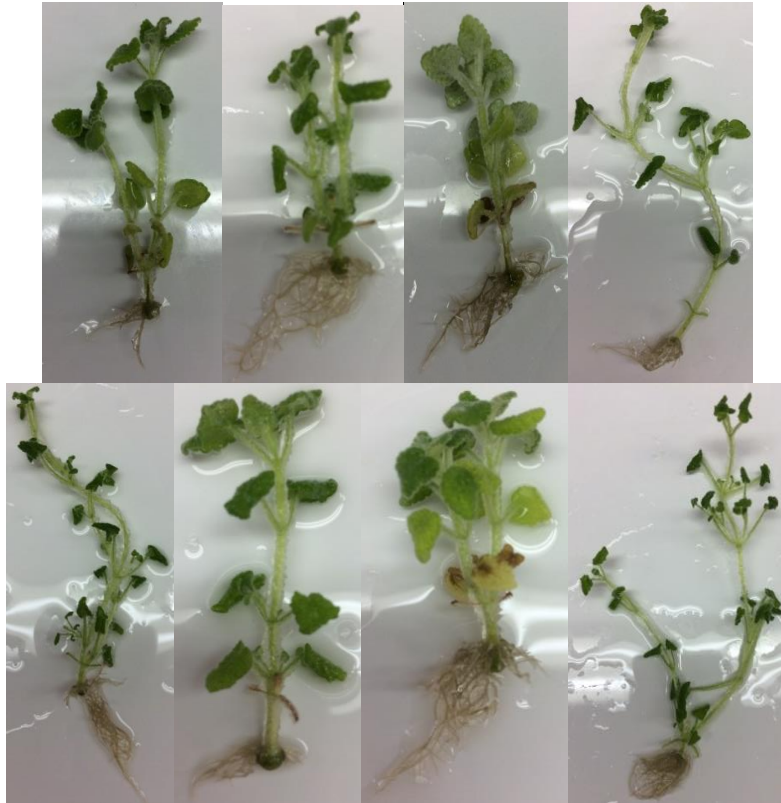
Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε 40 μέρες μετά την καλλιέργεια.

Στον πίνακα 8 και στην εικόνα 39 φαίνονται τα αποτελέσματα της ριζοβολίας.

**Πίνακας 8. Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος MS μισής δύναμης στο ποσοστό ριζοβολίας, τον αριθμό και το μήκος των ριζών ανά ριζοβολημένο μικροβλαστό.**

Υπόστρωμα	Αριθμός ριζών	Μήκος ριζών (cm)	Ποσοστό ριζοβολίας (%)
MS/2	9,6	1,4	89,2





Εικ.39. Ριζοβολημένοι βλαστοί σε υπόστρωμα MS/2 του φυτού *Ballota acetabulosa*.

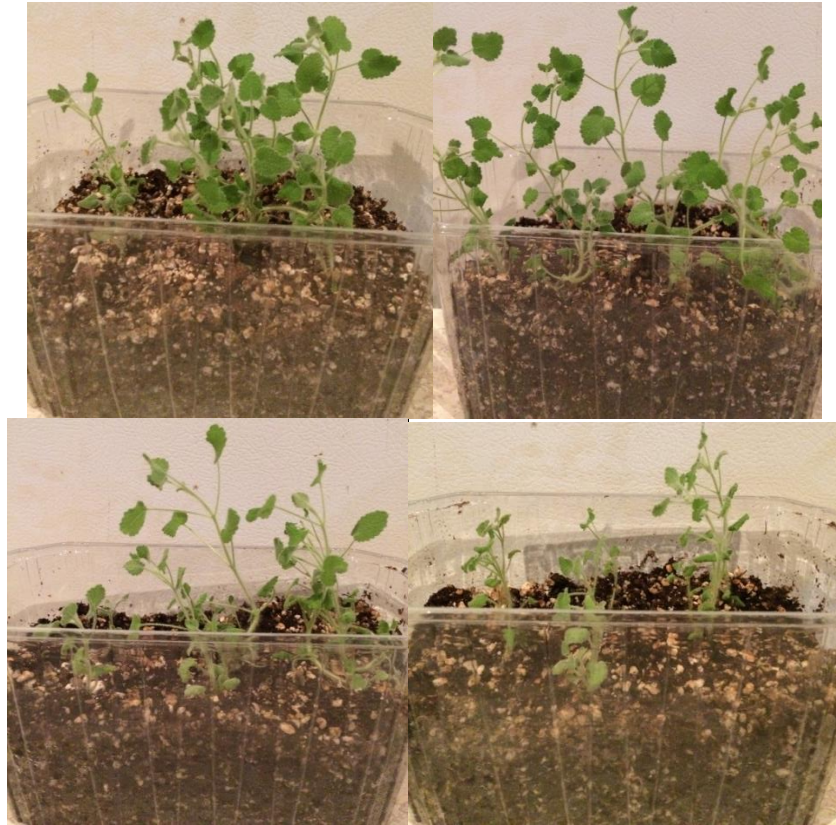
### 3.8 Εγκλιματισμός φυταρίων

Φυτάρια του *B. acetabulosa* που ριζοβόλησαν *in vitro*, μετά την απομάκρυνση του υποστρώματος από το ριζικό τους σύστημα, φυτεύτηκαν στα δοχεία καλλιέργειας σε μίγμα τύρφης-περλίτης 1:1 v/v, αρχικά σε θάλαμο σταθερών συνθηκών και στη συνέχεια στο θερμοκήπιο για περαιτέρω ανάπτυξη. Μετά από παραμονή μιας εβδομάδας, των δοχείων καλλιέργειας, σε θάλαμο σταθερών συνθηκών (20 °C, 16 h φωτοπερίοδος) αφαιρέθηκε η πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος και τα δοχεία μεταφέρθηκαν στο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου από τον Οκτώβριο μέχρι τον Φλεβάρη του 2018.

Τα φυτάρια εγκλιματίστηκαν με 100 % επιτυχία σε *ex vitro* συνθήκες.

Μετά την ολοκλήρωση του εγκλιματισμού (1 μήνα), ακολούθησε μεταφύτευση σε γλάστρα 10 cm σε υπόστρωμα τύρφης : περλίτη (1:1 v/v) και (2:1 v/v). Αυτά στη συνέχεια έδωσαν 2 βλαστούς ανά φυτό.

Στις εικόνες 40-42 φαίνονται τα εγκλιματισμένα φυτάρια σε διάφορα στάδια ανάπτυξης.



Εικ.40. Εγκλιματισμένα φυτάρια *Ballota acetabulosa* ένα μήνα μετά τη μεταφορά τους *ex vitro*.



Εικ.41. Εγκλιματισμένα φυτάρια *Ballota acetabulosa* ένα μήνα μετά την μεταφύτευση.



Εικ.42. Εγκλιματισμένα φυτάρια *Ballota acetabulosa* ένα μήνα μετά την μεταφύτευση.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 4.1 *In vitro* καλλιέργεια του είδους *Ballota acetabulosa*

Το στάδιο του πολλαπλασιασμού στις *in vitro* καλλιέργειες, είναι αρκετά σημαντικό κατά τη δημιουργία ενός πρωτοκόλλου μικροπολλαπλασιασμού. Η απόκτηση σε μικρό χρονικό διάστημα ενός μεγάλου αριθμού βλαστών, με μεγάλο μήκος χωρίς την παρουσία μολύνσεων ή ανεπιθύμητων φαινομένων όπως αυτό της υπερενυδάτωσης και η ομοιότητα των παραγόμενων βλαστών με τα μητρικά φυτά από όπου προήλθαν είναι μείζονος σημασίας.

Σχετικά με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *B. acetabulosa* δεν υπήρχαν βιβλιογραφικές αναφορές εκτός από μια που διεξήχθη στο εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου ΓΠΑ (Vlachou *et al.*, 2016). Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου *in vitro* πολλαπλασιασμού του *Ballota acetabulosa*, για την εισαγωγή του ως καλλωπιστικό φυτό, στην επιχειρηματική ανθοκομία ειδικά για τη χρήση στις αποκαταστάσεις τοπίων και στο αστικό πράσινο της ανατολικής μεσογείου. Η χρήση εκφύτων κόμβου βλαστού, που προήλθαν από *in vitro* καλλιέργειες ενηλίκων φυτών που συντηρούσε η Γ. Βλάχου, σε υπόστρωμα MS με 30 g L<sup>-1</sup> σακχαρόζη και 8 g L<sup>-1</sup> άγαρ ήταν το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην τρέχουσα μελέτη.

Η παρούσα μελέτη με στόχο την αύξηση του αποτελεσματικού μικροπολλαπλασιασμού του *B. acetabulosa* επικεντρώθηκε στην καλλιέργεια εκφύτων σε υγρό και σύγκρινε την απόδοση του με στερεό υπόστρωμα. Από τη μελέτη της υγρής καλλιέργειας του φυτού προέκυψε ότι μέσω της υγρής καλλιέργειας το ποσοστό υπερενυδάτωσης ήταν 100 % κάτι που δημιουργούσε πρόβλημα στην περαιτέρω ανάπτυξη του φυτού. Επιπλέον παρατηρήθηκε τόσο στα υπερενυδατωμένα φυτά που προέρχονταν από στερεό όσο και σε αυτά που προέρχονταν από υγρό υπόστρωμα μια υπερβολική βλαστογένεση με τον μέσο αριθμό των βλαστών να διαφέρει αισθητά από αυτόν των φυσιολογικών φυτών. Η υποκαλλιέργεια σε υγρό υπόστρωμα διεξήχθη δύο φορές και έδωσε τα ίδια ακριβώς αποτελέσματα. Επιπλέον έγινε μελέτη της μεταφοράς εκφύτων υπερενυδατωμένων από υγρή σε στερεή καλλιέργεια με στόχο τη μείωση της

υπερενουδάτωσης και παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό υπερενουδάτωσης παρέμεινε στο 100 %.

Επομένως σαν συμπέρασμα λαμβάνεται πως η υγρή καλλιέργεια είναι μη βιώσιμος τρόπος παραγωγής για *in vitro* πολλαπλασιασμό του είδους *Ballota acetabulosa*.

Σε πείραμα σύγκρισης στερεών υποστρωμάτων MS με διάφορες περιεκτικότητες σε άγαρ (5, 8, 12 g L<sup>-1</sup>) παρατηρήθηκε ότι αυξημένη ποσότητα άγαρ οδηγούσε σε χαμηλότερο ποσοστό υπερενουδάτωσης. Οι Bertouklis *et al.*, (2003) στο *Globularia algyptum* εφάρμοσαν υψηλή συγκέντρωση άγαρ (20 g L<sup>-1</sup>) και εξάλειψαν την υπερενουδάτωση αλλά μειώθηκε ο μέσος αριθμός και το μήκος των αναγεννημένων βλαστών κάτι που παρατήρηθηκε ομοίως και στη *Ballota acetabulosa* στη συγκέντρωση των 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ.

Η υποκαλλιέργεια εκφύτων κόμβου σε υπόστρωμα MS μισής δύναμης έδειξε καλά αποτελέσματα στο ποσοστό υπερενουδάτωσης ωστόσο παρατηρήθηκε μείωση στο μέσο μήκος των βλαστών.

Η δοκιμή στην αντοχή στο NaCl (10 g L<sup>-1</sup>) δεν επέφερε καλά αποτελέσματα ιδιαίτερα στο μήκος των βλαστών που ήταν εξαιρετικά χαμηλό (0,2 cm) και στη ριζοβολία που ήταν μηδενική.

Τέλος δοκιμάστηκε η επίδραση διαφορετικής συγκέντρωσης σακχαρόζης και η προσθήκη ενεργού άνθρακα (2 g L<sup>-1</sup>) στο υπόστρωμα. Σε αναφορές φαίνεται πως για να εξουδετερωθεί η υπερενουδάτωση, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις άγαρ και σακχαρόζης, καθώς αυτές οι δύο παράμετροι έχουν αναφερθεί για τον έλεγχο του φαινομένου (Langford and Wainwright, 1988, Kitto and Mackay, 1992, Luckner and Diettrich, 1992). Στους διάφορους συνδυασμούς που έγιναν η προσθήκη ενεργού άνθρακα έδωσε χειρότερα αποτελέσματα στον μέσο αριθμό και στο μέσο μήκος των βλαστών. Ούτε η μείωση της συγκέντρωσης σε σακχαρόζη έδωσε κάποιο αξιοσημείωτο αποτέλεσμα σχετικά με το φαινόμενο της υπερενουδάτωσης.

Οι Vlachou *et al.*, (2016) υποκαλλίεργησαν τα έκφυτα σε υπόστρωμα MS με 30 g L<sup>-1</sup> συμπληρωμένο με κυτικίνες. Χρησιμοποίησαν τέσσερα διαφορετικά είδη κυτικινινών, βενζυλαδενίνη (BA), ζεατίνη (ZEA), κινετίνη (KIN), ή N6- (2-ισοπεντενυλ) αδενίνη (2ip) σε 0,5, 1,0 ή 2,0 mg L<sup>-1</sup> καθώς η επίδραση του τύπου κυτοκινίνης και της συγκέντρωσης αυτής καθώς επίσης και το είδος του εκφύτου (κορυφής βλαστού

ή κόμβου) ήταν το θέμα μελέτης τους. Άλλα ξηροφυτικά είδη, όπως ο *Sideritis athoa*, *Lithodora zahnii*, and *Dianthus fruticosus* (Parafotiou and Kalantzis, 2009 a,b, Parafotiou and Stragas, 2009), είχαν υψηλότερα ποσοστά πολλαπλασιασμού υπό χαμηλή συγκέντρωση κυτοκίνης, αντίθετη με ό,τι δείχθηκε για το *Ballota acetabulosa* (Vlachou *et al.*, 2016) και στη μελέτη των Βλάχου *et al.*, (2016) υπήρχε ένα ποσοστό εκφύτων που παρουσίαζαν το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης και τα οποία δε χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ριζοβολίας. Τα ποσοστά υπερενυδάτωσης ήταν υψηλότερα στις υποκαλλιέργειες από ότι στην εγκατάσταση του φυτού. Έχουν παρατηρηθεί επίσης υψηλά ποσοστά υπερενυδάτωσης σε *in vitro* καλλιέργεια ξηροφύτων όπως του *Lithodora zahnii* (Parafotiou and Kalantzis, 2009b).

#### 4.2 Ριζοβολία του είδους *Ballota acetabulosa*

Το *B. acetabulosa* απόδειχτηκε ότι ριζοβολεί πολύ εύκολα *in vitro*. Στα στερεά υποστρώματα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 και 12 g L<sup>-1</sup> παρουσιάζονται υψηλά ποσοστά ριζοβολίας των εκφύτων που καλλιεργούνται για παραγωγή βλαστών που φτάνουν και στο 90 %.

Το NaCl εμπόδισε την ανάπτυξη των βλαστών και το ποσοστό ριζοβολίας ήταν μηδενικό.

Η προσθήκη ενεργού άνθρακα φάνηκε να παρεμποδίζει τη ριζοβολία.

Σε υπόστρωμα MS/2 που καλλιεργήθηκαν βλαστοί 1 cm παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό ριζοβολίας (89,2 %) ενώ και ο αριθμός και το μήκος των ριζών ήταν ικανοποιητικό για να εγκλιματιστεί αποτελεσματικά το φυτό. Οι Vlachou, *et al.*, 2016 δοκίμασαν ριζοβολία σε στερεό MS το οποίο όπως αναφέρουν ήταν απολύτως αποτελεσματικό (100 %) ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση IBA σε αντίθεση με άλλα ξηρόφυτα που χρειάζονταν την παρουσία αυξίνης για ριζοβολία ή έδειξαν χαμηλά ποσοστά ριζοβολίας ακόμη και παρουσία της αυξίνης (Parafotiou and Kalantzis, 2009 a, Parafotiou and Stragas, 2009). Ως φαίνεται η προσθήκη φυτορρυθμιστικής ουσίας IBA βοήθησε για να επιτευχθεί η ριζοβολία στο 100 %. Ο μεγαλύτερος αριθμός και μήκος των ριζών προέρχονταν από υπόστρωμα με τη χαμηλότερη

συγκέντρωση σε IBA ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) παρόμοια με το ξηρόφυτο *Lithodora zahnii* το οποίο επίσης ριζοβολούσε καλύτερα σε χαμηλή συγκέντρωση αυξίνης (Parafotiou and Kalantzis, 2009 b).

### 4.3 Εγκλιματισμός του είδους *Ballota acetabulosa*

Στο στάδιο του εγκλιματισμού ανεπτυγμένοι έρριζοι βλαστοί εγκλιματίστηκαν με 100 % επιτυχία σε *ex vitro* συνθήκες σε δοχεία των 500 mL, σε τύρφη: περλίτης (1: 1, v / v) και (2:1 v / v) , καλυμμένο για 7 ημέρες με διαφανή μεμβράνη, σε θάλαμο ανάπτυξης στους 20 °C με φωτοπερίοδο 16 h σε  $37,5 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , με λαμπτήρες φθορισμού λευκού φωτός. Μετά από μια εβδομάδα μεταφέρθηκαν στο θερμοκήπιο ανθοκομίας και αρχιτεκτονικής τοπίου όπου ένα μηνά μετά μεταφυτεύθηκαν και συνέχισαν να αναπτύσσονται. Αντίστοιχο πείραμα διεξήχθη και από τους Vlachou *et al.*, (2016) με τη διαφορά ότι ο εγκλιματισμός των Vlachou *et al.*, πραγματοποιήθηκε τον Ιούνιο ενώ στην παρούσα μελέτη τον Οκτώβριο.

### 4.4 Γενικό Συμπέρασμα

Γενικά παρατηρήθηκε ότι όσο μειώνεται η περικετικότητα του υποστρώματος σε άγαρ τόσο μεγαλύτερο ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών έχουμε. Επίσης, σε υπερενυδατωμένους βλαστούς, ακόμα και αν υποκαλλιεργηθούν σε υποστρώματα με υψηλή συγκέντρωση άγαρ, δεν εξαλείφεται το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης. Η υγρή καλλιέργεια δεν προτείνεται για *in vitro* πολλαπλασιασμό του φυτού *Ballota acetabulosa* διότι ναι μεν αυξάνει το γινόμενο πολλαπλασιασμού αλλά εμφανίζει στο 100% το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης, που καθιστά τους βλαστούς ακατάλληλους για ριζοβολία και *ex vitro* εγγλιματισμό.

Το φυτό δεν εμφανίζει αντοχή παρουσία άλατος και η ριζοβολία μηδενίζεται.

Η προσθήκη ενεργού άνθρακα δεν έδειξε να διαδραματίζει αξιοσημείωτο ρόλο στο φαινόμενο της υπερενυδάτωσης και παρουσίασε μείωση του ποσοστού ριζοβολίας.



Η μείωση της περιεκτικότητας σε σακχαρόζη από 30 στα 20 g L<sup>-1</sup> επίσης δεν έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στο φαινόμενο της υπερενυδάτωσης.

Τέλος το υπόστρωμα μισής δύναμης MS φάνηκε κατάλληλο για ριζοβολία και έδωσε φυτάρια τα οποία εγκλιματίστηκαν στο 100 %.



## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Διεθνής βιβλιογραφία

- Abdelshafeek, K.A., Elgattar A.A., Zarkoon A.H, Alwahash, M.A., Shahat, A.A. (2010). Investigation of the volatile oils, lipid constituents and biological activity of *Ballota andreuzziana*, *Teucrium zanonii* and *Verbena tenuisecta* in Libya. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 3: 594-601.
- Acker, C.A.M.M., Sholten, H.J. (1995). Development of axillary buds of rose *in vitro*. *Sci. Hort.* 63: 47-55.
- Ahmad, M., Sultana, S., Fazl-I-Hadi, S., Ben Hadda, T., Rashid, S., Zafar, M., Khan, M.A., Khan, M.P.Z., Yaseen, G. (2014). An ethnobotanical study of medicinal plants in high mountainous region of Chail valley (District Swat- Pakistan). *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 10: 36.
- Ahmad, V.U., Farooq, U., Hussain, J., Ullah, F., Nawaz, S.A., Choudhary, M.I. (2004b). Two new diterpenoids from *Ballota limbata*. *Chem. Pharm. Bull.* 52: 441-443.
- Ahmad, V.U., Farooq, U., Abbaskhan, A., Hussain, J., Abbasi, M.A., Nawaz, S.A., Choudhary, M.I. (2004a). Four new diterpenoids from *Ballota limbata*. *Helv. Chim. Acta* 87: 682-689.
- Ainaa, O.O., Quesenberry, K.H., & Galloa, M. (2015). Culture vessel and auxin treatments affect *in vitro* rooting and *ex vitro* survival of six *Arachis paraguariensis* genotypes. *Scientia Horticulturae* 183: 167-171.
- Alagumanian, S., Saravanaperumal, V., Balachandar, R., Rameshkannan, K., Rao, M.V. (2004). Plant regeneration from leaf and stem explants of *Solanum trilobatum* L. *Curr. Sci.* 86: 1478-1480.
- Alderson, P.G., Mckinless, J., Rice, R.D. (1988). Rooting of cultured rose shoots. *Acta Hort.* 226: 175-182.
- Ali, S., Mirza, B. (2006). Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. *Acta Bot. Croatia* 65: 137-146.
- Al-Khayri, J. M., Huang, F. H., Morelock, T. E., Busharar, T. A. (1992): Spinach tissue culture improved with coconut water. *HortScience* 27(4): 357-358.
- Altman, A. (2000). Micropropagation of plants, principles and practice. In: Spier, R. E. *Encyclopedia of Cell Technology*. New York: John Wiley & Sons, 916-929.
- Ancora, G. (1986). Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). In: Bajaj (Ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Berlin: Springer- Verlag, 2: 471-486.
- Aplada, E., Georgiadis, T., Tiniakou, A. and Theochatopoulos, M. (2007). Phytogeography and Ecological of Five Dominant Plant Species in Maquis and Phrygana Ecosystems in Greece. *Phyton* 25(1): 77-85.

- Archibald J.F. (1954). Culture *in vitro* of cambial tissues of cacao. *Nature* 173: 351-353.
- Arianoutsou-Faraggitaki, M. and Margaris, N. S. (1981). Producers and the fire cycle in a phrygic ecosystem. In: N.S. Margaris and H.A. Mooney, eds. *Components of productivity of Mediterranean climate regions: Basic and Applied Aspects*. pp. 181-190. Dr. W. Junk Publishers, the Netherlands.
- Arockiasamy S., Prakash, S., Ignacimuthu, S. (2002). Direct organogenesis from mature leaf and petiole explants of *Eryngium foetidum*. *Biol Plant*. 45: 129-132.
- Askun, T., Mouafo Tekwu, E., Satil, F., Modanlioglou, S. and Aydeniz, H. (2013). Preliminary antimycobacterial study on selected Turkish plants (Lamiaceae) against *Mycobacterium tuberculosis* and search for some phenolic constituents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13: 365.
- Beauchesne, G. (1981). Les milieux minéraux utilisés en culture *in vitro* et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique. *C.R. Acad. Agric. Paris* 67: 1389-1397.
- Benzioni, A., Mills, D., Wenkart, S., Zhou, Y. (2003). Effects of ventilation on the performance of jojoba (*Simmondsia chinensis*) clones: multiplication stage. *Acta Hort*. 616: 135-138.
- Berardi, G., Roncasaglia, R., Dradi, G. and Scaravelli, D. (2006). *In vitro* propagation of *Dianthus balbisii* Ser. subsp. *liburnicus* (Barti.) Pign. by shoot tip culture. *Acta Hort*. 725(1): 427-430.
- Bertouklis, K.F., Papafotiou, M. and Chronopoulos, I. (2007). Effect of cytokinin on shoot regeneration of *Arbutus andrachne*. *Proc. Hel. Soc. Hort. Sci.* 22ed, Patra, Greece, 1921 Oct. 2005, 12(a):153-156 (in Greek).
- Bertsouklis, K. and Papafotiou, M., (2009). *In Vitro* Propagation of *Arbutus andrachne* L., *Acta Horticulturae*, 813: 477-480.
- Bertsouklis, K., and Papafotiou, M. (2010). Studies on propagation of *Globularia alypum* L., an outstanding xerophyte of Greece with potential ornamental use. *Acta Horticulturae*. 885: 73-77.
- Bertsouklis, K., Papafotiou, M. and Balotis, G. (2003). Effect of medium on *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of *Globularia alypum*. *Acta Hort*. 616: 177-180.
- Bertsouklis, K.F and Papafotiou, M. (2010). Effect of Storage on *Arbutus andrachne* L. Seed Germination, *Acta Horticulturae*, 815: 65-72.

- Bertsouklis, K.F and Papafotiou, M. (2011). Effect of Various Cytokinins on Micropropagation of *Arbutus × andrachnoides* Link, *Acta Horticulturae*, 923: 213- 218.
- Bertsouklis, K.F. and Papafotiou, M. (2007). *In vitro* propagation of *Arbutus andrachne* L. *Acta Hort.* 813:477-480.
- Bhatia, P., Ashwath, N., Midmore, D. (2005). Effect of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41: 457-464.
- Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T., Midmore, D. (2004). Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 78: 1-21.
- Blamey, M. and Christopher Grey-Wilson, Ch. (1993). *Mediterranean Wild Flowers*. Harper Collins Publishers, London.
- Blonder, B., Nogués-Bravo, D., Borregaard, M., Donoghue, J., Jørgensen, P., Kraft, N., Lessard, J.P., Morueta-Holme, N., Sandel, B., Svenning, J. C., Violle, C., Rahbek, C. and Enquist, B. J. (2015). Linking environmental filtering and disequilibrium to biogeography with a community climate framework. *Ecological society of America*, 96: 972- 985.
- Blunden, G., Yang, M.H., Yuan, Z.X., Smith, B.E., Patel. A., Cegarra, J.A., Máthé, I.Jr., Janicsak, G. (1996). Betaine distribution in the Labiatae. *Biochem. Syst. Ecol.* 24: 71-81.
- Boase, M. R., Hopping, M. E., Paterson, D., Haine, HM. (1992): Dodecaploid somaclones of kiwifruit from leaf callus. P. 65 in: *Agricultural frontiers: opportunities & risks, programme and abstracts of NZIAS/NZSHS Convention, 26-28 August 1992, Lincoln University Campus.*
- Boase, M. R., Wright, S. and McLeay, P.L. (2010). Coconut milk enhancement of axillary shoot growth *in vitro* of kiwifruit. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 21: 171-176.
- Bornman, C.H. and Vogelmann, T.C. (1984). Effect of regioity of gel medium on benzyladenine- induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 61: 505-512.
- Boxus, P., Druart, P., Basseur, E. (1978). Rapport d' activitites du centre de recherché agronomiques de gembloux. 505-512.
- Brainerd, K.E., Fuchigami, L.H. (1981). Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *J Am. Soc. Hort. Sci.* 106: 515-518.
- Bruno, M., Bondí, M.L., Piozzi, F., Arnold, N.A., Simmonds, M.S.J. (2001). Occurrence of 18- hydroxyballonigrine in *Ballota saxatilis* ssp. *saxatilis* from Lebanon. *Biochem. syst. Ecol.* 29: 429-431.

- Buddendorf-Joosten, J.M.C., Woltering, E.J. (1994). Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. In: Lumsden, P.J., Nicholas, J.R., Davies, W.J. (Eds.). *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 165-190.
- Butenko R.G. (1968). In: *Plant Tissue Culture and Plant Morphogenesis*, Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, pp. 40-45.
- Capecka, E., Mareczek, A. and Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 93: 223- 226.
- Chahar, M.K., Sharma, N., Dobhal, M.P., Joshi, Y.C. (2011). Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn. Rev.* 5: 1-12.
- Cheng, Y., Maa, R.-L., Jiaoa, Y., Qiaoa, N., & Lib, T.T. (2013). Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on embryogenesis induction in microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). *South African Journal of Botany* 88: 306-309.
- Chitra, D.S., Padmaja, G. (2005). Shoot regeneration via direct organogenesis from *in vitro* derived leaves of mulberry using thidiazuron and 6-benzylaminopurine. *Sci. Hort.* 106: 593-602.
- Christiansen, K.I. (1995). *Quercus euboica* Pap. p. 434-435.
- Christodoulakis, N. and Bazos, J. (1990). Leaf anatomy of three seasonally dimorphic sub shrubs. *Acta Oecologica* 11(2): 291-296.
- Christodoulakis, N.S. (1989). An Anatomical study of Seasonal Dimorphism in the leaves of *Phlomis fruticosa*. *Annals of Botany* 63: 389-394.
- Christodoulakis, N.S., Arianoutsou-Faraggitaki, M. and Psaras, G.K. (1986). Post-fire leaf structure of two Seasonally Dimorphic Resprouters. *Acta Oecologica. (OecologiaPlantarum)* 7(1): 97-102.
- Chuo-Chun, L., Tsong-Ann, Y., Shyi-Dong, Y., Jiu-Shern, Y. (1998). Enhancement of *in vitro* growth of papaya multishoots by aeration. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53: 221-225.
- Çitoğlu, G., Tanker, M., Sever, B. (1999). Flavonoid aglycones from *Ballota saxatilis* subsp. *saxatilis*. *Pharm. Biol.* 37: 158-160.
- Çitoğlu, G., Tanker, M., Sever, B., Englert, J., Anton, R., Altanlar, N. (1998). Antibacterial activities of diterpenoids isolated from *Ballota saxatilis* subsp. *saxatilis*. *Planta. Med.* 64: 484- 485.
- Çitoğlu, G.S., Çoban, T., Sever, B., İşcan, M. (2004a). Antioxidant properties of *Ballota* species growing in Turkey. *J. Ethnopharmacol.* 92: 275-280.
- Çitoğlu, G.S., Özbek, H., Sever, B. (2005a). Antinociceptive activity of *Ballota glandulosissima* Hub.-Mor. & Patzak. *East. J. Med.* 10: 24-28.

- Çitoğlu, G.S., Sever, B., Antus, S., Baitz-Gács, E., Altanlar, N. (2003a). Antifungal flavonoids and flavonoids from *Ballota glandulosissima*. *Pharm. Biol.* 41: 483-486.
- Çitoğlu, G.S., Sever, B., Antus, S., Baitz-Gács, E., Altanlar, N. (2004b). Antifungal diterpenoids and flavonoids from *Ballota inaequidens*. *Pharm. Biol.* 42: 659-663.
- Çitoğlu, G.S., Yılmaz, B. S., Altanlar, N. (2003b). Antimicrobial activity of *Ballota* species growing in Turkey. *J. Fac. Pharm. Ankara* 32: 93-97.
- Çitoğlu, G.S., Yılmaz, B.S., Tarikahya, B., Tipirdamaz, R. (2005b). Chemotaxonomy of *Ballota* species. *Chem. Nat. Compd.* 41: 299-302.
- Cohen, D. (1995). The culture medium. *Acta Hort.* 393: 15-24.
- Couladis, M., Chinou, I.B., Tzakou, O., Loukis, A. (2002). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ballota pseudodictamnus* L. Benth. *Phytother. Res.* 16: 723-726.
- Couladis, M., Tzakou, O., Vrykokidou, E., Harvala, C. (2003). Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytother. res.* 17: 194-195.
- Cristea, V., Puscas, M., Miclaus, M. and Deliu, C. (2006). Conservative micropropagation of some endemic or rare species from the *Dianthus* genus. *Acta Hort.* 725(1): 357-363.
- Cullen, J. (2001). *Handbook of North European Garden Plants: With Keys to Families and Genera*, Cambridge University Press.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26: 343-356.
- Daels-Rakotoarison, D.A., Seidel, V., Gressier, B., Brunet, C., Tillequin, F., Bailleul, F., Luyckx, M., Dine, T., Cazin, M., Cazin, J.C. (2000). Neurosedative and antioxidant activities of phenylpropanoids from *Ballota nigra*. *Arzneim. Forsch.* 50: 16-23.
- Davis, M.J., Baker, R., Hanan, J.J., (1977). Clonal multiplication of carnation by micropropagation. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 102: 48-53.
- De Lerma, J.L., Garcia-Blanco, S., Rodríguez, J.G. (1980). New compounds from *Ballota hispanica*. X-ray crystal and molecular structure of hispanonic acid methyl ester (MEAH). *Tetrahedron Lett.* 21: 1273-1274.
- De Ropp R.S., Vitucci J.C., Hutchings B.L., Williams J.M. (1952). Effect of coconut fractions on growth of carrot tissues. *Proceedings of the Society of Experimental Biology* 81: 704-709.
- Debergh P.C., Read, P.E. (1991). Micropropagation. In: Debergh PC, Zimmerman RH, editors. *Micropropagation*. The Netherlands: Kluwer Acad. Publ. 1-13.

- Debergh, P.C. (1983). Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59: 270-276.
- Debergh, P.C. (2000). Micropropagation, Hyperhydricity. In: Spier, R. E. *Encyclopedia of Cell Technology*. New York: John Wiley & Sons, 929-933.
- Debergh, P.C., Harbaoui, Y., Lemeur, R. (1981). Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plant.* 53: 181-187.
- Debergh, P.C., Maene, L.J. (1985). Preparation of tissue cultured plants for rooting and establishment *in vivo*. Proceedings International Symposium Plant tissue and cell culture. Application to crop improvement Olomouc, Czechoslovakia.
- Debnath, S.C. and McRae, K.B. (2001). An efficient *in vitro* shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait) by axillary bud proliferation. *In Vitro Cel. & Devel. Biol.-Plant* 37: 243-249.
- Diallo, M.S., Ndiaye, A., Sagna, M., Gassama-Dia, Y.K. (2008). Plants regeneration from African cowpea variety (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Afr. J. Biotech.* 7: 2828-2833.
- Didry, N., Seidel, V., Dubreuil, L., Tillequin, F., Bailleul, F. (1999). Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*. *J ethnopharmacol* 67: 197- 202.
- Dimopoulos, P., Raus, Th., Bergmeier, E., Constantinidis, Th., Iatrou, G., Kokkini, S., Strid, A., Tzanoudakis, D. (2016). Vascular plants of Greece: An annotated checklist. Supplement. *Willdenowia* 46(3): 301-347.
- Dix L., Van Staden J. (1982). Auxin and gibberellin-like substances in coconut milk and malt extract. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1: 239-245.
- Đorđević, A.S., Jovanović, O.P., Zlatković, B.K., Stojanović, G.S. (2016). Chemical composition of *Ballota macedonica* Vandas and *Ballota nigra* L. ssp. foetida (Vis.) Hayek essential oils – The chemotaxonomic approach. *Chem. Biodiversity.* 13: 782-788.
- Duhamet L. (1951). Action du lait de coco sur la croissance des cultivés de tissus de crown-gall de vigne, de tabac, de topinambour et de scorsonère. *Comp. Rendus de la Soc. de Biol.* 145: 1781-1785.
- Duhamet L., Gautheret R.J. (1950). Structure anatomique de fragments de tubercules de topinambour cultivés en presence de lait de coco. *Comp. Rendus de la Soc. de Biol.* 144: 177-184.
- Dulger, B., and Sener, A. (2010). Evaluation of antimicrobial activity of *Ballota acetabulosa*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4: 1235–1238.



- Dulger, B., Dulger, G. (2012). Antimicrobial activity of the leaves of *Ballota acetabulosa* on microorganisms isolated from urinary tract infections. Turk. J. Pharm. Sci. 9: 257-262.
- Dulger, B., Kilcik, M.A. (2011). Antifungal activity of *Ballota acetabulosa* against yeast *Candida* and *Cryptococcus* species. Asian J. Chem. 23: 413-415.
- Dulger, B., Sener, A. (2010). Evaluation of antimicrobial activity of *Ballota acetabulosa*. Afr. J. Microbiol. Res. 4: 1235-1238.
- Dulger, G., Cuneyt, A. and Dulger, B. (2010) Antimicrobial Activity of Endemic *Ballota nigra* subsp. anatolica in Turkey. Asian Journal of Chemistry, Vol. 22, No. 8: 6497-6502.
- Dulger, G., Dulger, B. (2017). Antibacterial activity of endemic *Ballota nigra* subsp. anatolica against some human eye pathogens from Turkey. Innovare. J. Life Sci. 5: 1-3.
- Ebrahim, M. K.H., Ibrahim, I.A. (2000). Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana. Sci. Hort. 86: 211-221.
- El-Deen Osman, A.K. (2012). Comparative anatomical and palynological studies on genus *Ballota* (Lamiaceae) from Egypt. J. Med. Plants Res. 6: 5797-5812.
- Endringer, D.C., Taveira, F.S.N., Kondratyuk, T.P., Pezzuto, J.M., Braga, F.C. (2014). Cancer chemoprevention activity of labdane diterpenes from rhizomes of *Hedychium coronarium*. Rev. Bras. Farmacogn. 24: 408-412.
- Erdogan-Orhan, I., Sever-Yilmaz, B., Altun, M.L., Saltan, G. (2010). Radical quenching activity, ferric-reducing antioxidant power, and ferrous ion-chelating capacity of 16 *Ballota* species and their total phenol and flavonoid contents. J. Med. Food. 13: 1537-1543.
- Ertas, A., Boğa, M., Yeşil, Y. (2014). Phytochemical profile and ABTS cation radical scavenging, cupric reducing antioxidant capacity and anticholinesterase activities of endemic *Ballota nigra* L. subsp. anatolica P.H. Davis from Turkey. J. Coast. Life Med. 2: 555-559.
- Fernandes-Ferreira, M., Novais, J.M. and Pais, M.S.S. (1990). Free triterpenols and sterols produced by *in vitro* cultures and laticifer cells from *Euphorbia characias*. Phytochemistry 29(6): 1855-1860.
- Feyissa, T., Welander, M., Negash, L. (2005). *In vitro* regeneration of *Hagenia abyssinica* (Bruce) J.F. Gmel. (Rosaceae) from leaf explants Plant Cell Rep. 24: 392-400.
- Fleming, T., ed. (2000). PDR for herbal medicines, Montvale, NJ: Medical economics. Fraternal.
- Fowler, M.R. (2000). Plant cell culture, laboratory techniques. In: Spier, RE. Encyclopedia of Cell Technology. New York: John Wiley & Sons, 994-1002.

- Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T. A., and Vasil, I. K. (1976). Plant tissue culture media, Editors-in-Chief: D. Duncan, 12: 473- 478.
- Gandonou, C., Errabii, T., Abrini, J., Idaomar, M.F., Chibi, F., Skalisenhaji, N. (2005). Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). Af. J. Biotech. 4: 1250-1255.
- Gaspar, T., Kevers, C. (1985). Cobalt prevention of vitrification process in carnation. Plant. Physiol. 77:13.
- Gautheret, M. (1981). C.R. Acad. Agric. Paris: 693-694.
- Gavidia, I., Zaragozá, C., Segura, J., and Pérez-Bermúde P. (1997). Plant regeneration from juvenile and adult *Anthyllis cytisoides*, a multipurpose Leguminous Shrub. Journal of Plant Physiology. 150: 714-718.
- Georghiou, K. and Delipetrou P. (2010). Patterns and traits of the endemic plants of Greece. Botanical Journal of the Linnean Society, 162: 130- 153.
- Ghanbarimasir, Z., Bekhradnia, A., Morteza-Semnani, K., Rafiei, A., Razzaghi-Asl, N., Kardan, M. (2018). Design, synthesis, biological assessment and molecular docking studies of new 2- aminoimidazole-quinoxaline hybrids as potential anticancer agents, Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomol. Spectr. 194: 21-35.
- Goliaris, A. and Roupakias, D. (1997). Yield Performance of interspecific F1 hybrids of the Greek mountain tea (*Sideritis* spp. L.). Plant Breeding 166: 493-497.
- Grattapaglia, D, Machado, M.A. and Cristofani, M. (1998). Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. Euphytica. 109: 25- 32.
- Gray, C.A., Rivett, D.E.A., Davies-Coleman, M.T. (2003). The absolute stereochemistry of a diterpene from *Ballota aucheri*. Phytochemistry. 63: 409-413.
- Gribaudo, I., Restagno, M., Novello, V. (2003). Vented vessels affect growth rate of *in vitro* *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. Acta Hort. 616: 129-133.
- Gribble, K. (1999). The influence of relative humidity on vitrification, growth and morphology of *Gypsophila paniculata* L. Plant Growth Regulation, 27: 179-188.
- Gubis, L., Lajchová, Z., Faragó, J., Jureková, Z. (2003). Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. Czech J. Gen. Plant Breed. 39: 9-14.
- Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. S.B. Weisen Wien Naturwissenschaften. 111: 69-92.
- Haisel, D., Pospisilova, J., Synkova, H., Catsky, J., Wilhelmova, N., Plzakova, S. (1999). Photosynthetic pigments and gas exchange of *in vitro* grown tobacco plants as affected by CO<sub>2</sub> supply. Bioi Plant 42: 463-468.

- Halliwell, B. and Gutteridge, J. (1981) Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. The role of superoxide and hydroxyl radicals, FEBS Lett. 128: 347–352.
- Hammerschlag, F. (1982). Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstock myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh.). J Ame Soc. Hort. Sci. 107: 44-47.
- Hassanzadeh, M.K., Emami, S.A., Asili, J., Tayarani Najaran, Z. (2011). Review of the essential oil composition of Iranian Lamiaceae. J. Essent. Oil Res. 23: 35-74.
- Hauzinska, E., (1974). L' organogenese dans le tissu de cal de l' oeillet (*Dianthus caryophyllus* L.) dans les conditions de culture *in vitro*. In Proc. 19<sup>th</sup> Hortic. Congr., Warszawa 1A: 60.
- Heide, O.M. (1974). Growth and dormancy in Norway spruce ecotypes II. After-effects of photoperiod and temperature on growth and development in subsequent year. Physiol. Plant. 31: 131-139.
- Henderson J.H.M., Durrell M.E., Bonner J. (1952). The cultures of normal sunflower callus. Am. J. Bot. 39: 467-472.
- Henry, Y., Vain, P., Buyser, J.D. (1994). Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. Euphytica 79: 45-58.
- Horn, W., Schlegel, G., Hauft, B. (1988) Micropropagation of roses. Acta Hort. 226: 623-626.
- Hosny, S. M., Hammad, G., Sharbasy, S. and Zayed, Z. (2016). Effect of Coconut Milk, Casein Hydrolysate and Yeast Extract on the Proliferation of *in vitro* Barhi Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants, 8 (1): 46-54.
- Hussein, A.A., Jimeno, M.L., Rodríguez, B. (2007). Structural and spectral assignment of a new diterpenoid isolated from *Ballota undulata* and a complete 1H and 13C NMR data assignment for three other structurally related compounds. Magn. Reson. Chem. 45: 899-901.
- Huxley, A. and Taylor, W. (1977). Flowers of Greece and the Aegean. Chatto and Windus, London.
- Ibrahim, R., Debergh, P.C. (2001). Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). Sci. Hort. 88: 41-57.
- In: D. Phitos, A. Strid, S. Snogerup and W. Greyter (eds.), The Red Data Book of rare and threatened plants of Greece. Financed by the World Wide Fund for Nature (WWF).

- Kadifkova, T., Kulevanova. S., Stefova. M. (2005). *In vitro* antioxidant activity of some *Teucrium* species (Lamiaceae). *Acta Pharm.* 55: 207–214.
- Kadota, M. and Niimi, Y. (2003). Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72: 261-265.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A.I., Vuorela, H. J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954–3962.
- Kang, K.S., Veeder, G.T., Mirrasoul, P.J., Kaneko, T., Cottrell, W. (1982). Agar like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. *App. Env. Microbiology* 43: 1086-1091.
- Kartsonas, E. and Papafotiou, M. (2007). Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90(1): 111-116.
- Kartsonas, E. and Papafotiou, M. (2007). Studies on *ex vitro* acclimatization of *Quercus euboica*. *Proc. Hel. Soc. Hort. Sci.* 23ed, Chania, Greece, 23-26 Oct. 2005, 13: in press. Abstract p. 263 (in Greek).
- Kartsonas, E.D. and Papafotiou, M. (2009). Micropropagation of *Quercus euboica* Pap., a Rare Endemic Oak Species in Greece, *Acta Horticulturae*, 813: 485-490.
- Kataeva, N.V., Alexandrova, I.G., Butenko, R.G. and Dragavtceva, E.V. (1991). Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27: 149-154.
- Kevers, C., Coumans, M., Coumans- Gilles, M.F., Gaspar, Th. (1984). Physiological and Biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol. Plant* 61: 69- 74.
- Kevers, C., Gaspar, Th., (1985a). Soluble, membrane and cell wall peroxidases phenylalanine ammonia- lyase and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.* 118: 41-48.
- Kevers, C., Gaspar, Th., (1985b). Vitrification of carnation *in vitro* changes in ethelene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4: 215-223.
- Kevers, C., Gaspar, Th., (1985c). Vitrification of carnation *in vitro* changes in ethelene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4: 215-223.

- Khan, M.R.I., Heyes, J.K., Cohen, D. (1988). Plant regeneration from oca (*Oxalis tuberosa* M.): the effect of explant type and culture media. *Plant Cell Tiss. Org Cult.* 14: 41-50.
- Kheira, K., Benchaben, H., Adiba, B.D., Nadira, A., Abbassia, A. (2015). Seasonal variations of *Ballota hirsuta* benth flavonoids of Tessala mount of the prefecture of Sidi Bel-Abbes (Western Algeria). *Biochem. Mol. Biol.* 1: 1-6.
- Khong, D.T., Judeh, Z.M.A. (2017). Short synthesis of phenylpropanoid glycosides calceolarioside- B and eutigoside-A. *Tetrahedron lett.* 58: 109-111.
- Kim, C.K., Oh, J.Y., JEE, S.O., Chung, J.D. (2003). *In vitro* micropropagation of *Rosa* hybrid L. *J Plant Biotech.* 5: 115-119.
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. (2004). Anti-inflammatory plant Flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 96: 229-245.
- Kirdmanee, C., Kozai, T., Adelberg, J. (1996). Rapid acclimatization of *in vitro* *Eucalyptus* plantlets by controlling relative humidity *ex vitro*. *Acta Hort.* 440: 616-620.
- Konstas, J., & Kintzios, S. (2003). Developing a scale-up system for the micropropagation of cucumber (*Cucumis sativus* L.): the effect of growth retardants, liquid culture and vessel size. *Plant Cell Reports* 21: 538-548.
- Kovac, J. (1995). Micropropagation of *Dianthus arenarius* subsp. Bohemicus – an endangered endemic from the Czech Republic. *Bot. Gard. Microprop. News* 1:106108.
- Kumar, A., Palni, L.M.S., Nandi, S.K. (2003). The effect of light source and gelling agent on micropropagation of *Rosa damascene* Mill. and *Rhynchosyilis retusa* L.) *Bl. J. Hort. Sci. Biotech.* 78: 786-792.
- Kumar, N., and Reddy, M.P. (2011). *In vitro* Plant Propagation: A Review, *Journal of Forest Science*, 27: 61-72.
- Kumar, N., Reddy, M.P. (2010). Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. *Ann Appl Biol* 156: 367-375.
- Kumar, N., Vijayanand, K.G., Pamidimarri, D.V.N.S., Sarkar, T., Reddy, M.P., Radhakrishnan, Kaul T., Reddy, M.K., Saponi, S.K. (2010c). Stable genetic transformation of *Jatropha curcas* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using leaf explants. *Ind Crops Products* 32: 41-47.
- Kumar, N., Vijayanand, K.G., Reddy, M.P. (2010a). Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. *Acta Physiol Plant* 32: 917-924.

- Kumar, N., Vijayanand, K.G., Reddy, M.P. (2010b). *In vitro* plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas* L: direct shoot organogenesis from cotyledonary petiole explants. *J Crop Sci Biotech* 13: 189-194.
- Kumar, N., Vijayanand, K.G., Reddy, M.P. (2011a). *In vitro* regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Ind Crops Prod* 33: 146-151.
- Kumar, N., Vijayanand, K.G., Reddy, M.P. (2011b). Plant regeneration in non-toxic *Jatropha curcas* - impacts of plant growth regulators, source and type of explants. *J Plant Biochem Biotechnol.* 20: 125-133.
- Kwon, Y., Vatter, D., and Shetty, K. (2006). Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pac J Clin Nutr*, 15 (1):107-118.
- Landi, L., Mezzetti, B. (2006). TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Rep.* 25: 281-288.
- Langford, P.J. and Wainwright, H. (1988). Influence of sucrose concentration on the photosynthetic ability of *in vitro* grown rose shoots. *Acta Hort.* 227:305-310.
- Lauzer, D., Vieth, J. (1990). Micropropagation of seed-derived plant of *Cynara scolymus* L., cv. 'Green globe'. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 21: 237-244.
- Leshem, B. (1983a). Growth of carnation meristems *in vitro*: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. *Ann. Bot.* 52: 413-415.
- Leshem, B. (1983b). The carnation succulent plantlet, a stable teratological growth. *Ann. Bot.* 52: 873-876.
- Letouze, R., Daguin, F. (1983). Manifestation spontanee et aleatoire d' une croissance anormale en culture *in vitro*. Recherche de marqueurs metaboliques. *Rev. Can. Biol. Exp.* 42: 23-28.
- Levic, J., Čabarkapa, I., Todorovic, G., Pavkov, S., Sredanovic, S., Coghill- Galonja, T., Kostadinovic, L. (2011). *In vitro* antibacterial activity of essential oils from plant family Lamiaceae. *Romanian Biotechnological Letters*, University of Bucharest. 16: No. 2.
- Levic, J., Kostadinovic, L., Pavkov, S., Galonja- Coghill, T., Dozet, G. and Bojat, N. (2011). Effect of sulphachloropyrazine on antioxidative systems in blood and liver of broilers. *Acta Veterinaria Brno.* 80: 165-170.
- Leyhe, U., Horn, W. (1994). Ein Beitrag zur Mikrovermehrung von Rosa-Hybriden. *Gartenbauwissenschaft* 59: 85-88.
- Lian, M.L., Murthy, H.N., Paek, K.Y. (2002). Culture method and photosynthetic photon flux affect photosynthesis, growth and survival of *Limonium* 'Misty Blue' *in vitro*. *Sci. Hort.* 95: 239-249.

- Limiatas, P., Papafotiou, M. and Chronopoulos, I. (2001). Studies on *in vitro* propagation of *Arbutus unedo* L. Proc. Hel. Soc. Hort. Sci. 19th, Heraclion, Greece, 25-27 Oct 1999, 9: 453-456 (in Greek).
- Lopez-Iglesias, B., Villar, R. and Poorter, L. (2014). Functional traits predict drought performance and distribution of Mediterranean woody species. *Acta Oecologica*, 56: 10-18.
- Luckner, M. and Diettrich, B. (1992). Micropropagation of woolly foxglove (*Digitalis lanata*) by shoot tip culture. p.406. In: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 19. SpringerVerlag, Berlin.
- Majdi, M., Dastan, D., Maroofi, H. (2017). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Ballota nigra* subsp. *kurdica* from Iran. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* 12: 1-5.
- Makowczyńska, J., Grzegorzczak-Karolak, I., Wysokińska, H. (2015). Antioxidant activity of tissue culture-raised *Ballota nigra* L. Plants grown *ex vitro*. *Acta Pol. Pharm.* 72: 769- 775.
- Makunga, N.P., Jäger, A.K. and Van Staden, J. (2006). Improved *in vitro* rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsia garganica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 77-86.
- Margaris, N.S. (1981). Adaptive strategies in plants dominating Mediterranean-type ecosystems. In: di Castri F, Goodall DW, Specht RL, eds. *Mediterranean-type Shrublands. Ecosystems of the World 11*. Elsevier Scientific Publ., Amsterdam: 309-315.
- Margaris, N.S. and Papadopoulou, E. (1975). Day Length Effect on Leaf Anatomy of *Phlomis fruticosa*. *Biologia Gallo –Hellenica* 6:153-159.
- Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2013). Season and Explant Origin Affect Phenolic Content, Browning of Explants, and Micropropagation of *x Malosorbus florentina* (Zucc.) Browicz, *Hortscience*, 48(1): 102–107.
- Martini, A.N., Papafotiou, M. and Akoumianaki-Ioannidou, A. (2017). Vegetative propagation by stem cuttings and establishment of the Mediterranean aromatic and medicinal plant *Teucrium capitatum*, *Acta Horticulturae*, 1189: 455-460.
- Mayer L. (1956). Wachstum and organbildung an *in vitro* kultivierten segmenten von *Pelargonium zonale* and *Cyclamen persicum*. *Planta* 47: 401-446.
- Meletiou-Christou, M.S. and Rhizopoulou, S. (2012). Constraints of photosynthetic performance and water status of four evergreen species co-occurring under field conditions. *Botanical Studies*, 53: 325- 334.
- Mereti, M., Grigoriadou, K. and Nanos, G.D. (2002). Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Scient. Hort.* 93:143-148.

- Merikli, A.H., Merikli, F., Tuzlaci, E. (1988). Flavonoids of *Ballota acetabulosa*. Acta Pharm. Turc. 30: 143-144.
- Morel G. (1950). Sur la culture des tissus de deux monocotylédones. Comp. Rendus de L' Acad. des Sci. 230: 1099-1105.
- Morteza-Semnania, K., Ghanbarimasir Z. (2018). A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Ballota* 378-8741(18)32481-4
- Morzadec, J.M., Hourmant, A. (1997). *In vitro* rooting improvement of globe artichoke (cv. Camus de Bretagne) by GA3. Sci. Hort. 72: 59-62.
- Mozaffarian, V. (1996). A Dictionary of Iranian Plant Names. Tehran, Iran, Farhang Mo'aser Publishers (in Latin, English and Persian).
- Mulas, M. (2006). Traditional uses of Labiatae in the Mediterranean Area. Acta Hort. 723: 25–32 <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.723.1>.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473–497.
- Murphy, K.P., Santamaria, J.M., Davies, W.J., Lumsden, P J. (1998). Ventilation of culture vessels. I. Increase growth *in vitro* and survival *ex vitro* of Delphinium. J. Hort. Sci. Biotech. 73: 725-729.
- Myers, N., Mittermeier, R., Mittermeier, C., Fonseca and C., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, 403: 853–858.
- Najeeb, U., Ahmad, I. and Sultan, A. (2014). *In Vitro* Antimicrobial and Antiprotozoal Activities, Phytochemical Screening and Heavy Metals Toxicity of Different Parts of *Ballota nigra*. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International.
- Nakatani, N. (1997). Antioxidants from Spices and Herbs, in Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications (Ed. F. Shahidi), AOCS Press, Champaign, pp. 64–75.
- Navatel, J.C. (1982). Problems lies a la production de porte- greffe d' arbres fruitiers par multiplication *in vitro*. Fruits 37: 331- 336.
- Nétien G., Beauchesne G., Mentzer C. (1951). Influence du "lait de maïs" sur la croissance des tissus de carotte *in vitro*. Comp. Rendus de L' Acad. des Sci. 233: 92-98.
- Newall, C.A., Anderson, L.A., and Philipson, J.D. (1996). Herbal Medicines, a Guide for Health-Care Professionals (London, UK: The Pharmaceutical Press), pp.164.



- Nickell L.G. (1950). Effect of coconut milk on the growth *in vitro* of plant virus tumour tissue. *Botanical Gazette* 112: 225-229.
- Nishandhini, M., Viswanathan, T., Radha, M., Rathisre, P.R., Suganya, J. (2017a). Preliminary analysis of phyto-constituents from the leaf extracts of *Ballota nigra* Linn. *Res J Pharm Technol.* 10: 161-165.
- Nitsch J.P. (1951). Growth and development *in vitro* of excised ovaries. *Am. J. Bot.* 38: 566-571.
- Norton, M.E. and Norton, C.R. (1984). *In vitro* propagation of Ericaceae: A comparison of the activity of the cytokinins N6-benzyladenine and N6-isopentenyladenine in shoot proliferation. *Scient. Hort.* 27: 335-340.
- Nurdan, S. and Aysel, U. (2007). Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsia J BioSci* 4: 28-37.
- Osawa, T. (1994). Novel Natural Antioxidants for Utilization in Food and Biological Systems, in *Postharvest Biochemistry of Plant Food-materials in the Tropics* (Eds. I. Uritani, V. V. Garcia and E. M. Mendoza), Japan Scientific Societies Press, Tokyo pp. 241–251.
- Osman, A.K. (2012). Trichome micromorphology of Egyptian *Ballota* (Lamiaceae) with emphasis on its systematic implication. *Pak. J. Bot.* 44: 33-46.
- Overbeek J.V., Conklin M.E., Blakeslee A.F. (1941). Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura embryos*. *Science* 94: 350-352.
- Pan, M.J. and Staden, J. (1998). The use of charcoal in *in vitro* culture – A review, *Plant Growth Regulation*, 26: 155–163.
- Panovska, T.K., Kulevanova, S. and Stefova, M. (2005). *In vitro* antioxidant activity of some *Teucrium* species (Lamiaceae). *Acta Pharm.* 55: 207–214.
- Papafotiou M. and Martini A.N. (2016). *In Vitro* Seed and Clonal Propagation of the Mediterranean Aromatic and Medicinal Plant *Teucrium capitatum*. *HortScience*, 51: 403- 411.
- Papafotiou M. and Stragas, J. (2009). Seed germination and *in vitro* propagation of *Dianthus fruticosus* L. *Acta Hort.* 813: 481-484.
- Papafotiou M., Martini A.N. and Vlachou G. (2016). *In Vitro* Propagation as a Means of Producing Native Plants for Use as Ornamentals in Archaeological Sites of Greece. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, 19-24 April 2015, Sanremo, Italy, *Acta Horticulturae*, in press.

- Papafotiou, M. (2010). *In Vitro* Propagation of Temperate Zone Woody Plants with Potential Ornamental Use, *Acta Horticulturae*, 815: 255- 262.
- Papafotiou, M. and Kalantzis, A. (2009). Seed germination and *in vitro* propagation of *Sideritis athoa*. *Acta Hort.* 813: 471-476.
- Papafotiou, M. and Kalantzis, A. (2009). Studies on *in vitro* propagation of *Lithodora zahnii*. *Acta Hort.* 813: 465-470.
- Papafotiou, M. and Martini, A. (2009). Influence of season and sterilization method on response of *Malosorbus florentina* buds to *in vitro* culture. *Acta Hort.* 813: 497-502.
- Papafotiou, M. and Martini, A.N. (2009a). Effect of growth medium on *in vitro* regeneration of *Malosorbus florentina* Zucc. *Acta Horticulturae*, 813: 497-501.
- Papafotiou, M. and Martini, A.N. (2009b). Effect of season and sterilization method on response of *Malosorbus florentina* (Zucc.) Browicz (Rosaceae) buds to *in vitro* culture. *Acta Horticulturae*, 813: 503-508.
- Papafotiou, M., and Kalantzis, A. (2009a). Seed germination and *in vitro* propagation of *Sideritis athoa*. *Acta Hort.* 813: 471–476
- Papafotiou, M., and Stragas, J. (2009). Seed germination and *in vitro* propagation of *Dianthus fruticosus* L. *Acta Hort.* 813: 481–484 Synges, P.M. (1981). *Dictionary of Gardening*, (UK: Oxford University Press), 1: 163–164.
- Papafotiou, M., Balotis, G.N., P.T. Louka, P.T. and Chronopoulos, J. (2001). *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65(2): 163-167.
- Papafotiou, M., Bertsoyklis, K.F., Martini, A.N., Vlachou, G., Akoymianaki-loannidou, A., Kannellou, E. and Kartsonas, E.D. (2017). Evaluation of the establishment of native Mediterranean plant species suggested for landscape enhancement in archaeological sites of Greece, *Acta Horticulturae*, 1189: 177-180.
- Papafotiou, M., Majumder, D. A. N., Martini, A. N. and Bertsoyklis, K. F. (2016). Micropropagation of *Atriplex halimus* L. *Acta Horticulturae*, 1113: 207-210.
- Papafotiou, M., Martini, A.N. and Vlachou, G. (2017). *In vitro* propagation as a tool to enhance the use of native ornamentals in archaeological sites of Greece, *Acta Horticulturae*, 1155: 301-308.

- Papafotiou, M., Tassoula, L. and Mellos, K., (2018). Construction and maintenance factors affecting most the growth of shrubby Mediterranean native plants on urban extensive green roofs, *Acta Horticulturae*, 1215: 101-108.
- Papanikolaou, G.D. and Sarlis, G.P. (1991). Physiological studies in the Tatoi district (Attica, Greece). *Vegetatio* 93: 81-90.
- Paques, M. (1991). Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. *Acta Hort.* 289: 283-290.
- Pâques, M. and Boxus, P. (1984). Comparative study of vitreous and non vitreous plantlets of apple rootstock M.26 cultivated *in vitro*. Abstracts book, 4<sup>th</sup> Congress Feder. Europ. Soc. Plant Physiol., Strasbourg: 282-283.
- Pâques, M. and Boxus, P. (1987c). Vitrification: review of literature. *Acta Horticulturae*, 212: 155-166.
- Pâques, M. and Boxus, Ph. (1985). A model to learn vitrification apple M.26. Present results. In proceedings 'Symposium *in vitro* problems related to mass propagation of horticultural plants'. In this book.
- Paris D., Duhamet L., Goris A. (1954). Action des vitamines et des acides aminés contenus dans le lait de coco sur la prolifération d'une souche de tissus de carotte. *Comp. Rendus de la Soc. de Biol.* 148: 296-302.
- Pellegrineschi, A. (1997). *In vitro* plant regeneration via organogenesis of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] *Plant Cell Rep.* 17: 89-95.
- Phan, C.T., Letouze, R. (1983). A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents and of hydroxycinnamate: CoA ligase activity of normal and vitreous plants (*Prunus avium* L.) obtained *in vitro*. *Plant Sci. Letters* 31: 323-327.
- Pierik, R.L.M. (1997). *In vitro* Cultures of Higher Plants. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers.
- Pieroni, A. (2000). Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. *J. Ethnopharmacol.* 70: 235-273.
- Pietta, P. G., (1998). Flavonoids in Medicinal Plants, in *Flavonoids in Health and Diseases* (Eds. C. A. Rice-Evans and L. Packer), Marcel Dekker, New York, pp. 61-110.
- Pollard J.K., Shantz E.M., Steward F.C. (1961). Hexitols in coconut milk: their role in nurture of dividing cells. *Plant. Physiol.* 36: 492-498.
- Polunin, O. (1987). *Flowers of Greece and the Balkans, a field guide*. Oxford University Press, Hong Kong.
- Polunin, O., (1980). *Flowers of Greece and the Balkans: a field guide*, p. 354-355. Oxford, Oxford University Press.

- Prakash, M.G., Gurumurthi, K. (2005). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis*. *Curr. Sci.* 88: 1311- 1316.
- Preil, W. (2003). Micropropagation of ornamental plants. In: Laimer M, Rucker W, editors. *Plant tissue culture 100 years since Gottlieb Haberlandt*. New York: Springer-Verlag. 115-133.
- Psaras, G., Rhizopoulou, S. (1995). Mesophyll structure during leaf development in *Ballota acetabulosa*. *New phytol.* 131: 303-309.
- Psaras, G.K. (1986). Chloroplast arrangement along intercellular spaces in the leaves of a Mediterranean sub shrub. *Journal of Plant Physiology* 126: 189-193.
- Psaras, G.K. and Christodoulakis N.S. (1987). Air Pollution Effects on the Ultrastructure of *Phlomis fruticosa* Mesophyll Cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38(4): 610-617.
- Puchooa, D. and Ramburn, R. (2004) A Study on the use of carrot juice in the tissue culture of *Daucus carota*. *African Journal of Biotechnology*, 3 (4): 248-252.
- Puddephat, I.J., Alderson, P.G. and Wright, N.A. (1997). Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 48(309): 951-962.
- Radley M., Dear E. (1958). Occurrence of gibberellin-like substances in coconut. *Nature* 182: 1098-1100.
- Rahman, S.M., Hossain, M., Islam, A.K.M.R., Joarder, O.I. (1992). Effects of media composition and culture conditions on *in vitro* rooting of rose. *Sci. Hort.* 52: 163-169.
- Razdan, M.K. (1993). *An Introduction to Plant Tissue Culture*. Andover: Hampshire
- Read, P.E., Preece, J.E. (2003). Environmental management for optimizing micropropagation. *Acta Hort.* 616: 129-133.
- Rechinger, K. (1982). *Flora Iranica*, Graz, Austeria, Akademische Druck-U. Verlagsantalt (in Latin).
- Reddy, M.P., Kumar, N., Vijayanand, G., Singh, A.H. Singh, S. (2008). Method for micropropagation of *Jatropha curcas* plants from leaf explants (Patent filed US and PCT, Application No. 2537 de 2008).
- Rhizopoulou, S., Heberlein, K., Kassianou, A. (1997). Field water relations of *Capparis spinosa* L. *Journals & Books*, 36: 237- 248.
- Romano, A., Barros, S. and Martins-Loucao, M. (2002). Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 68: 35-41.

- Rout, G.R., Jain, S.M. (2004). Micropropagation of ornamental plants-cut flowers. *Propag. Ornam. Plants* 4: 3-28.
- Rustaiyan, A., Faridchehr, A., Ariaee Fard, M. (2017). Constituents of two *Ballota* species from Iran; *Ballota aucheri* and *Ballota nigra*. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research (EJPMR)*. 4: 215-218.
- Sauer, A., Walther, F., Preil, W. (1985). Different suitability for *in vitro* propagation of *rose cultivars*. *Gartenbauwissenschaft* 3: 133-138.
- Savona, G., Bruno, M., Piozzi, F., Barbagallo, C. (1982). Diterpenes from *Ballota* species. *Phytochemistry*. 21: 2132-2133.
- Savona, G., Piozzi, F., Hanson, J.R. (1978a). 13-Hydroxyballonigrinolide, a new diterpenoid from *Ballota lanata*. *Phytochemistry*. 17: 2132-2133.
- Savona, G., Piozzi, F., Hanson, J.R., Siverns, M. (1976). Structure of ballotinone, a diterpenoid from *Ballota nigra*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1: 1607-1609.
- Savona, G., Piozzi, F., Hanson, J.R., Siverns, M. (1977a). Structures of three new diterpenoids from *Ballota* species. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1. 3: 322-324.
- Savona, G., Piozzi, F., Hanson, J.R., Siverns, M. (1977b). The structure of ballotenol, a new diterpenoid from *Ballota nigra*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1. 5: 497-499.
- Savona, G., Piozzi, F., Hanson, J.R., Siverns, M. (1978b). 18-Hydroxyballonigrin, a new diterpenoid from *Ballota acetabulosa*. *J. Chem. Soc. Trans.* 1. 10: 1271-1272.
- Savona, G., Piozzi, F., Marino, M. (1977c). Rupestralic acid, a new diterpene lactone. *Heterocycles*. 7: 161-164.
- Savona, G., Piozzi, F., Rodríguez, B. (1978c). Hispanolone, a new furanoditerpene. *Heterocycles*. 9: 257-261.
- Schween, G., Schwenkel, H.G. (2003). Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in greenhouse of *Primula* ssp. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 72: 53-61.
- Scott, G., Springfield, E.P., Coldrey, N. (2004). A pharmacognostical study of 26 South African plant species used as traditional medicines. *Pharm. Biol.* 42: 186-213.
- Seidel, V., Bailleul, F., Libot, F., Tillequin, F. (1997). A phenylpropanoid glycoside from *Ballota nigra*. *Phytochemistry*. 44: 691-693.
- Seidel, V., Bailleul, F., Tillequin, F. (1996a). Phenylpropanoid glycosides from *Ballota nigra*. *Planta. Med.* 62: 186-187.
- Seidel, V., Bailleul, F., Tillequin, F. (1996b). Isolation from *Ballota nigra* of 13-hydroxyballonigrinolide, a diterpene useful for the standardization of the drug. *J. Pharm. Belg.* 51: 72-73.

- Seidel, V., Verholle, M., Malard, Y., Tillequin, F., Fruchart, J.C., Duriez, P., Bailleul, F., Teissier, E. (2000). Phenylpropanoids from *Ballota nigra* L. inhibit *in vitro* LDL peroxidation. *Phytother. Res.* 14: 93-98.
- Shahidi, F., Janitha P.K. and Wanasundara, P.D. (1992) Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 31: 67–103.
- Sharma, R., Wakhlu, A. (2001). Adventitious shoot regeneration from petiole explants of *Heracleum candicans* wall. *In vitro Cell. Dev. Biol.Plant* 37: 794-797.
- Siciliano, T., Bader, A., Vassallo, A., Braca, A., Morelli, I., Pizza, C., De Tommasi, N. (2005). Secondary metabolites from *Ballota undulata* (Lamiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33: 341-351.
- Stearn, W. (1976). Union of *Chionanthus* and *Linociera* (Oleaceae). Missouri Botanical Garden Press, 63: 355- 357.
- Steinhart C.E., Standifer L.G., Skoog F. (1961). Nutrient requirements for *in vitro* growth of spruce tissue. *Am. J. Bot.* 48: 465-472.
- Steward F.C., Caplin S.M. (1952). Investigation on growth and metabolism of plant cells: Evidence on the role of coconut milk factor in development. *Ann. Bot.* 16: 491-498.
- Steward F.C., Shantz E.M. (1959). The chemical regulation of growth (some substances and extracts which induce growth and morphogenesis). *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 10: 379-386.
- Steward, F.C., Mapes, M.O., Mears, K. (1958). Growth and organised development of cultured cells: II. Organisation in cultured grown from freely suspended cells. *Am J. Bot.* 45: 705-707.
- Stewart, F. C., Caplin, S. M. (1951): A tissue culture from potato tuber: the synergistic action of 2,4-D and of coconut milk. *Science* 113: 518-520.
- Straus J. (1960). Maize endosperm tissue grown *in vitro* : Development of a synthetic medium. *Am. J Bot.* 47: 641-646.
- Straus J., La Rue C.D. (1954). Maize endosperm tissue grown *in vitro*: Cultural requirements. *Am. J. Bot.* 41: 687-692.
- Sujatha, M., Mukta, N. (1996). Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44: 135-141.
- Sutter, E., Langhans, R.W. (1979). Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J.Am.Soc. Hort. Sci.* 104: 493-496.
- Tagashira, M., and Ohtake, Y. (1998). A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melissa officinalis*, *Planta Med.* 64: 555–558.
- Taiz, L., Zeiger, E. (1991). *Plant Physiology*. Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing.

- Tanker, N., Ilisulu, F., Koyuncu, M., Coşkun, M. (1986). Phytochemical Screening of Plants from the Ermenek-Mut Gülnar (Turkey) Area, III. Labiatae. *Int. J. Crude Drug Res.* 24: 177-182.
- Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T.J., Tosun, F., Rüedi, P. (2006). Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1352-1364.
- Tenenbaum, F. (2003). *Taylor's Encyclopedia of Garden Plants*, Houghton Mifflin Company, New York.
- Teng, W.L. (1999). Source, etiolation and orientation of explants affect *in vitro* regeneration of Venus fly-trap (*Dionaea muscipula*). *Plant Cell Rep.* 18: 363-368.
- Tipirdamaz, R., Guvenc, A., (2004). Seed fatty acids composition of *Ballota cristata*. *Chem. Nat. Compd.* 40: 291-292.
- Tóth, E. (2009). Comparative chemical analysis of *Ballota* species, with special respect to *Ballota nigra*, our new official plant in Ph. Hg. VIII. (Ph.D. Thesis). University of Szeged, Hungary. Tóth, E., Tóth, G., Máthé, I., Blunden, G. (2007). Martynoside, forsythoside B, ladanein and 7 $\alpha$ - acetoxyroyleanone from *Ballota nigra* L. *Biochem. Syst. Ecol.* 35: 894-897.
- Través, P.G., López-Fontal, R., Cuadrado, I., Luque, A., Boscá, L., De las Heras, B., Hortelano, S. (2013). Critical role of the death receptor pathway in the antitumoral effects induced by hispanolone derivatives. *Oncogene.* 32: 259-268.
- Tyagi, A.P., Comai, L., Byers, B. (2001). Comparison of plant regeneration from root, shoot and leaf explants in pigeon pea (*Cajanus cajan*) cultivars. *SABRAO J. Breed. Gen.* 33: 59-71.
- Ullah, N., Ahmad, I., Ayaz, S. (2014). *In vitro* antimicrobial and antiprotozoal activities, phytochemical screening and heavy metals toxicity of different parts of *Ballota nigra*. *BioMed. res. int.* 2014: 1-9.
- Vieitez, A.M., Ballester, A., San-Jose, M.C., Vieitez, E. (1985). Anomatal and chemical studies of vitrified shoots of chesnut regenerated *in vitro*. *Physiol. Plant.* 65: 177-184.
- Vieitez, A.M., Pintos, F, San-Jose, M.C. and Ballester, A. (1993). *In vitro* shoot proliferation determined by explant orientation of junevile and mature *Quercus rubra* L. *Tree Physiol.* 12: 107-117.
- Vieth, J., Morisset, C., Lamond, M. (1983). Histologie de pantules vitreuses de Pyrus, Malus cv. M.26 et de *Pelargonium pelatum* cv. Chester Frank, issues de la culture *in vitro* (Etude preliminaire) *Rev. Can. Biol. Exp.* 42: 29-32.

- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsoouklis, K.F. (2017). Studies on *in vitro* propagation of *Anthyllis barba-jovis* L., *Acta Horticulturae*, 1155: 317-320.
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsoouklis, K.F. (2017). The effect of cytokinin type and concentration on micropropagation of *Calamintha cretica*, *Acta Horticulturae*, 1189: 477-480.
- Vlachou, G., Papafotiou, M., and Bertsoouklis, K.F. (2016). *In vitro* propagation of *Ballota acetabulosa* L. *Acta Horticulturae*, 1113: 25.
- Von Arnold, S. (1982). Factors influencing formation, development and rooting of adventitious shoots from embryos of *Picea abies* L. Karst. *Plant science Letters*. 27: 285-287.
- Von Arnold, S., Eriksson, T. (1984). Effect of agar concentration and growth of anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 3: 257-264.
- Vrchovská, V., Spilková, J., Valentão, P., Sousa, C., Andrade, P.B., Seabra, R.M. (2007). Antioxidative properties and phytochemical composition of *Ballota nigra* infusion. *Food. chem.* 105: 1396-1403.
- Vukovic, N., Sukdolak, S., Solujic, S., Niciforovic, N. (2009). Antimicrobial activity of the essential oil obtained from roots and chemical composition of the volatile constituents from the roots, stems, and leaves of *Ballota nigra* from Serbia. *J. Med. Food*. 12: 435- 441.
- Vural, K., Ezer, N., Erol, K., Şahin, F.P. (1996). Anxiolytic and antidepressant activities of some *Ballota* species. *J. Fac. Pharm. Gazi*. 13: 29-32.
- Waheed, I., Ahmad, M., Syed, NH., Ashraf, R. (2014). Investigation of phytochemical and antioxidant properties of methanol extract and fractions of *Ballota limbata* (Lamiaceae). *Indian. J. Pharm. Sci.* 76: 251-256.
- Webb D.T., Flinn B.S. and Georgis W. (1988). Micropropagation of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Can J For Res* 18: 1570–1580.
- Werker, E., Putievsky, E. and Ravid, U. (1985a). The Essential Oils and Glandular Hairs in Different Chemotypes of *Origanum vulgare* L. *Annals of Botany* 55: 793-801.
- Werker, E., Ravid, U. and Putievsky, E. (1985b). Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Israel Journal of Botany* 34: 31-45.
- Westman, W.E. (1981). Seasonal Dimorphism of Foliage in Californian Coastal Sage Scrub. *Oecologia (Berl.)* 51 (3): 385-388.
- Westman, W.E. (1985). Air Pollution Injury to Coastal Sage Scrub in the Santa Monica Mountains, Southern California. *Water, Air, Soil Pollut.* 26 (1): 19-41.



- Wiggans S.C. (1954). Growth and organ formation on callus tissues derived from *Daucus carota*. Am. J. Bot. 41: 321-326.
- Williams, R.R., Taji, A.M. (1987). Effects of temperature, darkness and gelling agent on long-term storage of *in vitro* shoot cultures of Australian woody plant species. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 11: 151-156.
- Yazgan, A.N., Yilmaz, G., Yilmaz B.S. (2010). Anatomical studies on *Ballota acetabulosa* (L.) Benth. J. Fac. Pharm. Ankara 39: 265-274.
- Yilmaz, B.S., Ergene, B., Çitoğlu, G.S. (2015). Determination of total ortho-dihydroxycinnamic acid derivatives and flavonoid contents of *Ballota* species growing in Turkey. Turk. J. Pharm. Sci. 12: 67-74.
- Zgorka, G. and Głowniak, K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 26: 79–87.
- Zheng, W. and Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, J. Agric. Food Chem. 49: 5165–5170.
- Zimmerman, R. H. (1995). Environmental effects and their control in plant tissue culture-overview. Acta Hort. 393: 11-14.
- Ziv, M. (1991). Quality of micropropagated plants – Vitrification. *In Vitro* Cell. Dev. Biol.Plant, 27: 64-69.
- Ziv, M., Meir, G., Halevy, A.H. (1983). Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Culture. 2: 55-65.
- Zobayed, S.M.A., Afreen-Zobayed, F., Kubota, C., Kozai, T. (2000). Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. Ann. Bot. 85: 587-592.
- Zuccherelli, G. (1979). Moltiplicazione *in vitro* dei porteinnesti clonalidel pesco. Frutticoltura 41: 15-20.
- Zukar, A., Ahroni, A., Shejtman, H., vinstein, A. (1997). Adventitious shoot regeneration from leaf explants of *Gypsophla paniculata* L. Plant cell Rep. 16: 775-778.
- Kitto, S.L. and Mackay, W.A. (1992). Micropropagation of French tarragon (*Artemisia dracunculus* L. var. *sativa*). p.354. In: Y.P.S. Bajaj (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 19. SpringerVerlag, Berlin.

### **Ελληνική βιβλιογραφία**

- Βαρδαβάκης, Μ. (1993). Συστηματική Βοτανική (Κρυπτόγαμα-Σπερματοφύτα). Τόμος Ι, Έκδοση 4η . Εκδόσεις Σαλονικίδης, Θεσσαλονίκη.
- Διοσκουρίδης, Π. (77μ.Χ.). Περί ύλης ιατρικής. Εκδόσεις Μίλητος (1999), Αθήνα.
- Ζερλέντης, Κ. (1981). Συστηματική Βοτανική, μέρος 2ο και 3ο . Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών, Εργαστήριο Συστηματικής Βοτανικής.
- Ζαχαράκη, Σ. (2012). Ανατομικές και Ιστοχημικές διαφορές στα φύλλα του φυτού Βαλλωτή (*Ballota acetabulosa*) κατά τη διάρκεια του έτους. Μεταπτυχιακή εργασία, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Καββάδας Σ. Δ. (1956). Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν. Αθήνα, τόμ. Β., σελ. 532-533.
- Κίντζιος, Σ. (2005). Συνοδευτικές σημειώσεις παραδόσεων κυτταρο /ιστοκαλλιέργειας φυτών. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Κίντζιος, Σ. (2015). Εισαγωγή στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών. Εκδόσεις Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράματα και Βοηθήματα
- Κοράκης, Γ. (2015). Δασική Βοτανική. Αυτοφυή δένδρα και θάμνοι της Ελλάδας. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Αθήνα.
- Μετζάκης, Δ. (2005). Καλλιέργειες *in vitro*. Εκδόσεις ΙΩΝ.
- Μπαμπαλώνας Δ. και Κοκκίνη Σ., (2004). Συστηματική Βοτανική. Εκδόσεις Αιβατζή, Θεσσαλονίκη.
- Μποζαμπαλίδης, Α. (2008). Οι αδένες των φυτών. Θεσσαλονίκη.
- Παπαφωτίου Μ. (2008). Εργαστηριακές Σημειώσεις Ανθοκομίας ΙΙ, τεύχος Β, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Σαρλής, Γ. (1999). Συστηματική Βοτανική Εφαρμογές κορμοφύτων. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλη

### **Διαδίκτυο**

- Δ1<http://kpe-kastor.kas.sch.gr/dasos/b1/mediterranean.htm> (ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018)
- Δ2<http://kpe-kastor.kas.sch.gr/dasos/b1/bushes.htm> (ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018)

Δ3<https://kentromeletisarxaiasthourias.wordpress.com/2016/06/21/ballota-acetabulosa-%CE%B2%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CF%89%CF%84%CE%AE-%CE%B7-%CE%BA%CF%81%CE%B1%CF%84%CE%B7%CF%81%CE%BF%CE%B5%CE%B9%CE%B4%CE%AE%CF%82%CE%BB%CF%85%CF%87%CE%BD%CE%B1%CF%81%CE%AC%CE%BA%CE%B9/>(ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018)

Δ4[https://en.wikipedia.org/wiki/Ballota\\_acetabulosa](https://en.wikipedia.org/wiki/Ballota_acetabulosa)(ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018)

Δ5<https://en.wikipedia.org/wiki/Ballota>(ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018)

Δ6<http://www.nhmc.uoc.gr/el/museum/photoarchive/selection/images/nhmc.image.59803>(ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018)

Δ7[http://mediplantepirus.med.uoi.gr/pharmacology/plant\\_details.php?id=163](http://mediplantepirus.med.uoi.gr/pharmacology/plant_details.php?id=163)(ημ/νία πρόσβασης 20/12/2018)

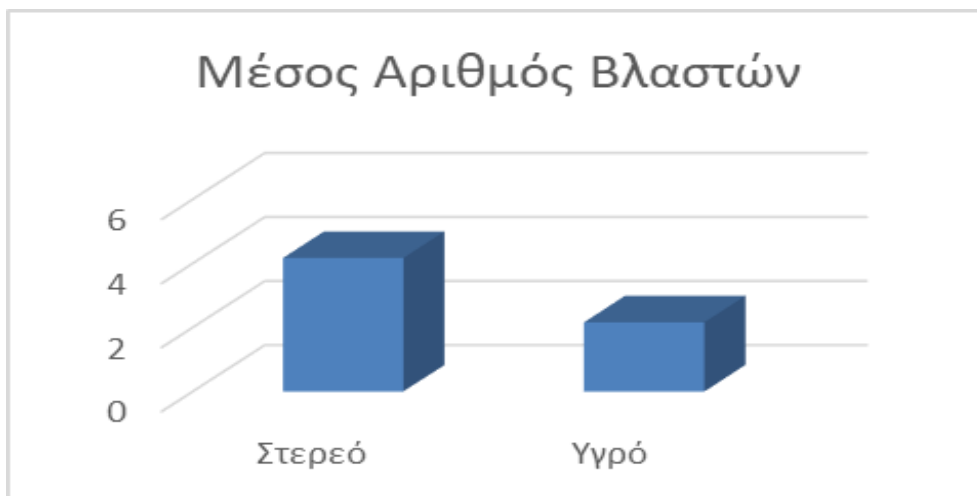
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Διαγραμματική απεικόνιση της καλλιέργειας εκφύτων κόμβου του σταδίου πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών, της ριζοβολίας, της υπερενυδάτωσης και της καλογένεσης του *Ballota acetabulosa*.

### 1<sup>η</sup> υποκαλλιέργεια



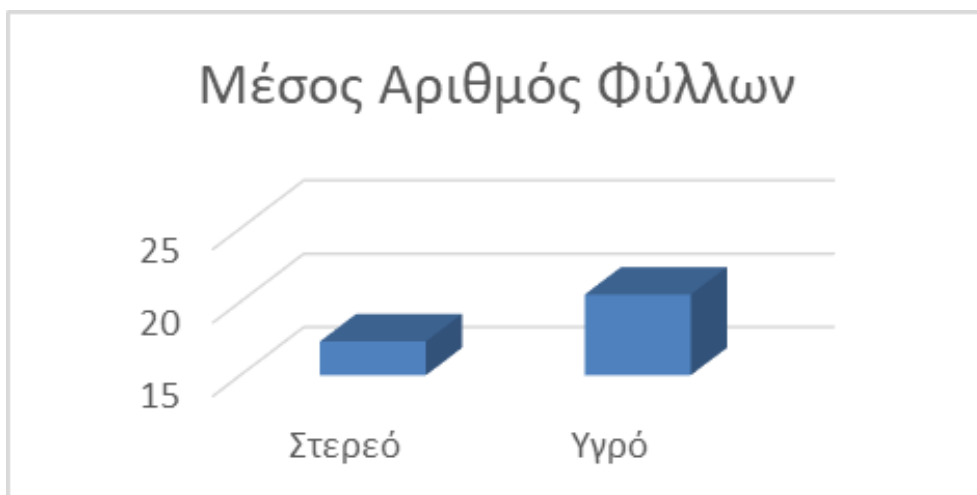
Σχήμα 1: Επίδραση του τύπου υποστρώματος στη βλαστογένεση (%) εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .



Σχήμα 2: Επίδραση του τύπου υποστρώματος στο μέσο αριθμό βλαστών εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n=100$ .



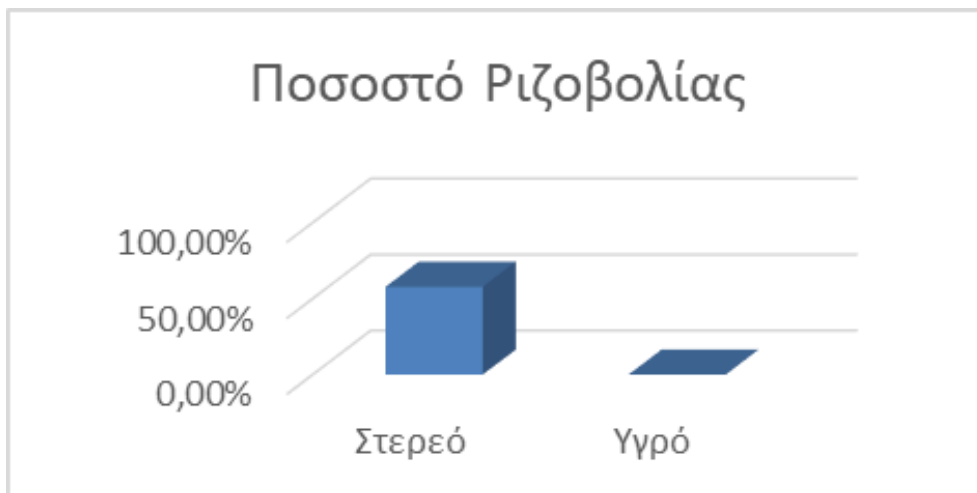
Σχήμα 3: Επίδραση του τύπου υποστρώματος στο μέσο μήκος βλαστών εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .



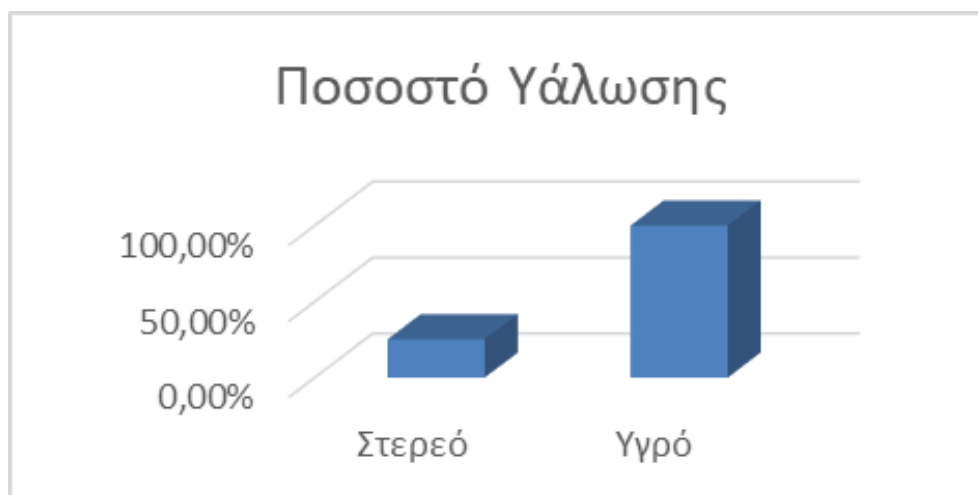
Σχήμα 4: Επίδραση του τύπου υποστρώματος στο μέσο αριθμό φύλλων εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .



Σχήμα 5: Επίδραση του τύπου υποστρώματος στο ποσοστό καλογένεσης εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω *Student's t test*,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .

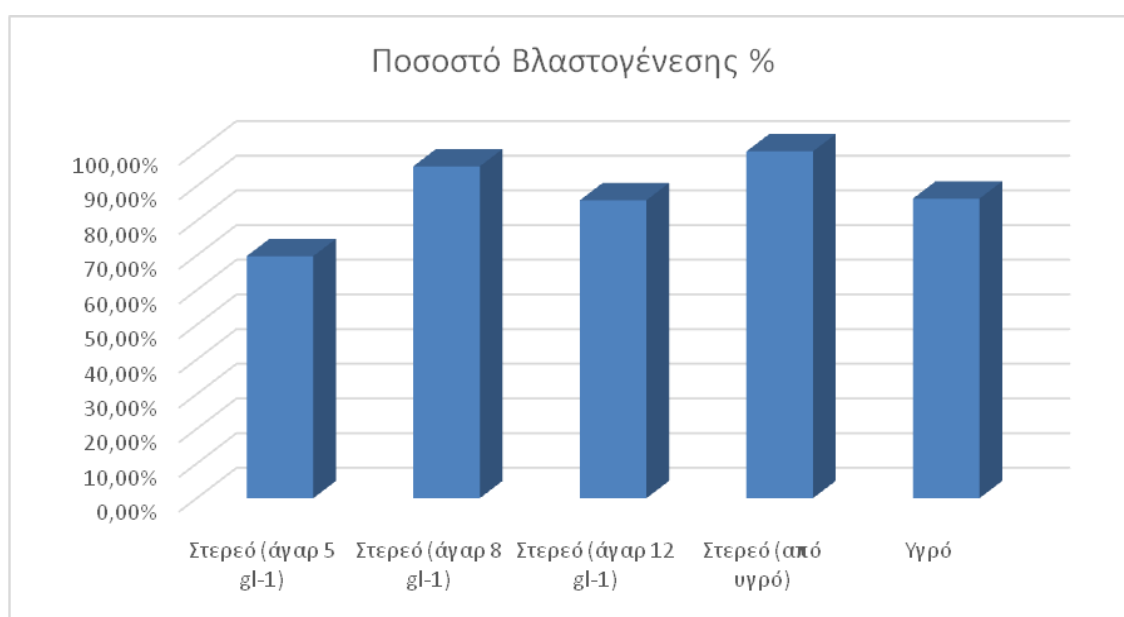


Σχήμα 6: Επίδραση του τύπου υποστρώματος στο ποσοστό ριζοβολίας εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω *Student's t test*,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .

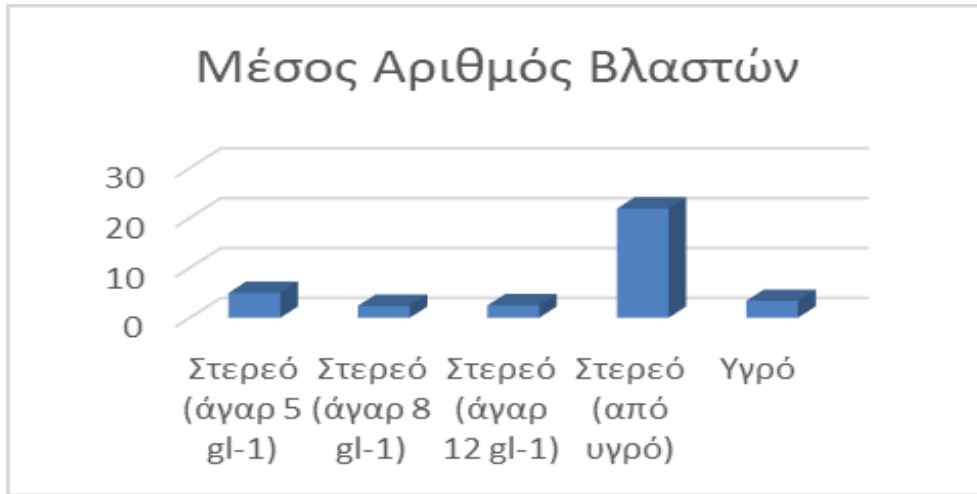


Σχήμα 7: Επίδραση του τύπου υποστρώματος στο ποσοστό υάλωσης εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .

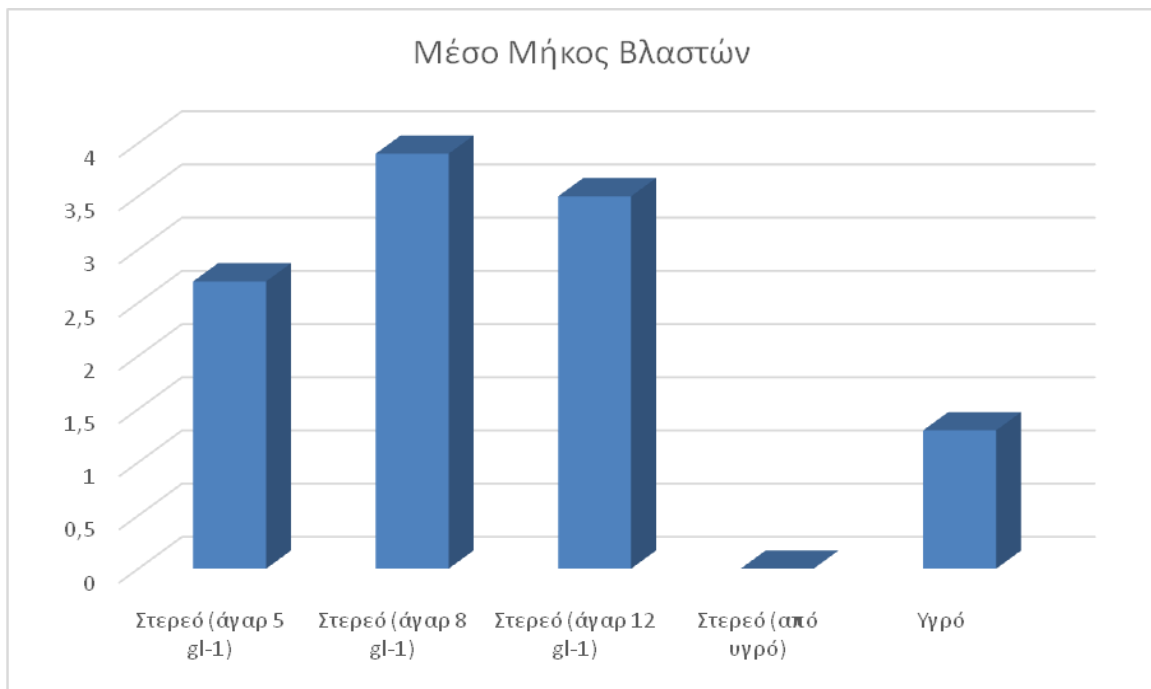
## 2<sup>η</sup> υποκαλλιέργεια



Σχήμα 8: Επίδραση της περιεκτικότητας σε άγαρ του υποστρώματος στο ποσοστό βλαστογένεσης εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .

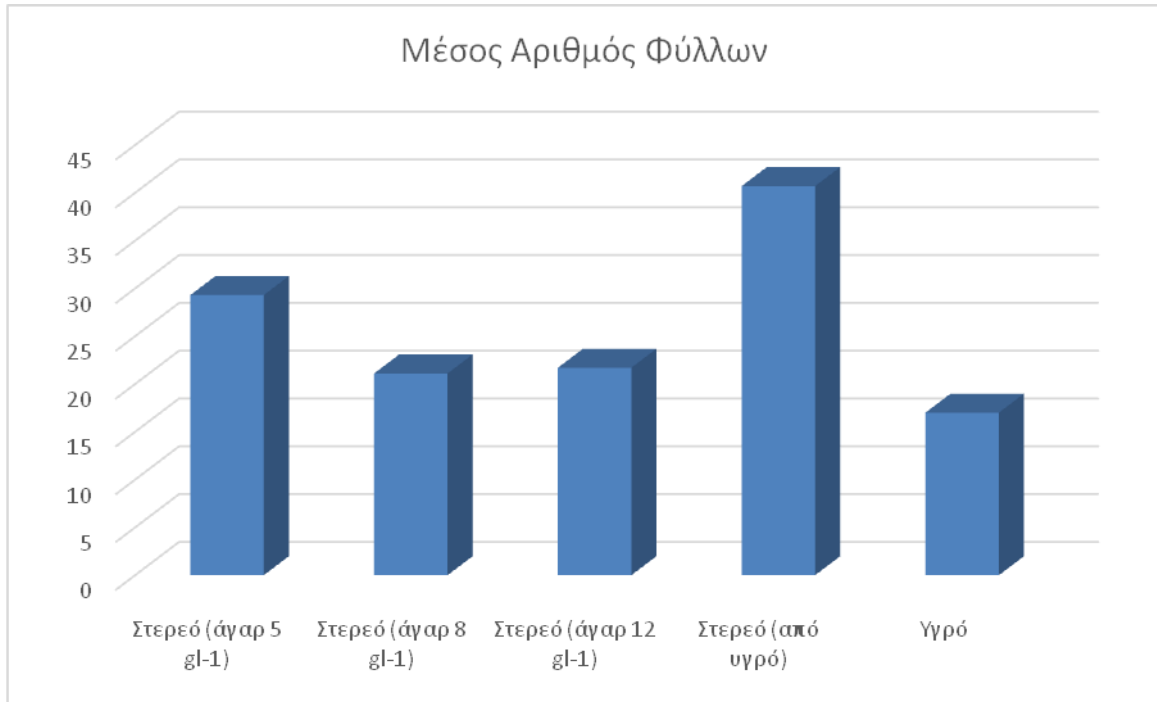


Σχήμα 9: Επίδραση της περιεκτικότητας σε άγαρ του υποστρώματος στο μέσο αριθμό βλαστών εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .

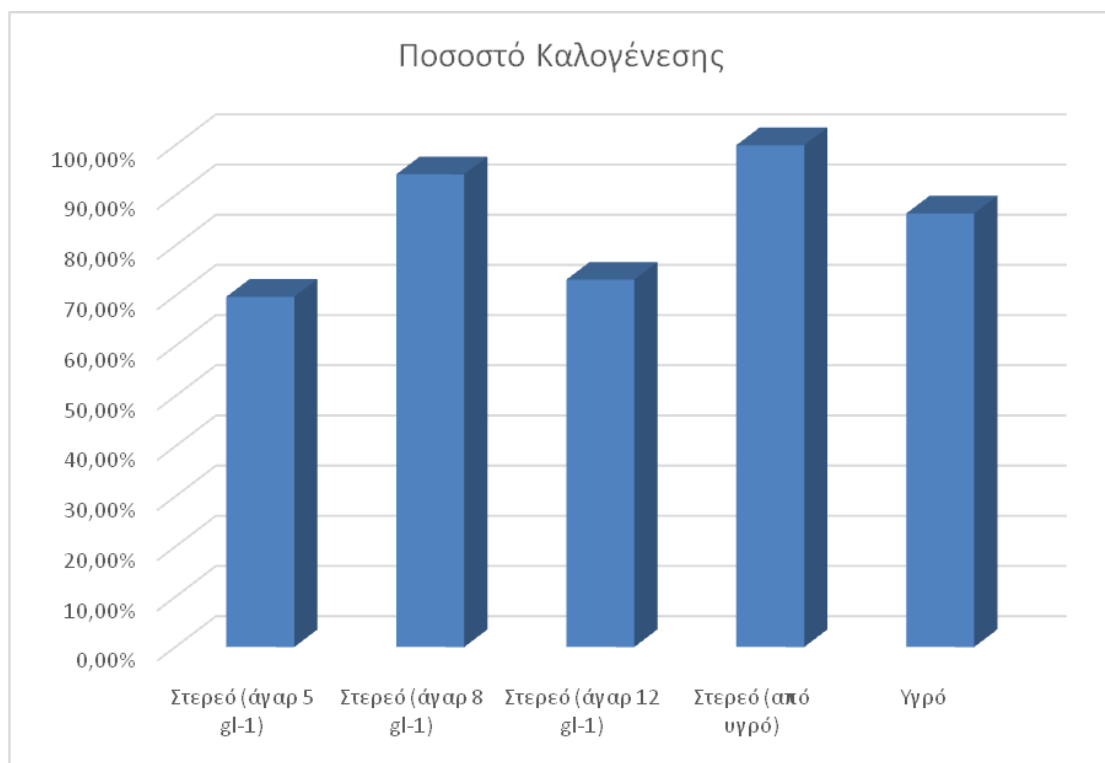


Σχήμα 10: Επίδραση της περιεκτικότητας σε άγαρ του υποστρώματος στο μέσο μήκος βλαστών εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .

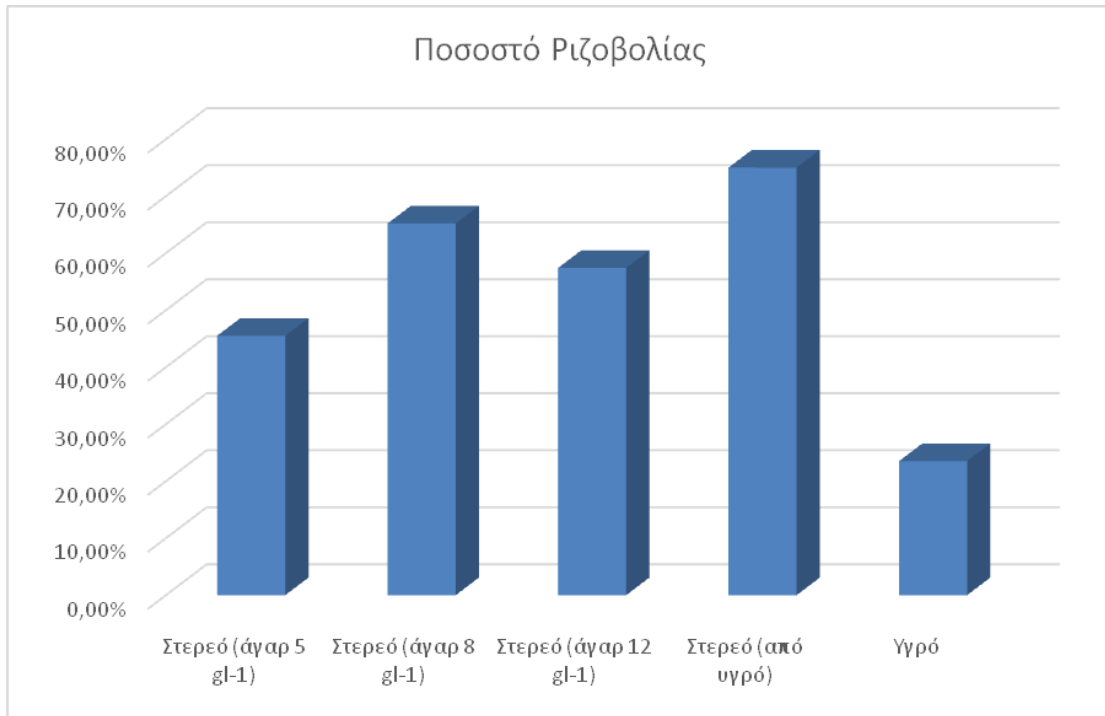




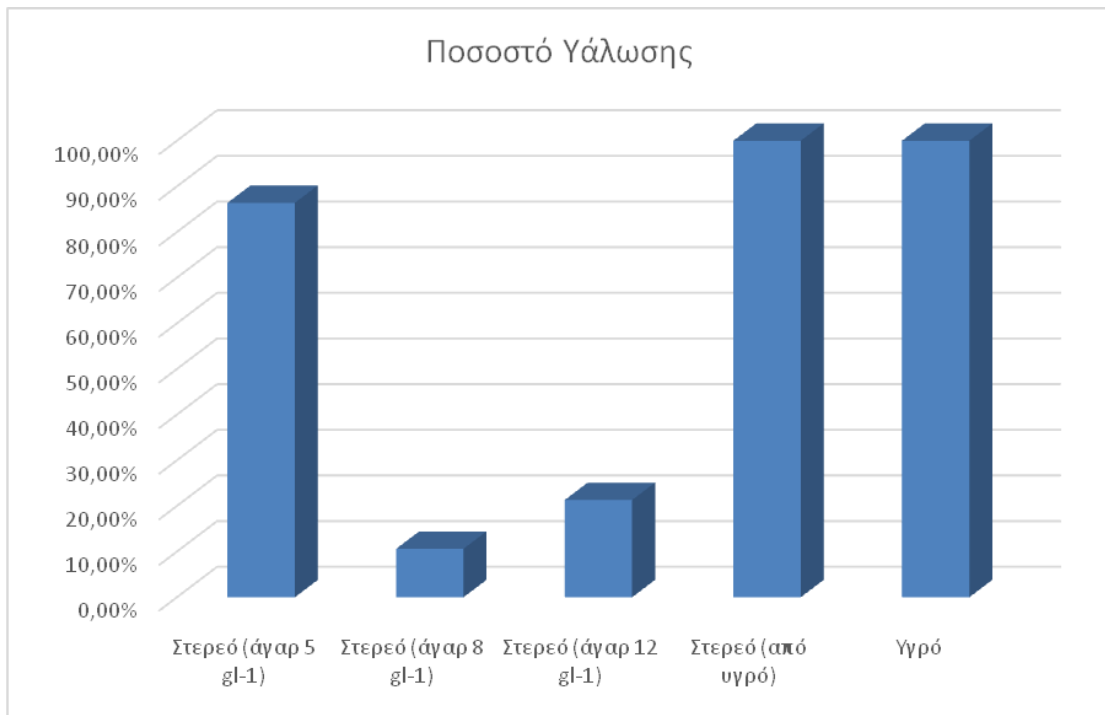
Σχήμα 11: Επίδραση της περιεκτικότητας σε άγαρ του υποστρώματος στο μέσο αριθμό φύλλων εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .



Σχήμα 12: Επίδραση της περιεκτικότητας σε άγαρ του υποστρώματος στο ποσοστό καλογένεσης εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .

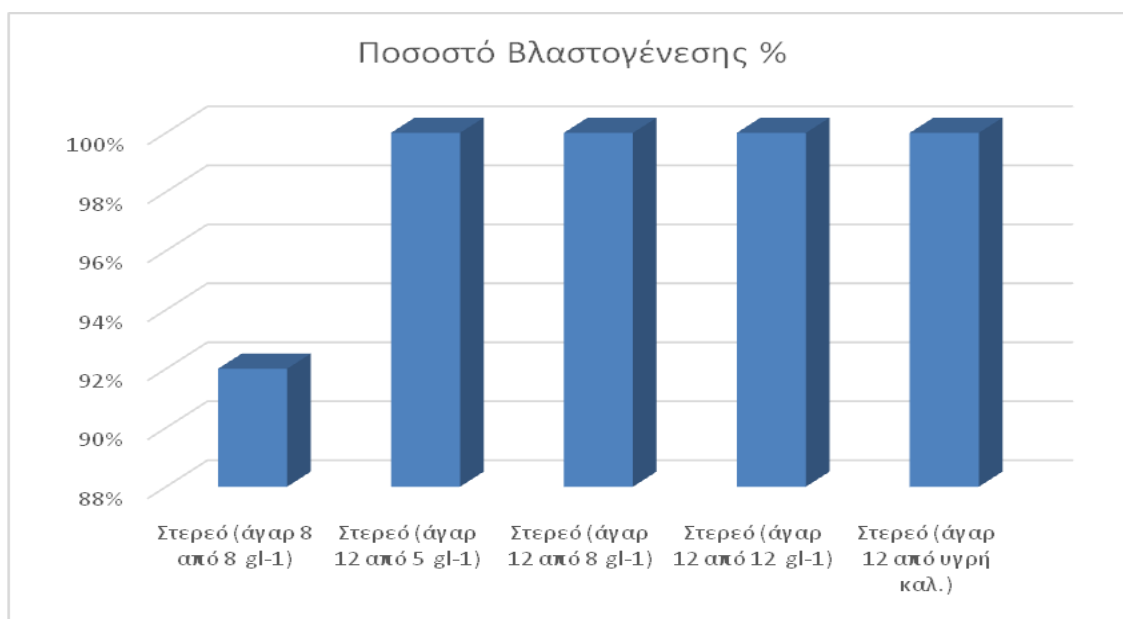


Σχήμα 13: Επίδραση της περιεκτικότητας σε άγαρ του υποστρώματος στο ποσοστό ριζοβολίας εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test,  $P=0,05$ ,  $n=100$ .

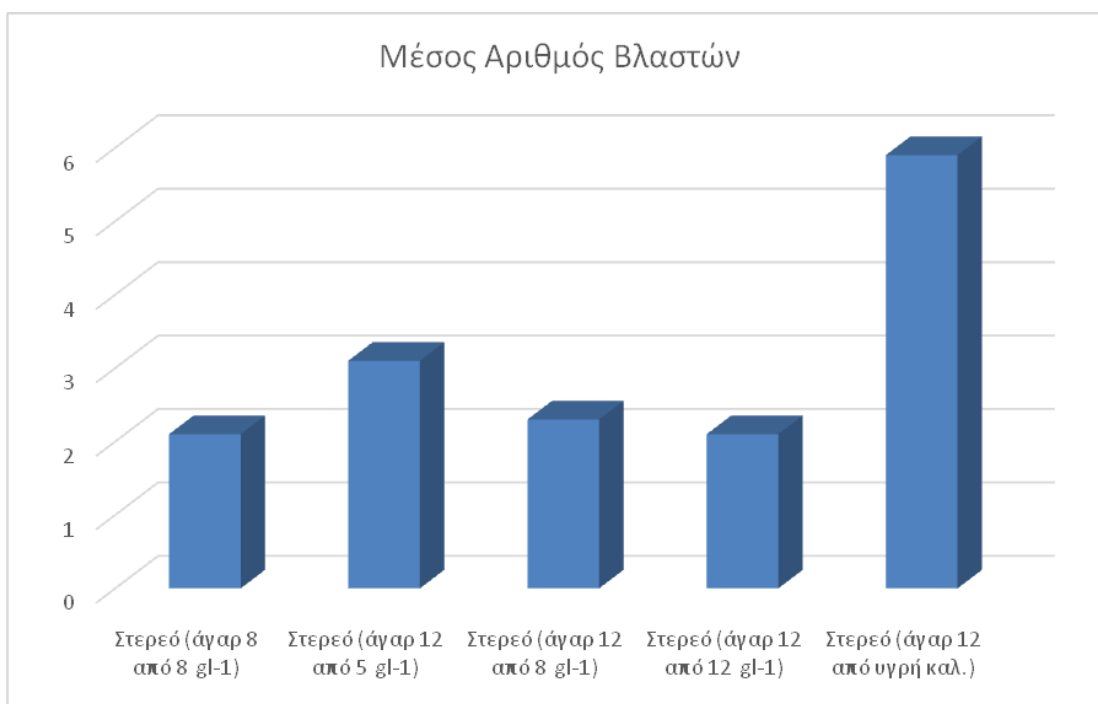


Σχήμα 14: Επίδραση της περιεκτικότητας σε άγαρ του υποστρώματος στο ποσοστό υάλωσης εκφύτων κόμβου του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test,  $P=0,05$ ,  $n=100$ .

### 3<sup>η</sup> υποκαλλιέργεια



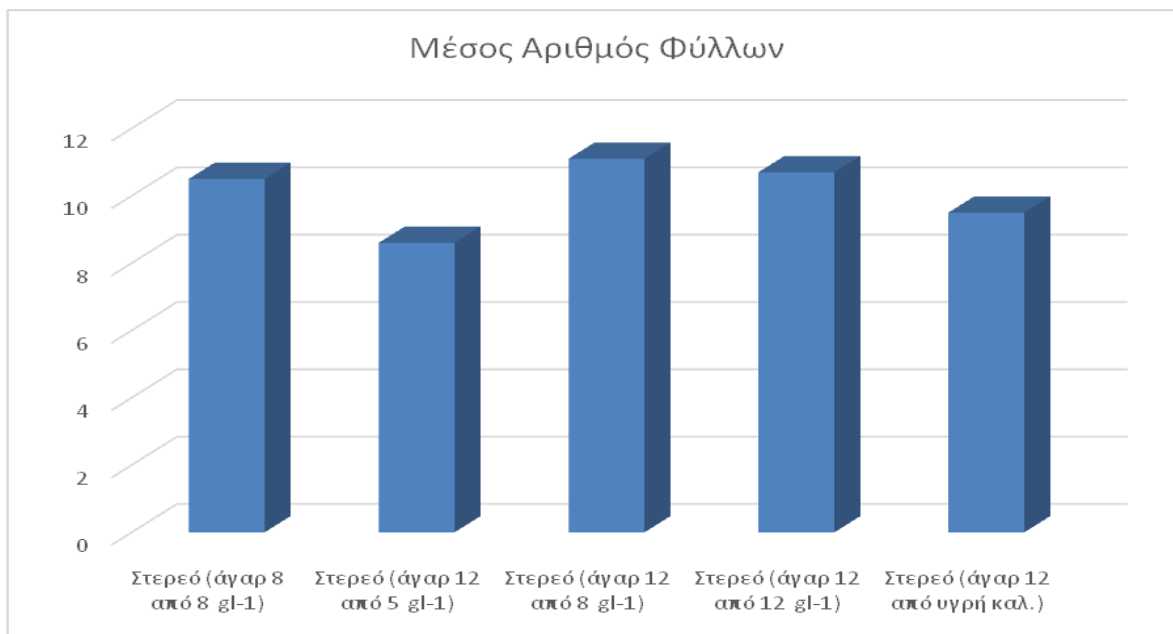
Σχήμα 15: Επίδραση των περιεκτικότητων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS σε έκφυτα κόμβου που έχουν προέλθει από υποστρώματα MS με διαφορετικές περιεκτικότητες σε άγαρ στο ποσοστό βλαστογένεσης του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.



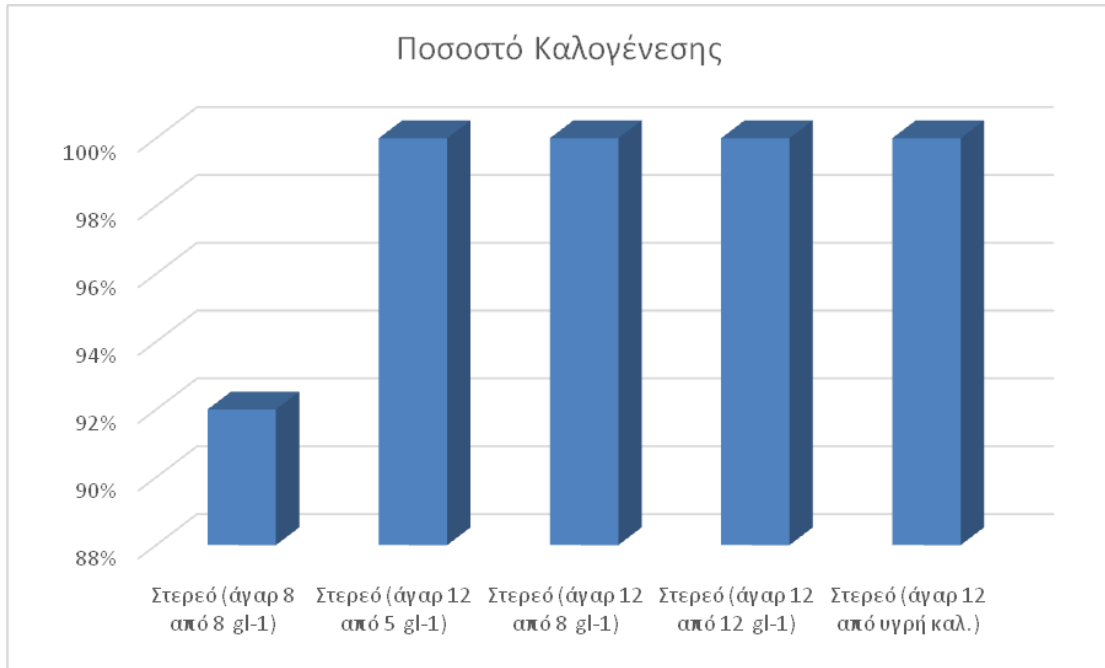
Σχήμα 16: Επίδραση των περιεκτικότητων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS σε έκφυτα κόμβου που έχουν προέλθει από υποστρώματα MS με διαφορετικές περιεκτικότητες σε άγαρ στο μέσο αριθμό βλαστών του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.



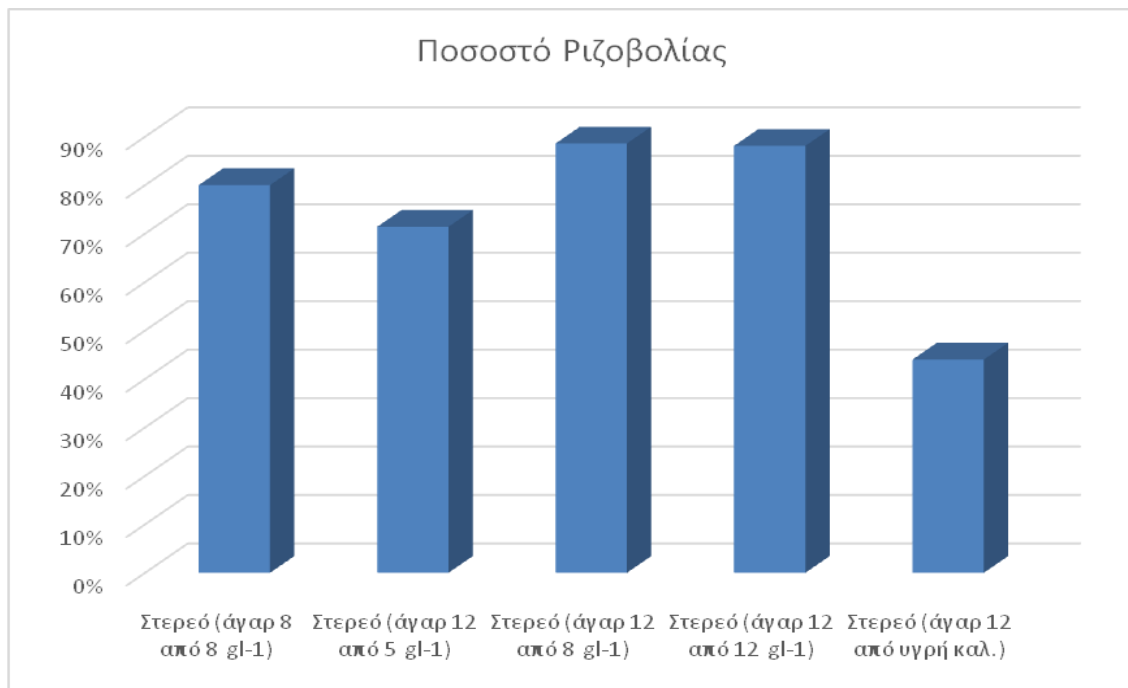
Σχήμα 17: Επίδραση των περιεκτικότητων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS σε έκφυτα κόμβου που έχουν προέλθει από υποστρώματα MS με διαφορετικές περιεκτικότητες σε άγαρ στο μέσο μήκος βλαστών του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.



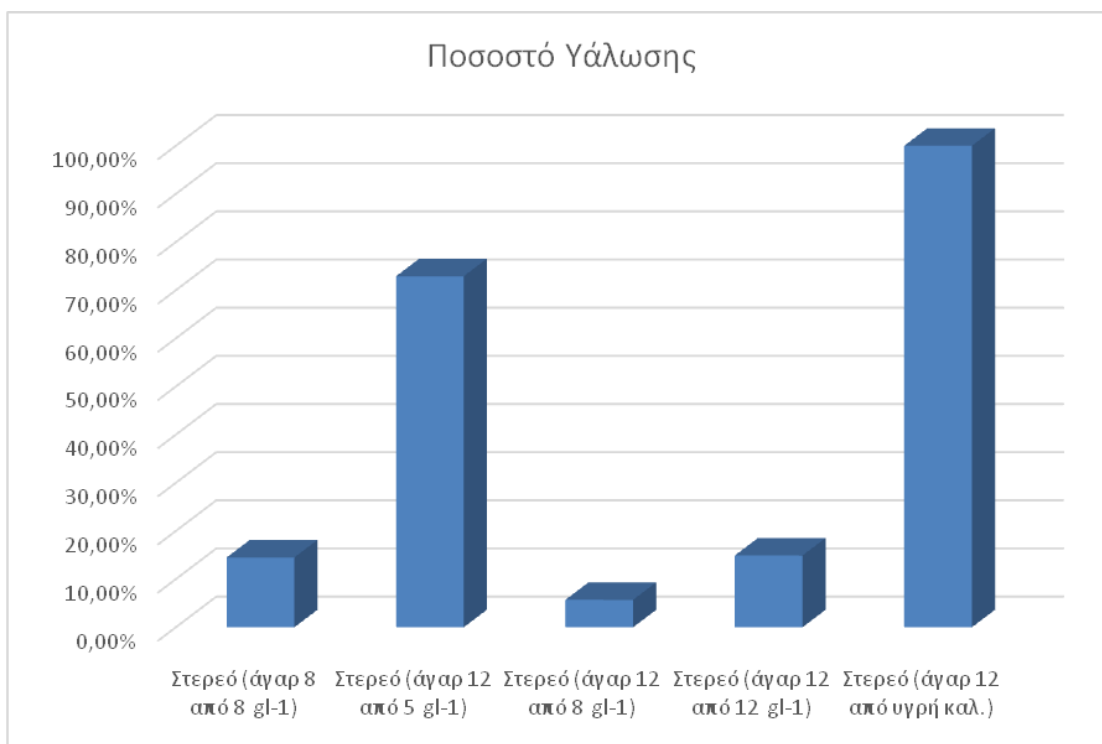
Σχήμα 18: Επίδραση των περιεκτικότητων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS σε έκφυτα κόμβου που έχουν προέλθει από υποστρώματα MS με διαφορετικές περιεκτικότητες σε άγαρ στο μέσο αριθμό φύλλων του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.



Σχήμα 19: Επίδραση των περιεκτικότητων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS σε έκφυτα κόμβου που έχουν προέλθει από υποστρώματα MS με διαφορετικές περιεκτικότητες σε άγαρ στο ποσοστό καλογένησης του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100

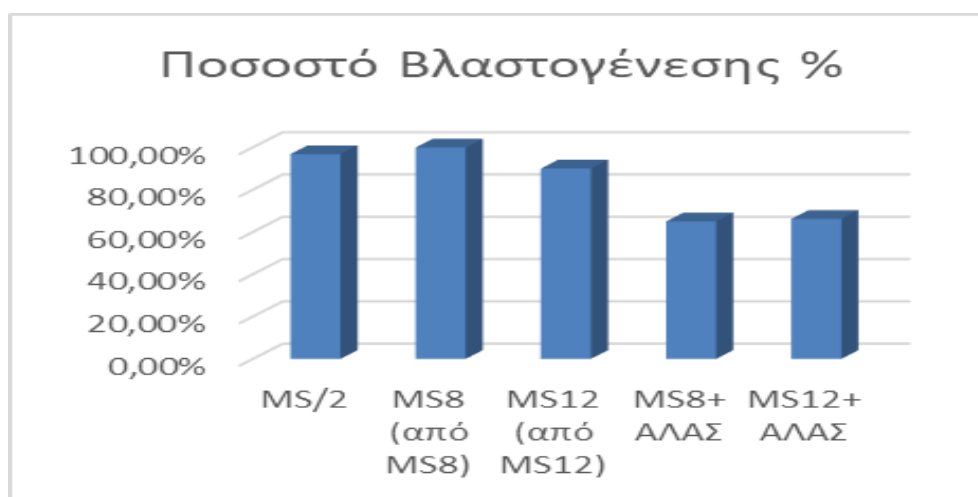


Σχήμα 20: Επίδραση των περιεκτικότητων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS σε έκφυτα κόμβου που έχουν προέλθει από υποστρώματα MS με διαφορετικές περιεκτικότητες σε άγαρ στο ποσοστό ριζοβολίας του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.



Σχήμα 21: Επίδραση των περιεκτικοτήτων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS σε έκφυτα κόμβου που έχουν προέλθει από υποστρώματα MS με διαφορετικές περιεκτικότητες σε άγαρ στο ποσοστό υάλωσης του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.

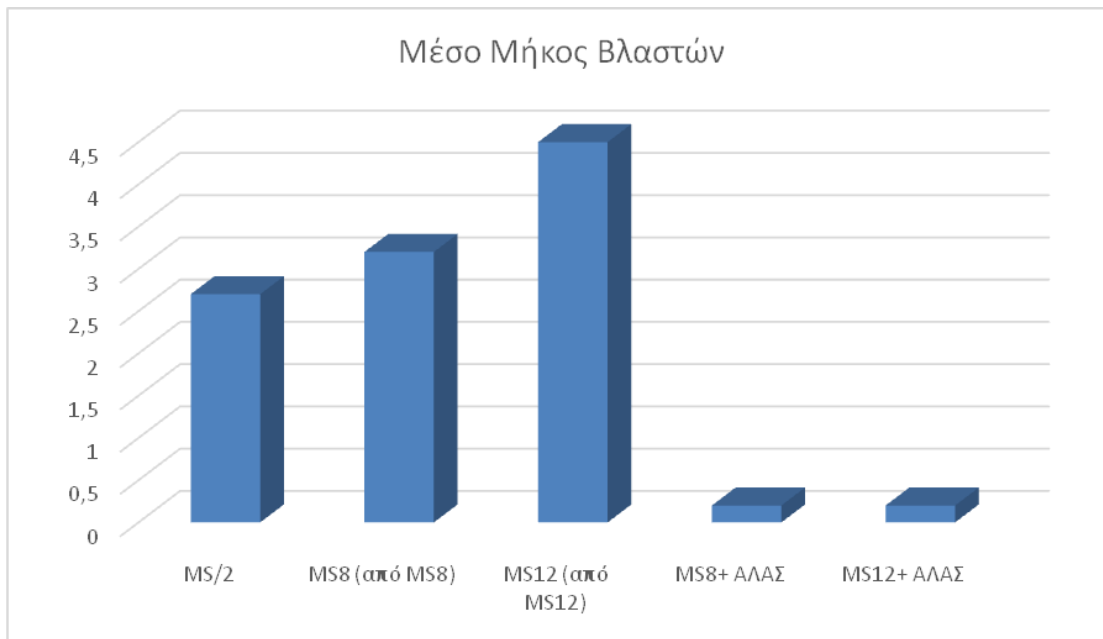
#### 4<sup>η</sup> υποκαλλιέργεια



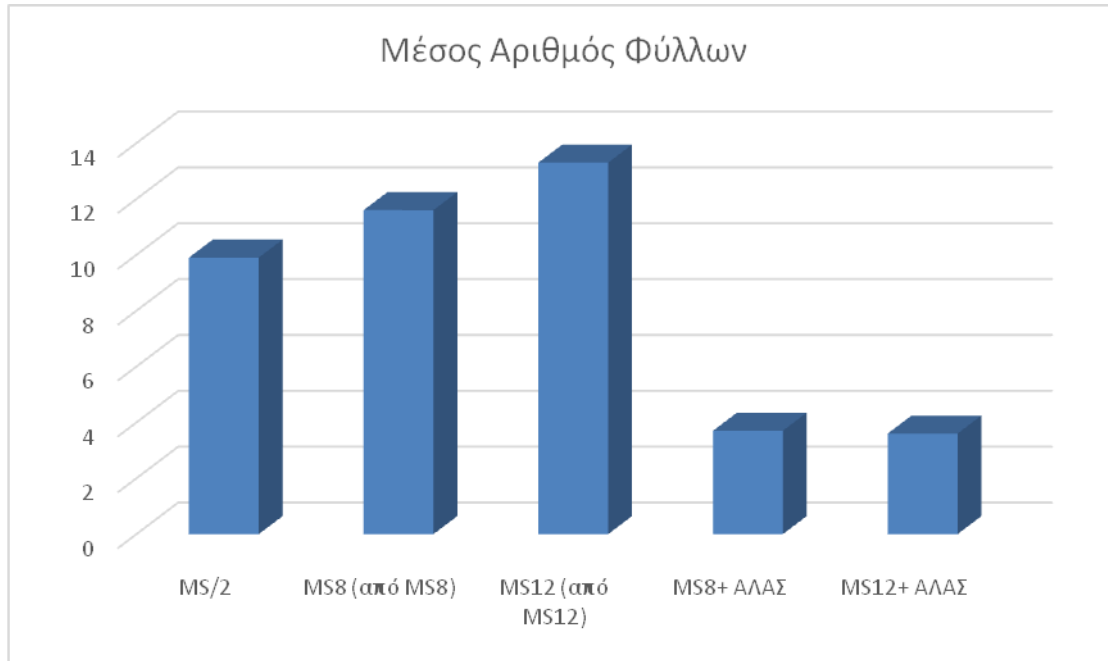
Σχήμα 22: Επίδραση μισής δύναμης MS και των περιεκτικοτήτων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS παρουσία ή απουσία άλατος σε έκφυτα κόμβου στο ποσοστό βλαστογένεσης του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.



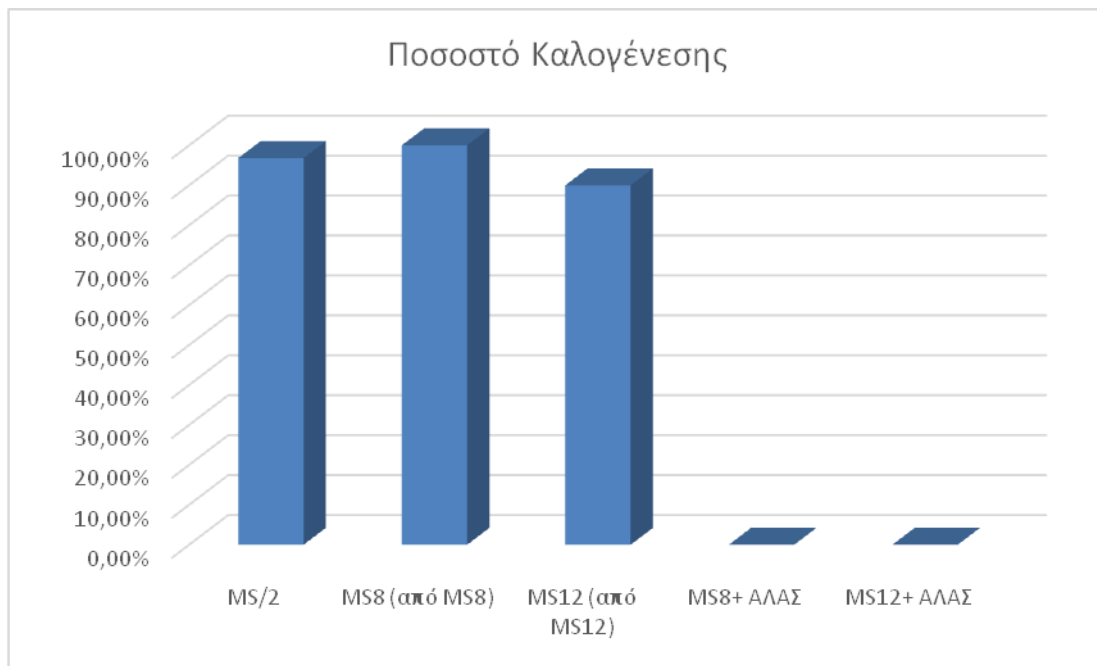
Σχήμα 23: Επίδραση μισής δύναμης MS και των περικετικοτήτων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS παρουσία ή απουσία άλατος σε έκφυτα κόμβου στο μέσο αριθμό βλαστών του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.



Σχήμα 24: Επίδραση μισής δύναμης MS και των περικετικοτήτων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS παρουσία ή απουσία άλατος σε έκφυτα κόμβου στο μέσο μήκος βλαστών του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.

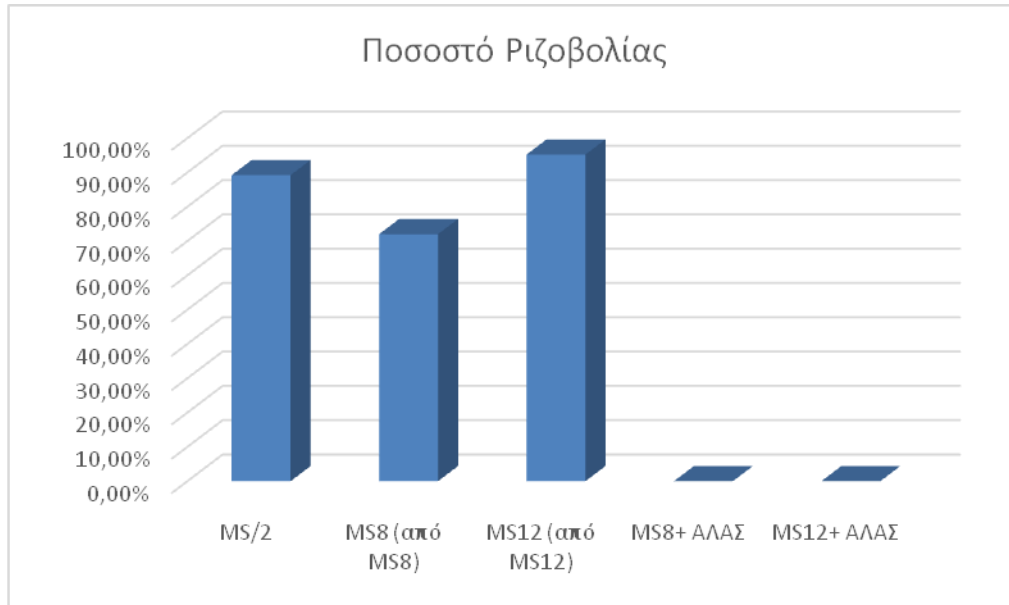


Σχήμα 25: Επίδραση μισής δύναμης MS και των περικετικοτήτων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS παρουσία ή απουσία άλατος σε έκφυτα κόμβου στο μέσο αριθμό φύλλων του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.

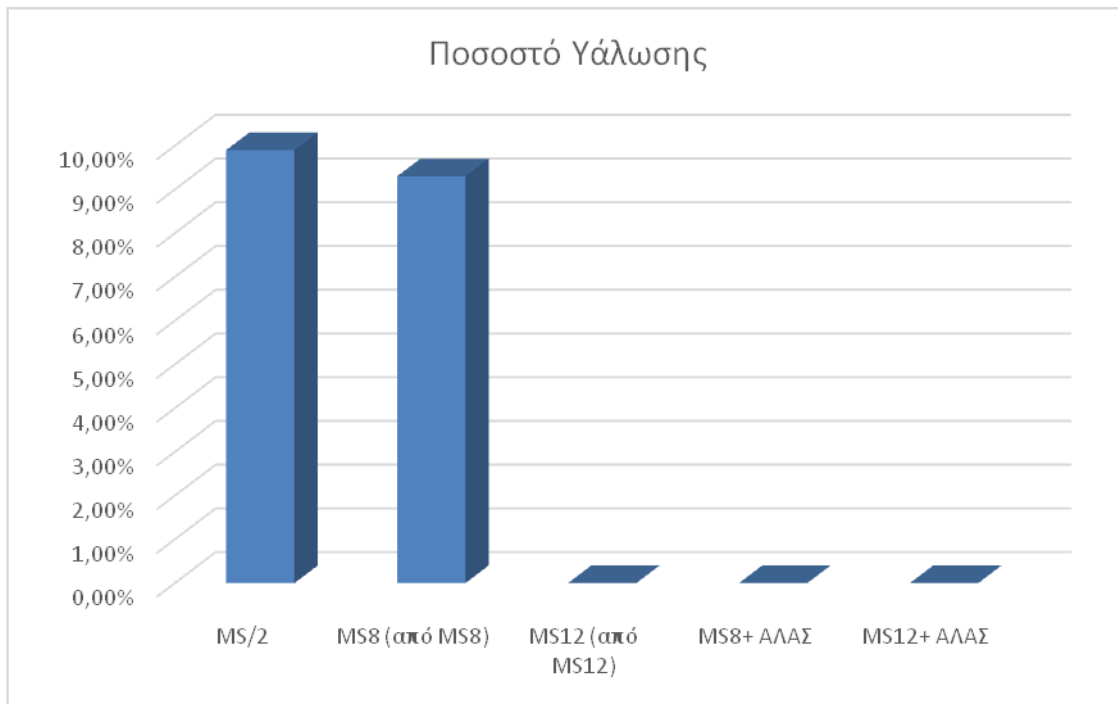


Σχήμα 26: Επίδραση μισής δύναμης MS και των περικετικοτήτων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS παρουσία ή απουσία άλατος σε έκφυτα κόμβου στο ποσοστό καλογένεσης του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.



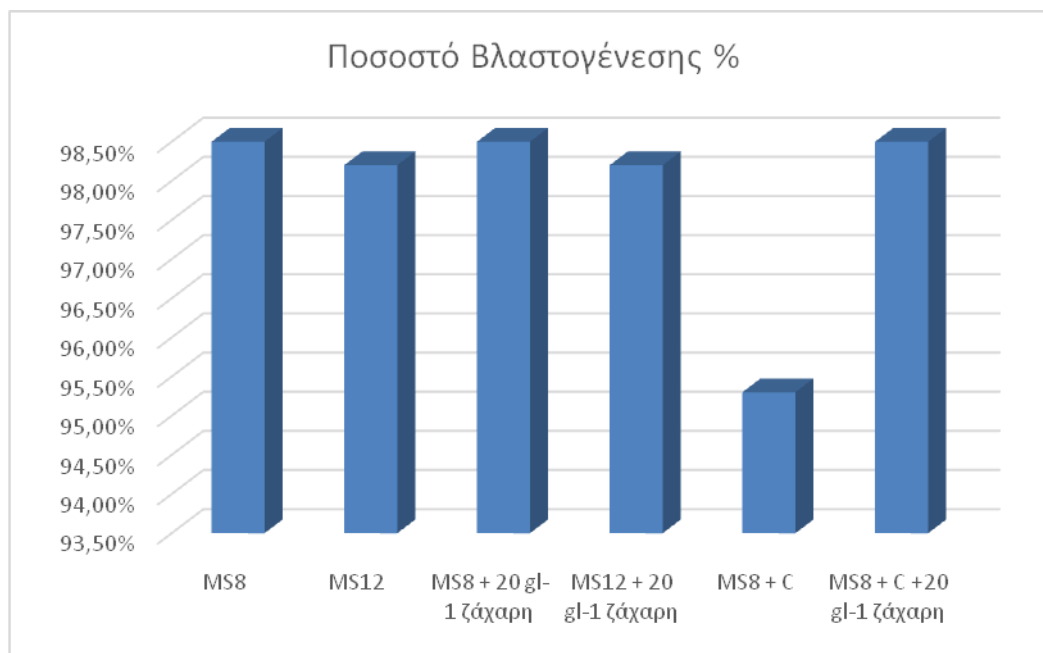


Σχήμα 27: Επίδραση μισής δύναμης MS και των περικετικοτήτων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS παρουσία ή απουσία άλατος σε έκφυτα κόμβου στο ποσοστό ριζοβολίας του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.



Σχήμα 28: Επίδραση μισής δύναμης MS και των περικετικοτήτων 8 και 12 g L<sup>-1</sup> άγαρ σε υπόστρωμα MS παρουσία ή απουσία άλατος σε έκφυτα κόμβου στο ποσοστό υάλωσης του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test, *P*= 0,05, *n*= 100.

### 5<sup>η</sup> υποκαλλιέργεια



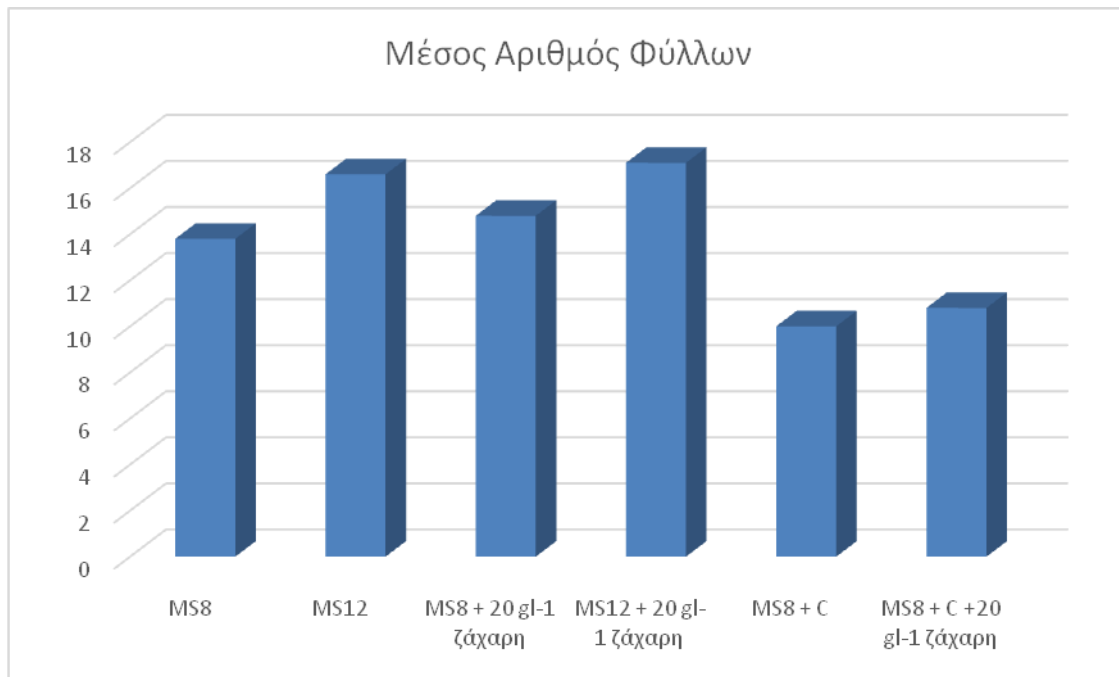
Σχήμα 29: Επίδραση ενεργού άνθρακα , διαφορετικών περιεκτικότητων άγαρ και σουκρόζης σε έκφυτα κόμβου στο ποσοστό βλαστογένεσης του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .



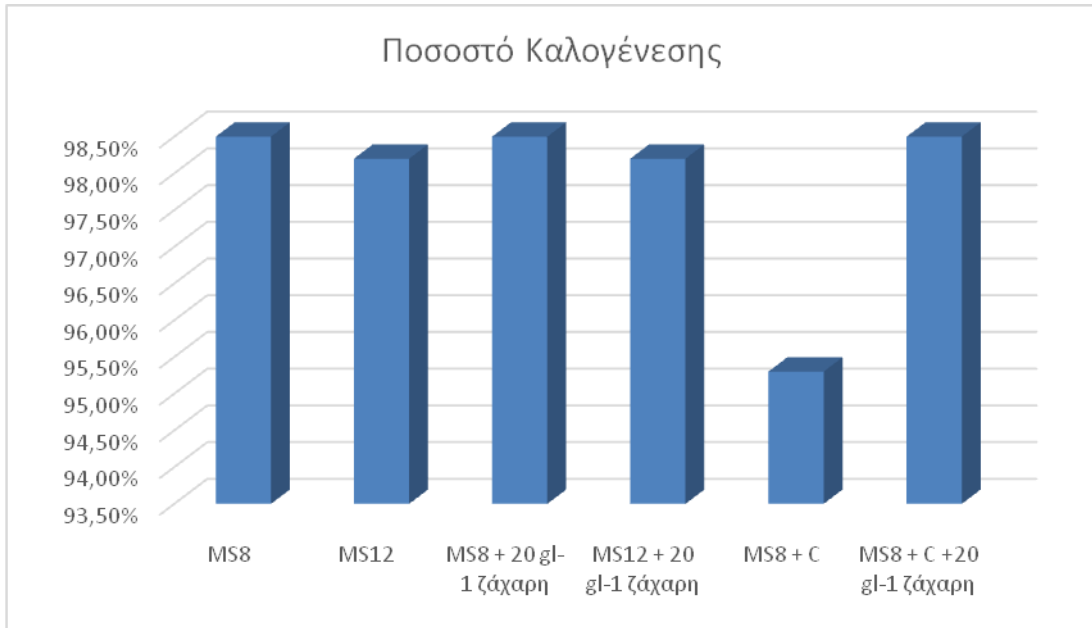
Σχήμα 30: Επίδραση ενεργού άνθρακα , διαφορετικών περιεκτικότητων άγαρ και σουκρόζης σε έκφυτα κόμβου στο μέσο αριθμό βλαστών του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .



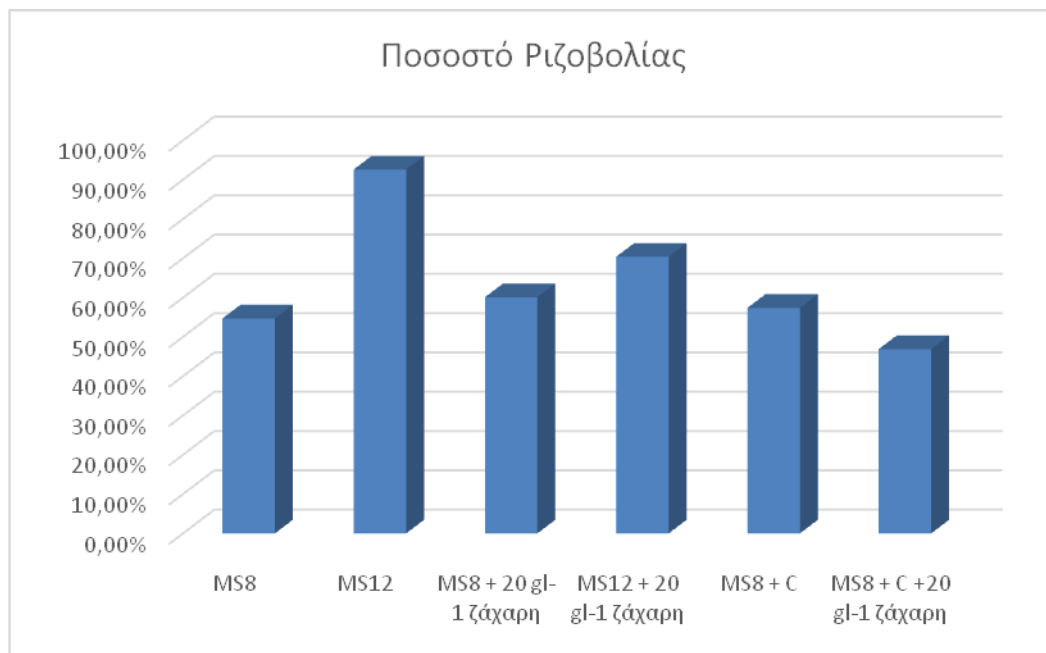
Σχήμα 31: Επίδραση ενεργού άνθρακα , διαφορετικών περιεκτικοτήτων άγαρ και σουκρόζης σε έκφυτα κόμβου στο μέσο μήκος βλαστών του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .



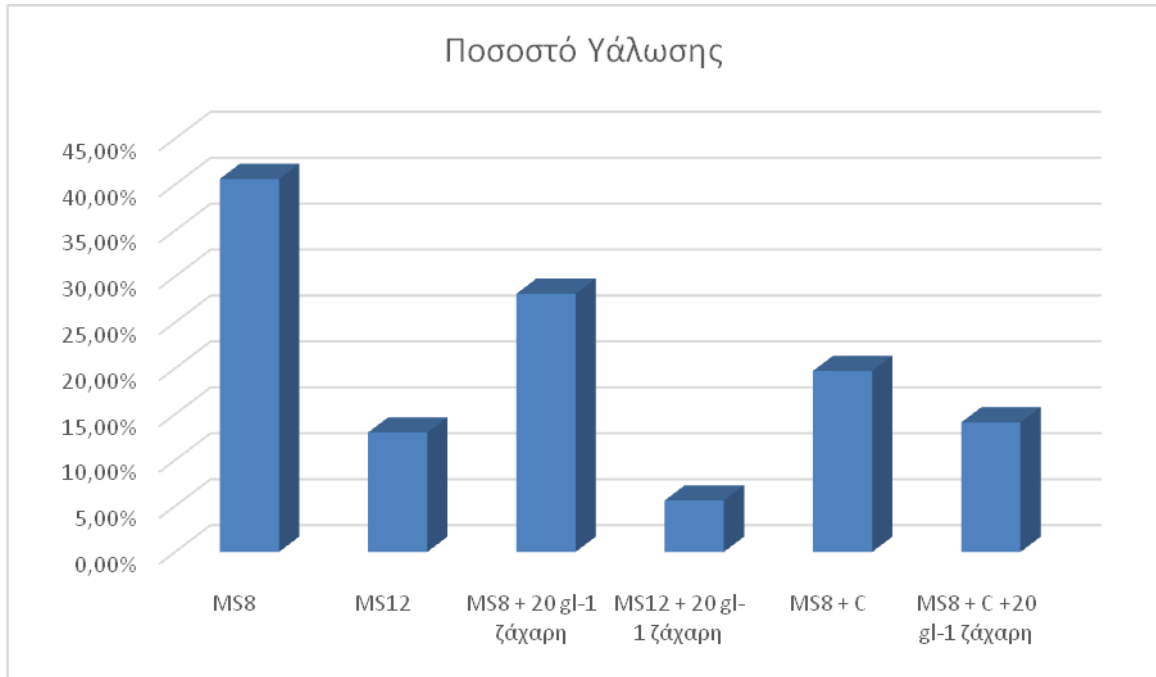
Σχήμα 32: Επίδραση ενεργού άνθρακα , διαφορετικών περιεκτικοτήτων άγαρ και σουκρόζης σε έκφυτα κόμβου στο μέσο αριθμό φύλλων του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .



Σχήμα 33: Επίδραση ενεργού άνθρακα , διαφορετικών περιεκτικοτήτων άγαρ και σουκρόζης σε έκφυτα κόμβου στο ποσοστό καλογένεσης του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .



Σχήμα 34: Επίδραση ενεργού άνθρακα , διαφορετικών περιεκτικοτήτων άγαρ και σουκρόζης σε έκφυτα κόμβου στο ποσοστό ριζοβολίας του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσων με Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .



Σχήμα 35: Επίδραση ενεργού άνθρακα , διαφορετικών περιεκτικότητων άγαρ και σουκρόζης σε έκφυτα κόμβου στο ποσοστό υάλωσης του *Ballota acetabulosa*. Σύγκριση μέσω Student's *t* test,  $P= 0,05$ ,  $n= 100$ .

**Σύγκριση πέντε υποκαλλιεργειών στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup>.**



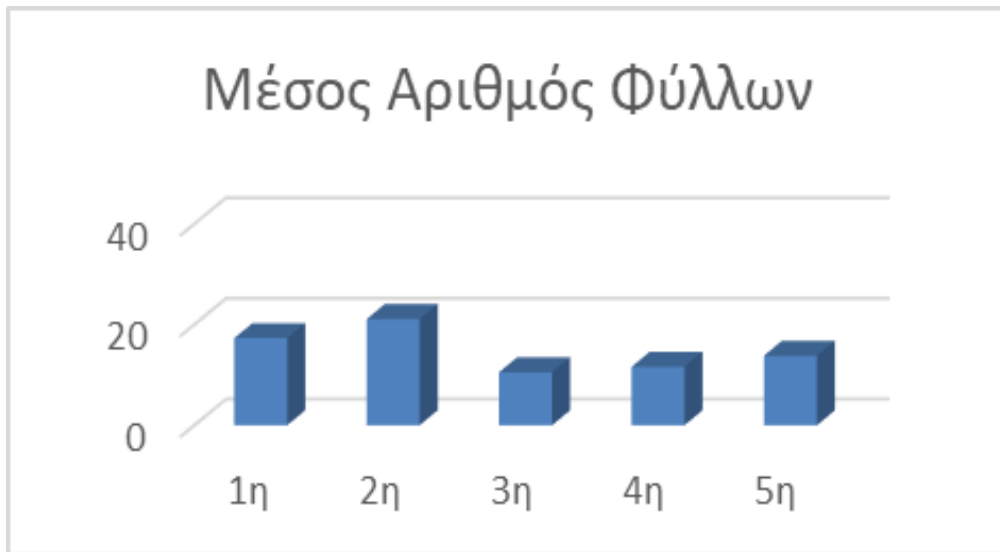
Σχήμα 36: Σύγκριση πέντε υποκαλλιεργειών στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ 8 g L<sup>-1</sup> στο ποσοστό βλαστογένεσης του φυτού *Ballota acetabulosa*.



Σχήμα 37: Σύγκριση πέντε υποκαλλιεργειών στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  στο μέσο αριθμό βλαστών του φυτού *Ballota acetabulosa*.



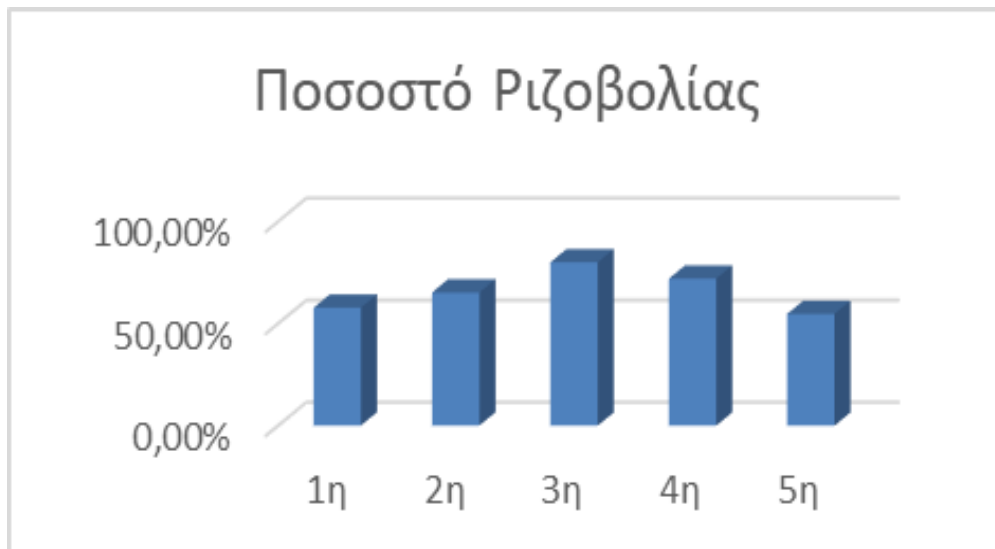
Σχήμα 38: Σύγκριση πέντε υποκαλλιεργειών στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  στο μέσο μήκος βλαστών του φυτού *Ballota acetabulosa*.



Σχήμα 39: Σύγκριση πέντε υποκαλλιεργειών στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  στο μέσο αριθμό φύλλων του φυτού *Ballota acetabulosa*.



Σχήμα 40: Σύγκριση πέντε υποκαλλιεργειών στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  στο ποσοστό καλογένεσης του φυτού *Ballota acetabulosa*.



Σχήμα 41: Σύγκριση πέντε υποκαλλιιεργειών στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  στο ποσοστό ριζοβολίας του φυτού *Ballota acetabulosa*.



Σχήμα 42: Σύγκριση πέντε υποκαλλιιεργειών στο υπόστρωμα MS με περιεκτικότητα σε άγαρ  $8 \text{ g L}^{-1}$  στο ποσοστό υάλωσης του φυτού *Ballota acetabulosa*.



