

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥ
Sideritis clandestina subs peloponnesiaca

Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας: **Μαρίας Σιάννη**



Καλαμάτα, Οκτώβριος του 2017

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ) ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ
ΓΕΩΠΟΝΩΝ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥ
Sideritis clandestina subs peloponnesiaca

Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας: **Μαρίας Σιάννη**
Επιβλέπων Καθηγητής: **Επαμεινώνδας Κάρτσωνας**

Καλαμάτα, Οκτώβριος του 2017

Ευχαριστίες

Τελειώνοντας ουσιαστικά με αυτή τη μελέτη τη φοίτηση μου στο Τμήμα Φυτικής Παραγωγής του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω ανθρώπους που με στήριξαν στις όποιες δυσκολίες και απογοητεύσεις πολλές φορές υπήρξαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου και επιβλέποντα στην παρούσα μελέτη Επαμεινώνδα Κάρτσωνα για την πολύτιμη βοήθεια, στήριξη και καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση και συγγραφή αυτής της μελέτης. Επίσης και όλους τους καθηγητές που είχα αυτά τα τέσσερα χρόνια με των οποίων τη διδασκαλία, κατάφερα να διευρύνω σε σημαντικό βαθμό τις γνώσεις μου.

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright ©

Υπεύθυνη Δήλωση : Εγώ, η Σιάννη Μαρία βεβαιώνω ότι είμαι ο συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας με τίτλο ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ *Sideritis clandestina subs peloponnesiaca*. Στο τέλος της εργασίας αναφέρονται λεπτομερώς οι πηγές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την άντληση πληροφοριών, δεδομένων, πινάκων καθώς και εικόνων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	7
1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	8
1.3 ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΙΚΟΤΗΤΑ	15
1.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ - ΧΡΗΣΕΙΣ	15
1.5 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ.....	17
1.5.1 ΈΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΟΡΟΥ “ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ <i>in vitro</i> ” Ή “ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ”	18
1.6 Η ΧΛΩΡΙΔΑ ΤΟΥ ΜΑΙΝΑΛΟΥ	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	25
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1 ΥΛΙΚΑ.....	25
2.1.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	25
2.1.2.ΥΛΙΚΑ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΣΠΟΡΩΝ	25
2.1.3. ΥΛΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ <i>in vitro</i> ...	25
2.1.4. ΔΟΧΕΙΑ <i>in vitro</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	26
2.1.5. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ <i>in vitro</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	26
2.1.6. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΒΛΑΣΤΗΣΗΣ ΣΠΟΡΩΝ <i>ex vitro</i>	27
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ.....	27
2.2.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΔΙΚΩΝ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ	28
2.2.3. ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΥΛΙΚΩΝ –ΚΟΠΗ ΕΚΦΥΤΩΝ –ΕΠΩΑΣΗ.....	28
2.3 ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΠΟΡΩΝ.....	31
2.3.1 ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΠΟΡΩΝ <i>ex vitro</i>	31
2.3.2 ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΠΟΡΩΝ <i>in vitro</i>	32
2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΠΟΡΟΥ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ <i>Sideritis clandestina peloponnesiaca</i> ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΚΦΥΤΩΝ.....	33
2.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	34
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
3.1 ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΣΠΟΡΩΝ <i>ex vitro</i>	34
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	40
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο πολλαπλασιασμός του ενδημικού είδους της Βορείας Πελοποννήσου, *Sideritis clandestina peloponnesiaca*, το οποίο είναι και το ενδημικό τσάι της περιοχής. Στόχος ήταν η εύρεση μιας επιτυχούς μεθόδου πολλαπλασιασμού του είδους. Εξετάστηκαν τόσο ο εγγενής πολλαπλασιασμός του με σπόρο όσο και ο μικροπολλαπλασιασμός του. Για το συγκεκριμένο είδος έως τώρα δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για τον πολλαπλασιασμό του.

Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι καθώς και τμήματα του φυτού που συλλέχθηκαν από την περιοχή του Μαίναλου, την περίοδο Ιουνίου – Ιουλίου και σε υψόμετρο πάνω από 1600m. Αρχικά διερευνήθηκε ο πολλαπλασιασμός του με σπόρο. Σπόροι από τα αυτοφυή φυτά εξετάστηκαν ως προς την βλάστησή τους σε διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας, φωτισμού και εδάφους. Στη συνέχεια εξετάστηκε η δυνατότητα μικροπολλαπλασιασμού του είδους, εξετάστηκε η εύρεση μιας μεθόδου απολύμανσης, η χρήση κατάλληλων εκφύτων και συνθηκών επώασης αυτών.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το επιστημονικό του όνομα *Sideritis* προέρχεται από την ελληνική λέξη σίδηρος και κατα μια εκδοχή δόθηκε στο φυτό, εξαιτίας της ικανότητάς του να θεραπεύει τις πληγές που προκαλούνται από σιδερένια αντικείμενα. Σύμφωνα με άλλη εκδοχή, ονομάστηκε έτσι επειδή αποτελεί φυσική πηγή σιδήρου, αφού στα ροφήματα που παρασκευάζονται από αυτό περιέχεται αρκετός σίδηρος. Μια τρίτη άποψη υποστηρίζει ότι η ονομασία του προέρχεται από την εικόνα του, δηλαδή, στο σχήμα των δοντιών του κάλυκα, που μοιάζουν με αιχμή λόγχης. Εκτός από την επούλωτική ιδιότητα τούχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για αιώνες λόγω των αντιφλεγμονωδών, αντιμικροβιακών και αντιελκογόνων ιδιοτήτων του. Η εκτεταμένη και σημαντική χρήση του *Sideritis spp.* στη μεσογειακή παραδοσιακή ιατρική έχει αναφερθεί σε πολλά φαρμακευτικά εγχειρίδια. Από το Λιναίο (1753) περιγράφεται το *Sideritis Lcanariensis*. Ο Font Quer αργότερα επισημάνει στο βιβλίο του “ Μια αναθεώρηση του Διοσκουρίδη” την αξιοσημείωτη ευρεία χρήση του *Sideritis angustifolia* ως επούλωτικό κυρίως στον τομέα της κτηνιατρικής στη Καταλονία κατα το πρώτο μισό του εικοστού αιώνα.

Η βοτανική ταξινόμηση του γένους *Sideritis* στη Μακαρονησία είχε αποτέλεσει αιτία διαμάχης. Οι Aitton (1789) και Poiret (1811) διατήρησαν το όνομα αυτό, ενώ οι Webb και Berthelot (1845) πρότειναν τη δημιουργία ενός νέου γένους, *Leucorphae*, που να συμπεριλαμβάνει το *Sideritis* της Μακαρονησίας. Αργότερα, ορισμένοι συγγραφείς το ανέφεραν με το όνομα *Sideritis* ενώ άλλοι προτιμούσαν το *Leucorphae*. Ο Huynh το 1972, βάσει παλυνολογικών δεδομένων, χάρισε τελικά το *Sideritis* της Μακαρονησίας σε δυο ομάδες, *Empedocleopsis* και *Marrubiastrum*, και επαλήθευσε τις ήδη υπάρχουσες τέσσερις ομάδες του γένους *Sideritis* της Μεσογείου (*Hesiodia*, *Burgsdorffia*, *Empedoclea* και *Sideritis*). (Fragaetal.,2012)

1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Τα είδη του γένους *Sideritis* ανήκουν στην οικογένεια **Lamiaceae**. Τα φυτά που ανήκουν στην οικογένεια αυτή είναι ποώδη ή ημιθαμνώδη, ενώ οι δενδρώδεις μορφές είναι εξαιρετικά σπάνιες στην οικογένεια (εμφανίζονται μόνο Ν. Αμερικάνικο γένος *Hyrtis* αντιπρόσωποι του οποίου μπορούν να φτάσουν μέχρι 12m ύψος).

Ο βλαστός συνήθως έχει χαρακτηριστική τετράγωνη διατομή. Τα φύλλα είναι κυρίως απλά, αντίθετα και σταυροειδώς διατεταγμένα στο βλαστό και χωρίς παράφυλλα. Τα φυτά καλύπτονται από αδένες ή αδενώδεις τρίχες και έχουν έντονη αρωματική οσμή που οφείλεται στην ύπαρξη αιθέριων ελαίων, και λόγω της παρουσίας αυτών των ουσιών, τα φυτά της οικογένειας έχουν πολύ μεγάλη εμπορική αξία, αφού χρησιμοποιούνται ως αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά.

Τα άνθη είναι ισχυρά ζυγόμορφα, με δίχειλη στεφάνη, που φύονται πολλά μαζί στις μασχάλες των φύλλων κατά μονοχάσια ή διχάσια, που σχηματίζουν σπονδύλους ή σε ακραίους βότρεις. Τα άνθη των φυτών της οικογένειας είναι ουσιαστικά ερμαφρόδιτα, αλλά σε αρκετά είδη πχ., των γενών *Mentha*, *Nepeta*, *Zizyphora*, *Thymus* μέχρι και 50 % των φυτών μπορεί να έχουν άνθη όπου τα αρσενικά μέρη (στήμονες) είναι υποπλασμένα και άγονα και τα άνθη λειτουργούν ως θηλυκά. Σε αυτές τις περιπτώσεις η στεφάνη συνήθως είναι μικρότερη και τα χρώματά της είναι πιο άτονα.

Ο κάλυκας είναι συστέπαλος, 5μερής, δίχειλος και περιβάλλει τον επιμήκη σωλήνα της δίχειλης, 5μερούς στεφάνης. Από τα 5 πέταλα της στεφάνης, συνήθως τα 3 σχηματίζουν το κάτω χείλος και τα 2 το πάνω. Σπανιότερα τα 4 σχηματίζουν το κάτω και το 1 το πάνω ή όλα μαζί το κάτω, ενώ το επάνω λείπει τελείως (*Teucrium*) και τότε οι στήμονες είναι εντελώς ακάλυπτοι. Οι Στήμονες είναι 4 (ο διάμεσος λείπει), είναι ανά ζεύγη ανισομήκεις (διδύναμοι) και συμφύονται με τη στεφάνη(συμπέταλοι). Σε μερικά γένη (*Salvia*, *Rosmarinus*) υπάρχει μόνο το κατώτερο ζεύγος των κοντών στημόνων ή τουλάχιστον αυτό μόνο είναι γόνιμο.

Η ωθήκη είναι επιφυής, και αποτελείται από 2 καρπόφυλλα, είναι όμως 4-χωρη. Χωρίζεται, από την άνθηση ακόμα, σε τέσσερις, βαθείς λοβούς με την βοήθεια ψεύδο-διαφράγματος. Τα τέσσερα αυτά τμήματα της ωθήκης, που περιέχουν από μία σπερμοβλάστη, διογκώνονται σφαιρικά και μετατρέπονται σε σχιζοκάρπιο, που διασπάται σε τέσσερα καρπίδια (μονόσπερμα κάρυα), σπανιότατα σχηματίζουν

μικρές δρύπες (Prassium). Ο στύλος βρίσκεται στη βάση των καρπόφυλλων και μεταξύ αυτών (στύλος γυνοβασικός).



Εικόνα 1: Μορφολογικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Lamiaceae.

Η επικονίαση των φυτών γίνεται με πολλούς τρόπους όπου μπορεί να συμμετέχουν διάφορα έντομα ή διάφορες μορφές λεπιδοπτέρων (πεταλούδες), ή ακόμη και πουλιά. Ένας ιδιαίτερος μηχανισμός συναντάται στο γένος *Salvia*. Τα έντομα που επισκέπτονται τους αντιπροσώπους του γένους προσγειώνονται στο κάτω χείλος της στεφάνης και με το κεφάλι τους προσκρούουν σε ένα αρθρωτό συνοχέα του νήματος του στήμονα, ο οποίος κλείνει την είσοδο για την κοιλότητα με το νέκταρ. Με αυτή την κίνηση το άλλο άκρο του βραχίονα του στήμονα κατεβαίνοντας φέρνει σε επαφή με την ράχη του εντόμου τον ανθήρα (και το περιεχόμενό του την γύρη).

Χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι της οικογένειας Lamiaceae:

1. **Salvia spp.** Σάλβια, Φασκόμυλο,
2. **Thymus spp.** Θυμάρια,
3. **Origanum spp.** Ρίγανες, ρίγανη,
4. **Mentha spp.** Μέντες,
5. **Lavandula spp.** Λεβάντες,
6. **Stachys spp.** Στάχεις,
7. **Ocimum spp.** Βασιλικός,
8. **Rosmarinus spp.** Δεντρολίβανο,

9. **Micromeriaspp.** Μικρομέριες,
10. **Nepetaspp.** Νεπέτες,
11. **Teucriumspp.** Τεούκρια,
12. **Scutellariaspp.** Σκουτελάριας,
13. **Saturejaspp.** Θρούμπη,
14. **Sideritisspp.** Τσάι του βουνού.



Εικόνα 2: Άνθιση φυτού *Sideriti spp.*

Το γένος *Sideritis* περιλαμβάνει πολυετή φυτά, από τα οποία τα περισσότερα είναι ενδημικά της βαλκανικής χερσονήσου.

Τα σπουδαιότερα αυτοφυή είδη σιδερίτη στην Ελλάδα είναι :

- *Sideritis athoa* (τσάι του Άθω). Πολυετής πόα, ύψους έως 40cm. Ο βλαστός είναι όρθιος απλός ή διακλαδισμένος και ξυλώδης στη βάση του. Φύλλα λογχοειδή. Άνθη χρώματος κίτρινου. Κάλυκας κωδωνοειδής. Αυτοφύεται στον Άθω, στην Πίνδο και στην Σαμοθράκη (Εικ. 3).

- *Sideritis clandestina* (τσάι της Πελοποννήσου). Πολυετής πόα ύψους 40cm. Ο βλαστός του είναι, απλός ή διακλαδισμένο. Φύλλα χνουδωτά, σταχτόχροα, επιμήκη - λογχοειδή, ακέραια ή πριονωτά, τα κατώτερα με μίσχο και τα ανώτερα επιφυή ή με μίσχο. Άνθη χρώματος κίτρινου. Κάλυκας κωδωνοειδής που σκεπάζεται από πυκνές τρίχες.

- Στο είδος αυτό υπάρχουν δύο ευδιάκριτα υποείδη το *Sideritis clandestina* subsp. *Peloponnesiaca* το οποίο ενδημεί στην Βόρεια Πελοπόννησο και το *Sideritis clandestina* subsp. *Clandestina* το οποίο ενδημεί στην Νότια Πελοπόννησο στον Ταύγετο και στον Πάρνωνα (Μαλεβός). (Εικ. 4).



Εικόνα 3 : Φυτό *Sideritis athoa*.



Εικόνα 4 : Φυτό *Sideritis clandestina*.

- *Sideritis euboica* (τσάι της Ευβοίας). Πολυετής πόα ύψους 30-50 εκ., με πυκνό και λευκό χνούδι σε όλα τα μέρη του. Βλαστός ισχυρός, απλός ή μερικές φορές διακλαδισμένος. Φύλλα επιμήκη. Άνθη χρώματος κίτρινου.
- Κάλυκας σωληνοειδής που καταλήγει σε δόντια και έχει χνούδι. Το συναντάται στην Εύβοια και κυρίως στα βουνά Δίρφου.



Εικόνα 5 : Φυτό *Sideritis euboica*.

- *Sideritis raeseri* (τσάι του Παρνασσού). Είναι έντονα αρωματική πολυετής πόα με ανορθωμένους, απλούς ή διακλαδιζόμενους, απόξυλωμένους στη βάση βλαστούς ύψους 10-30cm οι οποίοι καλύπτονται από πυκνό τρίχωμα. Τα φύλλα βάσης είναι έμμισχα, αντωειδή ή επιμήκη και τα φύλλα βλαστού είναι σχεδόν άμισχα και επιμήκη-ελλειπτικά. Τα άνθη είναι μικρά, ανοιχτόχρωμα κίτρινα, χωρίς ρίγες, και αναπτύσσονται σε 3-15 απόμακρυσμένους σπονδύλους (ταξιανθίες), με ωοειδή ή σχεδόν κυκλικά αδενώδη-τριχωτά βράκτια που είναι μεγαλύτερα ή ισομεγέθη με τα άνθη. Ανθίζει από τον Ιούνιο έως τα μέσα Αυγούστου. Είναι αυτόχθον τοπικό ενδημικό των δυτικών Βαλκανίων και φύτεται σε ορεινούς όγκους με βράχους και πετρώδη εδάφη σε υψόμετρα από 1200 έως 2400m. Το συναντάται στον Νομό Μαγνησίας.

- *Sideritis scardiaca* (τσάι του ολύμπου). Είναι έντονα αρωματική πολυετής πόα με ανορθωμένους, απλούς ή δι- ακλαδιζόμενους, απόξυλωμένους στη βάση βλαστούς, ύψους 10-30(-50) cm οι οποίοι καλύπτονται από πυκνό τρίχωμα. Τα φύλλα βάσης είναι έμμισχα, ωοειδή ή ελλειπτικά και τα φύλλα βλαστού είναι άμισχα και στενώς επιμήκη-ελλειπτικά.

- Τα άνθη είναι μικρά, κίτρινα, και αναπτύσσονται σε πυκνά διατεταγμένους σπονδύλους (ταξιανθία), σε μήκος 3-15 cm του άνω τμήματος του βλαστού, με ευμεγέθη ωοειδή έως ευρέως ωοειδή βράκτια που είναι μεγαλύτερα από τα άνθη και τα οποία μπορεί να καλύπτονται ή όχι από αδενικά τριχώματα. Ανθίζει από τον Ιούνιο έως το Σεπτέμβριο. Είναι αυτόχθον τοπικό ενδημικό των Βαλκανίων και φύεται σε ορεινούς όγκους με βράχους και πετρώδη εδάφη σε υψόμετρα από 1600 έως 2300m. Το συναντάται στον Όλυμπο, στον Κίτσαβο και στο Πήλιο.



Εικόνα 6 : Φυτό *Sideritis raeseri*.



Εικόνα 7 : Φυτό *Sideritis scardiaca*.

- *Sideritis syriaca* (Μαλοτήρα). Είναι έντονα αρωματική πολυετής πόα με ανορθωμένους και διακλαδιζόμενους βλαστούς ύψους 30-50 cm οι οποίοι καλύπτονται από πυκνό τρίχωμα. Τα φύλλα βάσης είναι επιμήκη-σπατουλοειδή και τα φύλλα βλαστού είναι λογχοειδή. Τα άνθη αναπτύσσονται σε μη διακλαδιζόμενη ταξιανθία που αποτελείται από 6-9 αραιά διατεταγμένους σπονδύλους με δύο βράκτια, που έκαστος περιλαμβάνει 8 άνθη με ωχροκίτρινη στεφάνη. Το συναντάται στα βουνά της Κρήτης και κυρίως στα Λευκά Όρη και στον Ψηλορείτη.



Εικόνα 8 : Φυτό *Sideritis syriaca*.

1.3 ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

Το τσάι του βουνού ευδοκimeί σε περιοχές με υψόμετρο, Παρουσιάζει ιδιαίτερη αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα και το υπέργειο μέρος του δεν καταστρέφεται, όπως συμβαίνει με άλλα αρωματικά φυτά (π.χ ρίγανη) και έτσι η ανάπτυξη του ξεκινά από νωρίς την άνοιξη επωφελούμενο από τη συνήθως άφθονη υγρασία του εδάφους. Ευνοείται από μεγάλες διαφορές θερμοκρασίας μεταξύ ημέρας και νύχτας. Αναπτύσσεται σε ποικιλία εδαφών με pH 6,0-8,0. Συνήθως προτιμά βραχώδη και ασβεστολιθικά εδάφη. Τέλος μπορεί να αναπτυχθεί σε πετρώδη εδάφη και θεωρείται ξηρική καλλιέργεια.

1.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ - ΧΡΗΣΕΙΣ

Οι διάφορες χρήσεις του *Sideritis* που έχουν παρατηρηθεί εξαρτώνται από το είδος και από την περιοχή που αναπτύσσονται. Ο *Sideritis* είναι ευρέως διαδεδομένο σε χώρες όπως είναι η Ελλάδα, η Τουρκία, το Κόσοβο και η Πρώην Γιουγκοσλαβική Δημοκρατία Μακεδονίας. Ο *Sideritis* χρησιμοποιείται με μορφή αφεψήματος της ξηρής δρόγης των ανθοφόρων στελεχών. Πιο συγκεκριμένα η χρήση του είναι ευρύτερη στην Ελλάδα και στην Ανατολή σαν αρωματικό και θερμαντικό ρόφημα, και ιδιαίτερα κατά τους χειμερινούς μήνες με το κοινό όνομα << τσάι του βουνου >>. (Basileetal., 2005).

Επιπρόσθετα αποτελεί σημαντικό παράγοντα αφού ο σίδηρος που περιέχει βοηθάει στην καλύτερη χώνεψη, δυναμώνει το ανοσοποιητικό σύστημα και καταστέλλει την κοινή γρίπη, το κρύωμα, τις ιώσεις και τις αλλεργίες. Ωφελεί στην καλύτερη αναπνοή στην ρινική απόσυμφορηση και στην μείωση του αγχους. Ακόμα παρουσιάζει ισχυρή αντιφλεγμονώδη, αντιθρομβωτική, αντιυπερτασική, σπασμολυτική, αντιμικροβιακή, ηρεμιστική και αντιοξειδωτική δράση. Επίσης χρησιμοποιείται για την πρόληψη της αναιμίας και δρα σαν αναστολέας της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, όπως για παράδειγμα ο *Sideritis Euboea* που παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση φλαβονοειδών και κυρίως της luteolin και της apigenin.

Οι ευεργετικές του ιδιότητες βρίσκουν χρήση και στη βιομηχανία της ομορφιάς, καθώς χρησιμοποιείται στην παρασκευή διαφόρων καλλυντικών και προϊόντων περιποίησης, όπως κρέμες κατά της αντιγήρανσης (οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες καταπολεμούν τις ελεύθερες ρίζες), σαμπουάν και μάσκες για βαμμένα μαλλιάτα οποία δρουν καλύτερα έναντι του αποχρωματισμού και της βλάβης που προκαλείται από την καθημερινή έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η Ελληνική εταιρία Κορρές είναι μεταξύ των πρωτοπόρων που χρησιμοποίησαν τον σιδηρίτη σε δερμοκαλλυντικά βασιζόμενη σε συνεργασίες με ομάδες από το Παν/μιο Πατρών, Ιωαννίνων και Αθήνας.

Παρόλο που ο σιδηρίτης είναι αρωματικό φυτό με έγχυμα με εξαιρετικό άρωμα, η χρήση του είναι διαδεδομένη και στην αρωματοποιία αν και δεν έχει ακόμα κερδίσει τη θέση που της αξίζει, σε αντίθεση με άλλα βότανα της Μεσογείου (όπως ο αμάραντος ή ο λάδανος). Η παρουσία α-πινένιου και β-πινένιου, λιναλόλης και ευκαλυπτόλης καθιστά δυνατή τη συνύπαρξη της καμφορώδους οσμής με αυτή του πεύκου.



Εικόνα 9: Τσάι ως ρόφημα.

1.5 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

α) Εγγενώς: Ο σπόρος συγκεντρώνεται από το αυτοφυόμενο ή καλλιεργούμενο τσάι του βουνού. Τα φυτά από τα οποία θα πάρουμε το σπόρο πρέπει να είναι υγιή και εύρωστα, και ακόμα να έχει γίνει καλά η γονιμοποίηση των ανθέων και η ωρίμανση του σπόρου. Οι ταξιανθίες μαζεύονται, ξεραίνονται και ο σπόρος απόχωρίζεται με κτύπημα των σποροποιημένων ταξιανθιών, κυρίως τις μεσημεριανές ώρες, όταν η υγρασία τους θα έχει μειωθεί στο ελάχιστο. Ένα γραμμάριο έχει περίπου 600 σπόρους. Θεωρητικά, 7 γραμμάρια σπόρου φτάνουν για τη δημιουργία φυτών να καλύψουν καλλιέργεια ενός στρέμματος. Στην πράξη όμως για διάφορους λόγους (μειωμένη βλαστική ικανότητα και απώλεια στο φύτρωμα σπόρων) χρησιμοποιούμε γύρω στα 15 γραμμ. σπόρου για κάθε στρέμμα. Η ποσότητα αυτή σπέρνεται σε σπορείο 5 Τ.μ., από τον Αύγουστο μέχρι αρχές Οκτώβρη. Η σπορά και οι καλλιεργητικές φροντίδες του σπορείου είναι όμοιες με του καπνού ή της ντομάτας. Χρειάζεται προσοχή ώστε ο σπόρος να σπέρνεται αραιά, γιατί σε αντίθετη περίπτωση τα φυτά φυτρώνουν πυκνά, δεν αερίζονται καλά και καταστρέφονται εύκολα από σηψιρριζία. Τα σπορόφυτα μεταφυτεύονται όταν απόκτησουν 4-6 φύλλα.

β) Αγενώς με παραφυάδες: Ένα φυτό τσάι του βουνού, μετά το δεύτερο έτος δίνει αρκετές παραφυάδες, δηλαδή βλαστούς με λίγες ρίζες στη βάση. Εάν αυτό είναι καλλιεργούμενο, μπορεί να δώσει πάρα πολλές παραφυάδες, ενώ το αυτοφύες δίνει πολύ λιγότερες. Όταν οι παραφυάδες αφαιρεθούν από τα μητρικά φυτά, φυτεύονται στο χωράφι, όπως και τα φυτά των σπορείων. Αρχικό υλικό υψηλής ποιότητας μπορεί να δημιουργηθεί **με ιστοκαλλιέργεια** και στη συνέχεια στον αγρό να προκύψουν νέα φυτά από παραφυάδες. Σε ειδικευόμενα φυτώρια ο πολλαπλασιασμός μπορεί να γίνει με επιτυχία και με μοσχεύματα.

1.5.1 ΈΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΟΡΟΥ “ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ in vitro ” Ή “ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ”

Καλλιέργεια in vitro είναι η καλλιέργεια, με ασηπτικές συνθήκες, ενός τμήματος φυτού, μέσα σε γυάλινα δοχεία (απ' όπου προέρχεται και ο όρος in vitro = μέσα σε γυαλί), τα οποία περιέχουν θρεπτικό διάλυμα. Τοποθετούνται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας, με απώτερο σκοπό τον αγενή πολλαπλασιασμό φυτικών κυττάρων, ιστών ή ολόκληρων φυτών.

Συχνά χρησιμοποιείται ο όρος ιστοκαλλιέργεια, ο οποίος με τη στενή του έννοια αναφέρεται στην καλλιέργεια φυτικών ιστών, μιας ομάδας δηλαδή διαφοροποιημένων κυττάρων, συνήθως ομοιόμορφων, τα οποία εξυπηρετούν ένα κοινό σκοπό, όπως για παράδειγμα την εντεριώνη, τον ηθμαγγειώδη ιστό, το μεριστωματικό ιστό κ.τλ, ενώ με την ευρεία του έννοια αναφέρεται στη καλλιέργεια οποιουδήποτε τμήματος φυτού, όπως ορίστηκε προηγουμένως.

Τα στάδια εκπόνησης στοχεύουν στη συλλογή φυτικού υλικού από τις περιοχές όπου φύονται τα είδη *Sideritis* και την εισαγωγή τους σε ασηπτικό περιβάλλον in vitro υπό ελεγχόμενες συνθήκες θρέψης και περιβάλλοντος (θερμοκρασία, φωτοπερίοδος, σχετική υγρασία) σε ειδικό θάλαμο ανάπτυξης μέσα στο εργαστήριο για τη δημιουργία ενός δυναμικού και απότελεσματικού πρωτοκόλλου μαζικής παραγωγής (πολλαπλασιασμός, ριζοβολία) και κατόπιν εγκλιματισμός και σκληραγώγηση των παραγόμενων φυτών τόσο σε συνθήκες θερμοκηπίου όσο και σε εξωτερικές συνθήκες υπαίθρου. Τα πρωτόκολλα αυτά χρησιμοποιούνται από μεγάλες εξειδικευμένες εταιρίες ιστοκαλλιεργείας, φυτώρια αλλά και από ιδιώτες για την αγενή μαζική παραγωγή των παραπάνω ειδών και τη διάθεσή τους για καλλιέργεια στους Έλληνες αγρότες αλλά και στο εξωτερικό.



Εικόνα 10: Τοποθέτηση εκφύτων σε θρεπτικό διάλυμα.

ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ *in vitro* :

Η καλλιέργεια *in vitro* περιλαμβάνει μια σειρά από πέντε διακριτά στάδια τα οποία συνοψίζονται στη συνέχεια:

- 1. Επιλογή και προετοιμασία φυτικού υλικού:** Επιλογή του μητρικού φυτικού υλικού που θα χρησιμοποιηθεί για πολλαπλασιασμό. Τα μητρικά φυτά πρέπει να είναι υγιή, εύρωστα και σε νεαρή ηλικία. Έτσι αυξάνονται οι πιθανότητες θετικής απόκρισης και περιορίζεται σε κάποιο βαθμό η ενδεχόμενη διάδοση παθογόνων. Ως επί το πλείστον η καλλιέργεια του φυτικού υλικού γίνεται σε θερμοκήπια κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται εφικτός ο διαρκής και άμεσος έλεγχος της υγιεινής και φαινοτυπικής κατάστασης των φυτών.



Εικόνα 11 : Επιλογή φυτικού υλικού και προετοιμασία.

2.Εγκατάσταση κυτταρο-/ιστοκαλλιέργειας: Στο στάδιο αυτό γίνεται η επιλογή, η παραλαβή και η απολύμανση των εκφύτων. Έπειτα πραγματοποιείται η εγκατάσταση της ιστοκαλλιέργειας με εμφύτευση του φυτικού υλικού σε κατάλληλα δοχεία και τοποθέτησή τους στον θάλαμο καλλιέργειας.

3. Πολλαπλασιασμός : Στόχος του σταδίου αυτού είναι ο πολλαπλασιασμός του αρχικού φυτικού υλικού έτσι ώστε να αποκτηθεί ικανός αριθμός φυτών. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει αρκετές ανακαλλιέργειες για ανανέωση των θρεπτικών πόρων, καθώς τα θρεπτικά στοιχεία του υποστρώματος καταναλώνονται. Συνήθως ο πολλαπλασιασμός αφορά μόνο τους αναγεννημένους τυχαίους βλαστούς χωρίς επαγωγή ριζογένεσης.

4.Αναγέννηση φυτού: Αφού έχει αποκτηθεί ικανή ποσότητα φυτικού υλικού ακολουθεί η επιμήκυνση και παραγωγή ρίζας στα φυτά. Έτσι, τα φυτά που κρίνονται κατάλληλα μεταφυτεύονται στο υπόστρωμα ριζοβολίας. Η ορθή αναγέννηση του φυτού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μετέπειτα επιτυχή εγκλιματισμό του.



Εικόνα 12 : Ριζοβολία *Sideritis spp.* με ιστοκαλλιέργεια.

5. Εγκλιματισμός φυτού: Συνήθως πραγματοποιείται σε συνθήκες θερμοκηπίου ή σε ειδικούς θαλάμους εγκλιματισμού (βλ. επίσης Κε- φάλαιο 6). Τα φυτά, ανάλογα με τη φυσιολογική τους κατάσταση απαιτούν λιγότερο ή περισσότερο χρόνο για να αποκτήσουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες και την ικανότητα της φωτοσύνθεσης. Η χρήση θαλάμων εγκλιματισμού με αυστηρά καθορισμένες συνθήκες επιβάλλεται ώστε να έχουμε ομοιόμορφο εγκλιματισμό και ανάπτυξη των φυτών.

ΣΚΟΠΟΙ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ :

1. Απαλλαγή από ιούς και ασθένειες των βασικών μητρικών φυτών.
2. Μαζική παραγωγή φθινών φυτών.
3. Μαζική παραγωγή και γρήγορη επέκταση νέων υβριδίων – ποικιλιών.
4. Μαζική παραγωγή φαρμακευτικών φυτών γενετική βελτίωση φυτών, ομοζύγωτα φυτά, καλλιέργεια – σύντηξη πρωτοπλαστών).
5. Διατήρηση γενετικού υλικού επί μακρόν σε τράπεζες γενετικού υλικού.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ :

1. Απαιτείται μικρό μέγεθος χώρου για παραγωγή πολλών φυτών.
2. Συνεχής παραγωγή φυτών ανεξαρτήτως κλιματικών ή βιολογικών σταδίων.
3. Επιτάχυνση σε όλες τις διαδικασίες και φθηνότερη παραγωγή φυτών και χημικών ουσιών από ποικίλους οργανισμούς.
4. Επιτάχυνσης βελτίωσης με ταχύτατο πολλαπλασιασμό ελάχιστου γενετικού υλικού.
5. Δυνατότητα διατήρησης ειδών που προέρχεται από εντελώς διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.
6. Αμεσότητα χρησιμοποίησης του φυτικού υλικού όποτε χρειαστεί.
7. Δυνατότητα αναπαραγωγής σε μεγάλο αριθμό σε σύντομο χρονικό διάστημα.
8. Δυνατότητα διατήρησης ειδών των οποίων τα σπέρματα παρουσιάζουν μειωμένη φυτρωτική ικανότητα.
9. Περιορισμός της έκτασης των μητρικών φυτών λήψης μοσχευμάτων αφού ανά πάσα στιγμή θα μπορούν να δημιουργηθούν νέα.

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ :

1. Κίνδυνος τυχαίων μεταλλάξεων.
2. Κόστος παραγωγής της εγκατάστασης.

1.6 Η ΧΛΩΡΙΑΔΑ ΤΟΥ ΜΑΙΝΑΛΟΥ

Το ιερό βουνό του Πανός, το βουνό των θρύλων και της ιστορίας αποτελεί την καρδιά των ορεινών όγκων της Πελοποννήσου, διαφυλάσσοντας, ακόμα και στις μέρες μας, την μαγεία των πυκνών δασών και της απόλυτης φύσης, όπως αυτή εκφράστηκε ανά τους αιώνες από τους ποιητές του κόσμου.

Το Μαίναλο βρίσκεται στο κέντρο της Πελοποννήσου και απλώνεται από τα βόρεια στο μεγαλύτερο μέρος του νομού Αρκαδίας. Στα ανατολικά συνορεύει μέσω ημιορεινών κοιλάδων με τα όρη Ολίγυρτος, Λύρκειο και Αρτεμίσιο, στα βόρεια φτάνει μέχρι τον Χελμό και τον Ερύμανθο, στα δυτικά του κοιτάει προς το Λύκαιο και στα νότια σβήνει αργά προς τον Πάρνωνα και ενώνεται με τον βόρειο Ταΰγετο με την κοιλάδα της Μεγαλόπολης.

Απλώνεται σε έναν κυκλικό σχηματισμό καταλαμβάνοντας μια έκταση 1.500.000 στρεμμάτων με την ορεινή ζώνη να φτάνει τα 800.000 στρέμματα. Το βουνό χωρίζεται σε δύο τμήματα από την κοιλάδα του Καρδαρά. Η ψηλότερη κορυφή του είναι η Οστρακίνα (1.980 μ.), που αποτελεί και τη δεύτερη ονομασία του βουνού, και ακολουθούν η Τζελάτη (1.867 μ.), ο Αϊντίνης (1.849 μ.), η Μαύρη Κορυφή (1.818 μ.), η Μουρτζιά (1.761 μ.), ο Προφήτης Ηλίας (1.633 μ.) και η Πάνω Χρέπα (1.559 μ.). Στα δυτικά του βουνού πηγάζει και ρέει ο πανέμορφος ποταμός Λούσιος, δημιουργώντας μια εντυπωσιακή πυκνόφυτη χαράδρα. Κυρίαρχο πέτρωμα του βουνού είναι ο ασβεστόλιθος, ενώ στα δυτικά τμήματα εμφανίζεται σχιστόλιθος και φλύσχης. Το ανάγλυφο του βουνού είναι έντονο και εναλλάσσεται με απότομες χαράδρες, κωνικές κορυφές, ορεινά οροπέδια, μεγάλες dolines, δεκάδες μικρά ποτάμια και ένα πλούσιο δάσος που δίνει ζωή σε δεκάδες είδη της άγριας φύσης.



Εικόνα 13 : Φυτό *Sideritis clandestina peloponnesiaca*.

Το φυτό τσάι του Μαινάλου είναι πολυετής μικρός θάμνος ύψους 15 με 50 cm και ελαφρά ξυλώδες στη βάση. Στην Ελλάδα υπάρχουν δυο αναγνωριζόμενα υποείδη που διαχωρίζονται σε

- Υποείδος *clandestina* ενδημεί στην νότια Πελοπόννησο, Ταΰγετο και Πάρωνα.
- Υποείδος *peloponnesiaca* (Εικ. 13) ενδημεί στα βουνά της Κεντρικής και βόρειας Πελοποννήσου και έχει αριθμό χρωμοσωμάτων $2n=32$)

Είναι φυτό των υψηλών βουνών και απαντάται ως αυτοφύες σε ανοικτές πετρώδεις τοποθεσίες, ρωγμές βραχών, σταθεροποιημένες σάρες, ανωδασικά λιβάδια και σε διάκενα – ανοίγματα δασών ελάτης. Το είδος αυτό το συναντάμε σε υψόμετρα από 1600 μέχρι τα 2000 μ. περίπου, πάνω σε ασβεστόλιθους και η περίοδος άνθισης κυμαίνεται Ιούνιο με Ιούλιο.

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω στο Μαίναλο αυτοφύεται το τσάι του είδους *Sideritis clandestina subs peloponnesiaca*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Οι σπόροι και οι βλαστοί από τους οποίους κόπηκαν τα έκφυτα του είδους *Sideritis clandestina peloropnesiaca* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα *in vitro* ήταν συλλογής του Αυγούστου 2015. Οι κάψες επιλέχθηκαν από υγιή φυτά τα οποία αναπτύσσονταν στο όρος Μαίναλο σε υψόμετρο 1700m. Αφού εγκαταστάθηκαν σπορόφυτα του είδους κα βλάστησαν *invitro* στη συνέχεια, υποκαλλιεργήθηκαν στις 40 ημέρες για να επιτευχθεί πολλαπλασιασμός των καλλιεργειών.

2.1.2.ΥΛΙΚΑ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΣΠΟΡΩΝ

Πριν την τοποθέτηση *invitro*των σπόρων και των εκφύτων προηγείται απόλύμανση όπου χρησιμοποιούνται τα εξής υλικά:

- Χλωρίνη εμπορίου, που περιέχει 4,5 % NaOCL
- Προσκολλητική ουσία Tween-20 (PolyxyethylenesorbitanMonolaurate) της εταιρίας MERCK.

2.1.3. ΥΛΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

invitro

- Υπόστρωμα MS (MourashigeandSkoog, 1962) σε σκόνη χωρίς IAA, Kinetin της εταιρίας ICNBIOMEDICALS.
- Σουκρόζη εμπορίου
- Μυοινοζιτόλη Myo-inositol) M.B.= 180,16(της εταιρείας Merck
- Άγαρ της εταιρίας Ρουμπουλάκης Α.Ε.
- Απιονισμένο νερό.

2.1.4. ΔΟΧΕΙΑ *invitro* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Σε όλα τα στάδια της *invitro* καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν

A) δοχεία τύπου magenta όγκου 120 ml.

B) Τρυβλία Petri

2.1.5. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ *invitro* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Για την *invitro* βλάστηση σπόρων και εκφύτων χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα με βάση το MS. Χρησιμοποιήθηκε μισής δύναμης MS (Mourashige&Skoog, 1962). Στον πίνακα φαίνονται τα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος.

Πίνακας 1:Συστατικά (μακροστοιχεία-ιχνοστοιχεία) των υποστρωμάτων MS και ½ MS (Mourashige&Skoog, 1962).

Συστατικά	MS (mg/l)	½MS (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650	825
KNO ₃	1900	950
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	220
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	170	85
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8	13,9
Na ₂ EDTA	37,3	18,35
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3	11,15
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	4,3
H ₃ BO ₃	6,2	3,1
KI	0,83	0,415
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25	0,125
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	0,0125
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	0,0125
Myo-inositol	100	50
Nicotinic acid	0,5	0,25
Pyrodoxine. HCL	0,5	0,25
Thiamine. HCL	0,1	0,05
Glycine	2	1

Όλα τα υποστρώματα σταθεροποιήθηκαν με 8g l⁻¹ άγαρ. Το pH όλων των υποστρωμάτων ρυθμιζόταν με αραιό HCL ή αραιό NaOH 1 N στην τιμή 5,7 πριν την τοποθέτηση του άγαρ και την απόστειρωση.

2.1.6. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΒΛΑΣΤΗΣΗΣ ΣΠΟΡΩΝ *ex vitro*

Το εδαφικό υπόστρωμα που τοποθετήθηκαν οι σπόροι για βλάστηση αποτελούνταν από :

Τύρφη

Περλίτη

Άμμο.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Σε απόσταγμένο νερό όγκου λιγότερου του τελικού προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες (αναλόγως του όγκου του υπό Παρασκευή υποστρώματος) MS, σουκρόζης και Μυοινοζιτόλης και αναδεύονταν με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι να διαλυθούν. Ακολουθούσε η ογκομέτρηση (προσθήκη απεσταγμένου νερού ως τον επιθυμητό όγκο) και στη συνέχεια ρύθμιση του pH στην τιμή 5,6 της κλίμακας. Στη συνέχεια προσθέτονταν το άγαρ και ακολουθούσε θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το άγαρ. Έπειτα μοιράζονταν το διάλυμα ανά 15 ml σε κάθε τρυβλίο.

2.2.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΔΙΚΩΝ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ

Θάλαμος ανάπτυξης φυτών:

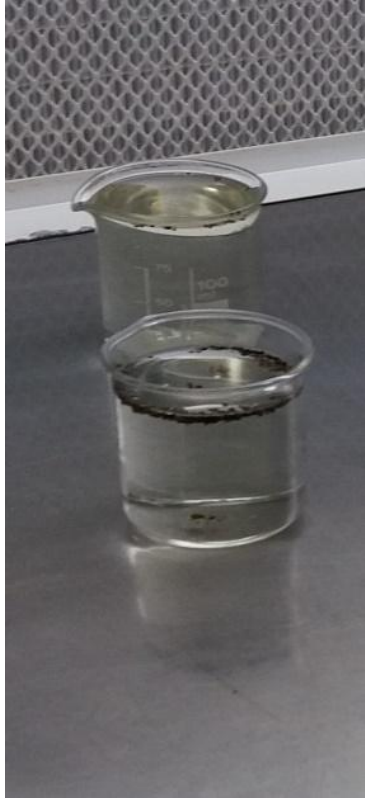
Θάλαμος διαστάσεων 4x4x3.5 με ειδική θερμομονωτική κάλυψη, διατήρησης θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας σε σταθερά επίπεδα (10-25° C και 60% αντίστοιχα) με δυνατότητα αυξομείωσης των τιμών αυτών. Οι συνθήκες αυτές εξασφαλίζονται με χρήση κεντρικού κλιματιστικού συστήματος ολικής ισχύος 22 Kw, αυτόματα ελεγχόμενου.

Με κατάλληλα απόλυτα φίλτρα εξασφαλίζεται η καθαρότητα του ανακυκλούμενου αέρα σε ποσοστό 99,999% (clean-air system).

Προβλέπεται η διάταξη, εντός του θαλάμου, 60 μεταλλικών ραφιών (τύπου Dexion) εκάστου διαστάσεων 76x92 τ.μ. και εφοδιασμένου με σύστημα φωτισμού αποτελούμενο από 2 λαμπτήρες φθορισμού COOL-WHITE ολικής εντάσεως 6.000 Lux και ισχύος 72W. Η τροφοδοσία των λαμπτήρων ελέγχεται από χρονοδιακόπτη.

2.2.3. ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΥΛΙΚΩΝ –ΚΟΠΗ ΕΚΦΥΤΩΝ –ΕΠΩΑΣΗ

Η απόστείρωση γινόταν σε κλίβανο υγρής απόστείρωσης για 20min σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1.1 Atm (Εικ. 15).



Εικόνα 14: Απολύμανση σπόρων με χλωρίνη.

Όλα τα τριβλία και τα δοχεία καλλιέργειας με τα υποστρώματα καλύπτονταν με φύλλο αλουμινίου καθώς και τα εργαλεία που χρησιμοποιούνταν στις εμφυτεύσεις ή απόλυμάνσεις όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκι πάνω στο οποίο γίνονταν οι κοπές εκφύτων, τρυβλία και απιονισμένο νερό.

Η απόλυμανση των σπόρων (Εικ. 14) και των εκφύτων γινόταν μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής. Η απαιτούμενη ποσότητα σπόρων και εκφύτων τοποθετήθηκαν αντίστοιχα σε απόστειρωμένα τρυβλία που περιείχαν 4,5 ml απόστειρωμένο απεσταγμένο νερό και 0,15ml χλωρίνη εμπορίου με 1 σταγόνα της προσκολλητικής ουσίας Tween-20. Αναδεύονταν για 12min και μετά γίνονταν 3 ξεπλύματα των 3 min με απόστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Η κοπή των εκφύτων έγινε στην τράπεζα νηματικής ροής (Εικ. 16) και τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας.

Μετά την εγκατάσταση των σπόρων και των εκφύτων στα τρυβλία καλλιέργειας, τοποθετήθηκαν για επώαση σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών όπου επώαστηκαν στις εξής συνθήκες:

- Στους $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ με 16h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent συνεχές φως.
- Σε κάθε τρυβλίο καλλιέργειας τοποθετήθηκαν 5 σπόροι του είδους.



Εικόνα 15 : κλίβανος υγρής απόστείρωσης.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μία υποκαλλιέργεια (καλλιέργεια πολλαπλασιασμού) στις 40 ημέρες, τα έκφυτα και οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε υποστρώματα μισής δύναμης MS και επώαστηκαν στους $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ με 16h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent συνεχές φως.



Εικόνα 16: τράπεζα νηματικής ροής.

2.3 ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΠΟΡΩΝ

2.3.1 ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΠΟΡΩΝ *ex vitro*

Σπόροι του είδους τοποθετήθηκαν στα εξής τρία υποστρώματα

1. Περλίτη :τύρφη, σε αναλογία 1:1,
2. Περλίτη : χώμα, σε αναλογία 1:1,
3. Άμμος

Σε τρυβλία Petri που περιείχαν διηθητικό χαρτί το οποίο βρέχονταν τακτικά ώστε οι σπόροι να έχουν στην διάθεσή τους πάντα υγρασία.

Οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε διάφορες συνθήκες φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας. Σπόροι του είδους εγκαταστάθηκαν για βλάστηση σε τρυβλία και επώαστηκαν:

α) σε θάλαμο σταθερών συνθηκών σε θερμοκρασία 20 °C, τόσο σε φωτοπερίοδο 16 h όσο και σε σκοτάδι (20 σπόροι σε φωτοπερίοδο 16h και 20 σπόροι σε σκοτάδι),

β) σε θερμοκρασία δωματίου (μεταβαλλόμενη θερμοκρασία νυκτός και ημέρας) τόσο σε φωτοπερίοδο 16 h όσο και σε σκοτάδι (20 σπόροι σε φωτοπερίοδο 16h και 20 σπόροι σε σκοτάδι). Επίσης ποσοστό των σπόρων πριν την εγκατάστασή τους για βλάστηση δεχτήκαν ψυχρή μεταχείριση (παρέμειναν για 40 ημέρες στους 4 °C).

2.3.2 ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΠΟΡΩΝ *in vitro*

Σε τρυβλία Petri που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα μισής δύναμης MS, τοποθετήθηκαν σπόροι του είδους για ανάπτυξη *in vitro* (Εικ 17).



Εικόνα 17 : Εγκατάσταση σπόρων *in vitro*.

Οι σπόροι επώαστηκαν σε διάφορες συνθήκες φωτοπεριόδου (16 h φως ή σε σκοτάδι. Επίσης ποσοστό των σπόρων πριν την εγκατάστασή τους για βλάστηση δεχτήκαν ψυχρή μεταχείριση (παρέμειναν για 40 ημέρες στους 4 °C πριν τοποθετηθούν για βλάστηση).

2.3.3 ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ *in vitro* ΑΠΟ ΕΝΗΛΙΚΑ ΑΥΤΟΦΥΗ ΦΥΤΑ

Βλαστοί από ενήλικα αυτοφυή φυτά του είδους που αναπτύσσονταν στην περιοχή του Μαίναλου, εγκαταστάθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα MS *in vitro* με σκοπό την διερεύνηση της δυνατότητας μικροπολλαπλασιασμού του είδους. Οι βλαστοί από τα αυτοφυή φυτά μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο, ξεπλύθηκαν με άφθονο νερό βρύσης και στη συνέχεια απολυμάνθηκαν με διάλυμα χλωρίνης 15 % για 12 min. Αφού ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό τοποθετήθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα. Εξετάστηκε επίσης η επίδραση της θέσης του εκφύτου πάνω στο βλαστό στην μετέπειτα αντίδραση των εκφύτων. Τοποθετήθηκαν βλαστοί από την κορυφή, από τον 1^ο, 2^ο, και 3^ο κόμβο από την κορυφή των βλαστών. Στη συνέχεια επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία αλλά ο χρόνος παραμονής στη χλωρίνη αυξήθηκε στα 15 min.

2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΠΟΡΟΥ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Sideritis clandestina peloponnesiaca* ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΚΦΥΤΩΝ

Οι παρατηρήσεις της βλάστησης πραγματοποιούνταν ανά δύο ημέρες με έναρξη τη ημέρα εγκατάστασής τους στο υπόστρωμα. Ως έναρξη βλάστησης των σπόρων θεωρήθηκε η έκπτυξη του ριζιδίου.

2.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα στα πειράματα βλάστησης λαμβάνονταν μετά από 40 ημέρες μετά την εγκατάσταση των σπόρων στο υπόστρωμα. Μετρήθηκαν όλοι οι σπόροι που βλάστησαν σε τρυβλίο καλλιέργειας. Όσον αφορά την έκπτυξη και ανάπτυξη των εκφύτων στις καλλιέργειες πολλαπλασιασμού εκτιμήθηκαν το ποσοστό αντίδρασης, ο αριθμός των βλαστών, ο αριθμός των κόμβων, το μήκος του βλαστού και ο σχηματισμός ή όχι κάλλου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΣΠΟΡΩΝ *ex vitro*

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.2.4.1. σπόροι του είδους *Sideritis clandestina subs peloponnesiaca*, καλλιεργήθηκαν διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου, δέχτηκαν ή όχι ψυχρή μεταχείριση και τοποθετήθηκαν σε διάφορα εδαφικά υποστρώματα ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό βλαστικότητάς τους.

Αρχικά εξετάστηκαν η επίδραση της θερμοκρασίας (σταθερή θερμοκρασία ή κυμαινόμενη στην διάρκεια της ημέρας) σε συνδυασμό με την εγκατάσταση των σπόρων σε φωτοπερίοδο 16 h φως ή σε πλήρες σκοτάδι στην βλάστηση των σπόρων του είδους (Πίν. 2). Η εγκατάσταση των σπόρων σε κυμαινόμενη θερμοκρασία στη διάρκεια της ημέρας και σε φωτοπερίοδο 16h φως αύξησε σημαντικά το ποσοστό βλάστησης των σπόρων του είδους. Η καλλιέργεια των σπόρων σε στο σκοτάδι μηδένισε την βλάστηση των σπόρων (Πίν. 2).

Πίνακας 2. Επίδραση της θερμοκρασίας καθώς και της φωτοπεριόδου, επώασης των σπόρων του είδους *Sideritis clandestina subs peloponnesiaca* στο ποσοστό βλάστησής, n=10

Συνθήκες επώασης	Ποσοστό βλάστησης (%)
Θερμοκρασία 20 °C 16h φως	10 b
Θερμοκρασία 20 °C σκοτάδι	0 b
Κυμαινόμενη Θερμοκρασία 16hφως	30 a
ΚυμαινόμενηΘερμοκρασίαΣκοτάδι	0 b
Σημαντικότητα	*
(*) Στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο 0.05%, (NS) μη στατιστικά σημαντική διαφορά	

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση της παραμονής των σπόρων σε ψύχος (40 ημέρες στους 4 °C), μετά την ολοκλήρωση της ψυχρής μεταχείρισης, οι σπόροι τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε θάλαμο σταθερών συνθηκών (16 h φως και 20 °C). Τόσο οι σπόροι που δέχτηκαν την ψυχρή μεταχείριση όσο και αυτοί που τοποθετήθηκαν αμέσως για βλάστηση δεν βλάστησαν (Πίν.3).

Πίνακας 3. Επίδραση της ψυχρής μεταχείρισης (άμεση σπορά ή παραμονή 40 ημέρες στους 4 °C στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων του είδους *Sideritis clandestina subsp peloponnesiaca*, κατά την *ex vitro* εγκατάσταση τους n=10

Εφαρμογή ψυχρής μεταχείρισης	Ποσοστό βλάστησης (%)
0 ημέρες	0
40 ημέρες	0
Σημαντικότητα	NS
(*) Στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο 0.05%, (NS) μη στατιστικά σημαντική διαφορά	

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών εδαφικών υποστρωμάτων στην βλάστηση των σπόρων του είδους. Σπόροι του είδους τοποθετήθηκαν στα εξής μίγματα:

- α) Τύρφη : Περλίτη
- β) Περλίτη : Χώμα
- γ) Χώμα
- δ) Άμμος.

Όλοι οι σπόροι εγκαταστάθηκαν για βλάστηση σε φυτοδοχεία και τοποθετήθηκαν σε μη θερμαινόμενο θερμοκήπιο στον περιβάλλοντα χώρο του ΤΕΙ Πελοποννήσου.

Σε όλα τα εδαφικά υποστρώματα το ποσοστό βλάστησης ήταν χαμηλό ή μηδενικό και κανένα εδαφικό υπόστρωμα δεν προκάλεσε αύξηση του ποσοστού βλάστησης (Πίν. 4).

Πίνακας 4. Επίδραση στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων του είδους *Sideritis clandestina subsp peloponnesiaca*, κατά την *ex vitro* εγκατάστασή τους n=15

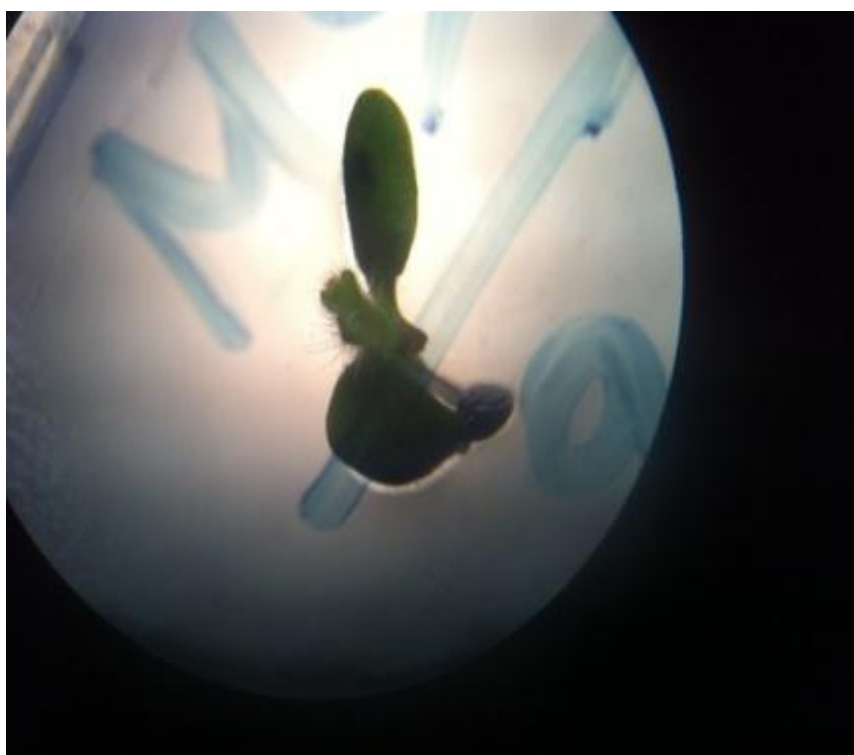
Εδαφικό υπόστρωμα	Ποσοστό βλάστησης (%)
Τύρφη : Περλίτη	5 a
Περλίτη : Χώμα	0 a
Χώμα	0 a
Άμμος	0 a
Σημαντικότητα	NS
(*) Στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο 0.05%, (NS) μη στατιστικά σημαντική διαφορά	

3.2 ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΣΠΟΡΩΝ *in vitro*

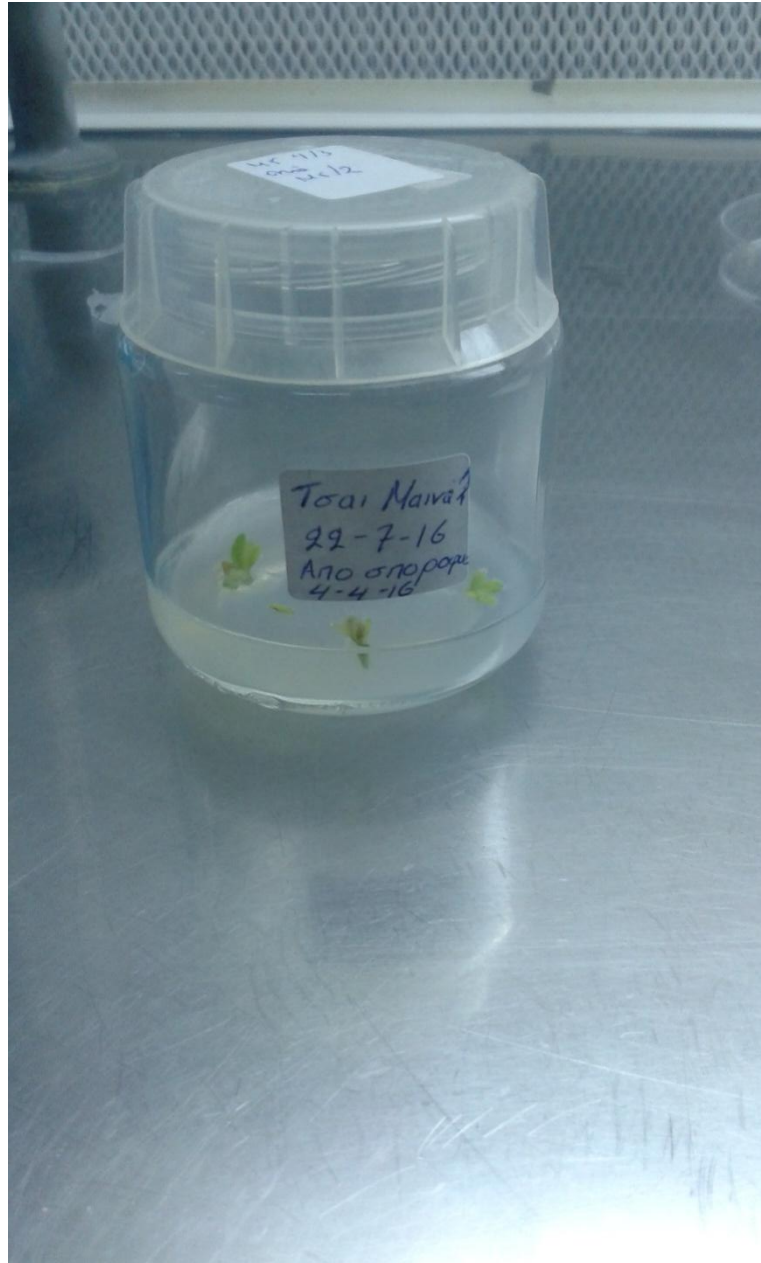
Μελετήθηκε επίσης η δυνατότητα βλάστησης *in vitro* των σπόρων του είδους *Sideritis clandestina subsp peloponnesiaca*. Σπόροι του είδους εγκαταστάθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα MS μισής δύναμης. Οι σπόροι απολυμάνθηκαν με διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 10% για 12 min, ακολούθησαν 3 ξεπλύματα με αποσταγμένο αποστειρωμένο νερό για 3 min και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα. Εκτιμήθηκε το ποσοστό βλάστησης των σπόρων, καθώς και η δυνατότητα βλάστησης τους *in vitro*, ώστε να αποτελέσουν μητρικό υλικό για καλλιέργεια *in vitro* του είδους. Οι σπόροι παρέμειναν για αρκετό χρονικό διάστημα στο υπόστρωμα καλλιέργειας και μόνο μετά από 3 μήνες βλάστησε ένας σπόρος (Εικ. 18 και 19). Στη συνέχεια το σπορόφυτο που βλάστησε *In vitro* υποκαλλιεργήθηκε σε υποστρώματα καλλιέργειας ώστε να επιτευχθεί πολλαπλασιασμός του είδους (Εικ. 20).



Εικόνα 18: Βλάστηση σπόρου απο μικροσκοπιο.



Εικόνα 19 :Βλάστηση σπόρου μέσα



Εικόνα 20: Υποκαλλιέργεια του είδους από σπορόφυτο που βλάστησε *in vitro*.

3.3 ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ *in vitro* ΑΠΟ ΕΝΗΛΙΚΑ ΑΥΤΟΦΥΗ ΦΥΤΑ

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.3.3. εγκαταστάθηκαν έκφυτα από βλαστούς που αναπτύσσονταν σε μητρικά αυτοφυή φυτά από την περιοχή του Μαϊναλου. Εξετάστηκε αρχικά η δυνατότητα επιτυχούς απολύμανσης ώστε να επιτευχθεί εγκατάσταση καλλιιεργειών *in vitro*.

Από μια μέθοδο απολύμανσης εκφύτων απαιτείται το ελάχιστο ποσοστό μολύνσεων καθώς και το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσής τους από την απολύμανση. Στην πρώτη καλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε μεγάλο ποσοστό των εκφύτων μολύνθηκε. Μόνο από τους κόμβους 1^ο και 3^ο επέζησαν από ένα έκφυτο αντίστοιχα (Εικ. 20), ενώ μεγάλο ποσοστό των εκφύτων μολύνθηκαν και καταστράφηκαν από την απολύμανση (Πίν 5). Στην επόμενη καλλιέργεια αυξήθηκε ο χρόνος απολύμανσης αλλά όλα τα έκφυτα νεκρώθηκαν



Εικόνα 20: Εγκατάσταση εκφύτων από αυτοφυή ενήλικα φυτά.

Πίνακας 5. *In vitro* πολλαπλασιασμός ενήλικων αυτοφυών φυτών, επίδραση του αριθμού του κόμβου από τον οποίο κόπηκε το έκφυτο, στο ποσοστό των εκφύτων που μολύνθηκαν, στο ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων, n=25. Απολύμανση σε 15 % χλωρίνη για 12 min.

Θέση (κόμβος) εκφυτου πάνω στο βλαστό	Ποσοστό μόλυνσης (%)	Ποσοστό αντίδρασης (%)
Κορυφή	84	16
1 ^{ος} κόμβος	100	0
2 ^{ος} κόμβος	100	0
3 ^{ος} κόμβος	84	16
4 ^{ος} κόμβος	100	0
Σημαντικότητα	NS	NS

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σπόροι του είδους *Sideritis clandestina subs peloponnesiaca*, καλλιεργήθηκαν σε διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου, δέχτηκαν ή όχι ψυχρή μεταχείριση και τοποθετήθηκαν σε διάφορα εδαφικά υποστρώματα ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό βλαστικότητάς τους. Φαίνεται η εγκατάσταση των σπόρων σε κυμαινόμενη θερμοκρασία στη διάρκεια της ημέρας και σε φωτοπερίοδο 16h φως αύξησε σημαντικά το ποσοστό βλάστησης των σπόρων του είδους. Αντίθετα η τοποθέτηση των σπόρων σε στο σκοτάδι μηδένισε την βλάστηση τους, ενώ η ψυχρή μεταχείριση τους πριν την τοποθέτηση τους για βλάστηση δεν επηρέασε την βλαστικότητά τους. Σπόροι του είδους που εγκαταστάθηκαν invitro παρουσίασαν επίσης πολύ χαμηλό ποσοστό βλάστησης.

Η χρησιμοποίηση εκφύτων από μητρικά αυτοφυή φυτά από την περιοχή του Μαίναλου τέλος, δεν οδήγησε σε επιτυχή μικροπολλαπλασιασμό του είδους.

Ανακεφαλαιώνοντας στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν διάφορες μέθοδοι πολλαπλασιασμού του είδους για πρώτη φορά. Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα τόσο στον πολλαπλασιασμό του με σπόρο όσο και με μικροπολλαπλασιασμό. Ιδιαίτερη έρευνα απαιτεί ο χρόνος εγκατάστασης των σπόρων και η εποχή λήψης των εκφύτων. Απολύμανση των σπόρων και των σπόρων με 10% χλωρίνη εμπορίου για 12min και των εκφύτων αντίστοιχα με 15% χλωρίνη εμπορίου για 12min, φαίνεται να αποτελούν αποτελεσματικές μεθόδους απολύμανσης για τον μικροπολλαπλασιασμό του.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [http://www.naturagraeca.com/ws/122,184,131,1,1,Μαίναλο-%20\(Οστρακίνα](http://www.naturagraeca.com/ws/122,184,131,1,1,Μαίναλο-%20(Οστρακίνα)
- https://en.m.wikipedia.org/wiki/Sideritis#History_and_etymology
- <https://eclass.upatras.gr>BIO348>>
- www.gaiapaidia.gr/gaiapaidia/index.php/Σιδερίτης_φυτό
- https://www.google.gr/search?q=tissue+culture&client=ms-android-om-lge&prmd=ivn&source=lnms&tbm=isch&a=X&ved=0ahUKEwi-9d9f1u3WAhVFzxQKHR4TAGYQ_AUICgB&biw=320&bih=440
- <http://www.pkm.gov.gr/inst/pkm/gallery/PE/Pieria/E%CE%9D%CE%97%CE%9C%CE%95%CE%A1%CE%A9%CE%A4%CE%99%CE%9A%CE%9F%20%CE%A6%CE%A5%CE%9B%CE%9B%CE%91%CE%94%CE%99%CE%9F%20%CE%97%CE%9C%CE%95%CE%A1%CE%99%CE%94%CE%91%CE%A3.pdf>
- http://dspace.aua.gr/xmlui/bitstream/handle/10329/6092/Karachasani_A.pdf?sequence=3
- <http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/%CE%A3%CE%B9%CE%B4%CE%B5%CF%81%CE%AF%CF%84%CE%B7%CF%82%CF%86%CF%85%CF%84%CF%8C>
- <http://www.reherb.eu/el/content/sideritis-cladestina-subsp-peloponnesiaca>
- <http://www.agriamanitaria.gr/?gallery=%CF%84%CF%83%CE%AC%CE%B9-%CF%84%CE%BF%CF%85-%CE%B2%CE%BF%CF%85%CE%BD%CE%BF%CF%8D-sideritis-spp>
- https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/244/1/02_CHAPTER_04.pdf
- https://www.google.gr/search?q=%CE%B5%CF%85%CE%B5%CF%81%CE%B3%CE%B5%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%B5%CF%82+%CE%B9%CE%B4%CE%B9%CE%BF%CF%84%CE%B7%CF%84%CE%B5%CF%82+%CF%84%CF%83%CE%B1%CE%B9+%CF%84%CE%BF%CF%85+%CE%B2%CE%BF%CF%85%CE%BD%CE%BF%CF%85+%CF%89%CF%82+%CF%81%CF%8C%CF%86%CE%B7%CE%BC%CE%B1&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwibwvezzJbXAhWjDZoKHY_uCVkQ_AUICgB&biw=1366&bih=662#imgrc=yhzc3VLyt8_y_M:

- <https://link.springer.com/article/10.1007/s00394-011-0292-2>