



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

«ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ»

Π.Μ.Σ. «Αειφόρος και Βιώσιμη Φυτική Παραγωγή»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«Τεχνικές ιστοκαλλιέργειας στο είδος *Echinacea purpurea* (L.) με στόχο την
ενίσχυση του βιοδραστικού δυναμικού»**

Διγκτσή Σαμπίνα Μαρία (00011)

ΒΟΛΟΣ, 2024

**Τεχνικές ιστοκαλλιέργειας στο είδος *Echinacea purpurea* (L.) με στόχο την ενίσχυση του
βιοδραστικού δυναμικού**

In vitro techniques in *Echinacea purpurea* (L.) towards increasing its bioactive potential

Διγκτσή Σαμπίνα Μαρία

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παυλή Ουρανία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας
Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γιαννούλης Κυριάκος, Επίκουρος Καθηγητής, Γεωργία με έμφαση στην καλλιέργεια
Ενεργειακών, Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής
και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δαναλάτος Νικόλαος, Καθηγητής, Γεωργία και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία Φυτών, Τμήμα
Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Copyright © ΔΙΓΚΤΣΗ ΣΑΜΠΙΝΑ ΜΑΡΙΑ, 2024

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη σε όσους με στήριξαν και με ενθάρρυναν καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας.

Πρώτα και κύρια, ευχαριστώ την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Ουρανία Παυλή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική της καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές της και τη συνεχή υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων που οδήγησαν στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα Χριστίνα Τούμπου για την πολύτιμη βοήθειά της και τις κατευθύνσεις που μου παρείχε, καθώς και την κα. Ευαγγελία Παναγιωτάκη, μέλος ΕΔΙΠ, για τη συνδρομή της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και τη βοήθειά της στην ανάλυση των στατιστικών δεδομένων.

Επιπλέον, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στους κ. Νικόλαο Δαναλάτο, Καθηγητή του Εργαστηρίου Γεωργίας και Εφαρμοσμένης Φυσιολογίας Φυτών, και κ. Κυριάκο Γιαννούλη, Επίκουρου Καθηγητή του Εργαστηρίου Γεωργίας και Εφαρμοσμένης Φυσιολογίας Φυτών, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους αγαπημένους μου, που με στήριξαν αδιάκοπα σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Η μεγάλη φαρμακευτική αξία των δευτερογενών μεταβολιτών φυτικής προέλευσης έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των φαρμακοβιομηχανιών τις τελευταίες δεκαετίες, κυρίως με στόχο τον εμπλουτισμό των ήδη υπαρχόντων φαρμακευτικών σκευασμάτων και την εύρεση εναλλακτικών θεραπειών ποικίλων ασθενειών. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως οι φαινολικές ενώσεις, τα αλκαλοειδή και φλαβονοειδή, χαρακτηρίζονται από αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση, με αποτέλεσμα να αυξάνεται συνεχώς η εκμετάλλευση των φυσικών πληθυσμών για την κάλυψη των ολοένα αυξανόμενων αναγκών των καταναλωτών και της βιομηχανίας φαρμάκων. Παράλληλα, οι φυσικοί πληθυσμοί των εν λόγω ειδών εμφανίζουν σημαντική διακύμανση ως προς την περιεκτικότητά τους σε βιοδραστικά συστατικά, με αποτέλεσμα η βιομάζα αυτών να εμφανίζει συχνά περιορισμένο βιοδραστικό δυναμικό και έλλειψη επαναληψιμότητας, λόγω της εξάρτησης τους από τις επικρατούσες εδαφοκλιματικές συνθήκες. Από την άλλη πλευρά, τα φαρμακευτικά είδη ενδιαφέροντος αφενός μεν καλύπτουν ένα μικρό ποσοστό των καλλιεργούμενων εκτάσεων και αφετέρου αντιμετωπίζουν προβλήματα προσαρμογής στην καλλιέργειά τους σε μεγάλη κλίμακα. Στοχεύοντας συνεπώς στην προστασία των φυσικών πόρων και την ενίσχυση της παραγωγής των πολύτιμων βιοδραστικών ενώσεων εξετάζονται εκτεταμένα οι τεχνικές ιστοκαλλιέργειας που μπορούν να εφαρμοστούν στα διάφορα φυτικά είδη, με στόχο την παραγωγή βέλτιστης ποιότητας βιομάζας που είναι αξιοποιήσιμη για την εξαγωγή των βιοδραστικών συστατικών.

Το είδος *Echinacea purpurea* (L.) αποτελεί ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα είδη στη βιομηχανία φαρμάκων για την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής, λόγω του έντονου ανοσοδιεγερτικού χαρακτήρα των ουσιών που συντίθενται στα διάφορα φυτικά τμήματα, ιδιαίτερα στο ριζικό σύστημα. Η συσσώρευση των φαινολικών ενώσεων στις ρίζες έχει εγείρει το επιστημονικό ενδιαφέρον, με αποτέλεσμα να εξετάζονται οι προοπτικές ενίσχυσης του βιοδραστικού δυναμικού των ριζών μέσω τεχνικών ιστοκαλλιέργειας με υψηλή αποτελεσματικότητα και επαναληψιμότητα. Ταυτόχρονα, ερευνητικό στόχο αποτελεί και η δυνατότητα ενίσχυσης της βλάστησης των σπόρων και της ευρωστίας των σποροφύτων, με απώτερο σκοπό την ενίσχυση της παραγωγής υψηλής ποιότητας βιομάζας.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εστίασε στην αξιολόγηση διαφορετικών τεχνικών ιστοκαλλιέργειας στο είδος *Echinacea purpurea* (L.) με στόχο την αύξηση των βιοενεργών

συστατικών στο ριζικό σύστημα. Οι υπό μελέτη τεχνικές αφορούν στην εφαρμογή διεγερτών βλάστησης στους σπόρους με τη μέθοδο «seed priming», με στόχο την ενίσχυση της βλάστησης των σπόρων και της πρωτογενούς ανάπτυξης των σποροφύτων. Μία άλλη πειραματική κατεύθυνση αφορούσε στη διερεύνηση της δυνατότητας κατευθυνόμενης ανάπτυξης των σποροφύτων σε ελεγχόμενες συνθήκες καταπόνησης ξηρασίας και αλατότητας με στόχο την ενεργοποίηση του δευτερογενούς μεταβολισμού ως μέσου παραγωγής μεγαλύτερης ποσότητας βιοδραστικών συστατικών. Περαιτέρω, η μελέτη εστίασε στο γενετικό μετασχηματισμό με τη χρήση δύο στελεχών, R1000 και K599, του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes* που ενισχύει την βιομάζα των ριζών και τη συσσώρευση βιοδραστικών ενώσεων, μέσω της επαγωγής θυσσανωδών ριζών. Τέλος, μελετήθηκε η προοπτική χρήσης φυτοορμονών, και συγκεκριμένα α-Ναφθαλινοξικού οξέος (NAA) για την αύξηση της ριζοβολίας.

Αναφορικά με την αποτελεσματικότητα των διαφορετικών μεθόδων «seed priming», σημειώνεται πως ορισμένοι διεγέρτες έπειτα από την προεπεξεργασία των σπόρων βελτίωσαν την απόδοση των σποροφύτων σε *in vitro* συνθήκες, καθώς η οσμωτική επαγωγή των σπόρων είχε ως αποτέλεσμα την ενισχυμένη βλάστηση και τη μεγαλύτερη ριζική ανάπτυξη. Αξίζει να αναφερθεί πως τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας προτείνουν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου με ορισμένες τροποποιήσεις στο είδος *Echinacea purpurea* (L.) με τελικό στόχο τη βελτιστοποίησή του και την επέκταση της εφαρμογής του, καθώς οι παρατηρήσεις που λήφθηκαν υπογραμμίζουν τις αξιόλογες προοπτικές της μεθόδου στην ενίσχυση του ποσοστού βλάστησης και της ευρωστίας των σποροφύτων.

Σχετικά με την επίδραση της υδατικής καταπόνησης και της αλατότητας, τα αποτελέσματα συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι εν λόγω καταπονήσεις ενέτειναν τον δευτερογενή μεταβολισμό στο εσωτερικό των ιστών. Η ύπαρξη αλάτων στο υπόστρωμα ανάπτυξης αύξησε σημαντικά τη σύνθεση των φαινολικών ουσιών στους ριζικούς ιστούς, ενώ η υδατική καταπόνηση μεγιστοποίησε την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Σημειώνεται πως παρατηρήθηκε ότι η χαμηλότερη ένταση των καταπονήσεων λειτούργησε πιο αποτελεσματικά στη βελτίωση των επιθυμητών παραμέτρων.

Όσον αφορά στις διαδικασίες γενετικού μετασχηματισμού της εχινάκειας με τη χρήση διαφορετικών στελεχών του *A. rhizogenes*, τα ευρήματα της παρούσας διατριβής υπογραμμίζουν τη θετική επίδραση του στελέχους R1000 τόσο στην αύξηση της ανάπτυξης της κύριας ρίζας και

του σχηματισμού πρωτογενών και δευτερογενών ριζιδίων όσο και στην ενίσχυση του βιοδραστικού προφίλ των ριζών, μέσω της αυξημένης συσσώρευσης φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων στο ριζικό σύστημα. Αντίθετα, η αποτελεσματικότητα του στελέχους K599 χαρακτηρίστηκε ως ανεπαρκής καθώς δεν οδήγησε σε ανάπτυξη ριζικού συστήματος αυξημένης βιομάζας. Τέλος, σημειώνεται πως ο εμπλουτισμός του θρεπτικού μέσου επαγωγής ριζών με φυτοορμόνη δεν επίδρασε θετικά στην ανάπτυξη υγιούς πλούσιο ριζικού συστήματος, χωρίς ωστόσο αυτό να συνεπάγεται πως η τροποποιημένη χρήση τους δεν θα ευνοούσε τη ριζογένεση και την καλύτερη ανάπτυξη των υπαρχουσών ριζών.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης μπορούν να αξιοποιηθούν μελλοντικά για τη βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων ιστοκαλλιέργειας που εφαρμόστηκαν, ενώ παράλληλα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως κατευθυντήρια γραμμή για την εφαρμογή και την εξέταση των τεχνικών σε άλλα είδη του γένους *Echinacea* ή σε άλλα φυτά με φαρμακευτικό ενδιαφέρον.

Λέξεις κλειδιά: φαρμακευτικά φυτά, εχινάκεια, *Echinacea purpurea* (L.), γενετικός μετασχηματισμός, *Agrobacterium rhizogenes*, δευτερογενής μεταβολισμός, φαινολικές ενώσεις, αντιοξειδωτικός χαρακτήρας, αβιοτικές καταπονήσεις, υδατική καταπόνηση, καταπόνηση ξηρασίας, seed priming, διεγέρτες βλάστησης

Abstract

The great medicinal value of secondary metabolites of plant origin has drawn the interest of the pharmaceutical industry during the last decades, with the aim of enriching the existing pharmaceutical preparations and finding alternative treatments for various diseases. Secondary metabolites, such as phenolic compounds, alkaloids and flavonoids, are characterized by antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activity, leading to a continuous increase in the overexploitation of natural sources to meet the ever-growing needs and demands of consumers and pharmaceutical industries. Further, the native populations of such species show great variation with respect to their content in bioactive compounds, thus producing biomass with limited content of bioactive compounds and unstable quality, due to dependence from pedoclimatic conditions. On the other hand, the medicinal plants of interest cover a small percentage of the cultivated areas, while also facing limitations in their adaptation to large-scale production. Addressing the goal of protecting natural resources and enhancing the production of valuable bioactive compounds, various *in vitro* techniques that can be applied to the different plant species are extensively examined in order to produce biomass of optimal quality to be exploited in procedures of extracting bioactive components.

The species *Echinacea purpurea* (L.) is one of the most frequently used species in the pharmaceutical industry for the creation of nutritional supplements, due to the immunostimulating activity of its bioactive compounds that are synthesized in various plant parts, particularly in the root area. The accumulation of phenolic compounds in roots has stimulated the scientific interest towards enhancing the root bioactive potential via applying various *in vitro* techniques with high efficiency and reproducibility. In parallel, the scientific interest is directed towards enhancing seed germination and seedling vigor, with the ultimate goal of increasing the production of high-quality biomass.

This MSc thesis focused on the evaluation of different *in vitro* techniques in the species *Echinacea purpurea* (L.) in the context of enhancing the production of bioactive compounds in the root system. The techniques under study involved application of various "seed priming" approaches with the aim of improving seed germination and primary seedling growth. Another research goal was to apply seedling growth under controlled drought stress conditions and salinity in the context of triggering the secondary metabolism to produce higher quantity of bioactive compounds.

Further, the research conducted involved procedures of genetic transformation using two strains, R1000 and K599, of the bacterium *Agrobacterium rhizogenes*, which is suitable for enhancing the root biomass and its content of bioactive compounds, through the formation of proliferative multiple-branched adventitious roots. Finally, the effects of phytohormones, α -Naphthalenoacetic acid (NAA) in particular, was studied in the context of enhancing the rooting potential of echinacea seedlings.

Regarding the different "seed priming" methods, it is noted that some stimulators during seed pretreatment improved seedling performance in the *in vitro* conditions, as the osmotic induction of seeds resulted in enhanced germination and root growth. It is worth mentioning that the results of experimental procedures suggest that the applied method must be adjusted to the *Echinacea purpurea* (L.) species in order to optimize and extend its application, as the data provide prospects of considerably enhancing both the germination rate and the vigor of seedlings.

Furthermore, it was observed that the effect of drought and salinity stress enhanced the synthesis of secondary metabolites inside the plant tissues. The presence of salts in the growing environment significantly increased the synthesis of phenolic substances in roots, while drought stress maximized their antioxidant activity. It was observed that the lower stress intensity was more effective in improving the desired parameters.

In relation to the use of different bacterial strains of *A. rhizogenes* as agents for the genetic transformation of echinacea, the findings highlight the positive effect of the R1000 strain on the growth of the main root as well as the formation of primary and secondary roots. Moreover, the bioactive profile of the roots was strengthened, as evidenced by the increased accumulation of phenolic and antioxidant compounds in the root tissues. In contrast, genetic transformation via strain K599 did not enhance the root biomass of transformed seedlings. Finally, enriching the rooting medium with phytohormone did not favor the production of a healthy and rich root system, yet it is not suggested that their modified application would not act in favor of rhizogenesis and enhanced growth of the existing roots.

Overall findings of this study may be employed to further optimize the *in vitro* methods applied, whilst at the same time, they may be exploited as a baseline for investigating the prospects of their application in other Echinacea species or other plant species of medicinal interest.

Key words: medicinal plants, *Echinacea purpurea* (L.), genetic transformation, *Agrobacterium rhizogenes*, phenolic compounds, antioxidant activity, abiotic stress, water deficit, drought stress, salinity stress, seed priming, germination stimulant

Εγώ, η Διγκτσή Σαμπίνα Μαρία είμαι ο συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.

Υπογραφή

Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα. Διγκτσή Σαμπίνα Μαρία.

Υπογραφή

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	v
Abstract	viii
1. Εισαγωγή	1
1.1 Γενικά για τα φαρμακευτικά φυτά.....	1
1.2 Αξία και χρήσεις των φαρμακευτικών φυτών	3
1.3 Προβλήματα και προοπτικές αξιοποίησης των φαρμακευτικών φυτών.....	6
1.4 Το είδος <i>Echinacea purpurea</i> (L.).....	7
1.4.1 Ιστορία και Εξάπλωση.....	8
1.4.2 Ταξινόμηση.....	9
1.4.3 Βοτανική περιγραφή.....	10
1.4.3.1 Βλαστός.....	11
1.4.3.2 Φύλλα.....	11
1.4.3.3 Ριζικό σύστημα.....	12
1.4.3.4 Άνθη.....	12
1.4.3.5 Σπόροι	13
1.4.4 Αύξηση και Ανάπτυξη	13
1.4.4.1 Βιολογικός κύκλος.....	13
1.4.4.2 Λήθαργος.....	14
1.4.5 Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις.....	15
1.4.5.1 Θερμοκρασία	15
1.4.5.2 Υγρασία.....	16
1.4.5.3 Εδαφικές απαιτήσεις	16
1.4.6 Καλλιεργητικές τεχνικές.....	19
1.4.6.1 Λίπανση.....	19

1.4.6.2 Άρδευση	19
1.4.6.3 Σπορά	20
1.4.6.4 Διαχείριση ζιζανίων	21
1.4.6.5 Εχθροί και Ασθένειες.....	21
1.4.7 Φυτοχημικό προφίλ του είδους <i>Echinacea purpurea</i> (L.)	22
1.4.7.1 Σύνολο βιοδραστικών ενώσεων	22
1.4.7.2 Βιοδραστικές ενώσεις και καταπονήσεις.....	27
1.4.8 Φαρμακευτικές χρήσεις	29
1.5 Έρευνα στο είδος <i>Echinacea purpurea</i> (L.).....	30
1.6 Γενετική Μηχανική	34
1.7 Το <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ως φορέας γενετικού μετασχηματισμού.....	38
1.7.1 Περιγραφή του <i>Agrobacterium rhizogenes</i> και του πλασμιδίου Ri.....	39
1.7.2 Περιγραφή του τρόπου μόλυνσης και των συμπτωμάτων	41
1.7.3 Αξιοποίηση στη γενετική τροποποίηση	43
1.7.4 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> και φαρμακευτικά φυτά.....	45
1.8 Μέθοδοι προσδιορισμού φυτοχημικού προφίλ	46
1.8.1 Υγρή (HPLC) και αέρια (GC-MS) χρωματογραφία	46
1.8.2 Χρήση φασματοφωτομέτρου.....	47
1.9 Σκοπός της μελέτης.....	49
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	50
2.1 Επιλογή φυτικού υλικού.....	50
2.2 Εφαρμογή διεγερτών βλάστησης - «Seed priming»	50
2.3 Εφαρμογή καταπονήσεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας.....	54
2.4 Γενετικός μετασχηματισμός με τη χρήση του βακτηρίου <i>Agrobacterium rhizogenes</i>.....	57
2.4.1 Προετοιμασία φυτικού υλικού	57

2.4.2 Βακτηριακά στελέχη του <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	58
2.4.3 Γενετικός μετασχηματισμός φυταρίων εχινάκειας.....	59
2.4.4 Επίδραση διαλυμάτων ορμονών	63
2.5 Προσδιορισμός συνολικών φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων	63
2.5.1 Προσδιορισμός συνολικών φαινολικών ενώσεων.....	63
2.5.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας	66
2.6 Στατιστική ανάλυση.....	67
3. Αποτελέσματα.....	68
3.1 Ενίσχυση της βλάστησης με τη χρήση διεγερτών – «Seed priming»	68
3.1.1 Επίδραση των διεγερτών στο ποσοστό βλάστησης (GP%) των σπόρων	68
3.1.2 Επίδραση των διεγερτών στο ρυθμό βλάστησης (GR) και στο μέσο χρόνο βλάστησης (MGT)	72
3.1.3 Επίδραση των διεγερτών στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και του βλαστικού τμήματος των σποροφύτων	73
3.1.4 Επίδραση των διεγερτών στον δείκτη ευρωστίας των σποροφύτων (SVI)	82
3.1.5 Επίδραση των διεγερτών στο ποσοστό περιεχόμενης υγρασίας των σποροφύτων (WC%).....	83
3.2 Παραγωγή διαγονιδιακών ριζών μέσω του βακτηρίου <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	85
3.2.1 Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών μετά τον μετασχηματισμό.....	86
3.2.2 Συγκριτική φαινοτυπική αξιολόγηση των μετασχηματισμένων φυταρίων	87
3.2.3 Συχνότητα μετασχηματισμού.....	91
3.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών του ριζικού συστήματος	94
3.6 Ενίσχυση της ριζοβολίας με τη χρήση φυτοορμονών	95
4. Συζήτηση και Συμπεράσματα.....	96
4.1 Ενίσχυση της βλάστησης με τη χρήση διεγερτών – «seed priming».....	96
4.2 Γενετικός μετασχηματισμός του είδους <i>E. purpurea</i> μέσω του <i>A. rhizogenes</i>	100

4.3 Επίδραση των αβιοτικών καταπονήσεων στο βιοχημικό προφίλ των ριζών	101
Συμπεράσματα	106
5. Βιβλιογραφία	107

1. Εισαγωγή

Εδώ και χιλιάδες χρόνια οι άνθρωποι στρέφονται στη χρήση φαρμακευτικών φυτών για τη θεραπεία ποικίλων παθήσεων. Διάφορα φυτικά είδη χαρακτηρίζονται από εξαιρετικές ιαματικές ιδιότητες, που οφείλονται στις πολύτιμες ενώσεις που παράγονται κατά το δευτερογενή μεταβολισμό. Σήμερα, περισσότερο από ποτέ στον σύγχρονο πολιτισμό, οι άνθρωποι επιλέγουν την κατανάλωση φυτικών σκευασμάτων για τη διατήρηση της ευεξίας τους, στο πλαίσιο ενός υγιεινού τρόπου ζωής. Λόγω αυτής της ραγδαίας αύξησης της ζήτησης των φαρμακευτικών φυτών, η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρωθεί στην εύρεση κατάλληλων μεθόδων και τεχνικών με σκοπό τη μέγιστη δυνατή αξιοποίηση των βιοδραστικών ενώσεων ενδιαφέροντος, ενώ ταυτόχρονα εξετάζονται εντατικά οι προοπτικές εκτεταμένης καλλιέργειας των φαρμακευτικών φυτικών ειδών, με απώτερο σκοπό τη μεγιστοποίηση της παραγωγής και τη μείωση της εκμετάλλευσης των διαθέσιμων φυτικών πόρων, η οποία επιβαρύνει σημαντικά την ισορροπία και τη συνέχεια των οικοσυστημάτων. Ένα από τα σημαντικότερα φαρμακευτικά φυτά που έχουν γνωρίσει ευρεία διάδοση και αξιοποίηση, είναι το *Echinacea purpurea* (L.), το οποίο αποτελεί πολύτιμη πηγή βιοδραστικών ενώσεων, κυρίως χάρη των παραγώγων καφεϊκού οξέος που βρίσκονται στο ριζικό σύστημα και η πρόσληψή τους ενισχύει σημαντικά το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων της εχινάκειας, θεωρείται σημαντική η περαιτέρω έρευνα για την αξιοποίησή της καθώς και η εύρεση τρόπων ενίσχυσης της βιομάζας των ριζών, όπου απαντάται η πλειονότητα των βιοενεργών ουσιών της.

1.1 Γενικά για τα φαρμακευτικά φυτά

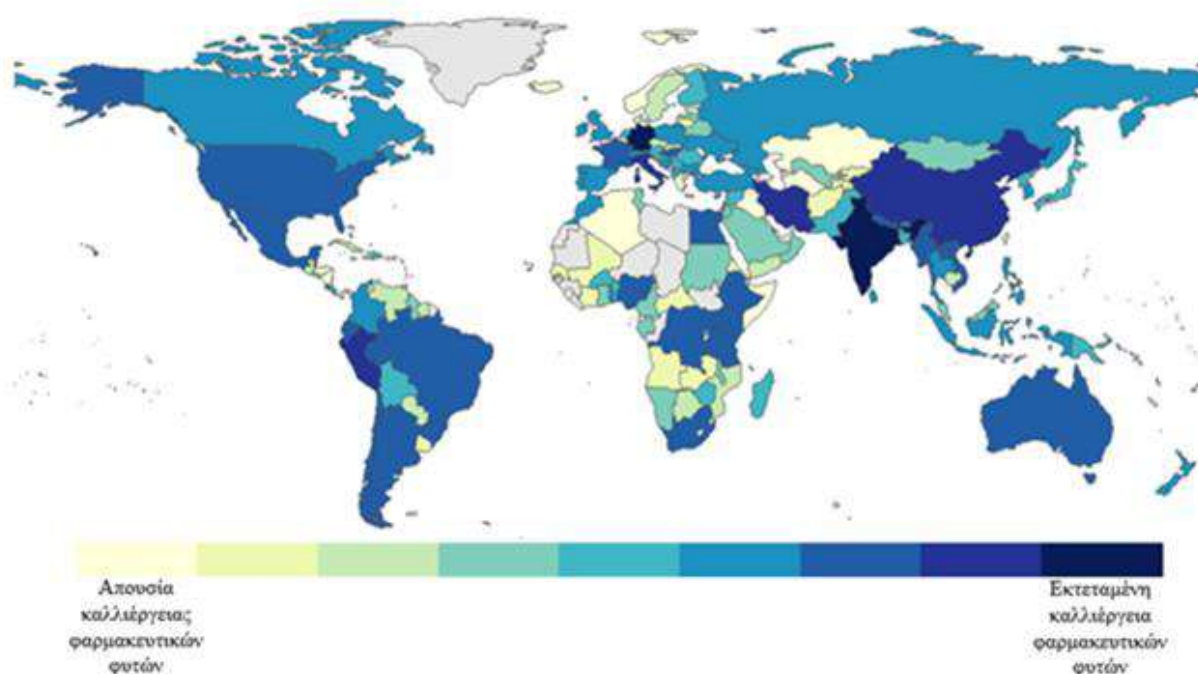
Από την αρχή της ανθρωπότητας, οι κοινωνίες των ανθρώπων αξιοποιούσαν ό,τι τους προσέφερε το περιβάλλον όπου ζούσαν, προκειμένου να καλύψουν τις διατροφικές τους ανάγκες και να αντιμετωπίσουν τυχόν ιατρικά προβλήματα. Εμπειρικά, οι άνθρωποι συνειδητοποίησαν τις φαρμακευτικές ιδιότητες των διαφορετικών φυτικών ειδών και σταδιακά πολλά φυτά χρησιμοποιούνταν αποκλειστικά ως φάρμακα ή τονωτικά, σύμφωνα με τις συμβουλές των γιατρών της εποχής. Με το πέρασμα των αιώνων, η ιατρική εξέλιξη και η τεχνολογική ανάπτυξη επέτρεψαν την ανάπτυξη δοκιμασιών ελέγχου και επαλήθευσης της φαρμακευτικής αξίας των φυτών, με αποτέλεσμα να ενσωματωθούν συμπληρωματικά στην αντιμετώπιση προβλημάτων ιατρικής φύσεως στη σύγχρονη εποχή. Έτσι, λόγω της ένταξης συγκεκριμένων φυτικών ειδών

στον φαρμακευτικό κλάδο, δημιουργήθηκε και ο όρος «φαρμακευτικά φυτά». Ως φαρμακευτικά ορίζονται τα φυτικά είδη που περιέχουν στους ιστούς τους ωφέλιμες ενώσεις, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ίαση ποικίλων ασθενειών και, γενικότερα, προβλημάτων υγείας (Jamshidi-Kia et al., 2018; Shakya, 2016).

Σήμερα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, παρόλο που τα συνθετικά φάρμακα είναι σε θέση να αντιμετωπίσουν ή να περιορίσουν την πλειονότητα των ασθενειών, όλο και περισσότερα άτομα στρέφονται σε σκευάσματα φυτικής προέλευσης που έχουν ως βάση κάποιο φαρμακευτικό φυτό, με αποτέλεσμα η επιστημονική κοινότητα να εξετάζει τη δυνατότητα αξιοποίησής τους σε μεγαλύτερο φαρμακευτικό εύρος. Πιο ειδικά, στόχος είναι η δημιουργία ενός ολοκληρωμένου φαρμακευτικού προφίλ για ποικίλα είδη, που είναι γνωστά για τον φαρμακευτικό τους χαρακτήρα, με απώτερο σκοπό τον σαφή και ορθό προσδιορισμό των ενώσεων που παρουσιάζουν έντονο φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Επιπλέον, γίνονται προσπάθειες εύρεσης των φυτικών τμημάτων που χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα φαρμακευτικών ουσιών, αλλά και νέων ειδών με ισχυρό φαρμακευτικό προφίλ, καθώς υπάρχουν περισσότερα από μισό εκατομμύριο φυτά στον πλανήτη, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων δεν έχει ακόμη μελετηθεί (Jamshidi-Kia et al., 2018).

Στην περιοχή της Μεσογείου, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας, απαντάται τεράστια ποικιλομορφία φυτικών ειδών, εκ των οποίων πολλά αξιοποιούνται στη φαρμακοβιομηχανία. Οι ιδανικές κλιματολογικές συνθήκες που χαρακτηρίζονται από ήπιους χειμώνες και ζεστά καλοκαίρια καθώς και η ποικιλία εδαφών δίνουν τη δυνατότητα σε διάφορα φυτικά είδη να ευδοκιμήσουν, φτάνοντας στο ποσοτικό και ποιοτικό μέγιστο της παραγωγής τους. Σύμφωνα με τους Cheminal et al. (2020), η Ελλάδα θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους τόπους σε παγκόσμιο επίπεδο, όπου η παραγωγή των φαρμακευτικών φυτών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα και να χαρακτηρίζεται ταυτόχρονα από εξαιρετική ποιότητα. Φυτά, όπως η ρίγανη, το χαμομήλι, ο σιδερίτης και το φασκόμηλο, που αναπτύσσονται εύκολα στην Ελλάδα, χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ποιότητα και αξιοποιούνται εκτεταμένα τόσο στον φαρμακευτικό τομέα όσο και στον τομέα της κοσμετολογίας, ενώ ταυτόχρονα αποτελούν αντικείμενο προϋούσας έρευνας για πιθανές εναλλακτικές εφαρμογές (Axiotis et al., 2018; Κουτσός, 2006).

Παράλληλα, γενικά τα φαρμακευτικά φυτικά είδη χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητες σε διάφορες δυσμενείς συνθήκες, με αποτέλεσμα τα ευνοϊκά περιβάλλοντα ανάπτυξής τους να καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα. Ωστόσο, ο αριθμός των φαρμακευτικών φυτών που καλλιεργείται στην Ελλάδα είναι πολύ μικρός και καταλαμβάνει μικρές εκτάσεις, ενώ θα μπορούσαν να αποτελέσουν εναλλακτικές καλλιέργειες για την εκμετάλλευση περιοχών, που λόγω της μειωμένης γονιμότητας ή των λιγοστών διαθέσιμων πόρων, παραμένουν ακαλλιέργητες (Tsioutsiou et al., 2022; Κουτσός, 2006). Επιπλέον, λόγω της απουσίας καλλιέργειας αυτών των φυτών, συχνά γίνεται συγκομιδή των άγριων ειδών, με αποτέλεσμα την υπερεκμετάλλευσή τους στα φυσικά οικοσυστήματα και την καταστροφή των οικοτόπων τους (Axiotis et al., 2018).



Εικόνα 1.1: Καλλιεργούμενες εκτάσεις φαρμακευτικών φυτών σε παγκόσμια κλίμακα.

1.2 Αξία και χρήσεις των φαρμακευτικών φυτών

Η βάση της σύγχρονης ιατρικής βρίσκεται στην αρχαία Ελλάδα του Ιπποκράτη, ο οποίος υποστήριζε πως κάθε σωματικό πρόβλημα, εφόσον έχει φυσική βάση, μπορεί να αντιμετωπιστεί με φυσικούς πόρους. Ο ίδιος στις θεραπείες του χρησιμοποιούσε ποικίλα φυτά και βότανα, με φαρμακευτικό χαρακτήρα. Στα γραπτά του που έχουν σωθεί, καταγράφονται πάνω από 400 είδη φυτικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων της μέντας και του φασκόμηλου, που συγκαταλέγονται

στα φαρμακευτικά φυτά και χρησιμοποιούνται στην παραγωγή φαρμακευτικών σκευασμάτων και στην εναλλακτική ιατρική μέχρι και σήμερα. Αντίστοιχα ιστορικά τεκμήρια έχουν βρεθεί στην περιοχή της Αιγύπτου και της Κίνας, όπου στην αρχαιότητα ο ιατρικός κλάδος ήταν εξαιρετικά εξελιγμένος. Εννοείται πως εκείνη την περίοδο τα φυτά χρησιμοποιήθηκαν ως φάρμακα για πρώτη φορά σε ακατέργαστη μορφή, όπως η σκόνη, το τσάι και τα βάμματα, ενώ κατά τον 19^ο αιώνα ξεκίνησε ο προσδιορισμός και η στοχευμένη απομόνωση των χημικών ουσιών που ήταν υπεύθυνες για τη θεραπευτική δράση των φυτών (Solomou et al., 2016; Suntar, 2020).

Με αυτόν τον τρόπο, ήταν ευκολότερη η ασφαλής διαχείριση και μεταχείριση των ενώσεων αυτών, ενώ παράλληλα αποτέλεσαν τη βάση για τη σύνθεση πολλών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται και σήμερα. Στη συνέχεια, κατά τον 20^ο αιώνα, λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας των βιοδραστικών ουσιών στους φυτικούς ιστούς, γεννήθηκε η ανάγκη παραγωγής τους σε μεγαλύτερες ποσότητες με συνθετικά μέσα. Ωστόσο, η σύνθετη χημική βάση πολλών από αυτών δεν επέτρεψε την παραγωγή τους σε εργαστηριακό επίπεδο, με αποτέλεσμα η ανάγκη μεγιστοποίησης της σύνθεσής τους σε φυτικό επίπεδο, με παράλληλη διατήρηση υψηλού ποιοτικού προφίλ, να παραμένει μέχρι και σήμερα (Solomou et al., 2016; Suntar, 2020).

Ο ιαματικός χαρακτήρας των φαρμακευτικών φυτών συγκεντρώνεται, κατά κύριο λόγο, στους δευτερογενείς μεταβολίτες που συντίθενται στα διάφορα φυτικά τμήματα. Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών είναι σχετικά απλός, καθώς λειτουργούν προστατευτικά στο φυτό, έχοντας αντιοξειδωτική δράση, περιορίζοντας την επίδραση καταπονήσεων και, ταυτόχρονα, προστατεύοντας το φυτό από ποικίλους βιοτικούς κινδύνους, από βακτήρια, μύκητες και ιούς. Αντίστοιχη είναι η ωφέλιμη επίδρασή τους στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς διαθέτουν αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιική λειτουργία, η οποία περιορίζει σημαντικά τις δυσμενείς συνέπειες διαφόρων προσβολών (Sen και Samanta, 2015; Solomou et al., 2016). Οι πολύτιμες αυτές ενώσεις βρίσκονται σε ποικίλες συγκεντρώσεις στα διαφορετικά φυτικά όργανα και στο αιθέριο έλαιο των φυτών, ενώ σε κάθε φυτό απαντώνται διαφορετικές ουσίες ενδιαφέροντος. Για παράδειγμα, στο φασκόμηλο οι ουσίες ενδιαφέροντος, τα φλαβονοειδή, βρίσκονται στα φύλλα (Ghorbani και Esmailizadeh, 2017), ενώ στην εχινάκεια τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος που εμφανίζουν έντονο ανοσοδιεγερτικό χαρακτήρα εντοπίζονται στην περιοχή των ριζών.

Σήμερα τα φαρμακευτικά φυτά αξιοποιούνται με ποικιλία τρόπων. Αρχικά, αξιοποιούνται στη σύνθεση φαρμακευτικών σκευασμάτων, τα οποία, κατά κύριο λόγο, είναι ενισχυτικά του ανοσοποιητικού και δρουν συμπληρωματικά με κάποια φαρμακευτική αγωγή και με μία ισορροπημένη καθημερινότητα. Επιπλέον, αρκετά από αυτά, όπως το χαμομήλι και το τσάι του βουνού, καταναλώνονται με τη μορφή αφεψήματος για την αντιμετώπιση του πεπτικού έλκους (González-Burgos et al., 2011; Zadeh et al., 2014), ενώ κάποια αξιοποιούνται στον κλάδο της κοσμετολογίας για τη σύνθεση αρωμάτων και καταπραϋντικών αλοιφών, όπως η καλέντουλα (Silva et al., 2021). Τέλος, τις τελευταίες δεκαετίες, αξιοποιείται σε πολύ μεγάλο βαθμό το αιθέριο έλαιο πολλών φαρμακευτικών φυτών με αρωματικό χαρακτήρα, όπως αυτό της ρίγανης, για την αντιμετώπιση εντόμων και εχθρών σε καλλιέργειες, ως οικολογική και βιολογική εναλλακτική των φυτοπροστατευτικών (Jbilou et al., 2024).

Στο πλαίσιο υιοθέτησης ενός πιο υγιεινού τρόπου ζωής, τα τελευταία χρόνια όλα και περισσότεροι άνθρωποι επιλέγουν φυτικά σκευάσματα για την πρόληψη ή τη θεραπεία ασθενειών. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το 80% του παγκόσμιου πληθυσμού χρησιμοποιεί σκευάσματα φυτικής προελεύσεως για την αντιμετώπιση ελαφρών προβλημάτων υγείας (Sakya, 2016). Σε εκτεταμένες δημοσκοπήσεις των Cadar et al. (2021), τα περισσότερα άτομα δεν απορρίπτουν φάρμακα που χορηγούνται από την ιατρική κοινότητα, αλλά δείχνουν προτίμηση σε φυσικές θεραπείες, καθώς θεωρούν πως η προέλευσή τους συνεπάγεται μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της δράσης τους και διάρκεια στον χρόνο. Ταυτόχρονα, οι περισσότεροι δήλωσαν πως η επιλογή φυτικών φαρμάκων υποστηρίζει μία πιο οικολογική στάση ζωής, καθώς το ενεργειακό αποτύπωμα για την παραγωγή τους είναι σημαντικά ελαττωμένο. Παρατηρείται, επομένως, η κυριαρχία μιας νέας τάσης, πιο βιώσιμης και φιλικής στο περιβάλλον, η οποία αναμένεται τις επόμενες δεκαετίες να κορυφωθεί. Αναπόφευκτο απότοκο αυτής της τάσης θα αποτελέσει η αύξηση της ζήτησης για φυτικά προϊόντα και, συνεπώς, της ανάγκης για αύξηση των διαθέσιμων φαρμακευτικών φυτικών πόρων. Παράλληλα, λόγω των κινδύνων που εγκυμονεί η αλόγιστη κατανάλωση τέτοιων σκευασμάτων, η έρευνα για την ακριβή εύρεση των ποσοτήτων και των ουσιών που βελτιώνουν την ανθρώπινη υγεία, θα αποτελέσει μονόδρομο (Cadar et al, 2016).

Σήμερα στις ΗΠΑ, περίπου 115 από τα 180 συνταγογραφούμενα φάρμακα εξαρτώνται πλήρως από φαρμακευτικά φυτά, ενώ περισσότερο από το 25% των συνταγογραφούμενων φαρμάκων

παγκοσμίως προέρχονται από άγρια είδη με φαρμακευτικές ιδιότητες. Η χρήση των φαρμακευτικών φυτών αυξάνεται ραγδαία σε παγκόσμια κλίμακα, ενώ η εξέλιξη των βιοτεχνολογικών μέσων έχει επιτρέψει την εύρεση περισσότερων χημικών ενώσεων, που έχουν ευεργετική δράση για τον ανθρώπινο οργανισμό (Chen et al., 2016). Παράλληλα, είναι ευκολότερος ο προσδιορισμός του βιοχημικού προφίλ περισσότερων φυτών, με αποτέλεσμα νέα είδη να εντάσσονται ως φάρμακα σε θεραπευτικά προγράμματα ή να χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των ουσιών με φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Η συνεχής έρευνα των φυτών ως αξιόλογων πηγών βιοδραστικών ενώσεων και των τρόπων βελτιστοποίησης της παραγωγής τους σε ποσοτικό και σε ποιοτικό επίπεδο, θα προαγάγει τη δημιουργία καινοτόμων προϊόντων συνδυάζοντας τη συμβατική ιατρική με τον φυτικό πλούτο (Suntar, 2020).

1.3 Προβλήματα και προοπτικές αξιοποίησης των φαρμακευτικών φυτών

Η αυξανόμενη ζήτηση για φαρμακευτικά σκευάσματα φυτικής προελεύσεως, έχει οδηγήσει στην ανεξέλεγκτη εκμετάλλευση των αυτοφυών φαρμακευτικών φυτών, καθώς υπάρχουν σημαντικοί καλλιεργητικοί παράγοντες, οι οποίοι εμποδίζουν την καλλιέργειά τους σε μεγάλη κλίμακα. Πιο ειδικά, η περιορισμένη πληροφόρηση αναφορικά με τις καλλιεργητικές πρακτικές που θα πρέπει να εφαρμόζονται σε καλλιέργειες τέτοιου τύπου, η ελλιπής διαθεσιμότητα πιστοποιημένου σπόρου καθώς και η ελάχιστη εκβιομηχάνιση των γεωργικών εργασιών που αυξάνει το εργατικό κόστος και αποθαρρύνει τους γεωργούς να επενδύσουν σε αυτόν τον κλάδο, είναι κάποιοι από τους λόγους που εμποδίζουν την καλλιέργεια των φαρμακευτικών φυτών σε μεγάλη κλίμακα. Επιπλέον, τα φαρμακευτικά φυτά δεν συμπεριλαμβάνονται στις «παραδοσιακές καλλιέργειες», με αποτέλεσμα αρκετοί παραγωγοί να περιορίζονται στην «ασφάλεια» άλλων ειδών, των οποίων η καλλιέργεια είναι ευρέως διαδεδομένη, γιατί οι καλλιεργητικές φροντίδες που απαιτούνται ορίζονται από σαφή καλλιεργητικά πρωτόκολλα και η διαθεσιμότητά τους στο εμπόριο είναι εγγυημένη. Συνεπώς, είναι λίγοι οι παραγωγοί που είναι διατεθειμένοι να δοκιμάσουν κάποιο φαρμακευτικό φυτό ως εναλλακτική καλλιέργεια, ειδικά αν δεν είναι τόσο γνωστό ή δημοφιλές (Dajic-Stevanovic και Pljevljakusic, 2015).

Επομένως, οι ελάχιστες καλλιεργούμενες εκτάσεις φαρμακευτικών φυτών οδηγούν στην υπερκμετάλλευση των φυσικών πηγών, με αποτέλεσμα την καταστροφή των οικοσυστημάτων και τη μείωση της βιοποικιλότητας. Επιπλέον, οι τεχνικές συγκομιδής που ακολουθούνται πολύ συχνά καταστρέφουν το περιβάλλον ανάπτυξης των άγριων ειδών, με αποτέλεσμα η επιβίωσή τους στην

περιοχή να κλονίζεται. Περισσότερα από 15.000 φυτικά είδη που αξιοποιούνται στη φαρμακοβιομηχανία απειλούνται σε παγκόσμιο πλέον επίπεδο και η εξαφάνισή τους θα είναι αναπόφευκτη, εφόσον δεν υιοθετηθεί μια οικολογική στάση διαχείρισης των φυσικών αποθεμάτων (Chen et al., 2016; Dass και Manthur, 2009; Parageorgiou et al., 2020

Παράλληλα, υπάρχουν ορισμένα προβλήματα τα οποία παρουσιάζουν τα ίδια φαρμακευτικά φυτά και δυσχεραίνουν τόσο τη μελέτη όσο και την καλλιέργειά τους. Πιο συγκεκριμένα, τα σπέρματα των φυτικών ειδών με φαρμακευτική δράση συχνά χαρακτηρίζονται από άστατους ληθάργους, των οποίων η λειτουργία δεν είναι πλήρως κατανοητή και ταυτόχρονα είναι δύσκολη η διακοπή τους. Ο άστατος λήθαργος οδηγεί σε εξαιρετικά μειωμένη βλάστηση και ανομοιογένεια ανάπτυξης, με απότοκο να δυσχεραίνεται ακόμη περισσότερο η καλλιέργεια των φαρμακευτικών φυτών (Khajeh-Hosseini, 2014). Επιπροσθέτως, οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται στα φυτικά όργανα διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ειδών και επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης και από το στάδιο του βιολογικού κύκλου.

Για παράδειγμα, η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων στο ριζικό σύστημα συνήθως είναι μεγαλύτερη σε φυτά μικρότερης ηλικίας, και αυξάνεται εξαιρετικά σε συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας νερού και υψηλής εδαφικής αλατότητας, ως αποτέλεσμα προσαρμογής του δευτερογενούς μεταβολισμού στις συνθήκες καταπόνησης. Ωστόσο, συχνά αυτές οι συνθήκες καταπόνησης επηρεάζουν αρνητικά την παραγόμενη βιομάζα και τη φυτική ανάπτυξη, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η ποσότητα του τελικού προϊόντος (Li et al., 2020). Συνεπώς, είναι σαφές πως είναι αναγκαία η συστηματική μελέτη των φυτών ενδιαφέροντος με στόχο την ενίσχυση της ικανότητας βλάστησης και παραγωγής των ουσιών με φαρμακευτική αξία. Επιπλέον, είναι σημαντικό να προσδιοριστούν στα είδη στα οποία αυτές οι ενώσεις συντίθενται σε μεγάλες ποσότητες και χαρακτηρίζονται από υψηλή ποιότητα. Με αυτόν τον τρόπο, θα υπάρξουν περισσότερες προοπτικές αξιοποίησης και ένταξης των φαρμακευτικών φυτών στον τομέα της ανθρώπινης υγείας, καθώς θα διασφαλιστεί η παροχή των απαραίτητων φαρμακευτικών ενώσεων, χωρίς να διαταράσσεται η φυσική χλωρίδα.

1.4 Το είδος *Echinacea purpurea* (L.)

Η εχινάκεια (*Echinacea purpurea* (L.)), είναι ένα φυτικό είδος που προέρχεται από διάφορες περιοχές των ΗΠΑ, αλλά απαντάται ως αυτοφυές σε μεγάλες εκτάσεις και στην περιοχή του Καναδά. Είναι πιο γνωστή για την ιδιότητά της να ενισχύει φυσικά το ανθρώπινο ανοσοποιητικό

σύστημα διεγείροντας τύπους λευκοκυττάρων, όπως τα μακροφάγα. Ο ανοσοδιεργητικός της χαρακτηήρας οφείλεται στις μεγάλες ποσότητες των παραγώνων του καφεϊκού οξέος που συντίθενται στα διάφορα φυτικά όργανα, ιδιαίτερα στο ριζικό σύστημα του φυτού (Barrett, 2003). Είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα φαρμακευτικά φυτά παγκοσμίως και τα προϊόντα της χαρακτηήζονται από υψηλή ζήτηση σε Ευρώπη και Αμερική (Κουτσός, 2006). Σήμερα, σύμφωνα με το Global Market Insights, οι πωλήσεις σκευασμάτων εχινάκειας σε παγκόσμια κλίμακα ανέρχονται στα 144 εκατομμύρια δολάρια.

1.4.1 Ιστορία και Εξάπλωση

Το είδος *Echinacea purpurea* (L.) εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην περιοχή της Βόρειας Αμερικής, όπου χρησιμοποιούνταν εκτεταμένα από τον 17^ο αιώνα από τους ιθαγενείς ως αντίδοτο σε τσιμπήματα φιδιών και εντόμων, ενώ παράλληλα εφαρμοζόταν παραδοσιακά σε διάφορες δερματολογικές παθήσεις. Στη συνέχεια, λόγω των αναλγητικών ιδιοτήτων του που προσδιορίστηκαν μέσω εμπειρικής παρατήρησης, ξεκίνησε η χρήση του ως παυσίπονου για τον πονόδοντο και για το στομαχικό έλκος. Η παρατεταμένη παραδοσιακή χρήση του οδήγησε στην ιατρική προσέγγισή του και τον 19^ο αιώνα ξεκίνησε η παρασκευή των πρώτων σκευασμάτων εχινάκειας, που χορηγούνταν ως παυσίπονο. Οι εντυπωσιακές ενδείξεις της φαρμακευτικής του δράσης οδήγησαν στην εντατικοποίηση της καλλιέργειάς του στην περιοχή της Αμερικής, ενώ τον 20^ο αιώνα εισήχθη στην ευρωπαϊκή ήπειρο, όπου τα βιοενεργά του συστατικά αποτέλεσαν αντικείμενα εντατικής μελέτης (Kumar και Ramaiah., 2011, Hostettmann, 2003).

Ακόμη και σήμερα, η εχινάκεια εξακολουθεί να απασχολεί την επιστημονική κοινότητα ως φαρμακευτικό φυτό με εξαιρετικές προοπτικές. Έχουν προσδιοριστεί και απομονωθεί εκατοντάδες βιοδραστικές ουσίες, όπως παράγωγα καφεϊκού οξέος, αλκαμίδες και πολυσακχαρίτες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις φαρμακευτικές ιδιότητες της εχινάκειας και συνιστούν το βιοδραστικό της προφίλ. Ωστόσο, μέχρι τώρα δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως ο τρόπος που επιδρούν οι περιβαλλοντικοί παράγοντες στη σύνθεση των προαναφερθεισών ουσιών, καθώς και τα φυτικά τμήματα στα οποία τα βιοενεργά συστατικά παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα. Γενικά, για την καλλιέργεια των φαρμακευτικών φυτών δεν έχουν προσδιοριστεί σαφή καλλιεργητικά πρωτόκολλα που συμβάλλουν στη μεγιστοποίηση των αποδόσεων και στη βελτιστοποίηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των παραγόμενων προϊόντων. Αντίστοιχο

μοτίβο παρατηρείται και στο φυτό της εχινάκειας, για το οποίο δεν έχουν καταγραφεί λεπτομερείς οδηγίες καλλιεργητικών μέτρων που ενισχύουν την παραγωγή της.

Σήμερα τα διάφορα είδη εχινάκειας, με κυριότερο *Echinacea purpurea* (L.), αξιοποιούνται στη φαρμακοβιομηχανία για την παρασκευή διατροφικών συμπληρωμάτων με ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες. Ωστόσο, η πληθώρα των συστατικών του, εκ των οποίων κάποια χαρακτηρίζονται από αντιμυκητιακή και αντιβακτηριακή δράση, προσφέρουν τη δυνατότητα ένταξης του φυτού για τη σύνθεση και παραγωγή εναλλακτικών σκευασμάτων. Ταυτόχρονα, οι συνεχείς μελέτες για την εύρεση των ιδανικών συνθηκών που προάγουν τη σύνθεση των ουσιών με φαρμακευτικό ενδιαφέρον πρόκειται να εξασφαλίσουν την παραγωγή βιομάζας υψηλότερου επιπέδου, τόσο σε ποσοτικό όσο και σε φυτοχημικό επίπεδο (Parsons et al., 2018).

1.4.2 Ταξινόμηση

Το φυτό της εχινάκειας ανήκει στο γένος *Echinacea*, το οποίο εντάσσεται στην οικογένεια Asteraceae (γνωστή και ως οικογένεια Compositae). Το γένος αποτελείται από 9 είδη, εκ των οποίων τα γνωστότερα είναι το *Echinacea purpurea* (L.), *Echinacea pallida* και *Echinacea angustifolia* (DC.) (Binns et al., 2002). Το είδος *Echinacea purpurea* (L.) παρουσιάζει πιο εμφανείς και διακριτές μορφολογικές και γενετικές διαφορές συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη, οι οποίες το καθιστούν σαφώς διακριτό είδος, ενώ τα είδη *Echinacea pallida* και *Echinacea angustifolia*, λόγω των έντονων ομοιοτήτων τους (DC.), συχνά συγχέονται (Flagel et al., 2002). Ωστόσο, τα συγκεκριμένα είδη εχινάκειας χρησιμοποιούνται ευρέως στη φαρμακοβιομηχανία, καθώς χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις ουσιών με φαρμακευτικό ενδιαφέρον.

Τα φυτά του γένους *Echinacea* είναι ικανά να αναπτύσσονται σε περιοχές, όπου οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν ευνοούν την επιβίωση άλλων φυτικών ειδών. Παράλληλα, εμφανίζουν εξαιρετική αντοχή σε ξηρικές συνθήκες, ενώ ταυτόχρονα πλήττονται ελάχιστα από μυκητολογικούς και εντομολογικούς εχθρούς, λόγω των αντιμικροβιακών και αντιβακτηριακών παραγόντων που διαθέτουν. Οι συγκεκριμένες ενώσεις που προσέλκυαν το ανθρώπινο ενδιαφέρον είναι και ο λόγος που η εχινάκεια καλλιεργείται ως φαρμακευτικό φυτό μέχρι και σήμερα (Kindscher, 2016). Σημειώνεται πως το πιο δημοφιλές είδος, το οποίο καλύπτει το μεγαλύτερο ποσοστό των καλλιεργούμενων εκτάσεων είναι το *Echinacea purpurea* (L.), καθώς οι ουσίες με φαρμακευτικό χαρακτήρα εντοπίζονται σε υψηλές ποσότητες σε όλα τα συγκομιζόμενα φυτικά τμήματα του φυτού (McKeown, 1999).

Η συστηματική ταξινόμηση του είδους *Echinacea purpurea* (L.), κατά Moench, παρατίθεται στον πίνακα 1.1:

Πίνακας 1.1: Συστηματική ταξινόμηση του είδους *Echinacea purpurea* (L.).

Βασίλειο	Plantae
Συνομοταξία	Spermatophyta
Ομοταξία	Magnoliophyta
Τάξη	Magnoliopsida - Dicotyledons
Υποτάξη	Asteridae
Οικογένεια	Asteraceae
Γένος	<i>Echinacea</i>
Είδος	<i>Echinacea purpurea</i> (L.)

1.4.3 Βοτανική περιγραφή

Όλα τα είδη του γένους εχινάκεια περιλαμβάνουν πολυετή, ποώδη φυτά που παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες ως προς τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η διάκρισή τους. Οι κυριότερες βοτανικές διαφορές τους εντοπίζονται στο ύψος των βλαστικών τμημάτων καθώς επίσης και στην ανάπτυξη και την εμφάνιση του ριζικού συστήματος (Kindscher, 2016). Παράλληλα, όλα τα είδη είναι μόνοικα και δικλινή και τα άνθη τους διαθέτουν τόσο θηλυκά όσο και αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα, χαρακτηριστικό που επιτρέπει την αυτογονιμοποίηση του φυτού. Το είδος *Echinacea purpurea* (L.) αυτογονιμοποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη. Γενικά, η σταυρογονιμοποίηση των ειδών εχινάκειας επιτυγχάνεται κατά κανόνα με γονιμοποίηση των ανθέων με επικονιαστικά έντομα, με αποτέλεσμα να συντελείται ενίσχυση της γενετικής τους ποικιλότητας (McKeown, 1999). Τέλος, αναφορικά με την πλοειδία των φυτών, η πλειοψηφία των ειδών είναι διπλοειδή ($n = 11$), με εξαίρεση το είδος *Echinacea pallida* και ορισμένους πληθυσμούς του *Echinacea angustifolia* (DC.), που είναι τετραπλοειδείς ($n = 22$) (McKeown, 1999; Mistríková και Vavrková, 2007).

Το είδος *Echinacea purpurea* (L.) είναι αυτό που καλλιεργείται ευρέως και πλέον σπάνια απαντάται ως αυτοφυές (Κουτσός, 2006). Λόγω της εντατικής χρήσης του στη φαρμακοβιομηχανία, κρίνεται απαραίτητη η σωστή αναγνώριση των φυτών του είδους, γεγονός που προκύπτει από τη σαφή κατανόηση και διάκριση των μορφολογικών του χαρακτηριστικών (Kindscher, 2016). Οι βοτανικοί χαρακτήρες του είδους περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω:

1.4.3.1 Βλαστός

Το ύψος του στελέχους κυμαίνεται από 60 ως 180 cm, αν και συνήθως δεν ξεπερνάει τα 120 cm. Ο βλαστός έχει σκούρο πράσινο χρώμα, το οποίο ανάλογα με το περιβάλλον ανάπτυξης και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού ενδέχεται να αποκτήσει πορφυρή απόχρωση. Ο βλαστός σχηματίζει λίγες διακλαδώσεις κοντά στην κορυφή και καλύπτεται από τριχίδια μικρού μήκους, τα οποία αυξάνουν την τραχύτητα της βλαστικής επιφάνειας. Σημειώνεται πως ο βλαστός είναι άκαμπτη κατασκευή, ιδιαίτερα σε μεγαλύτερα στάδια ανάπτυξης, με αποτέλεσμα τα φυτά να χαρακτηρίζονται από καλή στήριξη (Kindscher, 2016).

1.4.3.2 Φύλλα

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα φύλλα της εχινάκειας, τα οποία είναι τοποθετημένα κατ' εναλλαγή πάνω στο βλαστικό τμήμα και έχουν ωοειδές ως λογχοειδές σχήμα (Εικόνα 1.2). Τα φύλλα που βρίσκονται χαμηλότερα στο βλαστό είναι μεγαλύτερα, με μήκος έως 25 cm και πλάτος μέχρι και 12 cm, και έχουν πιο έντονο ωοειδές σχήμα, ενώ αυτά που βρίσκονται πιο κοντά στο άνθος είναι μικρότερα, πιο τρυφερά και λογχοειδή. Τα φύλλα είναι οξυκατάληκτα και η φυλλική περιφέρεια είναι οδοντωτή με ακανόνιστο τρόπο. Ο οδοντωτός σχηματισμός αποτελεί το βασικότερο στοιχείο που διακρίνει το συγκεκριμένο είδος από τα υπόλοιπα του γένους (Kindscher, 2016). Παράλληλα, στην πάνω επιφάνεια παρατηρούνται 3 βαθιές κύριες νευρώσεις, μία κεντρική και δύο ζεύγη πλευρικών, ενώ τόσο η επάνω όσο και η κάτω φυλλική επιφάνεια καλύπτονται από πυκνό στρώμα τριχών που προσδίδουν στο έλασμα τραχιά υφή. Η ύπαρξη των τριχιδίων πάνω στα στομάτια περιορίζει σημαντικά την απώλεια νερού από το εσωτερικό των ιστών, μειώνοντας την υδατική καταπόνηση σε περιόδους ξηρασίας (Mistriková και Vaverková, 2007).



Εικόνα 1.2: Φύλλωμα του είδους *Echinacea purpurea* (L.).

1.4.3.3 Ριζικό σύστημα

Το *Echinacea purpurea* (L.) είναι το μοναδικό είδος του γένους *Echinacea* που χαρακτηρίζεται από θυσσανώδες ριζικό σύστημα, καθώς τα υπόλοιπα είδη αναπτύσσουν μόνο μία ενιαία ρίζα. Το ριζικό σύστημα του *Echinacea purpurea* (L.) αποτελείται από μία κύρια ρίζα μεγαλύτερης διαμέτρου και περιορισμένου μήκους, η οποία διακλαδίζεται σε δευτερεύουσες ρίζες μεγαλύτερου μήκους και μικρότερης διαμέτρου (Εικόνα 1.3). Η κύρια ρίζα είναι ξυλώδης και δύσκαμπτη, προσδίδοντας καλύτερη στήριξη στο φυτό, ενώ οι διακλαδιζόμενες ρίζες είναι πιο μαλακές και εύκαμπτες, εισχωρώντας ευκολότερα στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα και αξιοποιώντας αποτελεσματικότερα τα θρεπτικά συστατικά και το διαθέσιμο νερό. Έχουν κυλινδρικό σχήμα και εξωτερικά ένα πιο σκούρο καφέ χρώμα, ενώ στο εσωτερικό εμφανίζουν μία λευκή απόχρωση (Burlou-Nagy et. al.; 2022, Keller, 2014; McKeown, 1999).



Εικόνα 1.3: Ριζικό σύστημα του είδους *Echinacea purpurea* (L.).

1.4.3.4 Άνθη

Τα άνθη της εχινάκειας σχηματίζουν κεφαλωτές ταξιανθίας, χαρακτηριστικό της οικογένειας Asteraceae. Ο κεντρικός δίσκος έχει κωνικό σχήμα και πλάτος ως 3,5cm και περιβάλλεται από βράκτια φύλλα, τα οποία στο τέλος της ωρίμανσής τους λιγνοποιούνται και γίνονται αγκαθωτά. Τα πέταλα που βρίσκονται στη βάση της ταξιανθίας έχουν μήκος 3-8cm και έντονο ροζ έως πορφυρό χρώμα (Εικόνα 1.4). Λόγω του ζωηρού χρώματός τους, η κύρια λειτουργία τους περιορίζεται στην προσέλκυση επικονιαστών (κυρίως μέλισσες και πεταλούδες) για τη γονιμοποίηση των ανθιδίων του δίσκου. Σημειώνεται πως το σύνολο της ανθοκεφαλής ενδέχεται

να αναδίνει ένα ελαφρώς γλυκό άρωμα, το οποίο καθιστά το φυτό πιο ελκυστικό στα επικονιαστικά έντομα. Τα ανθίδια του δίσκου έχουν πολύ μικρότερο μέγεθος (4.5-5.5 mm) και έχουν σωληνοειδές σχήμα. Είναι διατεταγμένα σπειροειδώς στο κέντρο της κεφαλής, έχουν κίτρινο έως καφέ χρώμα και είναι γόνιμα, παράγοντας γύρη και σπόρους. Η ανθοφορία έχει διάρκεια περίπου ένα τρίμηνο, ξεκινά τον Ιούνιο και ολοκληρώνεται τον Αύγουστο (Anderson, 2006; Burlou-Nagy et. al.; 2022, McKeown, 1999).



Εικόνα 1.4: Άνθη του είδους *Echinacea purpurea* (L.).

1.4.3.5 Σπόροι

Ο σπόρος είναι αχαίνιο με διάμετρο 4-5 mm και έχει σχεδόν ορθογώνιο σχήμα, με 4 διακριτές γωνίες. Επιπλέον, χαρακτηρίζεται από μία καφέ-γκρι απόχρωση και τραχιά επιφάνεια (Burlou-Nagy et. al., 2022; Κουτσός, 2006).

1.4.4 Αύξηση και Ανάπτυξη

1.4.4.1 Βιολογικός κύκλος

Τα αυτοφυή φυτά της εχινάκειας πολλαπλασιάζονται αποκλειστικά με σπόρο. Οι σπόροι ξεκινούν να εκβλαστάνουν νωρίς την άνοιξη (Μάρτιος-Απρίλιος), με την αύξηση της θερμοκρασίας του εδάφους. Σημειώνεται πως το είδος χαρακτηρίζεται από μικρή φυτρωτική ικανότητα και τα νεαρά φυτάρια εμφανίζουν ευαισθησία σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα σπορόφυτα που επιβιώνουν αναπτύσσονται με αργό ρυθμό, σχηματίζοντας το ριζικό σύστημα και εκπτύσσοντας τα πρώτα φύλλα. Τα φυτά μεγαλύτερης ηλικίας με εδραιωμένο ριζικό σύστημα ξεκινούν τον σχηματισμό των φύλλων τους αρκετά νωρίτερα, την περίοδο του Μαΐου, όπου η ανάπτυξη των

φύλλων επιταχύνεται. Στις αρχές του καλοκαιριού, τα φύλλα λαμβάνουν τελικό μέγεθος και μορφή, ενώ παράλληλα εκπύσσονται οι πρώτοι ανθοφόροι βλαστοί, από τους οποίους προκύπτουν τα άνθη την περίοδο του Ιουνίου. Η ανθοφορία, κατά κανόνα, διαρκεί όλο το καλοκαίρι και τον Αύγουστο τα άνθη είναι ώριμα και γονιμοποιούνται με τη βοήθεια των επικονιαστικών εντόμων. Με την ολοκλήρωση της γονιμοποίησης στις αρχές του φθινοπώρου, το άνθος αρχίζει να μαραίνεται και ξεκινάει η ωρίμαση των σπόρων. Οι σπόροι στη συνέχεια διασπείρονται, λόγω του μικρού τους μεγέθους και βάρους, με τον άνεμο όλο το φθινόπωρο και τον χειμώνα, με αποτέλεσμα να μην περιορίζονται αποκλειστικά στο περιβάλλον ανάπτυξης του μητρικού φυτού. Η ευκολία της διασποράς των σπερμάτων επιτρέπει την εξάπλωση του είδους σε ποικίλα ενδιαίτηματα και την ενίσχυση της βιοποικιλότητας της περιοχής. Ταυτόχρονα με τη διασπορά των σπόρων, πραγματοποιείται συσσώρευση και αποθήκευση θρεπτικών στοιχείων στο ριζικό σύστημα, τα οποία θα εξασφαλίζουν την αρχική ανάπτυξη των φυτών την επόμενη άνοιξη. Στο τέλος του φθινοπώρου, όλα τα βλαστικά τμήματα μαραίνονται και καταστρέφονται και το φυτό εισάγεται σε λήθαργο. Το μόνο φυτικό τμήμα που διατηρείται ζωντανό καθ' όλη τη διάρκεια του χειμώνα είναι οι ρίζες, οι οποίες εξασφαλίζουν την αναγέννηση ολόκληρου του φυτού την επόμενη άνοιξη (Kindscher, 2016). Αξίζει να αναφερθεί πως εκτός από τις μορφολογικές μεταβολές που παρατηρούνται στα διαφορετικά στάδια του βιολογικού κύκλου, εντοπίζονται και αντίστοιχες βιοχημικές διαφοροποιήσεις στα φυτικά τμήματα. Συγκεκριμένα, οι ποσότητες των βιοενεργών συστατικών ποικίλουν ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού και το είδος του φυτικού ιστού, γεγονός που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς προσφέρεται η δυνατότητα συλλογής των βιοδραστικών ουσιών όταν βρίσκονται στο μέγιστο επίπεδο (Mei et al., 2020).

1.4.4.2 Λήθαργος

Θεωρείται πως ο λήθαργος του σπόρου είναι το βασικό αίτιο που προκαλεί το περιορισμένο ποσοστό βλάστησης του είδους. Ωστόσο, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο τύπος του ληθάργου που χαρακτηρίζει το είδος ούτε και οι παράγοντες που ευνοούν τη διακοπή του και εξασφαλίζουν την εκβλάστηση. Πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν πως ο λήθαργος του είδους *Echinacea purpurea* (L.) διακόπτεται ευκολότερα συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη του γένους, γεγονός που πιθανά αποδίδεται στο περίβλημα του σπόρου που δεν επιτρέπει την είσοδο του οξυγόνου και του νερού στο έμβρυο. Έχουν προσδιοριστεί αρκετές τεχνικές, οι οποίες επιτρέπουν σε μεγάλο βαθμό το πέρας του ληθάργου με πιο επιτυχημένη τη διαδικασία pre-chilling, κατά την οποία οι σπόροι παραμένουν για ένα χρονικό διάστημα σε χαμηλές θερμοκρασίες, αντίστοιχες με εκείνες του

χειμώνα στο έδαφος, χωρίς ωστόσο να έχει καθοριστεί επακριβώς το χρονικό διάστημα και το θερμοκρασιακό εύρος που απαιτούνται για τη διακοπή του ληθάργου. Επιπλέον, σε εργαστηριακό επίπεδο, εξαιρετικά αποτελέσματα παρουσίασε και η επαγωγή της εκβλάστησης με τη χρήση γιββεριλικού οξέος και αιθυλενίου, χωρίς όμως να μπορεί να εφαρμοστεί η τεχνική σε επίπεδο αγρού. Τέλος, δεν σημειώθηκε πως η φωτοπερίοδος διαδραματίζει μεμονωμένα σημαντικό ρόλο στην έναρξη της βλάστησης, αν και με την ταυτόχρονη εφαρμογή των προαναφερθεισών μεθόδων, η άμεση επαφή του φωτός με τον σπόρο για μεγάλες χρονικές περιόδους ενίσχυσε το ποσοστό εκβλάστησης (Fariman et al., 2011; Li et al., 2007; Macchia et al., 2001; Parsons et al., 2018).

1.4.5 Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις

Αξίζει να αναφερθεί πως η μελέτη των ιδανικών εδαφοκλιματικών παραγόντων που καθορίζουν σημαντικά τόσο την ποσότητα όσο και την ποιότητα της απόδοσης των φαρμακευτικών φυτών εξακολουθεί να είναι περιορισμένη, παρά την αύξηση της δημοτικότητας και της φαρμακευτικής αξιοποίησής τους τις τελευταίες δεκαετίες. Αυτό το γεγονός περιορίζει σημαντικά την εφαρμογή σαφών καλλιεργητικών οδηγιών και πρακτικών που μπορούν να εξασφαλίσουν τη βελτίωση της παραγωγής. Τα τελευταία χρόνια, λόγω της αναγνώρισης της σημασίας των περιβαλλοντικών παραμέτρων που επηρεάζουν τις ποσότητες των ουσιών με φαρμακευτικό ενδιαφέρον, γίνονται εντατικές προσπάθειες για τον προσδιορισμό των ιδανικών συνθηκών ανάπτυξης αυτών των καλλιεργειών.

1.4.5.1 Θερμοκρασία

Αν και δεν έχει προσδιοριστεί συγκεκριμένο ιδανικό θερμοκρασιακό εύρος για την ανάπτυξη της εχινάκειας, αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία ότι η εχινάκεια αναπτύσσεται καλύτερα σε περιοχές με εύκρατο κλίμα, ενώ κάποια είδη, όπως το *Echinacea angustifolia* (DC.), ευδοκιμούν και σε βορειότερες περιοχές (Κουτσός, 2006). Ως ευνοϊκότερη θερμοκρασία περιβάλλοντος ανάπτυξης ορίζονται οι 20-30°C, με άριστη θερμοκρασία τους 25°C, όπως ισχύει για τα περισσότερα φυτικά είδη. Σημειώνεται, ωστόσο, πως έχει αυξημένη αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες καθώς είναι σε θέση να επιβιώσει κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού σε θερμοκρασία 38°C, εφόσον η καταπόνηση διατηρηθεί για περιορισμένο χρονικό διάστημα. Αναφορικά με την αντοχή του είδους *Echinacea purpurea* (L.) στο ψύχος κατά τη διάρκεια του χειμώνα, η αντοχή των σπόρων είναι σημαντικά αυξημένη εξαιτίας του ληθάργου, με αποτέλεσμα

να μην προκαλείται νέκρωση του εμβρύου σε χαμηλές θερμοκρασίες (-40°C) (Anderson, 2006). Αντίθετα, τα βλαστικά τμήματα είναι ιδιαίτερα ευπαθή στον παγετό, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει ολοκληρωτική καταστροφή του φυτού. Βέβαια, οι περιοχές όπου απαντάται η καλλιέργεια της εχινάκειας σπάνια πλήττονται από τέτοιου τύπου καιρικά φαινόμενα και, συνεπώς, τα νεαρά φυτάρια σπάνια κινδυνεύουν κατά τη διάρκεια της άνοιξης (Keller, 2014).

1.4.5.2 Υγρασία

Όλα τα είδη του γένους *Echinacea* εμφανίζουν υψηλή ανθεκτικότητα στο υδατικό στρες και εξαιρετική προσαρμοστικότητα σε περιβάλλοντα με περιορισμένη εδαφική υγρασία (Kindscher, 2006). Αναλυτικότερα για το είδος είδους *Echinacea purpurea* (L.), η αυξημένη ανθεκτικότητά του στην ξηρασία οφείλεται στο βαθύ ριζικό σύστημα που αναπτύσσεται καθώς και στο στρώμα τριχών που καλύπτει τα στομάτια των φύλλων και περιορίζει τις υδατικές απώλειες από το εσωτερικό των φυτικών ιστών. Φυσικά, παρατεταμένες περίοδοι ξηρασίας επηρεάζουν σημαντικά τόσο το σχηματισμό βιομάζας όσο και την παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων, καθώς το υδατικό στρες περιορίζει την ανάπτυξη των φυτικών τμημάτων (Zakerian et al., 2021) αλλά αυξάνει σημαντικά την ποσότητα ωφέλιμων για τον άνθρωπο συστατικών, όπως οι φαινολικές ενώσεις (παράγωγα του καφεϊκού οξέος) (Attarzadeh et al., 2020). Επομένως, η καλλιέργεια του συγκεκριμένου είδους ενδείκνυνται για περιοχές όπου η διαθεσιμότητα του αρδευτικού νερού είναι περιορισμένη και όπου η ευδοκίμηση άλλων φυτικών ειδών δεν είναι δυνατή (Heidari et al., 2019). Επιπλέον, λόγω της αυξημένης παραγωγής των δευτερογενών μεταβολιτών, που αξιοποιούνται εντατικά για τη σύνθεση φαρμακευτικών σκευασμάτων προτείνεται η στοχευμένη και σύντομη υδατική καταπόνηση σε κάποια στάδια του βιολογικού κύκλου, ώστε να μεγιστοποιηθεί η ποσότητα των ουσιών ενδιαφέροντος (Kindscher, 2016). Αναφέρεται, φυσικά, πως κατά τον πρώτο χρόνο ανάπτυξης των φυταρίων πρέπει να πραγματοποιούνται τακτικές αρδεύσεις ώστε να εξασφαλισθεί η επιτυχής εγκατάσταση της καλλιέργειας και ο ικανοποιητικός σχηματισμός του ριζικού συστήματος.

1.4.5.3 Εδαφικές απαιτήσεις

Σε γενικά πλαίσια, η εχινάκεια έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται και να επιβιώνει σε ποικίλους εδαφικούς τύπους. Αναφέρεται στην παγκόσμια βιβλιογραφία πως το είδος *Echinacea purpurea* (L.) ως αυτοφυές έχει εντοπιστεί σε άγονες, ξηρές περιοχές, καθώς και σε βραχώδη περιβάλλοντα (Anderson, 2006). Ωστόσο, παρά την υψηλή προσαρμοστικότητά της, κρίνεται απαραίτητο να

επιλέγονται ευνοϊκά γεωγραφικά σημεία για την εκτεταμένη καλλιέργεια της εχινάκειας, τα οποία θα εξασφαλίσουν την επιθυμητή ποσότητα και ποιότητα της βιομάζας. Συνεπώς, είναι σημαντικό να καλλιεργείται σε καλά αποστραγγιζόμενα εδάφη, τα οποία επιτρέπουν τη διέλευση του αέρα μεταξύ των εδαφικών πόρων και τον αερισμό του εδάφους. Επομένως, αναφορικά με τη μηχανική σύσταση του εδαφικού τύπου, ενδείκνυνται αμμώδη ή αμμοπηλώδη εδάφη που χαρακτηρίζονται από καλή αποστράγγιση. Σημειώνεται πως το *Echinacea purpurea* (L.) ευδοκμεί και σε αργιλώδη εδάφη που συγκρατούν μεγαλύτερες ποσότητες νερού, αλλά παρουσιάζει καλύτερη ανάπτυξη σε συνθήκες μειωμένης υγρασίας (Kindscher, 2016).

Οι απαιτήσεις της εχινάκειας περιορίζονται, κατά κύριο λόγο, στην τιμή του pH του εδάφους ανάπτυξής της. Η ιδανική τιμή pH για το είδος *Echinacea purpurea* (L.) κυμαίνεται από 6,0 ως 7,0 και η εκμετάλλευση όξινων εδαφών για την καλλιέργειά της δεν συστήνεται (Kindscher, 2016). Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες, η ανάπτυξη των φυτών σε συνθήκες χαμηλού pH δεν εμποδίζει την συνολική αύξησή τους αλλά παρεμποδίζει τη σύνθεση βιοενεργών ουσιών, όπως το κιχωρικό οξύ, μειώνοντας την τελική περιεκτικότητα των ιστών σε αυτές τις ενώσεις και υποβαθμίζοντας τη φαρμακευτική αξία του φυτού. Επομένως, ο προσδιορισμός του pH του εδάφους πριν την εγκατάσταση θεωρείται θεμελιώδης (Xu et al., 2022).

Αναφορικά με τη θρεπτική κατάσταση του εδάφους, η εχινάκεια χαρακτηρίζεται από χαμηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά στοιχεία και αναπτύσσεται εξαιρετικά σε εδάφη μέτριας γονιμότητας, χωρίς προσθήκη λιπάσματος. Αντίθετα, η εφαρμογή ενός προγράμματος λίπανσης σε εδάφη που καλύπτουν τις ανάγκες σε μακροστοιχεία ενδέχεται να υποβαθμίσει την ποιότητα της τελικής παραγωγής, καθώς αποτρέπει τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών που αξιοποιούνται στη βιομηχανία φαρμάκων. Συγκεκριμένα, σε πειράματα των Soltanbeigi και Maral (2022), τόσο η βασική λίπανση αζώτου όσο και η διαφυλλική εφαρμογή του μείωσαν την ποσότητα των ουσιών ενδιαφέροντος στο παραγόμενο αιθέριο έλαιο της εχινάκειας. Αντίστοιχα αποτελέσματα σημειώθηκαν και σε πειράματα των Zheng et al. (2006), όπου το πλεονάζον άζωτο περιόρισε την περιεκτικότητα του κιχωρικού οξέος και της εχινakoσίδης στους ριζικούς ιστούς του είδους *Echinacea purpurea* (L.).

Φυσικά, αναφέρεται πως η ποσότητα των θρεπτικών θα πρέπει να είναι επαρκής στα πρώτα στάδια βιολογικού κύκλου του φυτού και, επομένως, κατά τον πρώτο χρόνο ανάπτυξης των σποροφύτων συστήνεται μερική εφαρμογή αζώτου, ειδικά όταν η εδαφολογική ανάλυση υποδεικνύει

ανεπαρκείς ποσότητες στην περιοχή (Κουτσός, 2006). Ως εκ τούτου, προτείνεται η εχινάκεια να καλλιεργείται σε μέσης γονιμότητας εδάφη, τα οποία μπορούν να υποστηρίξουν τις ετήσιες ανάγκες τις καλλιέργειας, χωρίς επιπρόσθετη λιπαντική παρέμβαση (Bonomelli et al., 2005).

Τέλος, όλα τα φυτά του γένους *Echinacea* εμφανίζουν περιορισμένη αντοχή στο στρες αλατότητας, καθώς ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα καταπόνησης τα φυτά εμφανίζουν μειωμένη φωτοσυνθετική ικανότητα και περιορισμένη βλαστική έκπτυξη και ανάπτυξη. Αναφέρεται πως το είδος *Echinacea purpurea* (L.) εμφανίζει μεγαλύτερη ανεκτικότητα στην ύπαρξη αλάτων στο εδαφικό διάλυμα συγκριτικά με τα υπόλοιπα φυτικά είδη (Sabra et al., 2012), χωρίς αυτό να συνεπάγεται πως η καλλιέργειά της μπορεί να πραγματοποιείται εντατικά σε αλατούχα εδάφη. Ενδιαφέρον, βέβαια, παρουσιάζει η επίδραση των αλάτων στη σύσταση του αιθέριου ελαίου και στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών στο εσωτερικό των ιστών. Η καταπόνηση αλατότητας σε χαμηλό και μέτριο επίπεδο επάγει την παραγωγή των φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών που υπάρχουν στο ριζικό σύστημα του φυτού καθώς επίσης και την παραγωγή τερπενίων, όπως το α-πινένιο και το β-καρνοφυλλένιο, που υπάρχουν στο εκχύλισμα του αιθέριου ελαίου. Συνεπώς, η αντοχή διαφόρων γονοτύπων *Echinacea purpurea* (L.) στην αλατότητα αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης, με στόχο την εύρεση του τύπου και της συγκέντρωσης του αλατούχου διαλύματος που επηρεάζει θετικά τη σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών και δεν περιορίζει σε σημαντικό βαθμό την παραγόμενη βιομάζα. Απώτερο σκοπό του συγκεκριμένου εγχειρήματος αποτελεί ο προσδιορισμός της δυνατότητας της καλλιέργειας εχινάκειας σε περιοχές με αλατούχα εδάφη (Ahmadi et al., 2022, Ahmadi et al., 2023).

1.4.5.4 Φωτοπεριοδισμός

Όλα τα είδη της εχινάκειας είναι φυτά ουδέτερα ως προς την φωτοπερίοδο, αλλά αναπτύσσονται καλύτερα σε συνθήκες ενδιάμεσης έως μακράς φωτοπερίοδου. Συγκεκριμένα, απαιτούν τουλάχιστον 12h ηλιακού φωτός ημερησίως, προκειμένου η ανάπτυξή τους να είναι η μέγιστη δυνατή. Το είδος *Echinacea purpurea* (L.) λόγω της μορφολογίας των φύλλων του (μεγαλύτερο μήκος και πλάτος) είναι καλύτερα προσαρμοσμένο στην έλλειψη ηλιοφάνειας και μπορεί να αναπτυχθεί ικανοποιητικά και σε σκιερά ενδιαιτήματα (Kindscher, 2016). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η ιδανική διάρκεια φωτός, που ευνοεί την πλήρη αύξηση των φυτών, ορίζεται στις 12-14h (Runkle et al., 2001). Παράλληλα, εξετάστηκε η επιρροή της άμεσης επαφής της ηλιακής ακτινοβολίας με το ριζικό σύστημα της εχινάκειας και διαπιστώθηκε ότι η έκθεση των ριζών

νεαρών φυταρίων στο φως είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή παραγώγων του καφεϊκού οξέος, και ειδικότερα καφταρικού και κιχωρικού οξέος, που χαρακτηρίζονται από ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες. Αντίστοιχη ήταν η επίδραση του φωτός στα βλαστικά τμήματα και στα φύλλα των φυτών, όπου εκτεταμένες περιόδους φωτός προήγαγαν τη σύνθεση αλκαμιδών και εχινakoσίδης (Aşikgöz et al., 2018). Τα συγκεκριμένα ευρήματα προτείνουν μια εναλλακτική μέθοδο παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών σε ευρεία κλίμακα από το ριζικό σύστημα και τα στελέχη, η οποία χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη σταθερότητα. Ωστόσο, είναι αναγκαία η περαιτέρω μελέτη για την πλήρη κατανόηση του φωτορυθμιζόμενου δευτερογενούς μεταβολισμού (Abbasi et al., 2007).

1.4.6 Καλλιεργητικές τεχνικές

1.4.6.1 Λίπανση

Όπως προαναφέρθηκε, οι λιπαντικές ανάγκες της εχινάκειας είναι εξαιρετικά περιορισμένες. Αν και δεν υπάρχουν σαφή καλλιεργητικά πρωτόκολλα που να καταγράφουν τις συνιστώμενες ποσότητες λιπάσματος που μεγιστοποιούν ποιοτικά και ποσοτικά την καλλιέργεια, έχει αποδειχθεί ότι περιορισμένες ποσότητες λιπάσματος ενισχύουν την παραγόμενη βιομάζα, χωρίς να υποβαθμίζουν το φυτοχημικό προφίλ. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως η εφαρμογή 4,4 kg/στρ. αζώτου τον πρώτο χρόνο ανάπτυξης συνέβαλε σημαντικά στην έκπτυξη νέων βλαστών και φύλλων, ενώ τα επόμενα χρόνια τα 2 kg/στρ. N ήταν επαρκή. Το ίδιο ισχύει και για την εφαρμογή καλίου και φωσφόρου, όπου τον πρώτο χρόνο ανάπτυξης απαιτείται εφαρμογή 4 kg/στρ. και 2 kg/στρ. αντίστοιχα (Drutu et al., 2002; Ghatas και Abdallah, 2016), ενώ τα επόμενα χρόνια και αυτές οι ποσότητες μειώνονται. Σημειώνεται πως είναι προτιμότερο η λίπανση να πραγματοποιείται την περίοδο του Απριλίου-Μαΐου, όταν η βλαστική ανάπτυξη είναι εντονότερη και ταχύτερη. Εξίσου αποτελεσματική ήταν και η μεμονωμένη εφαρμογή οργανικής ουσίας σε ποσότητα έως και 4 kg/στρ., η οποία μάλιστα συνέβαλε στην αύξηση της ποσότητας των φλαβονοειδών και των φαινολικών ενώσεων σε όλα τα φυτικά τμήματα. Συνεπώς, θεωρείται πως η χρήση οργανικής ουσίας είναι πιο ωφέλιμη συγκριτικά με τη χημική λίπανση και θα πρέπει να προτιμάται (Drutu et al., 2013).

1.4.6.2 Άρδευση

Η καλλιέργεια της εχινάκειας είναι δυνατή σε περιοχές όπου το αρδευτικό νερό είναι ελλιπές, λόγω της αυξημένης αντοχής της σε συνθήκες ξηρασίας. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο

περιορισμένος εφοδιασμός με νερό περιορίζει σημαντικά την παραγόμενη βιομάζα, αλλά συμβάλλει στην αυξημένη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών. Ωστόσο, επειδή το παρατεταμένο υδατικό στρες επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή των ουσιών ενδιαφέροντος, προτείνεται άρδευση την περίοδο του θέρους. Παράλληλα, σε περιπτώσεις όπου πραγματοποιείται λίπανση την περίοδο της άνοιξης, ιδιαίτερα εφαρμογή αζωτούχων λιπασμάτων, θα πρέπει να έχει εγκατασταθεί αρδευτικό σύστημα, ώστε να εξασφαλίζεται η ευχερής απορρόφηση των διαθέσιμων θρεπτικών στοιχείων. Στην περίπτωση που πραγματοποιείται και άρδευση και λίπανση, σημειώνεται πως μπορεί να μειωθεί και η ποσότητα του αρδευτικού νερού αλλά και η ποσότητα του λιπάσματος, καθώς το άζωτο περιορίζει τις δυσμενείς επιπτώσεις του υδατικού στρες και το νερό βελτιώνει την απορρόφηση του αζώτου. Με αυτόν τον τρόπο, γίνεται μια πιο ορθολογική και οικολογική χρήση των διαθέσιμων πόρων, εξασφαλίζοντας την καλύτερη δυνατή ποιότητα και ποσότητα της παραγόμενης βιομάζας (Sheshbahreh et al., 2018; Sheshbahreh et al., 2019).

1.4.6.3 Σπορά

Όταν η σπορά γίνεται κατευθείαν στο χωράφι, δεν απαιτείται κάποια προεργασία του σπόρου για τη διακοπή του ληθάργου και για την αύξηση της βλαστικότητας. Ωστόσο, θα πρέπει να γίνεται στο τέλος του φθινοπώρου, ώστε οι σπόροι να εκτεθούν στο κρύο και στην υγρασία την περίοδο του χειμώνα και να σπάσει φυσικά ο λήθαργος. Πριν τη σπορά, είναι καλό να πραγματοποιείται αναμόχλευση, ώστε οι κόκκοι του εδάφους να βρίσκονται σε καλύτερη επαφή με τον σπόρο. Η σπορά μπορεί να γίνει είτε μηχανικά είτε πεταχτά, αλλά είναι απαραίτητο οι σπόροι να μη βρίσκονται σε μεγάλο βάθος, καθώς μειώνεται σε μεγάλο βαθμό το ποσοστό βλάστησης. Πέντε ημέρες μετά το πέρας του ληθάργου, εφόσον το έδαφος διαθέτει την απαραίτητη υγρασία και ο σπόρος έρχεται σε άμεση επαφή με το ηλιακό φως, ξεκινάει η εκβλάστηση. Αντίθετα, εάν ο σπόρος τοποθετηθεί πολύ βαθιά ή το έδαφος είναι ξηρό, η εκβλάστηση ενδέχεται να καθυστερήσει μέχρι και 4 εβδομάδες. Εναλλακτικά, στην περίπτωση που δεν επιλεχθεί η απευθείας σπορά, ώστε να ενισχυθεί η ικανότητα βλάστησης σε ελεγχόμενες συνθήκες, μπορεί να πραγματοποιηθεί αρχική σπορά σε γλάστρες και μεταφύτευση στο χωράφι τον Μάιο. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία είναι πιο κοστοβόρα και είναι δύσκολο να εξασφαλισθεί η σωστή μεταφορά στον αγρό, χωρίς να προκληθούν πληγές στο ριζικό σύστημα (Kindscher, 2016).

1.4.6.4 Διαχείριση ζιζανίων

Τα ζιζάνια αποτελούν βασικό πρόβλημα για την καλλιέργεια της εχινάκειας, ιδιαίτερα όταν τα φυτά βρίσκονται στα πρώτα στάδια ανάπτυξης. Είναι απαραίτητο να πραγματοποιούνται τακτικοί έλεγχοι, ώστε να απομακρύνονται χειρωνακτικά. Η χρήση μηχανικών μέσων για την απομάκρυνση των ζιζανίων δεν ενδείκνυται, καθώς ο βλαστός είναι ευαίσθητος και λεπτός και μπορεί να σπάσει εύκολα. Σημειώνεται πως η αρχική σπορά σε γλάστρες και η μετέπειτα μεταφύτευση στον αγρό προστατεύει αποτελεσματικότερα τα νεαρά φυτάρια από τα ζιζάνια, καθώς έχουν ήδη σχηματίσει το βλαστικό τμήμα και το ριζικό τους σύστημα. Τέλος, ακόμη και όταν τα φυτά είναι μεγάλης ηλικίας, είναι αναγκαία η καταστροφή των ζιζανίων καθώς η ύπαρξή τους στο περιβάλλον ανάπτυξης ενδέχεται να μεταβάλει τη χημική σύσταση των υπέργειων οργάνων, υποβαθμίζοντας την ποιότητα του βιοχημικού προφίλ. Αντίστοιχη αλλοίωση παρατηρείται και στις ουσίες που συντίθενται στην περιοχή των ριζών, αλλά σε μικρότερο βαθμό (Kindscher, 2016).

1.4.6.5 Εχθροί και Ασθένειες

Παρόλο που στο παρελθόν τα είδη του γένους *Echinacea* εμφάνιζαν ανθεκτικότητες σε διάφορα παθογόνα και έντομα, η συνεχής καλλιέργειά τους είχε ως αποτέλεσμα το «σπάσιμο» των ανθεκτικότητων και την εμφάνιση ασθενειών. Τα κύρια παθογόνα που προσβάλλουν την εχινάκεια ανήκουν στους μύκητες και στους ιούς, με βασικότερους τον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς και τον ιό του μωσαϊκού της ντομάτας (Dikova και Djourmanski, 2019). Σημαντικά προβλήματα προκαλούν και οι προσβολές από το μύκητα *Fusarium oxysporum*, καθώς ο μαρασμός των φύλλων και στη συνέχεια του βλαστού ακολουθείται από ολική νέκρωση των ιστών (Kindscher, 2016). Σε περιβάλλοντα με υψηλή υγρασία, εφόσον δημιουργηθούν πληγές στο ριζικό σύστημα, είναι πιθανή η μόλυνση των ριζών από παθογόνα εδάφους, με τελικό αποτέλεσμα το σάπισμα του ριζικού συστήματος και τη νέκρωση των φυτών. Αναφορικά με τους εντομολογικούς εχθρούς, το κυριότερο είδος που προσβάλλει το είδος *Echinacea purpurea* (L.) είναι το λεπιδόπτερο *Homoesa electella*. Τα ενήλικα θηλυκά εναποθέτουν τα ωά στα βράκτια φύλλα των αναπτυσσόμενων ανθέων. Στη συνέχεια, οι προνύμφες τρέφονται με τη γύρη και τα νεαρά άνθη, καταστρέφοντας τις ανθοκεφαλές και δημιουργώντας πληγές, οι οποίες καθιστούν το φυτό ευάλωτο σε προσβολές από μύκητες (Letchamo et al., 2002).

1.4.7 Φυτοχημικό προφίλ του είδους *Echinacea purpurea* (L.)

1.4.7.1 Σύνολο βιοδραστικών ενώσεων

Όπως προαναφέρθηκε, η εχινάκεια αποτελεί ένα από τα δημοφιλέστερα φαρμακευτικά φυτά σε παγκόσμιο επίπεδο, ενώ το πλέον διαδεδομένο είδος που καταλαμβάνει την πλειονότητα των καλλιεργούμενων εκτάσεων εχινάκειας είναι το *Echinacea purpurea* (L.). Το σύνολο των βιοενεργών ενώσεων του επιτρέπει την αξιοποίηση όλων των φυτικών τμημάτων από τη φαρμακοβιομηχανία, με σκοπό τη σύνθεση σκευασμάτων, όπως εκχυλίσματα και διατροφικά συμπληρώματα που εμφανίζουν ανοσοδιεγερτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Παράλληλα, η συνεχής απομόνωση και μελέτη των συστατικών της εχινάκειας προτείνουν καινοτόμες κατευθύνσεις στην ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών προϊόντων που θα στοχεύουν στην αντιμετώπιση ιατρικών παθήσεων σε μεγαλύτερη κλίμακα.

Έχουν διεξαχθεί σημαντικές πειραματικές έρευνες με σκοπό τη σκιαγράφηση του φυτοχημικού προφίλ που διαθέτει το *Echinacea purpurea* (L.). Μέχρι σήμερα, έχουν προσδιοριστεί σε μεγάλο ποσοστό το είδος και η ποσότητα των ενώσεων που εντοπίζονται στα διαφορετικά φυτικά τμήματα, καθώς επίσης και τα φαρμακευτικά τους οφέλη. Οι κυριότερες ενώσεις που προσδίδουν στην εχινάκεια τη φαρμακευτική της αξία ανήκουν στην ομάδα των αλκαμιδών, των πολυσακχαριτών, των γλυκοπρωτεϊνών, των φλαβονοειδών και των φαινολικών (Burlou-Nagy et al., 2022). Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά τα σημαντικότερα στοιχεία που εμπεριέχονται στα διαφορετικά τμήματα του φυτού *Echinacea purpurea* (L.), καθώς και οι φαρμακευτικές ιδιότητες αυτών:

- Αλκαμίδες (Alkamides): Πρόκειται για λιπόφιλες ενώσεις, οι οποίες εντοπίζονται σε μεγάλες ποσότητες στα φυτά της οικογένειας Asteraceae, ιδιαίτερα στα είδη του γένους *Echinacea*. Χαρακτηρίζονται από απλή χημική δομή και η έντονη φαρμακευτική τους αξία έχει οδηγήσει σε εντατικές προσπάθειες συστηματοποίησης της χημείας και της λειτουργικότητάς τους, με σκοπό την ένταξή τους σε θεραπευτικά προγράμματα που βασίζονται στις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Παρουσιάζουν αξιόλογο φαρμακευτικό προφίλ, καθώς χαρακτηρίζονται από ανοσοδιεγερτικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, ενώ μελέτες υποδεικνύουν την ύπαρξη αντιικών, αντιβακτηριακών και αντικαρκινικών λειτουργιών, οι οποίες διευρύνουν σημαντικά το φαρμακευτικό φάσμα εφαρμογής τους (Rios και Olivo, 2014). Σε φυτικό επίπεδο, οι αλκαμίδες σχετίζονται με την αύξηση του κύριου ριζικού συστήματος και με την επιμήκυνση των ριζικών

τριχιδίων. Η παραγωγή τους ως δευτερογενών μεταβολιτών σε μεγαλύτερη κλίμακα συνδέεται με την επίδραση καταπόνησης, και ιδιαίτερα του υδατικού στρες, καθώς σε τέτοια περίπτωση απαιτείται η καλύτερη εκμετάλλευση των περιορισμένων υδατικών πόρων (Elufioye et al., 2020). Ειδικότερα, για το είδος *Echinacea purpurea* (L.), οι αλκαμίδες βρίσκονται σε υψηλές ποσότητες στο ριζικό σύστημα, ενώ σε χαμηλότερα ποσοστά εντοπίζονται και στο υπέργειο μέρος. Σημειώνεται πως οι ποσότητες των αλκαμιδών στα στελέχη και στα φύλλα είναι αντιστρόφως ανάλογες με την ηλικία του φυτού, ενώ μεγιστοποιούνται στο ριζικό σύστημα στο 2^ο έτος. Οι βασικότερες αλκαμίδες που έχουν προσδιοριστεί στην εχινάκεια μέχρι σήμερα είναι οι N-αλκυλαμίδες, με κυριότερες τα ισομερή ισοβουτυλαμίδια δώδεκα-2E,4E-διένιο οξέα (Woelkart και Bauer, 2007).

- Πολυσακχαρίτες (Polysacharides): Παρόλο που οι πολυσακχαρίτες που προέρχονται από το φυτό εχινάκειας προσφέρουν δυνατότητες φαρμακευτικής αξιοποίησης, η ένταξή τους σε σκευάσματα είναι περιορισμένη, λόγω της δυσκολίας που παρουσιάζει η απομόνωσή τους και η μελέτη τους (Melchart et al., 2002). Το φαρμακευτικό ενδιαφέρον τους συγκεντρώνεται κυρίως στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν χημικές ουσίες που ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις του οργανισμού και ενισχύουν την ισορροπημένη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Gupta et al., 2023). Αντίστοιχα με τις αλκαμίδες, οι πολυσακχαρίτες ενισχύουν την παραγωγή μακροφάγων λευκοκυττάρων, χαρακτηριστικό που υπογραμμίζει την ανοσοδιεγερτική τους ιδιότητα. Σημειώνεται πως το υψηλότερο ποσοστό των πολυσακχαριτών έχει εντοπισθεί στην περιοχή των ριζών, ενώ μικρότερες ποσότητες απαντώνται και στους ιστούς του υπέργειου τμήματος (Yang et al., 2018). Περαιτέρω μελέτες που θα συμβάλουν στην καλύτερη εκμετάλλευση των πολυσακχαριτών του είδους *Echinacea purpurea* (L.) κρίνονται απαραίτητες, καθώς θεωρείται πως μπορεί να συμπεριληφθεί εκτεταμένα σε συμπληρώματα διατροφής με αντιοξειδωτική δράση (Hou et al., 2020).

- Γλυκοπρωτεΐνες (Glycoproteins): Οι γλυκοπρωτεΐνες που προέρχονται από το φυτό της εχινάκειας χαρακτηρίζονται από ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες, οι οποίες συμβάλλουν στη ρύθμιση της ανοσοποιητικής ισορροπίας και εξασφαλίζουν την ορθή ανοσοποιητική απόκριση του οργανισμού σε περίπτωση μόλυνσης. Παρά τον φαρμακευτικό χαρακτήρα τους, δεν αποτελούν τον κύριο μεταβολίτη που απομονώνεται από τα είδη του γένους *Echinacea*. Όπως ισχύει και για τους πολυσακχαρίτες, η πλειονότητα των γλυκοπρωτεϊνών εντοπίζεται στους ιστούς των ριζών

και δευτερευόντως στα βλαστικά μέρη και στα άνθη. Οι γλυκοπρωτεΐνες παρουσιάζουν εξαιρετική ετερογένεια, ωστόσο η κατηγορία με την ουσιαστικότερη ανοσοδιεγερτική δράση που απαντάται στην echinacea είναι οι αραβινογαλακτάνες (arabinogalactan-proteins, AGPs), οι οποίες παράγονται σε υψηλές ποσότητες και σε άλλα φυτικά είδη. Αναφορικά με τη δράση τους, έχει αποδειχθεί πως επάγουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων λευκοκυττάρων σε περίπτωση μόλυνσης (Bergeron και Gafner, 2007; Leszczuk et al., 2023). Ταυτόχρονα, έχει προσδιοριστεί και η echinasίνη, μία γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται αποκλειστικά στα είδη echinaceas και διαθέτει αντιικά στοιχεία, ενισχύοντας τη φαγοκυτταρική απόκριση και αυξάνοντας την παραγωγή ιντερλευκινών (Bodinet και Beuscher., 1991).

- Φλαβονοειδή (Flavonoids): Τα φλαβονοειδή μελετώνται εντατικά τα τελευταία χρόνια, λόγω της εξαιρετικά ωφέλιμης επίδρασής τους στην ανθρώπινη υγεία. Πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά, αποτρέποντας την οξειδωτική βλάβη του DNA που προκαλείται από τις ενεργές μορφές οξυγόνου (Georgieva et al., 2014). Τα φλαβονοειδή παράγονται, κατά κύριο λόγο, στα άνθη, γεγονός που δυσχεραίνει την εξαγωγή και τη μελέτη τους από το είδος *Echinacea purpurea* (L.), όχι μόνο επειδή εμφανίζει καθυστέρηση στην άνθιση κατά τα πρώτα χρόνια ανάπτυξής του, αλλά και επειδή σε καταστάσεις καταπόνησης μειώνεται αισθητά ο αριθμός των ανθέων που σχηματίζονται. Σημειώνεται ωστόσο πως η ποσότητα των φλαβονοειδών δεν επηρεάζεται από την ηλικία του φυτού και από τις συνθήκες ανάπτυξής του, εφόσον αυτές είναι ευνοϊκές. Συνεπώς, φαίνεται πως η παραγωγή των φλαβονοειδών από καλλιέργεια echinaceas παρουσιάζει σταθερότητα σε βάθος χρόνου, συγκριτικά με τις υπόλοιπες βιοενεργές ουσίες (Seemannova et al., 2006; Kurkin et al., 2011). Τα φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί σε μεγαλύτερη κλίμακα από φυτά *Echinacea purpurea* (L.) είναι, κατά αύξουσα σειρά, η ρουτίνη, η κερσετίνη και η καμφερόλη (Kurkin et al., 2011).

- Φαινολικές ενώσεις (Phenolic compounds): Τα φαινολικά συστατικά είναι ουσίες με υψηλή φαρμακευτική αξία και σε αυτά οφείλεται η μεγάλη δημοτικότητα της echinaceas. Ειδικότερα, οι υψηλές ποσότητες των παραγώγων του καφεϊκού οξέος (Caffeic Acid Derivatives, CADs), που συντίθενται στο *Echinacea purpurea* (L.), είναι ο πρωταρχικός λόγος της εντατικής καλλιέργειάς του για φαρμακευτική αξιοποίηση. Αξίζει να αναφερθεί πως οι προαναφερθείσες ενώσεις διακρίνουν το συγκεκριμένο είδος από τα υπόλοιπα του γένους, καθώς παράγονται σε μεγάλο βαθμό σε όλα τα φυτικά τμήματα του φυτού, με αποτέλεσμα να καθίστανται όλοι οι ιστοί

κατάλληλοι για απομόνωση παραγώγων του καφεϊκού οξέος. Πιο αναλυτικά, τα κυριότερα οξέα που εντοπίζονται στο είδος *Echinacea purpurea* (L.) είναι το καφταρικό οξύ (caftaric acid), το κιχορικό οξύ (cichoric acid), το καφεϊκό οξύ (caffeic acid), το χλωρογενικό οξύ (chlorogenic acid), η κυναρίνη (cynarin) και η εχίνακοσίδη (echinacoside).

Φυσικά, η διαθεσιμότητα των παραπάνω ουσιών δεν είναι η ίδια σε όλα τα φυτικά τμήματα και, μάλιστα, μεταβάλλεται ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης, την ηλικία του φυτού καθώς και τους εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν την καλλιέργεια καθ' όλη τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου. Σχετικά με την ποσότητα των ουσιών στα φυτικά μέρη, η μέγιστη ποσότητα του κιχορικού οξέος έχει εντοπιστεί στο ριζικό σύστημα, ενώ υψηλές ποσότητες βρίσκονται σε νεαρά βλαστικά τμήματα και στον κύριο βλαστό. Ταυτόχρονα, το καφταρικό οξύ περιορίζεται στα φύλλα, ενώ η εχίνακοσίδη βρίσκεται σε μικρές ποσότητες στα στελέχη και στα ριζίδια. Τέλος, το χλωρογενικό οξύ συντίθεται περισσότερο στα φύλλα, ενώ η κυναρίνη στο ριζικό σύστημα (Tomsen, 2018; Ahmadi et al., 2024).

Στη συνέχεια, είναι σημαντικό να καταγραφεί πως για τις φαινολικές ουσίες που βρίσκονται στην περιοχή των ριζών, οι μεγαλύτερες ποσότητες βρίσκονται σε φυτά μικρότερης ηλικίας, σε συμφωνία με αυτές που παράγονται στα βλαστικά τμήματα. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως η ποσότητα των παραγώγων καφεϊκού οξέος μεγιστοποιείται την περίοδο του Αυγούστου, όταν η άνθιση είναι πλήρης. Ταυτόχρονα, έχει παρατηρηθεί σε ποικίλα πειράματα πως οι ποσότητες των φαινολικών ενώσεων, ως δευτερογενών μεταβολιτών, αυξάνονται ιδιαίτερα, όταν το φυτό υφίσταται υδατική καταπόνηση. Πιο ειδικά, η ποσότητα του κιχορικού και του καφεϊκού οξέος αυξήθηκε σε μεγάλο βαθμό στο ριζικό σύστημα ύστερα από μία περίοδο ξηρασίας. Οι υψηλές θερμοκρασίες του καλοκαιριού και οι περιορισμένοι υδατικοί πόροι ενισχύουν την παραγωγή τους την περίοδο του θέρους, με αποτέλεσμα τον Αύγουστο οι ποσότητες στο εσωτερικό των ιστών να μεγιστοποιούνται. Για τους παραπάνω λόγους, προτείνεται η συγκομιδή των φυτικών τμημάτων εκείνο το χρονικό διάστημα, εφόσον στόχο αποτελεί η απομόνωση των παραγώγων του καφεϊκού οξέος, και ιδιαιτέρως του κιχορικού οξέος (Freund Saxhaug et al., 2023; Mei et al., 2020).

Σημειώνεται πως μεταξύ των παραπάνω ενώσεων, το κιχορικό οξύ βρίσκεται σε μεγαλύτερη επάρκεια στο συγκεκριμένο είδος, ενώ παράλληλα, υψηλότερης φαρμακευτικής αξίας θεωρούνται το κιχορικό οξύ και η εχίνακοσίδη (Lin et al., 2023). Η φαρμακευτική αξία των παραπάνω ουσιών εντοπίζεται στην ικανότητά τους να ενισχύουν τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα (Ahmadi et al.,

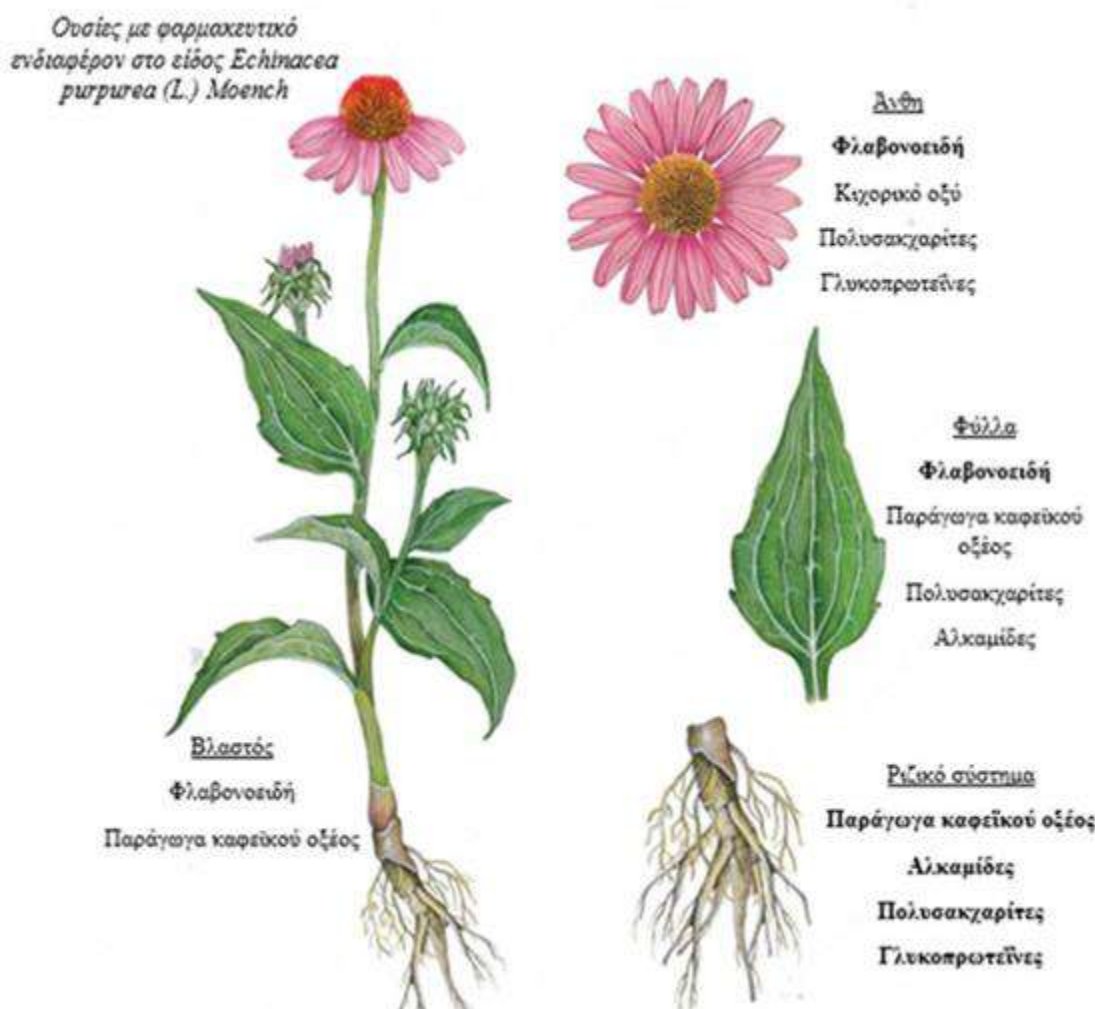
2024). Σύμφωνα με ιατρικές δοκιμές, το κιχορικό οξύ είναι σε θέση να αναστέλλει μερικώς την αναπαραγωγή του ιού HIV-1 στον οργανισμό, με αποτέλεσμα να λειτουργεί συμπληρωματικά στην παρεμπόδιση εμφάνισης του AIDS στα οροθετικά άτομα (Kim et al., 2000). Επιπλέον, η εχινakoσίδα διαθέτει ανοσοδιεγερτικούς παράγοντες, ενώ το χλωρογενικό οξύ αξιοποιείται σε φαρμακευτικά συμπληρώματα διαβητικών ατόμων, καθώς μειώνει την απορρόφηση της γλυκόζης. Τέλος, στην εχινάκεια έχουν εντοπιστεί σε μικρότερο βαθμό αντικαρκινικοί και αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Σημειώνεται πως σήμερα η καλλιέργεια της εχινάκειας έχει ως πρωταρχικό στόχο την παραγωγή κιχορικού οξέος και εχινakoσίδης, καθώς αυτά τα δύο συστατικά χρησιμοποιούνται ευρύτερα στη φαρμακοβιομηχανία και συμπεριλαμβάνονται σε διατροφικά συμπληρώματα (Ahmadi et al., 2024).

Πίνακας 1.2: Φαρμακευτικές ιδιότητες των βιοενεργών ενώσεων του είδους *Echinacea purpurea* (L.).

Ουσία	Φαρμακευτική δράση
Αλκαμίδες	Αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντιβακτηριακή, αντικαρκινική, αντιακή
Πολυσακχαρίτες	Ανοσοδιεγερτική
Γλυκοπρωτεΐνες	Ανοσοδιεγερτική
Φλαβονοειδή	Αντιοξειδωτική
Φαινολικές ενώσεις	Ανοσοδιεγερτική μέσω της ενίσχυσης της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας

• Άλλες ουσίες ενδιαφέροντος: Παράλληλα με τις ουσίες που προαναφέρθηκαν στους διάφορους ιστούς έχουν βρεθεί και άλλα συστατικά με φαρμακευτικές ιδιότητες. Ειδικότερα, στο αιθέριο έλαιο των ριζών εξακριβώθηκε η παρουσία γερμακρενίου (germacrene), καθώς επίσης και α-μυρσενίου (α -myrcene). Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν σημαντικές ποσότητες β-καρυοφυλλενίου (β -caryophyllene), α και β-πινενίου (α και β -pinene). Αν και αυτές οι ενώσεις είναι, κατά κύριο λόγο, γνωστές για τον αρωματικό τους ρόλο, φαίνεται να δρουν επίσης ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία, καθώς ανήκουν στη χημική ομάδα των τερπενίων που διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Οι εν λόγω ενώσεις συμβάλλουν στο φαρμακευτικό περιεχόμενο της εχινάκειας, αλλά έχουν δευτερεύουσα φαρμακευτική αξία στο συγκεκριμένο φυτό, καθώς βρίσκονται σε μεγάλες

ποσότητες σε πολυάριθμα φαρμακευτικά είδη (Burlou-Nagy et al., 2022; Dosoky et al., 2023; Hudaib και Cavrini, 2002).



Εικόνα 1.5: Κατανομή των βιοδραστικών ενώσεων στα φυτικά όργανα του είδους *Echinacea purpurea* (L.).

1.4.7.2 Βιοδραστικές ενώσεις και καταπονήσεις

Έχει παρατηρηθεί πως όταν ένα φυτό εκτίθεται σε έναν παράγοντα καταπόνησης, είτε αβιοτικό είτε βιοτικό, ενεργοποιείται η διαδικασία παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι δρουν προστατευτικά περιορίζοντας την επίδραση του παράγοντα καταπόνησης και επαναφέροντας το φυτό στην αρχική του κατάσταση. Σε αυτό το πλαίσιο, μελετάται συστηματικά ο τρόπος μεταβολής του βιοχημικού προφίλ των φυτικών ιστών ανάλογα με διαφορετικούς τύπους καταπόνησης (Thomsen, 2012). Ιδιαίτερα, αντικείμενο μελέτης αποτελεί η επίδραση των

αβιοτικών παραγόντων στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στους φυτικούς ιστούς, καθώς εξετάζεται το ενδεχόμενο μιας εναλλακτικής προσέγγισης των καλλιεργειών, όπου οι καταπονήσεις δεν αντιμετωπίζονται ως απειλή αλλά ως μέσο ενίσχυσης του παραγωγικού δυναμικού σε μεταβολικό επίπεδο, καθώς οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν το βασικό προϊόν ενδιαφέροντος των φαρμακευτικών φυτών (Petrova et al., 2024).

Συγκεκριμένα για τα διάφορα είδη εχινάκειας, στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί σημαντικά ευρήματα ως προς την αύξηση παραγωγής των δευτερογενών μεταβολιτών υπό ποικίλες συνθήκες στρες. Πιο αναλυτικά, σε συνθήκες ξηρασίας παρατηρείται σημαντική αύξηση των φαινολικών ενώσεων στο ριζικό σύστημα, ιδιαίτερα του κιχορικού οξέος (Gray et al., 2003; Seemannová et al., 2006), ενώ αντίστοιχα αυξάνεται και η συγκέντρωση των φλαβονοειδών στα υπέργεια τμήματα (Tavosi et al., 2023). Αναφορικά με την περιεκτικότητα των ιστών σε αλκαμίδες, υπό συνθήκες υδατικού στρες δεν έχει παρατηρηθεί μεταβολή της ποσότητάς τους συγκριτικά με φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες επαρκούς υγρασίας, παρόλο που θεωρητικά θα αναμένονταν αύξηση αντίστοιχη με αυτή των φαινολικών ουσιών (Gray et al., 2003).

Αντίστοιχα με το υδατικό στρες, η καταπόνηση αλατότητας επηρεάζει σημαντικά το προφίλ των μεταβολιτών στο είδος *Echinacea purpurea* (L.). Συγκεκριμένα, υπό συνθήκες χαμηλής και μέτριας έντασης καταπόνησης αλατότητας παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση των παραγώγων του καφεϊκού οξέος στο ριζικό σύστημα, με τις μεγαλύτερες αυξήσεις να αφορούν στο κιχορικό οξύ. Παράλληλα, αυξημένες ήταν οι συγκεντρώσεις των αλκαμιδών στο ριζικό σύστημα αλλά και των φλαβονοειδών στους νεαρούς βλαστούς. Σημειώνεται ωστόσο ότι οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις μειώθηκαν αισθητά σε συνθήκες καταπόνησης υψηλής έντασης, καθώς το είδος εμφανίζει περιορισμένη ανθεκτικότητα στην αλατότητα. Λόγω της θετικής επίδρασης της καταπόνησης αλατότητας στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στο είδος *Echinacea purpurea* (L.), θεωρείται πως η εκμετάλλευση εκτάσεων αλατούχων εδαφών με περιορισμένη διαθεσιμότητα νερού για την καλλιέργεια εχινάκειας είναι δυνατή. Ωστόσο, κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης του παράγοντα, ώστε να προσδιοριστούν σαφώς τα όρτους της καταπόνησης εντός των οποίων εξασφαλίζεται η μεγιστοποίηση της παραγωγής φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών και αλκαμιδών, χωρίς την ταυτόχροντουςείωση της παραγόμενης βιομάζας (Ahmadi et al., 2022; Sabra et al., 2012; Tomsen, 2012).

1.4.8 Φαρμακευτικές χρήσεις

Τις τελευταίες δεκαετίες η δημοτικότητα των φαρμακευτικών φυτών έχει αυξηθεί θεαματικά, καθώς αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη, εναλλακτική προσέγγιση για τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας. Η εχινάκεια, λόγω του πλούσιου φυτοχημικού της προφίλ, αξιοποιήθηκε από τους παλαιότερους χρόνους για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών και για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Σήμερα, η κύρια χρήση της εχινάκειας αφορά στην ενσωμάτωσή της σε διατροφικά συμπληρώματα για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς η πλειονότητα των ενεργών συστατικών της χαρακτηρίζεται από ανοσοδιεγερτική δράση, ενεργοποιώντας την παραγωγή και τη δραστηριότητα των μακροφάγων λευκοκυττάρων. Επιπλέον, στα εκχύλιστα του είδους *Echinacea purpurea* (L.) εντοπίζονται αντιβακτηριακές και αντιιικές ιδιότητες, καθιστώντας τα εξαιρετικά αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση λοιμώξεων του αναπνευστικού, ενώ έχει αποδειχθεί πως η κατανάλωση συμπληρωμάτων εχινάκειας συμβάλλει στη μείωση της οξύτητας και της διάρκειας των συμπτωμάτων ασθενειών, όπως της γρίπης και του έρπητα (Ross, 2016). Αναφορικά με τη συμβατική χρήση της εχινάκειας, έχουν παραχθεί καλλυντικά σκευάσματα, τα οποία στοχεύουν στη βελτίωση και την καταπράυνση του δέρματος. Συγκεκριμένα, το βάμμα της εχινάκειας έχει αποδειχθεί ευεργετικό στη θεραπεία του εκζέματος και στην εξάλειψη της ξηροδερμίας (Barnes et al., 2008; Burlou-Nagy et al., 2022).

Επιπλέον, λόγω των πολυάριθμων φαρμακευτικών ιδιοτήτων της, εξετάζεται η πιθανότητα χρήσης της εχινάκειας ως συμπληρώματος στις εντατικές θεραπείες ατόμων με καρκίνο και HIV. Ήδη πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν πως η χρήση εχινάκειας σε άτομα με HIV-1 ανέστειλε την ενσωμάτωση του ιού, σε συνδυασμό με τη λήψη της θεραπευτικής αγωγής. Αν και μέχρι στιγμής δεν έχει συμπεριληφθεί ως μέρος μιας συνδυασμένης θεραπείας, η πρόσληψη συμπληρωμάτων εχινάκειας συνέβαλε στην καλύτερη ρύθμιση του ανοσοποιητικού καρκινοπαθών ατόμων. Μάλιστα, σε *in vitro* μελέτες διαπιστώθηκε ότι το εκχύλισμα εχινάκειας περιορίζει τον πολλαπλασιασμό ορισμένων τύπων καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, επειδή η εχινάκεια προάγει την παραγωγή των λευκοκυττάρων, μελετάται η δυνατότητα της συστηματικής χορήγησής της σε άτομα με καρκίνο, έτσι ώστε να μην προκληθούν τα άκρως αντίθετα αποτελέσματα (Birt et al., 2008; Molto et al., 2011; Tafazoli, 2019).

Τέλος, τα τελευταία χρόνια ελέγχεται η χρήση εκχυλισμάτων εχινάκειας ως φυσική εναλλακτική συντηρητικού μέσου σε τρόφιμα. Ο αντιβακτηριακός και αντιοξειδωτικός χαρακτήρας ενισχύει τη διάρκεια ζωής των τροφίμων, χωρίς να αλλοιώνει τα οργανοληπτικά τους στοιχεία, ενώ παράλληλα δεν διαθέτει επιβαρυντικά συνθετικά που σε βάθος χρόνου η κατανάλωσή τους είναι επιβλαβής για την ανθρώπινη υγεία (Sharifi-Rad et al., 2018).

Σημειώνεται πως σήμερα η εχινάκεια χρησιμοποιείται αποκλειστικά ως φαρμακευτικό συμπλήρωμα, και όχι σαν εγκεκριμένη θεραπεία ασθενειών. Οι προτάσεις χρήσης και δοσολογίας αναγράφονται στα σκευάσματα, χωρίς ωστόσο να υπάρχει αυστηρός ιατρικός έλεγχος ως προς την πρόσληψή της. Συνεπώς, όπως ισχύει για όλα τα φαρμακευτικά σκευάσματα, ανεξάρτητα από το αν είναι φυτικά ή όχι, είναι αναγκαία η κατανάλωσή της να γίνεται πάντα σύμφωνα με τις προτεινόμενες δοσολογίες καθώς η ανεξέλεγκτη χρήση της ενδέχεται να επιφέρει σοβαρές παρενέργειες στον ανθρώπινο οργανισμό.

Αξίζει να αναφερθεί πως οι βιομηχανίες εξετάζουν τόσο τις προοπτικές αξιοποίησης της εχινάκειας σε πρόσθετους τομείς όσο και τη δυνατότητα μεγιστοποίησης της παραγωγής ουσιών ενδιαφέροντος, μέσω ποικίλων προσεγγίσεων της γενετικής, της μοριακής βιολογίας και της βιοτεχνολογίας. Όσον αφορά το πρώτο σκέλος, ελέγχεται η δυνατότητα προσθήκης υπολειμμάτων εχινάκειας σε ζωοτροφές με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της υγείας των ζώων και τη μείωση διάδοσης ασθενειών μεταξύ τους. Παράλληλα, η υποβολή των φυτών σε ελεγχόμενη καταπόνηση για την ενίσχυση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών καθώς και η προσπάθεια εύρεσης αποδεκτών βελτιωτικών μεθόδων για την τροποποίηση της εχινάκειας αποτελούν κύρια ερευνητική θεματική, με στόχο τη βελτιστοποίηση της παραγωγής και φυτοχημικής ποιότητας. Σε συνδυασμό με την βελτιστοποίηση της παραδοσιακής καλλιέργειας πεδίου, αυτές οι εξελίξεις θα διευρύνουν το φάσμα της φαρμακευτικής χρήσης της εχινάκειας, διευρύνοντας τη γκάμα των προϊόντων, σύμφωνα με τις συνεχώς αυξανόμενες απαιτήσεις της αγοράς (Parsons et al., 2018).

1.5 Έρευνα στο είδος *Echinacea purpurea* (L.)

Όπως αναφέρθηκε, γίνονται εντατικές προσπάθειες εύρεσης μεθόδων, τόσο εργαστηριακών όσο και καλλιεργητικών, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή των ουσιών ενδιαφέροντος από το είδος *Echinacea purpurea* (L.), το οποίο αποτελεί το πιο διαδεδομένο είδος εχινάκειας και χρησιμοποιείται σε μεγάλη κλίμακα από τις φαρμακοβιομηχανίες. Στο πλαίσιο διατήρησης της παραδοσιακής καλλιέργειας στον αγρό, ελέγχεται η προοπτική μεγιστοποίησης της

συγκομιζόμενης βιομάζας, χωρίς όμως να υποβαθμίζεται ποιοτικά σε βιοχημικό επίπεδο. Ήδη έχουν προσδιοριστεί ποσότητες λιπάσματος και αρδευτικού νερού, οι οποίες καλύπτουν πλήρως τις ανάγκες των φυτών στα διάφορα στάδια του βιολογικού κύκλου και επιτρέπουν την αύξηση του αριθμού των ανθέων και της εκβλάστησης (Drutu et al., 2002; Ghatas και Abdallah, 2016; Sheshbahreh et al., 2018; Sheshbahreh et al., 2019).

Επιπλέον, ο ακανόνιστος λήθαργος του είδους σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος του σπόρου που δεν επιτρέπει την εκβλάστηση, όταν τοποθετηθεί σε μεγάλο βάθος, μειώνουν σημαντικά το ποσοστό βλάστησης στον αγρό, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα, λόγω του περιορισμένου αριθμού φυτών και της ανομοιόμορφης ανάπτυξης. Αντίστοιχα, η παραγωγή μεγάλης ποσότητας βιομάζας, μέσω της ιστοκαλλιέργειας, παρουσιάζει περιορισμούς που σχετίζονται με το γεγονός ότι είναι μία κοστοβόρα και χρονοβόρα διαδικασία, αν και ενισχύει την ικανότητα βλάστησης. Στοχεύοντας στην ενίσχυση του δυναμικού βλάστησης, ποικίλες μελέτες εξετάζουν τη δυνατότητα προεπεξεργασίας των σπόρων με διεγέρτες (seed priming).

Στο πλαίσιο αυτό, έχει αποδειχθεί ότι η χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) οδηγεί σε σημαντική αύξηση του ποσοστού βλάστησης και μείωση του ρυθμού βλάστησης, επιτυγχάνοντας παράλληλα καλύτερο συγχρονισμό ως προς την ανάπτυξη των νεαρών σποροφύτων (Pill et al., 1994). Ανάλογα ευρήματα αναφέρονται σε πρόσφατες έρευνες, όπου η χρήση του PEG εξασφάλισε μεγαλύτερο ποσοστό και βελτιωμένη ομοιογένεια στη βλάστηση (Chiu et al., 2006; Bishnoi et al., 2010). Σε ανάλογες έρευνες αξιολογήθηκε και η χρήση γιββεριλικού οξέος και διαπιστώθηκε σημαντική ενίσχυση του ποσοστού βλάστησης, ενώ ταυτόχρονα σημειώθηκε βελτίωση της ανάπτυξης και ευρωστίας των φυταρίων (Ansari et al., 2021; Farshid et al., 2021). Μάλιστα, σύμφωνα με τους Hadis et al. (2021), τόσο η μεμονωμένη εφαρμογή γιββεριλικού οξέος όσο και η συνδυασμένη χρήση του με σαλικυλικό οξύ, οδήγησαν σε ταχύτερη ανάπτυξη των βλαστικών τμημάτων, της φυλλικής επιφάνειας αλλά και του ριζικού συστήματος των φυταρίων. Επιπλέον, η χρήση γιββεριλικού οξέος αύξησε σημαντικά το δυναμικό βλάστησης των σπόρων και ενίσχυσε τη συγχρονισμένη εκβλάστηση σε σπόρους που είχαν παραμείνει αποθηκευμένοι για εκτεταμένες χρονικές περιόδους (Pill και Haynes, 1996). Τέλος, αναφέρεται πως η παραμονή των σπόρων σε απιονισμένο νερό 12 και 24 ώρες αύξησε το ποσοστό βλάστησης των σπόρων (Ansari et al., 2016), ενώ και η προκατεργασία τους με διαλύματα NaCl σε ποικίλες συγκεντρώσεις είχε ως αποτέλεσμα, όχι μόνο την εκβλάστηση μεγαλύτερου αριθμού σπόρων, αλλά και την καλύτερη

αρχική ανάπτυξη των σποροφύτων (Miri και Mirjalili, 2013). Τα ανωτέρω υποδεικνύουν πως η εφαρμογή διεγερτών στους σπόρους πριν την τοποθέτησή τους σε οποιοδήποτε υπόστρωμα ενισχύει την ικανότητα βλάστησης, επιτυγχάνοντας παράλληλα ποιοτική αναβάθμιση των φυτικών ιστών σε βιοχημική κλίμακα.

Συγκεκριμένα για το είδος *Echinacea purpurea* (L.), το ενδιαφέρον εστιάζεται στη γενετική βελτίωσή του, η οποία προσεγγίζεται με ποικίλες μεθόδους, συμπεριλαμβανομένου του γενετικού του μετασχηματισμού με το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes*. Η μεταβολή του φυτικού γονιδιώματος μέσω της ένθεσης ενός τμήματος του βακτηριακού γονιδιώματος έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη ανάπτυξη του ριζικού συστήματος καθώς και το σχηματισμό περισσότερων διακλαδώσεων, συγκριτικά με μη μετασχηματισμένα φυτά. Το ριζικό σύστημα που είναι αποτέλεσμα της μόλυνσης από το *A. rhizogenes* χαρακτηρίζεται από φυσιολογική και βιοχημική σταθερότητα και παρουσιάζει ευκολία στη μεταχείρισή του (Wang et al., 2006). Επιπλέον, ο μετασχηματισμός είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί και σε άλλους φυτικούς ιστούς εκτός από τη ρίζα, όπως τα φύλλα, με σκοπό τη δημιουργία ριζικού συστήματος από τη φυλλική επιφάνεια, μία μέθοδος που ανοίγει νέες προοπτικές εκμετάλλευσης όλων των φυτικών τμημάτων για την παραγωγή ουσιών ενδιαφέροντος. Σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές, ο μετασχηματισμός των φύλλων με το στελέχος A14 του *A. rhizogenes* οδήγησε σε σχηματισμό πυκνών ριζών με ικανοποιητικό ξηρό βάρος και αξιόλογο βιοχημικό περιεχόμενο, όπως αναδείχθηκε μέσω ανάλυσης των ριζών με υγρή χρωματογραφία (HPLC) που αποκάλυψε την ύπαρξη πολύτιμων φαρμακευτικών ουσιών στους ιστούς των ριζών, με κυριότερα τα παράγωγα καφεϊκού οξέος (κιχορικό, καφταρικό και χλωρογενικό οξύ) (Abbasi et al., 2007).

Λόγω του ταχύτατου σχηματισμού του ριζικού συστήματος και της δυνατότητας δημιουργίας ριζών από διάφορα φυτικά τμήματα, ο γενετικός μετασχηματισμός της εχινάκειας αποτελεί μία εξαιρετικά σταθερή τεχνική που αποσκοπεί στη γρήγορη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών για φαρμακευτική αξιοποίηση. Ωστόσο, για την ώρα, η εισαγωγή του βακτηριακού γενετικού υλικού στο φυτικό γονιδίωμα δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε εμπορική κλίμακα, ιδιαίτερα εκτός εργαστηριακού περιβάλλοντος, καθώς ανήκει στις τεχνολογίες της γενετικής τροποποίησης. Παρά τις ανησυχίες του κοινού σχετικά με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών, είναι γεγονός ότι ο μετασχηματισμός με στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes* προσομοιάζει με

διαδικασίες φυσικής μόλυνσης από το βακτήριο είτε σε μία καλλιέργεια πεδίου είτε στο περιβάλλον ανάπτυξης ενός αυτοφυούς φυτού (Parsons et al., 2018).

Τέλος, σε ποικίλα πειράματα έχει αξιολογηθεί η επίδραση πρόσθετων φυτοορμονών στη ριζογένεση και στη βλαστογένεση. Πιο συγκεκριμένα, έχει εξεταστεί η χρήση αυξινών, κυρίως ναφθαλινοοξικού οξέος (NAA), για την επαγωγή σχηματισμού ριζικού συστήματος και κυτοκινινών (6-βενζυλοαμινοπουρίνη, BAP), οι οποίες συσχετίζονται με τη δημιουργία βλαστικών τμημάτων. Η εφαρμογή των ορμονών, τόσο μεμονωμένα όσο και συνδυαστικά, πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον σχηματισμό κάλλου. Η εφαρμογή κυτοκινινών αύξησε τον αριθμό των εκπυσσόμενων βλαστών, μειώνοντας ωστόσο το τελικό τους μήκος, ενώ τα μεγαλύτερα βλαστικά μήκη εντοπίστηκαν σε μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν συνδυαστικά κυτοκινίνες και αυξίνες (Koroch et al., 2008). Αντίθετα, η αποκλειστική χρήση NAA ήταν πιο αποτελεσματική, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση του μεγέθους των ριζών αλλά και της περιεκτικότητάς τους σε παράγωγα καφεϊκού οξέος. Αντίστοιχα αποτελεσματική ήταν και η εφαρμογή ινδόλη-3-Βουτυρικού οξέος (IBA), μιας συνθετικής αυξίνης, η οποία αύξησε σημαντικά τους δευτερογενείς μεταβολίτες τόσο στο ριζικό τμήμα όσο και στον κάλλο.

Αξίζει να σημειωθεί πως οι μεγαλύτερες ποσότητες παραγώγων καφεϊκού οξέος εντοπίστηκαν στους κάλλους, ύστερα από τη συνδυαστική δράση κυτοκινίνης και αυξίνης, ιδιαιτέρως όταν η συγκέντρωση της δεύτερης ήταν υψηλή. Σημειώνεται επιπλέον πως οι ποσότητες των παραγομένων δευτερογενών μεταβολιτών εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον ιστό που χρησιμοποιήθηκε ως έκφυτο για το σχηματισμό του κάλλου. Έχει αποδειχθεί πως είναι προτιμότερο να λαμβάνονται για την αναγέννηση τμήματα του μίσχου και των ριζών, παρά φύλλων, καθώς εμφανίζουν αυξημένη συγκέντρωση κιχορικού και καφταρικού οξέος σε σχέση με τα φύλλα. Οι εν λόγω μέθοδοι πολλαπλασιασμού *in vitro* διευκολύνουν σημαντικά τη διαδικασία παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών αφενός μεν γιατί οι συνθήκες ανάπτυξης των φυταρίων είναι πλήρως ελεγχόμενες και αφετέρου διότι δίνεται η δυνατότητα στοχευμένης ανάπτυξης φυτικών οργάνων που εμφανίζουν αυξημένη συγκέντρωση ουσιών ενδιαφέροντος (Coker και Camper, 2000; Erkoyuncu και Yorgancilar, 2021; Jang et al., 2012; Koroch et al., 2002; Koroch et al., 2008).

1.6 Γενετική Μηχανική

Η γενετική μηχανική (Genetic engineering) ανήκει στον κλάδο της βιοτεχνολογίας και αφορά στην τροποποίηση του γονιδιώματος ενός ζωντανού οργανισμού, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας σειράς αλλαγών, η οποία αποτελεί τη βάση βελτίωσης του οργανισμού. Αποτέλεσμα της γενετικής μηχανικής είναι οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί (Genetically Modified Organisms, GMOs), των οποίων η γονιδιακή σύσταση έχει μεταβληθεί με οποιαδήποτε μέθοδο γενετικής μηχανικής. Αξίζει να σημειωθεί ότι συχνά οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί δεν προκύπτουν από κάποια εργαστηριακή τεχνική, αλλά οι αλλαγές στο γονιδίωμά τους είναι απότοκο φυσικών διεργασιών (Acquaah, 2015). Η τροποποίηση της περιοχής ενδιαφέροντος του γονιδιώματος μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες άμεσες μεθόδους, όπως είναι η βιολιστική μέθοδος (Biolistic ή Particle Bombardment), ή και με έμμεσες μεθόδους, όπως ο γενετικός μετασχηματισμός με τη χρήση φορέων είτε βακτηριακής είτε ιικής προελεύσεως.

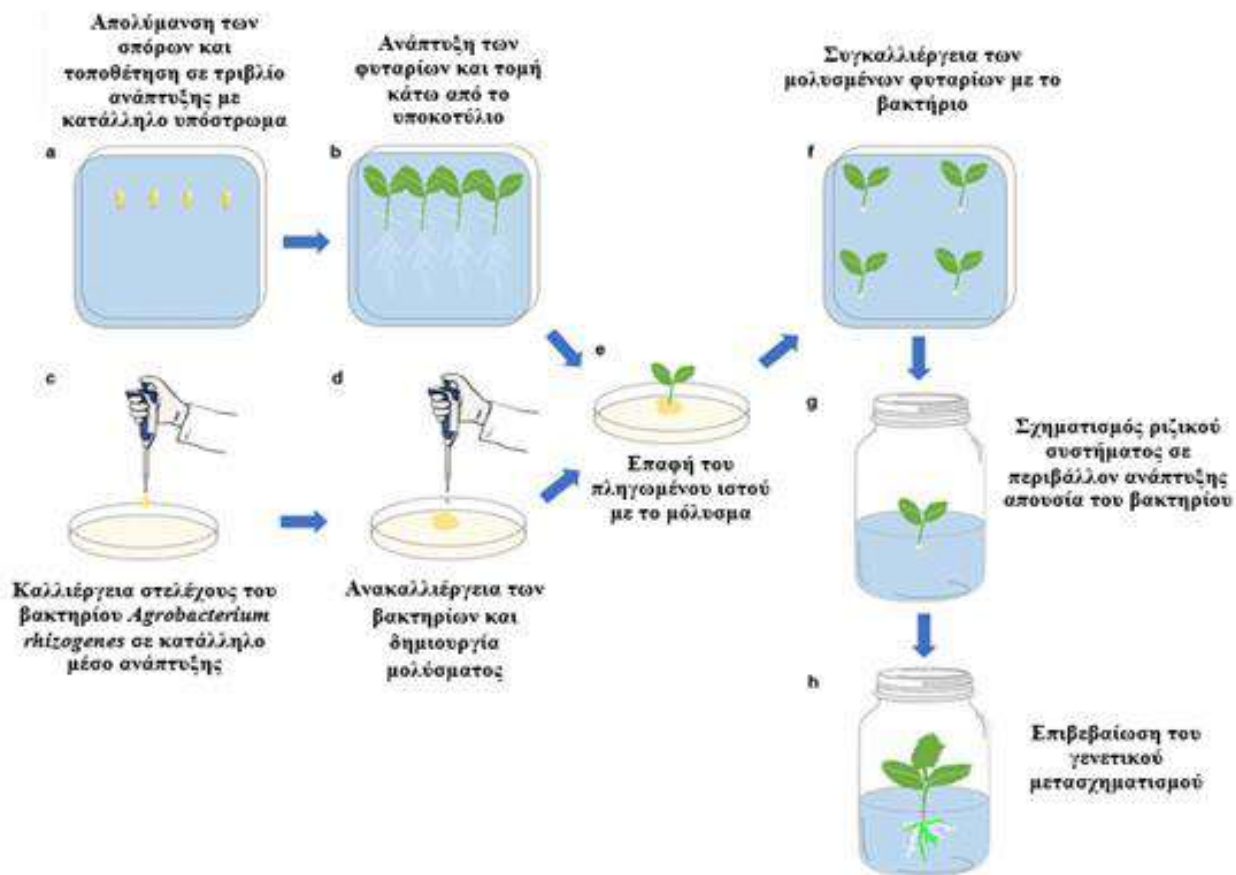
Η βιολιστική μέθοδος αφορά στην εισαγωγή του γενετικού υλικού στα κύτταρα με τη χρήση ενός «όπλου» μικροσωματιδίων υψηλής πίεσης. Τα μικροσωματίδια από χρυσό που εισάγονται, λόγω της υψηλής πίεσης, διαπερνούν τα κυτταρικά τοιχώματα και τις μεμβράνες, επιτυγχάνοντας μεταφορά του γενετικού υλικού στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων. Η μέθοδος της βιολιστικής είναι εξαιρετικά χρήσιμη σε περιπτώσεις κατά τις οποίες δεν είναι δυνατός ο μετασχηματισμός με τη χρήση φορέων, όπως η περίπτωση της γενετικής τροποποίησης πλαστιδίων (π.χ. χλωροπλάστες). Ως μέθοδος, ωστόσο, εμφανίζει περιορισμούς που έγκεινται στην τυχαία ενσωμάτωση του γενετικού υλικού στο φυτικό DNA, στην πιθανή καταστροφή των φυτικών ιστών εξαιτίας της υψηλής πίεσης κατά το βομβαρδισμό καθώς και στις απαιτήσεις για εξειδικευμένο εξοπλισμό και υλικά υψηλού κόστους (Ozygit et al., 2020; Wang et al., 2019).

Αντίθετα, η τεχνική της μικροέγχυσης αποτελεί μία πλήρως ελεγχόμενη και στοχευμένη φυσική προσέγγιση γενετικής, κυτταρικής τροποποίησης. Ειδικότερα, η μικροέγχυση αφορά στην άμεση εισαγωγή καλά καθορισμένων ποσοτήτων DNA στο φυτικό κύτταρο, η οποία γίνεται με τη χρήση μικροπιπέτας που διαπερνά το κυτταρικό τοίχωμα και τις μεμβράνες και εισάγει το γενετικό υλικό στον πυρήνα ή στο επιθυμητό οργανίδιο. Η εισαγωγή του «ξένου» γενετικού υλικού γίνεται με μικροσκοπικό έλεγχο, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ο κίνδυνος καταστροφής ή αλλοίωσης των κυττάρων. Ωστόσο, η τεχνική αυτή δεν χρησιμοποιείται ευρέως, λόγω της δυσκολίας που παρουσιάζει η διεξαγωγή της καθώς απαιτείται πλήρης εκπαίδευση του προσωπικού καθώς και

εξειδικευμένος, εργαστηριακός εξοπλισμός. Παράλληλα, είναι εξαιρετικά χρονοβόρα διαδικασία, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η μαζική τροποποίηση κυττάρων. Λόγω, κυρίως, του χρόνου που απαιτεί, η μικροέγχυση αξιοποιείται κυρίως σε ερευνητικά πλαίσια, όπου η ακριβής τροποποίηση των κυττάρων είναι θεμελιώδης (Neuhaus και Spangenberg, 1990; Schnorf et al., 1991).

Τέλος, η πιο διαδεδομένη μέθοδος γενετικής τροποποίησης αφορά στη χρήση φορέων, είτε βακτηριακής είτε ιικής προέλευσης. Όσον αφορά τη χρήση φορέων με ιική ταυτότητα, υπάρχουν αρκετές οικογένειες ιών, τόσο DNA όσο και RNA, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για τον σχεδιασμό φορέων που εξειδικεύονται σε διαφορετικές χρήσεις και έχουν παρουσιάζουν εξαιρετική αποτελεσματικότητα ως προς την ένθεση γονιδίων τόσο σε φυτά μοντέλα, όπως ο καπνός, όσο και σε καλλιεργούμενα είδη. Η χρήση ιών ως φορέων, αν και μειώνει σημαντικά το χρόνο που απαιτείται για την τροποποίηση καθώς μολύνεται ταυτόχρονα μεγάλος αριθμός φυτών, χαρακτηρίζεται από περιορισμένο είδος ξενιστών και, επομένως, η καθολική εφαρμογή της είναι ανέφικτη. Παράλληλα, πραγματοποιείται τροποποίηση των ιών πριν την εισαγωγή τους στα φυτά, με αποτέλεσμα να υφίσταται κίνδυνος ανεπιτυχούς τροποποίησης με απρόβλεπτες συνέπειες που μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη παθογένεια. Συνεπώς, η χρήση των ιών ως φορέων πρέπει να συνοδεύεται από εξαιρετικά προσεκτικό και αυστηρό σχεδιασμό, ο οποίος απαιτεί την αντίστοιχη τεχνογνωσία και πολύ χρόνο, χωρίς να αποκλείεται η πιθανότητα λάθους (Abrahamian et al., 2020; Zaidi, και Mansoor, 2017). Αντίθετα, η χρήση βακτηριακών φορέων για την γενετική τροποποίηση των φυτών αποτελεί σταθερότερη τεχνική με λιγότερους κινδύνους. Η μεταφορά του ξένου DNA γίνεται κυρίως με τη χρήση αγροβακτηρίων, εκ των οποίων τα πιο διαδεδομένα είναι τα στελέχη του *Agrobacterium tumefaciens*, το οποίο προκαλεί υπερπλασίες και όγκους στο ριζικό σύστημα, και *Agrobacterium rhizogenes*, το οποίο προκαλεί την έντονη ανάπτυξη διακλαδισμένων ριζών (hairy roots). Η μεταφορά του DNA των βακτηρίων γίνεται μέσω ενός πλασμιδίου, Ti για το *A. tumefaciens* και Ri για το *A. rhizogenes* (Hwang et al., 2017). Τα πλασμίδια διαθέτουν μία T-DNA περιοχή, στην οποία βρίσκονται τα γονίδια που ενσωματώνονται στο φυτικό γονιδίωμα. Η είσοδος του βακτηριακού DNA, είτε αυτή επιτυγχάνεται τεχνητά είτε με φυσικό τρόπο στο έδαφος, γίνεται ύστερα από επαφή του βακτηρίου με τραυματισμένο φυτικό ιστό (Εικόνα 1.6). Ο γενετικός μετασχηματισμός με τα είδη του γένους *Agrobacterium* παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η απλότητα της διαδικασίας, το χαμηλό κόστος και η υψηλή αποτελεσματικότητα και σταθερότητα, καθώς συμβαίνει και φυσικά στο περιβάλλον

(Azizi-Dargahlou και Pouresmaeil, 2024; Sunil Kumar και Ashwani Kumar, 2015). Ωστόσο, η αξιοποίηση των αγροβακτηρίων είναι εφικτή εφόσον είναι γνωστές συγκεκριμένες παράμετροι, όπως τα φυτικά είδη που είναι συμβατοί ξενιστές του παθογόνου, το φυτικό τμήμα που πρέπει να προσβληθεί και το στέλεχος που αποτελεί κατάλληλο φορέα (Ziemienowicz, 2014). Επομένως, αν και τα *Agrobacterium* έχουν εδραιωθεί ως γονιδιακοί φορείς, υπάρχουν ακόμη πολλά ζητήματα που πρέπει να διευθετηθούν πριν η εφαρμογή τους γίνει καθολική (Otten, 2018).



Εικόνα 1.6: Γενετικός μετασχηματισμός με τη χρήση του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*.

Η γενετική μηχανική έχει θέσει σαφείς στόχους που έχουν ως κέντρο το περιβάλλον και τον άνθρωπο και προσαρμόζονται ανάλογα με τις ανθρώπινες ανάγκες κάθε εποχής. Σήμερα, τα προγράμματα βελτίωσης στοχεύουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα φυτά, τόσο σε βιοτικούς όσο και σε αβιοτικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, η ανθεκτικότητα σε βιοτικές καταπονήσεις, όπως αυτές που προκαλούνται από έντομα και παθογόνα, επιτρέπει τον περιορισμό της χρήσης φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων, τα οποία αποτελούν βασική πηγή περιβαλλοντικής ρύπανσης αλλά και επιβάρυνσης της υγείας των καταναλωτών, λόγω των υπολειμμάτων τους στα νωπά,

φυτικά προϊόντα (Acquaah, 2015; Vincelli, 2016). Αντιστοίχως, η ανθεκτικότητα των φυτικών ειδών σε αβιοτικές καταπονήσεις προσφέρει τη δυνατότητα αξιοποίησης εδαφικών εκτάσεων όπου οι συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές (υψηλές θερμοκρασίες, υψηλή συγκέντρωση αλάτων στο έδαφος κλπ.) ή υπάρχει περιορισμένη διαθεσιμότητα υδατικών πόρων (Acquaah, 2015; Zhang et al., 2000).

Ταυτόχρονα, ένα μείζον ζήτημα στο οποίο επικεντρώνονται οι τεχνολογίες της γενετικής μηχανικής είναι η μεγιστοποίηση της ποιότητας και της ποσότητας της παραγωγής, ιδιαίτερα ενόψει των προβλέψεων σχετικά με τις διατροφικές ανάγκες του ανθρώπινου πληθυσμού που επιβάλλουν την αύξηση των αποδόσεων των καλλιεργειών με ταυτόχρονη βελτίωση της διατροφικής αξίας των τροφίμων. Η υψηλότερη διατροφική αξία συνεπάγεται τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας, ειδικά σε αναπτυσσόμενες χώρες, όπου κύριες πηγές τροφής, όπως το ρύζι και το κριθάρι, χαρακτηρίζονται από μειωμένη περιεκτικότητα σε αμινοξέα ή βιταμίνες. Στο πλαίσιο βελτίωσης της ανθρώπινης υγείας, είναι περαιτέρω εφικτή, μέσω της γενετικής μηχανικής, η αύξηση της συγκέντρωσης βιοενεργών ενώσεων σε πολυάριθμα φυτικά είδη που χρησιμοποιούνται για παραγωγή φαρμακευτικών σκευασμάτων και συμπληρωμάτων, με αποτέλεσμα τη βελτιστοποιημένη σύνθεση των φαρμάκων που χορηγούνται για τη θεραπεία ποικίλων παθήσεων. Παράλληλα, οι επαρκείς ποσότητες των βιοδραστικών ενώσεων επιτρέπουν την περαιτέρω έρευνα για την εύρεση καινοτόμων θεραπειών για μία διευρυμένη γκάμα ασθενειών και προβλημάτων υγείας (Acquaah, 2015).

Επιβάλλεται ωστόσο να σημειωθεί ότι οι τεχνολογίες της γενετικής μηχανικής συνοδεύονται από μία σειρά προβλημάτων και προκλήσεων που εμποδίζουν την εκτεταμένη εφαρμογή τους. Αναφορικά με τους φυσικούς και βιολογικούς κινδύνους, η επιστημονική κοινότητα έχει εκφράσει τις ανησυχίες της σχετικά με τις αρνητικές συνέπειες της κατανάλωσης γενετικά τροποποιημένων φυτικών τροφίμων στην ανθρώπινη υγεία, οι οποίες σχετίζονται, κυρίως, με τυχόν αλλεργικές αντιδράσεις, αν και τέτοια ζητήματα δεν έχουν καταγραφεί σε μεγάλη κλίμακα μέχρι τώρα. Παράλληλα, υπάρχει ο φόβος πιθανής μεταφοράς γονιδίων σε άγρια είδη, μέσω μεταφοράς της γύρης με επικονιαστικά έντομα, γεγονός που θα επιφέρει απρόβλεπτες μεταβολές στα υπάρχοντα οικοσυστήματα. Επίσης, σχετικά με τις κοινωνικοοικονομικές παραμέτρους από την αρχή της εφαρμογής των μεθόδων γενετικής τροποποίησης έχουν τεθεί ζητήματα βιοηθικής, κυρίως αναφορικά με το κατά πόσο είναι επιτρεπτό και ορθό να παρεμβαίνει ο άνθρωπος με μη φυσικό

τρόπο σε άλλους οργανισμούς, μεταβάλλοντάς τους κατά βούληση. Στην επιστημονική κοινότητα είναι ευρέως αποδεκτό ότι η πλήρης άρνηση των τεχνολογιών γενετικής μηχανικής έχει οδηγήσει σε διασπορά καταστροφολογικών, ανυπόστατων πληροφοριών που εμποδίζουν το ευρύ κοινό να εμπιστευτεί την παραγωγή των γενετικά τροποποιημένων προϊόντων, κλιμακώνοντας τις σχετικές αντιδράσεις.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι η ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων ποικιλιών συνοδεύεται από υψηλό κόστος και αποτελεί ιδιοκτησία συγκεκριμένων εταιρειών, με αποτέλεσμα να δημιουργείται πλήρης εξάρτηση της παραγωγής από μονοπώλεια, ιδιαίτερα όταν απαγορεύεται η αναπαραγωγή τους από τους παραγωγούς. Σε παγκόσμια κλίμακα, έχει θεσπιστεί ένα αυστηρό νομοθετικό πλαίσιο που αφορά όχι μόνο την καλλιέργεια, το εμπόριο, την ιχνηλασιμότητα γενετικά τροποποιημένων φυτών, αλλά και την έγκρισή τους, πριν επιτραπεί η συστηματική καλλιέργειά τους σε μεγάλη κλίμακα. Είναι γεγονός αδιαμφισβήτητο ότι η γενετική μηχανική, η οποία εξελίσσεται διαρκώς περιλαμβάνοντας ολοένα και περισσότερες νέες τεχνολογίες, προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα που μπορούν να δώσουν λύσεις σε θεμελιώδη προβλήματα των ανθρώπινων κοινωνιών. Ωστόσο, η εφαρμογή των εν λόγω τεχνολογιών απαιτεί σαφή και διάφανο σχεδιασμό των βελτιωτικών προγραμμάτων ώστε να διασφαλιστεί ότι τα προϊόντα της γενετικής τροποποίησης θα αξιοποιηθούν υπεύθυνα, ενώ παράλληλα πρέπει να προσπελαστούν τα ποικίλα εμπόδια που δυσχεραίνουν την εντατικότερη ενσωμάτωσή της στη βελτίωση των καλλιεργειών (Acquaah, 2015; Sunil Kumar και Ashwani Kumar, 2015; Pimentel et al., 1989).

1.7 Το *Agrobacterium rhizogenes* ως φορέας γενετικού μετασχηματισμού

Το βακτηριακό είδος *Agrobacterium rhizogenes* προσδιορίστηκε περισσότερο από 70 χρόνια πριν ως το παθογόνο αίτιο της ασθένειας των τριχωτών ειδών σε διάφορα φυτικά είδη, μέσω της ενσωμάτωσης ενός τμήματος του DNA στο φυτικό γονιδίωμα. Το βακτήριο μολύνει με φυσικό τρόπο τα φυτά στο περιβάλλον ανάπτυξής τους, αλλά χάρη στην υψηλή αποτελεσματικότητα εισαγωγής των γονιδίων του στο φυτικό γονιδίωμα αξιοποιείται εκτεταμένα στον τομέα της γενετικής μηχανικής. Μέχρι σήμερα, διάφορα στελέχη του χρησιμοποιούνται στη γενετική τροποποίηση πληθώρας φυτικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων ποικίλων φαρμακευτικών φυτών, με σκοπό την αύξηση της μάζας των ριζών και της συγκέντρωσης των δευτερογενών μεταβολιτών που συντίθενται σε αυτή την περιοχή (Veena και Taylor, 2007).

1.7.1 Περιγραφή του *Agrobacterium rhizogenes* και του πλασμιδίου Ri

Το *Agrobacterium rhizogenes* (παλιότερη ονομασία *Phytomonas rhizogenes*) είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο εδάφους που ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae και στο γένος *Agrobacterium*. Έχει ραβδοειδές σχήμα και έχει την ικανότητα να κινείται με τη χρήση ενός μέχρι και έξι πολυτριχικών μαστιγίων που επιτρέπουν την κίνησή του σε υγρά περιβάλλοντα. Τα μαστίγια είναι απαραίτητα για την είσοδο και τη μετακίνηση του βακτηρίου στους φυτικούς ιστούς. Πρόκειται για υποχρεωτικά αερόβιο βακτήριο, δηλαδή απαιτείται η ύπαρξη οξυγόνου για την επιβίωσή του. Όπως προαναφέρθηκε, το *Agrobacterium rhizogenes* είναι υπεύθυνο για την ασθένεια των «τριχωτών ριζών», κυρίως σε δικοτυλήδονα είδη, μεταφέροντας ένα κομμάτι του DNA του, γνωστό και ως T-DNA, στο γενετικό υλικό του φυτού. Το T-DNA είναι μία περιοχή του πλασμιδίου Ri, ένα μικρό, κυκλικό μόριο DNA, το οποίο απαντάται σε βακτήρια, είναι ανεξάρτητο του κύριου χρωμοσωμικού DNA του βακτηρίου και μπορεί να αναπαράγεται αυτόνομα (Ozygit et al, 2013; Thomas, 2000).

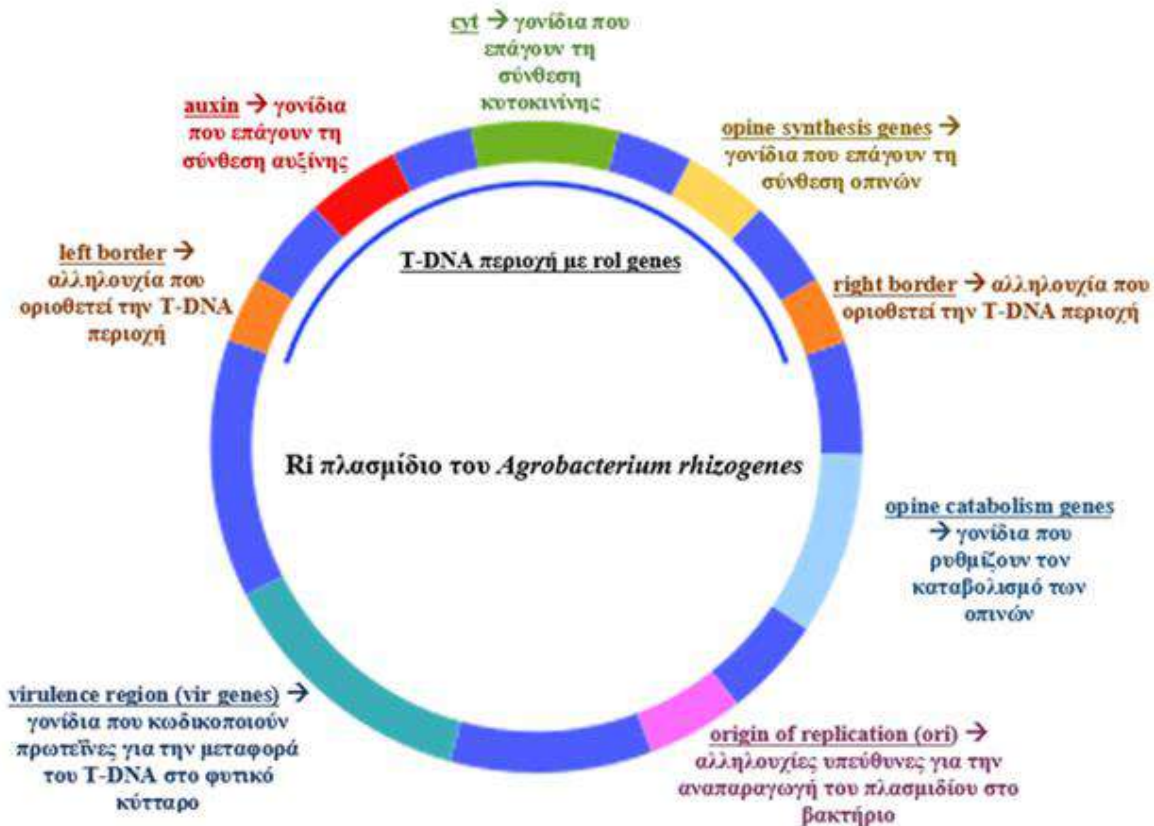
Η περιοχή T-DNA περιλαμβάνει μία σειρά γονιδίων, τα *rol* γονίδια (*rol*-genes, root loci genes), τα οποία είναι υπεύθυνα για την επαγωγή της ριζογένεσης, αλλά σχετίζονται και με τη βιοσύνθεση των οπινών, η οποία εξαρτάται από την έκφραση πρόσθετων γονιδίων που εδράζουν στο T-DNA (Εικόνα 1.7). Οι οπίνες είναι ενώσεις που λειτουργούν ως πηγή άνθρακα και αζώτου για τα βακτήρια και δεν παράγονται φυσιολογικά στα φυτά, αλλά συντίθενται στα φυτικά τμήματα ύστερα από μόλυνσή τους με κάποιο είδος του γένους. Συνεπώς, η ύπαρξή τους στους φυτικούς ιστούς είναι ένδειξη επιτυχούς μόλυνσης και γενετικής τροποποίησης του φυτικού DNA. Παρακάτω παρουσιάζονται τα κυριότερα *rol* γονίδια που έχουν προσδιοριστεί στην αριστερή T_L-DNA περιοχή του T-DNA του πλασμιδίου Ri:

- 1) *rolA* gene: Η δράση του *rolA* σχετίζεται κυρίως με ορμονικές μεταβολές στο φυτό, καθώς η παρουσία του επάγει τη μείωση της αυξίνης, της κυτοκίνης, του γιββερλικού και του αμπισισικού οξέος. Αναφορικά με τη δράση του στην αυξίνη, έχει αποδειχθεί ότι τα φυτά που τροποποιήθηκαν γενετικά με την ένθεση αποκλειστικά του *rolA* ήταν 100 φορές πιο ευαίσθητα στη δράση της αυξίνης, συγκριτικά με τους μάρτυρες, ανεξάρτητα από τη μειωμένη συγκέντρωσή της στα κύτταρα. Φαίνεται πως η δράση του *rolA* είναι αντίθετη από αυτή του γονιδίου *rolB*, ενώ θεωρείται πως υπάρχουν παράγοντες που εμποδίζουν την ταυτόχρονη έκφρασή τους στο φυτό. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, η δράση του *rolA* είναι

εμφανής στα φύλλα, καθώς προκαλεί έντονο ζάρωμα της φυλλικής περιφέρειας, με αποτέλεσμα να προσδίδει μία συνολικά καχεκτική όψη στο φυτό.

- 2) *rolB* gene: Είναι το σημαντικότερο γονίδιο της κατηγορίας των *rol* γονιδίων, καθώς έχει κεντρικό ρόλο στη ριζογένεση και στην επιμήκυνση των ριζών. Έχει αποδειχθεί ότι γενετικά τροποποιημένα φυτά με το πλασμίδιο Ri δεν αναπτύσσουν το ριζικό τους σύστημα σύμφωνα με τη συμπτωματολογία της ασθένειας των τριχωτών ριζών, εφόσον απουσιάζει το γονίδιο *rolB*. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό πολυάριθμων διακλαδώσεων, τη γρήγορη αύξηση των ριζών και τον πλαγιοτροπισμό που χαρακτηρίζει την ανάπτυξή τους. Σχετικά με τις ορμονικές και βιοχημικές μεταβολές στο εσωτερικό των ιστών, το γονίδιο *rolB* ενεργοποιεί σε μεγάλο βαθμό τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, ενώ ταυτόχρονα αναγκάζει τα τροποποιημένα κύτταρα να δεσμεύουν μεγαλύτερες ποσότητες αυξίνης, αυξάνοντας τη συγκέντρωσή της σε αυτά.
- 3) *rolC* gene: Η δραστηριότητα του γονιδίου *rolC* ενισχύει τον σχηματισμό και την ανάπτυξη των ριζών, αλλά χωρίς την παρουσία των προαναφερθέντων γονιδίων δεν μπορεί να προκαλέσει ριζογένεση σε μεγάλη κλίμακα. Παράλληλα, όπως και το *rolA*, αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στην αυξίνη, ενώ μειώνει σε μεγάλο βαθμό τη συγκέντρωση του αμπισικικού οξέος. Ωστόσο, η σημαντικότερη δράση του αφορά στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, και ιδιαίτερα αλκαλοειδών.
- 4) *rolD* gene: Είναι λιγότερο μελετημένο συγκριτικά με τα υπόλοιπα *rol* γονίδια και απαντάται σε συγκεκριμένους τύπους Ri πλασμιδίων. Η δράση του σχετίζεται με την ανάπτυξη των ιστών διαφόρων οργάνων, αλλά ποτέ με την ανάπτυξη των κορυφαίων μεριστωμάτων. Συνεπώς, δεν μπορεί να προκαλέσει ριζογένεση, αν απουσιάζουν τα υπόλοιπα *rol* genes, αλλά η ένθεση και έκφρασή του ενισχύει τον σχηματισμό των ανθέων.

Τέλος, εκτός της περιοχής του T-DNA, υπάρχουν τα *vir* γονίδια στην περιοχή «virulence» (*vir* genes), τα οποία δεν σχετίζονται με την πρόκληση της ασθένειας των τριχωτών ριζών αλλά διασφαλίζουν την επιτυχία της μόλυνσης, καθώς η μεταφορά της περιοχής T-DNA στο φυτικό DNA εξαρτάται από την έκφρασή τους (Bahramnejad et al., 2019; Ozyigit et al, 2013; Ron et al, 2014; Veena και Taylor, 2007).

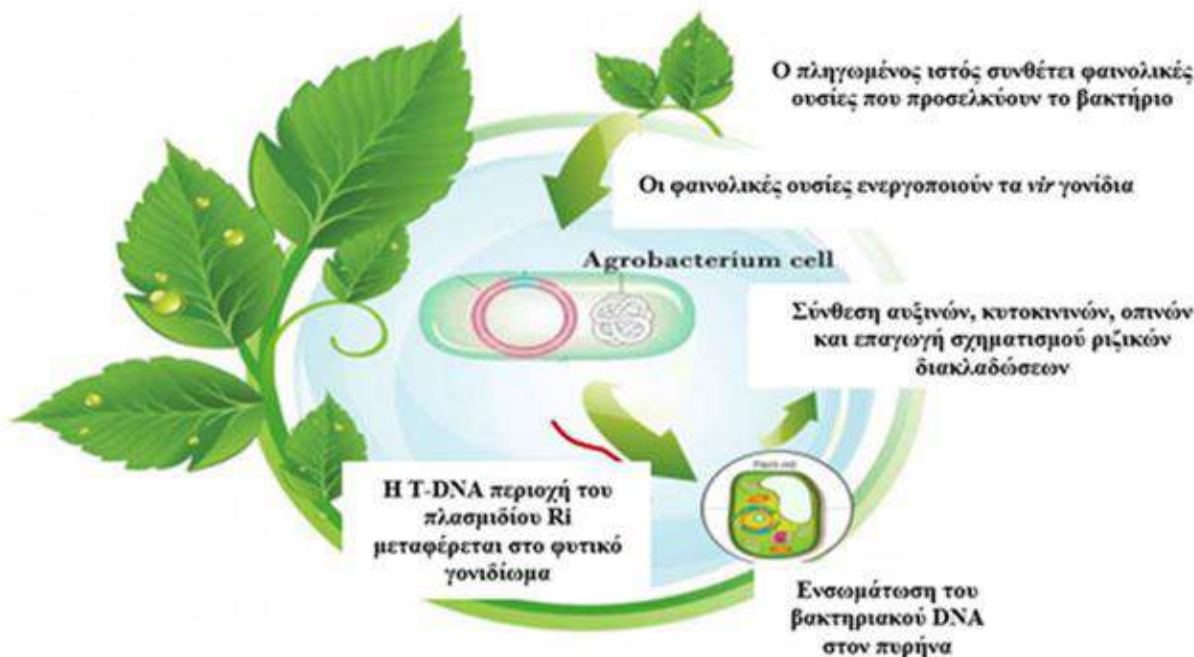


Εικόνα 1.7: Απεικόνιση του πλασμιδίου Ri του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*.

1.7.2 Περιγραφή του τρόπου μόλυνσης και των συμπτωμάτων

Η διαδικασία μόλυνσης περιλαμβάνει 4 διακριτά στάδια. Αρχικά, το βακτήριο εισέρχεται από πληγές των φυτικών τμημάτων, καθώς στα σημεία αυτά εκκρίνονται μικροποσότητες φαινολικών ενώσεων που το προσελκύουν. Με τη βοήθεια των μαστιγίων, το βακτήριο κατευθύνεται στον τραυματισμένο ιστό, λόγω χημειοταξίας, όπου και προσκολλάται. Οι φαινολικές ουσίες λειτουργούν ως ερέθισμα και ενεργοποιούν την έκφραση των *vir* γονιδίων που στη συνέχεια ενεργοποιούν τη μεταφορά της περιοχής του T-DNA. Με τη βοήθεια πρωτεϊνών που ρυθμίζονται από τα *vir* γονίδια, το βακτηριακό DNA εισέρχεται στο φυτικό κύτταρο και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου και ενσωματώνεται στο πυρηνικό DNA του φυτού (Εικόνα 1.8). Σημειώνεται πως η περιοχή T-DNA διαθέτει ευκαρυωτικές, ρυθμιστικές αλληλουχίες, οι οποίες επιτρέπουν την έκφραση των γονιδίων σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Με την ενσωμάτωση του T-DNA, ενεργοποιείται η έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των οπινών, καθώς και των *rol* γονιδίων που αναλύθηκαν παραπάνω. Η συνεργιστική δράση όλων των γονιδίων *rol*

έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του φυσιολογικού φαινοτύπου, επηρεάζοντας έντονα το ριζικό σύστημα και προκαλώντας την ασθένεια των «τριχωτών ριζών» (Ozygit et al, 2013; Ziemienowicz, 2014).



Εικόνα 1.8: Διαδικασία μόλυνσης φυτικού ιστού από το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes*.

Η ασθένεια των «τριχωτών ριζών» χαρακτηρίζεται από έντονο σχηματισμό διακλαδώσεων, τριχοειδών, πλευρικών ριζών που αναπτύσσονται σε πολύ μεγάλο βάθος, με αποτέλεσμα εξωτερικά το ριζικό σύστημα να έχει την εικόνα ενός ιδιαίτερα πυκνού δικτύου ριζών (Εικόνα 1.9). Οι νέες ρίζες ακολουθούν γεωτροπική ανάπτυξη, δηλαδή αναπτύσσονται πλάγια σε σχέση με τον κεντρικό άξονα του φυτού. Πέρα από τις μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στη ρίζα, οι οποίες αποτελούν την πιο χαρακτηριστική ένδειξη της μόλυνσης, τα μολυσμένα φυτά εμφανίζουν συμπτώματα συστροφής στα φύλλα, ακανόνιστη ανθοφορία, αυξημένο αριθμό ανθέων και μειωμένο μήκος στελεχών. Σε βιοχημικό επίπεδο, έχει προσδιοριστεί αυξημένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στο ριζικό σύστημα των γενετικά τροποποιημένων φυτών, συγκριτικά με τα φυτά που δεν έχουν μολυνθεί από το *Agrobacterium rhizogenes* (Cardelli et al., 1987; Ozygit et al., 2013; Sinkar et al, 1988; Veena και Taylor, 2007). Η μεταβολή του βιοχημικού προφίλ δεν ακολουθεί κάποιο μοτίβο, αλλά εξαρτάται από το φυτικό είδος. Για παράδειγμα, στο

είδος *Nicotiana rustica* L. η αύξηση των δευτερογενών μεταβολιτών οφείλεται στην αύξηση της μάζας του ριζικού συστήματος, ενώ στο είδος *Beta vulgaris* L. η μεταβολή στις ποσότητες των δευτερογενών μεταβολιτών είναι ανεξάρτητη από τη μεταβολή της μάζας των ριζών. Πρέπει να καταγραφεί πως η ανεξάρτητη παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών είναι επιθυμητή, όταν η γενετική τροποποίηση γίνεται σε εργαστηριακό επίπεδο με σκοπό την εξαγωγή τους (Sevon και Caldentey, 2002).



Εικόνα 1.9: Ριζικό σύστημα του είδους *Echinacea purpurea* (L.), ύστερα από προσβολή του *Agrobacterium rhizogenes*.

1.7.3 Αξιοποίηση στη γενετική τροποποίηση

Σε εργαστηριακό επίπεδο, το *Agrobacterium rhizogenes* είναι ικανό να μολύνει περισσότερα από 450 είδη φυτών, εκ των οποίων τα περισσότερα είναι δικοτυλήδονα. Η μόλυνση είναι δυνατή μέσω διαφόρων οργάνων, όπως το υποκοτύλιο, το φύλλο, ο βλαστός και ο μίσχος, ανάλογα με το φυτικό είδος που προσβάλλεται (Veena και Taylor, 2007). Σήμερα διάφορα στελέχη του βακτηρίου χρησιμοποιούνται για τον γενετικό μετασχηματισμό πολλών φυτικών ειδών, με σκοπό την αύξηση της μάζας του ριζικού συστήματος και της ποσότητας των δευτερογενών μεταβολιτών στην περιοχή των ριζών, την εισαγωγή ξένων γονιδίων στο φυτικό γονιδίωμα χρησιμοποιώντας ως φορέα το *A. rhizogenes* ή για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των βακτηρίων εδάφους με τα φυτά (Terfer, 1990). Επιπλέον, παρουσιάζουν γενετική και βιοχημική σταθερότητα, ενώ

ταυτόχρονα είναι εύκολη η διατήρησή τους. Η διαδικασία του μετασχηματισμού χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ταχύτητα και απλότητα, καθώς η δημιουργία των ριζών ολοκληρώνεται ύστερα από μερικές εβδομάδες (Chabaud et al., 2006). Αν και η επιτυχία της πειραματικής διαδικασίας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι το φυτικό είδος-ξενιστής, το στέλεχος και η μολυσματικότητα του βακτηρίου, η ταχύτητα της ανάπτυξης των ριζών καθιστά δυνατή και εύκολη την επανάληψη της διαδικασίας.

Το *Agrobacterium rhizogenes* αξιοποιείται, επίσης, εκτεταμένα για το γενετικό μετασχηματισμό φαρμακευτικών φυτών, με σκοπό τόσο την αύξηση της μάζας του ριζικού συστήματος όσο και την αύξηση της συγκέντρωσης των δευτερογενών μεταβολιτών στην περιοχή. Οι μετασχηματισμένες ρίζες χαρακτηρίζονται από υψηλότερη περιεκτικότητα δευτερογενών μεταβολικών ενώσεων, σε σχέση με τις αντίστοιχες αγρίου τύπου, χωρίς την προσθήκη ορμονών. Παράλληλα, οι ρίζες παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες για μεγάλα χρονικά διαστήματα, σε αντίθεση με της φυσιολογικές ρίζες, ενώ παράλληλα η συγκέντρωση των φαρμακευτικών ενώσεων παραμένει σχετικά σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια παραγωγής τους, σε αντίθεση με τους δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από κάλλο. Η δυνατότητα σταθερής ενίσχυσης του μεταβολικού προφίλ των φαρμακευτικών ειδών έχει οδηγήσει σε σημαντικές βελτιώσεις των αποδόσεων των δευτερογενών μεταβολιτών με φαρμακευτικό ενδιαφέρον, οι οποίες δεν θα μπορούσαν να επιτευχθούν σε συνθήκες αγρού, καθώς κατά την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος είναι δυνατή η βελτιστοποίηση των συνθηκών περιβάλλοντος (pH, άμεση επαφή των ριζών με το φως, περιεκτικότητα του υποστρώματος σε θρεπτικά συστατικά κλπ.), με αποτέλεσμα να ενισχύεται σημαντικά η σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών (Faraz et al., 2019; Georgiev et al., 2008; Van De Velde et al., 2003).

Προκειμένου να αποφευχθούν οι φυσικοί κίνδυνοι που παρουσιάζει η εγκατάσταση καλλιέργειας πεδίου διαγονιδιακών φυτών (π.χ. πιθανή μεταφορά ξένων γονιδίων σε γειτονικά φυτά, λόγω μεταφοράς της γύρης), ενδείκνυται η καλλιέργεια διαγονιδιακών φυτών με φαρμακευτικό ενδιαφέρον σε βιοαντιδραστήρες, όπου οι συνθήκες είναι πλήρως ελεγχόμενες και ερμητικές. Με αυτόν τον τρόπο, καθίσταται εφικτή η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών σε μεγάλη κλίμακα, συμβάλλοντας στην ευχερή απομόνωση και βιομηχανική αξιοποίησή τους. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται για πολύτιμες ουσίες, όπως ορισμένες πρωτεΐνες του είδους *Nicotiana benthamiana* L., αλλά η αξιοποίησή τους εξακολουθεί να είναι περιορισμένη, κυρίως λόγω του

υψηλού κόστους και του εξειδικευμένου εξοπλισμού που απαιτεί η διαδικασία. Έχουν σχεδιαστεί πολλά υποσχόμενοι βιοαντιδραστήρες ποικίλων τύπων (υγρής και αέριας φάσης) για την καλλιέργεια τριχωτών ριζών που περιέχουν ουσίες φαρμακευτικού ενδιαφέροντος, χωρίς όμως να χρησιμοποιούνται εκτεταμένα (Rawat et al., 2019)

1.7.4 *Agrobacterium rhizogenes* και φαρμακευτικά φυτά

Υπάρχουν πολλά φαρμακευτικά φυτικά είδη που έχουν υποστεί γενετικό μετασχηματισμό με σκοπό τη δημιουργία διαγονιδιακών ριζών, όπως το φασκόμηλο (*Salvia officinalis* L., *Salvia runcinata* L.) (Figlan και Makunga, 2017; Grzegorzczuk et al., 2014), η βαλεριάνα (*Valeriana officinalis* L.) (Zebarjadi et al., 2011) αλλά και η εχινάκεια (*Echinacea purpurea* (L.)). Στην εχινάκεια, ο μετασχηματισμός επετεύχθη με τη χρήση διαφορετικών βακτηριακών στελεχών, όπως τα K599 και AR15834, και έχουν καταγραφεί λεπτομερώς τόσο οι φαινοτυπικές όσο και οι βιοχημικές μεταβολές. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, ο μετασχηματισμός είχε ως αποτέλεσμα την ταχεία δημιουργία ενός δικτύου ριζών, που προσομοιάζει το ριζικό σύστημα που είναι τυπικό της ασθένειας των τριχωτών ριζών. Μεταξύ των διαφορετικών στελεχών, τα AR15834 και A4 εμφανίζουν καλύτερη συμβατότητα με την εχινάκεια, συγκριτικά με άλλα είδη όπως το K599, οδηγώντας σε αυξημένη μάζα ριζών. Ωστόσο, πέραν των φαινοτυπικών επιδράσεων του μετασχηματισμού, ως μεγαλύτερης σημασίας αναφέρονται οι μεταβολές στο βιοχημικό προφίλ του είδους *Echinacea purpurea* (L.), έπειτα από μετασχηματισμό με τη χρήση όλων των στελεχών που μόλυναν επιτυχώς τον φυτικό ιστό. Συγκεκριμένα, στις διαγονιδιακές ρίζες εντοπίστηκαν υψηλότερα ποσοστά παραγώγων καφεϊκού οξέος, με την κυριότερη αύξηση να αφορά στο κιχορικό οξύ, τη βασικότερη φαινολική ένωση στο συγκεκριμένο είδος εχινάκειας, που εμφάνισε 5πλάσια συγκέντρωση συγκριτικά με τα φυσιολογικά επίπεδα που απαντώνται στο ριζικό σύστημα των μαρτύρων. Αντίστοιχα, πολύ υψηλό ήταν το ποσοστό του χλωρογενικού, του καφαρικού οξέος και της εχινakoσίδης, ενώ αύξηση παρατηρήθηκε και στην περιεκτικότητα των αλκαμιδών, με βασικότερες τα ισομερή ισοβουτυλαμίδια δώδεκα-2E,4E-διένιο οξέα. Στο πλείστο των περιπτώσεων, οι διαγονιδιακές ρίζες προέκυψαν από μετασχηματισμό ιστού φύλλων ή υποκοτυλίου. Βάσει των ανωτέρω, είναι προφανές ότι ο γενετικός μετασχηματισμός του είδους *Echinacea purpurea* (L.) με τη χρήση του *Agrobacterium rhizogenes* αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο στοχεύοντας στην αυξημένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών με φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Παρά τις αναφορές σε διαδικασίες μετασχηματισμού της εχινάκειας με χρήση διαφορετικών αποτελεσματικών πρωτοκόλλων, αδιαμφισβήτητα υπάρχει σημαντικό

πεδίο έρευνας σχετικά με τη χρήση ποικίλων συνδυασμών εκφύτων – βακτηριακών στελεχών, που θα μπορούσαν να διερευνηθούν. Παράλληλα, η επανάληψη των ήδη εφαρμοζόμενων πρωτοκόλλων εγγυάται τη βελτιστοποίησή τους, με τελικό στόχο τη μεγιστοποίηση της παραγωγής των δευτερογενών μεταβολιτών στις παραγόμενες ρίζες (Demirci et al., 2020; Khalili et al., 2014; Liu et al., 2006; Motamedi et al., 2013; Trypsteen et al., 1991; Wang et al., 2006).

1.8 Μέθοδοι προσδιορισμού φυτοχημικού προφίλ

Η ανάλυση των δευτερογενών μεταβολιτών φυτικής προέλευσης αποτελεί μία πρόκληση, λόγω της τεράστιας ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν. Θεωρείται πως οι δευτερογενείς μεταβολίτες που απαντώνται σε όλα τα φυτικά είδη ανέρχονται αριθμητικά σε 10.000-20.000 και η πλειονότητά τους εντοπίζεται στα φυτά με φαρμακευτικές ιδιότητες. Συνεπώς, προκειμένου να εξασφαλιστεί ο αξιόπιστος προσδιορισμός του είδους και της συγκέντρωσης των ουσιών ενδιαφέροντος στα εκχυλίσματα διαφορετικών φυτικών ειδών είναι σαφώς αναγκαία η χρήση μεθόδων που χαρακτηρίζονται από υψηλή ακρίβεια, επαναληψιμότητα και ταχύτητα στη μέτρηση.

1.8.1 Υγρή (HPLC) και αέρια (GC-MS) χρωματογραφία

Η μέθοδος που εφαρμόζεται εκτεταμένα για τον προσδιορισμό του βιοχημικού προφίλ των φυτών είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Steinmann και Ganzera, 2011). Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι το εύρος των μορίων που δύναται να προσδιορίσει, καθώς μπορούν να μετρηθούν μεμονωμένα μικρά οργανικά μόρια, ιόντα, μεγάλα βιομόρια και πολυμερή. Επιπλέον, ο συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματοσκοπία μάζας (HPLC-MS) αυξάνει την ευαισθησία της μέτρησης. Παράλληλα, με αυτή την τεχνική αυξάνεται σημαντικά η ακρίβεια του προσδιορισμού, ενώ διευρύνεται η γκάμα των ενώσεων που μπορούν να ανιχνευθούν (Dang, 2013). Ενδεικτικά, κάποιοι τύποι ενώσεων που μπορούν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας και βρίσκονται σε υψηλές ποσότητες σε διάφορα φυτικά είδη είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα αλκαλοειδή, τα τερπένια, ορισμένες βιταμίνες και σάκχαρα. Η μέτρηση των ανωτέρω συστατικών, ωστόσο, προϋποθέτει τη βελτιστοποίηση μιας σειράς παραγόντων που καθορίζουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Αρχικά, είναι απαραίτητο να γίνει ένας σαφής ορισμός των ενώσεων που πρέπει να προσδιοριστούν και να ποσοτικοποιηθούν, καθώς δεν είναι εφικτή η ανίχνευση όλων των ενώσεων. Η ανίχνευση γίνεται βάσει πρότυπων διαλυμάτων που έχει προηγηθεί η ποσοτικοποίησή τους. Επιπλέον, είναι απαραίτητη η σωστή προκατεργασία των φυτικών τμημάτων (π.χ. εκχύλιση,

διήθηση), με την επιλογή των κατάλληλων διαλυτών και συνθηκών για την επιτυχή απομόνωση των ουσιών ενδιαφέροντος. Τέλος, πρέπει να προηγηθεί βελτιστοποίηση των συνθηκών και διατήρησή τους σε σταθερά επίπεδα έως ότου ολοκληρωθεί η μέτρηση, καθώς η μεταβολή τους μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια της μέτρησης, αλλά και την κατάσταση του οργάνου (Boligon και Athayde, 2011; Misan et al., 2010).

Αντίστοιχα, ο προσδιορισμός του βιοχημικού περιεχομένου διαφόρων φαρμακευτικών φυτών γίνεται και με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματοσκοπία μάζας (GC-MS). Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή της υγρής χρωματογραφίας, με τη διαφορά ότι το δείγμα κινείται μέσα στις στήλες υπό μορφή αερίου. Τα επιμέρους συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως το σημείο βρασμού και η αλληλεπίδραση με τη στερεή φάση που υπάρχει στις στήλες. Η αέρια χρωματογραφία χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ακρίβεια, υψηλή ευαισθησία και ειδίκευση και είναι ιδανική για τον προσδιορισμό ενώσεων με παρόμοιες δομές και ιχνοστοιχείων. Ωστόσο, εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της μέτρησης, δεν είναι εφικτός ο προσδιορισμός μη πτητικών ενώσεων ή ενώσεων που αλλοιώνονται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας. Παράλληλα, πρέπει να αναφερθεί πως δεν αποτελεί την ιδανική μέθοδο για τον προσδιορισμό των επιμέρους τμημάτων σύνθετων δειγμάτων (Iordache et al., 2009; Proestos et al., 2006; Sahil et al., 2011).

1.8.2 Χρήση φασματοφωτομέτρου

Η μέτρηση των συνολικών φαινολικών ενώσεων στους φυτικούς ιστούς είναι εφικτή και με τη μεμονωμένη χρήση φασματοφωτομέτρου, μετρώντας την απορρόφηση των διαλυμάτων σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, ανάλογα με τη μέθοδο που ακολουθείται και το είδος των πρότυπων διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών διαφόρων φυτικών ειδών, συμπεριλαμβανομένου και του *Echinacea purpurea* L., είναι η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου, η μέτρηση των ενώσεων ενδιαφέροντος πραγματοποιείται με απορρόφηση στα 765 nm και η ποσοτικοποίησή τους γίνεται βάσει της πρότυπης καμπύλης που δημιουργείται από τη μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος γνωστής συγκέντρωσης (Sidhiq et al., 2016). Άλλες μέθοδοι περιλαμβάνουν τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων κερσετίνης (Aarland et al., 2016) για τον

προσδιορισμό των συγκεντρώσεων και απορρόφηση στα 415 nm ή την παρασκευή προτύπων χλωρογενικού οξέος και απορρόφηση στα 745 nm (Tsai et al., 2012).

Ο προσδιορισμός των φαιολικών συστατικών των φυτικών ιστών με τη χρήση φασματοφωτομέτρου παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα και γι' αυτό αποτελεί δημοφιλή μέθοδο. Αρχικά, είναι δυνατή η ανίχνευση ακόμη και χαμηλών ποσοτήτων φαιολικών ουσιών, λόγω της υψηλής ευαισθησίας του οργάνου, ενώ παράλληλα η ταχύτητα και η ευκολία της διαδικασίας ξεπερνάει αυτή της χρωματογραφίας, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η μέτρηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων και η επανάληψη της διαδικασίας προς αύξηση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος, καθώς δεν απαιτούνται ακριβά αντιδραστήρια για τη διεξαγωγή των μετρήσεων, ενώ οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί παρουσιάζουν ευρεία εφαρμογή σε πολλά φυτικά είδη. Ωστόσο, πρέπει να διευκρινιστεί πως οι συγκεκριμένες μετρήσεις δεν είναι επαρκώς αναλυτικές, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο προσδιορισμός των επιμέρους ενώσεων αλλά μόνο του συνόλου των φαιολικών ουσιών. Ταυτόχρονα, άλλες ουσίες που απορροφώνται στο ίδιο μήκος κύματος ή αντιδρούν με το ίδιο αντιδραστήριο με τις φαιολικές, ενδέχεται να μετρηθούν ταυτόχρονα με τις υπό μελέτη ενώσεις, με αποτέλεσμα να οδηγούν σε υπερεκτίμηση των συγκεντρώσεων των φαιολικών ουσιών.

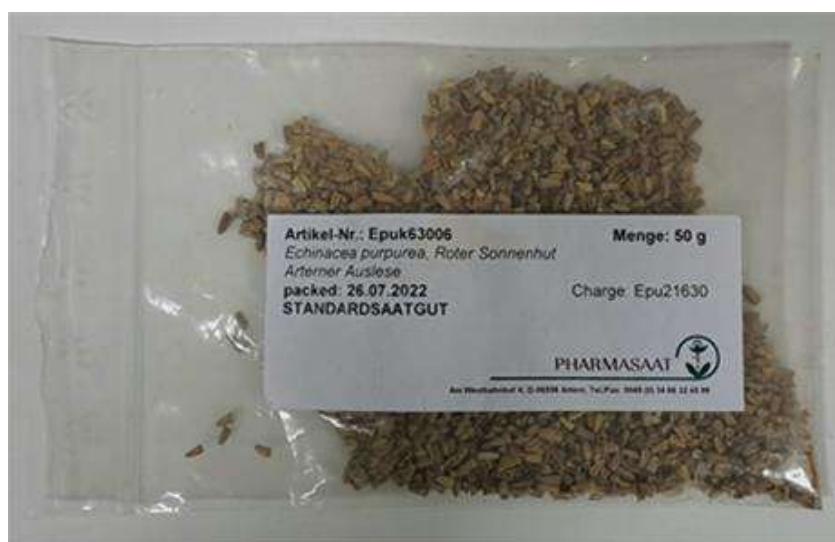
1.9 Σκοπός της μελέτης

Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η αξιολόγηση διαφορετικών τεχνικών και πρωτοκόλλων ιστοκαλλιέργειας στο είδος *Echinacea purpurea* (L.) με στόχο την παραγωγή επαναλήψιμης και υψηλής ποιότητας βιομάζας και απώτερο σκοπό την εξαγωγή βιοδραστικών συστατικών με φαρμακευτικό χαρακτήρα. Αρχικά, αξιολογήθηκε η επίδραση διαφορετικών τύπων διεγερτών στα πλαίσια της μεθόδου «seed priming», προκειμένου να ενισχυθεί το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και να βελτιωθεί η ευρωστία και η ανάπτυξη των σποροφύτων στα πρώτα στάδια του βιολογικού κύκλου. Ακολούθως, ως ερευνητικός στόχος τέθηκε η βελτιστοποίηση και η μεγιστοποίηση των ποσοτήτων των φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων στο ριζικό σύστημα, μέσω του γενετικού μετασχηματισμού με δύο στελέχη του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes* και της ελεγχόμενης αβιοτικής καταπόνησης των νεαρών σποροφύτων. Τελική επιδίωξη των παραπάνω διαδικασιών αποτελεί η δημιουργία πρωτοκόλλων προεπεξεργασίας των σπόρων, γενετικού μετασχηματισμού και στοχευμένων καταπονήσεων ξηρασίας και αλατότητας, που είναι πλήρως προσαρμοσμένα στο υπό μελέτη είδος εχινάκειας, ώστε να εξασφαλισθεί η μέγιστη δυνατή παραγωγή βιομάζας με το υψηλότερο και ποιοτικότερο βιοδραστικό προφίλ.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Επιλογή φυτικού υλικού

Για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας και την ολοκλήρωση των διαφορετικών τεχνικών ιστοκαλλιέργειας στο είδος *Echinacea purpurea* (L.) χρησιμοποιήθηκαν πιστοποιημένοι σπόροι, οι οποίοι εξασφαλίστηκαν από την εταιρεία Pharmasaat (<https://pharmasaat.de/en/>), που εξειδικεύεται στον πολλαπλασιασμό και στο εμπόριο πιστοποιημένου γενετικού υλικού φαρμακευτικών και αρωματικών φυτικών ειδών. Ο σπόρος της εχινάκειας είναι αχάινιο και χαρακτηρίζεται από μικρή διάμετρο (Εικόνα 2.1). Το βάρος 1000 σπόρων του είδους ανέρχεται στα 3.75 g.



Εικόνα 2.1: Γενετικό υλικό του είδους *Echinacea purpurea* (L.)

2.2 Εφαρμογή διεγερτών βλάστησης - «Seed priming»

Με σκοπό την ενίσχυση της ικανότητας βλάστησης των σπόρων και της πρώιμης ανάπτυξης των φυταρίων του είδους *Echinacea purpurea* (L.) πραγματοποιήθηκε προεπεξεργασία των σπόρων με διεγέρτες πριν την τοποθέτησή τους σε τριβλία με υπόστρωμα ανάπτυξης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των διαλυμάτων των διεγερτών καθώς επίσης και των υποστρωμάτων βλάστησης και ανάπτυξης των φυταρίων. Για την παρασκευή του υποστρώματος, ζυγίστηκαν 2,5 g agar σε ζυγό ακριβείας και προστέθηκαν σε 500 mL dH₂O, τα οποία είχαν

προηγούμενως μετρηθεί με τη χρήση ογκομετρικού σωλήνα. Ακολούθησε αποστείρωση του διαλύματος στη συσκευή αποστείρωσης.

Σχετικά με την παρασκευή των διαλυμάτων των διεγερτών, χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου Falcon και ddH₂O. Σε κάθε φιαλίδιο, προστέθηκε αποστειρωμένο ddH₂O, το οποίο μετρήθηκε με αποστειρωμένο ποτήρι ζέσεως, και στη συνέχεια προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα από το stock διαλύματος του κάθε διεγέρτη με τη χρήση μηχανικής πιπέτας ακριβείας. Οι μεταχειρίσεις διέγερσης που εφαρμόστηκαν ήταν α) αποστειρωμένο dH₂O – hydropriming, β) χλωριούχο νάτριο NaCl σε δύο συγκεντρώσεις (50 mM και 100 mM) – osmoprimering, γ) γιββερελλικό οξύ GA₃ σε δύο συγκεντρώσεις (50 μM και 100 μM) – hormonal primering και δ) ασκορβικό οξύ (Asc) σε δύο συγκεντρώσεις (50 mg/L και 100 mg/L) – nutritional primering. Στον Πίνακα 2.1 καταγράφονται ο τρόπος παρασκευής των stock διαλυμάτων καθώς και των διαλυμάτων εμφάνισης των σπόρων.

Πίνακας 2.1: Παρασκευή διαλυμάτων διεγερτών για την προεπεξεργασία των σπόρων εχινάκειας

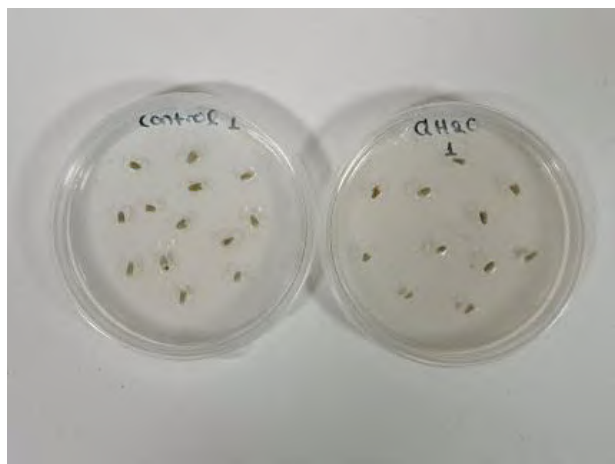
Μεταχείριση	Stock solution	Test solution 50	Test solution 100
NaCl (50mM και 100mM)	0,5844 g σε τελικό όγκο 10 mL dH ₂ O	1 mL stock solution σε τελικό όγκο 20 mL dH ₂ O (αραίωση 1/20)	2 mL stock solution σε τελικό όγκο 20 mL dH ₂ O (αραίωση 1/10)
GA₃ (50μM και 100μM)	0,0346 g σε τελικό όγκο 10 mL dH ₂ O + 1 σταγόνα 95% αιθυλική αλκοόλη για τη διάλυση	0,1 mL stock solution σε τελικό όγκο 20mL dH ₂ O (αραίωση 1/200)	0,2 mL stock solution σε τελικό όγκο 20 mL dH ₂ O (αραίωση 1/100)
Asc (50mM και 100mM)	0,17612 g σε τελικό όγκο 100 mL dH ₂ O	0,56 mL stock solution σε τελικό όγκο 20 mL dH ₂ O	1,134 mL stock solution σε τελικό όγκο 20 mL dH ₂ O

Ακολούθησε η απολύμανση των σπόρων με διάλυμα χλωρίνης 30% (15 mL χλωρίνης σε 50 mL dH₂O) που περιείχε Tween-20. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν μαζί με το διάλυμα σε αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου Falcon και αναδεύτηκαν για 5 λεπτά. Η ανάδευση ακολουθήθηκε από 3 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών έκαστη με αποστειρωμένο dH₂O, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της χλωρίνης. Οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν στα διαλύματα των διεγερτών, όπου

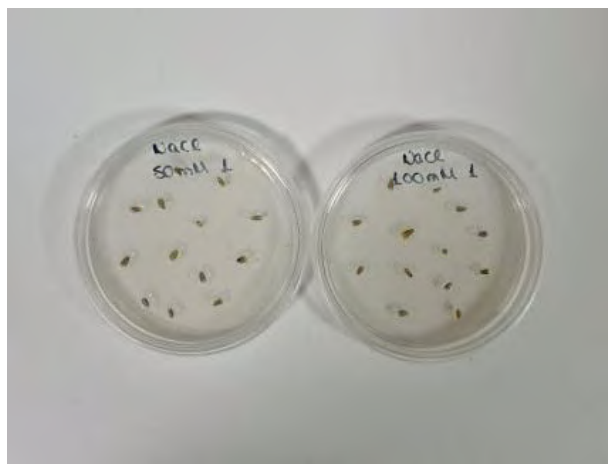
παρέμειναν για 24 ώρες, υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης σε μηχανικό αναδευτήρα (160 rpm) και θερμοκρασία δωματίου. Τα φιαλίδια Falcon με τα διαλύματα των διεγερτών και τους σπόρους τυλίχτηκαν με αλουμινόχαρτο, ώστε να εξασφαλισθούν συνθήκες σκότους.

Ύστερα από το πέρας των 24 ωρών και την ολοκλήρωση της προεπεξεργασίας των σπόρων, πραγματοποιήθηκε επιφανειακό ξέπλυμα των σπόρων με αποστειρωμένο dH₂O. Ακολούθησε ολιγόλεπτη επώαση των σπόρων εντός της τράπεζας νηματικής ροής προκειμένου να αποκτήσουν φυσιολογικά επίπεδα υγρασίας. Οι «primed» σπόροι τοποθετήθηκαν σε τριβλία petri, τα οποία περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε με νερό και άγαρ (Εικόνα 2.2).

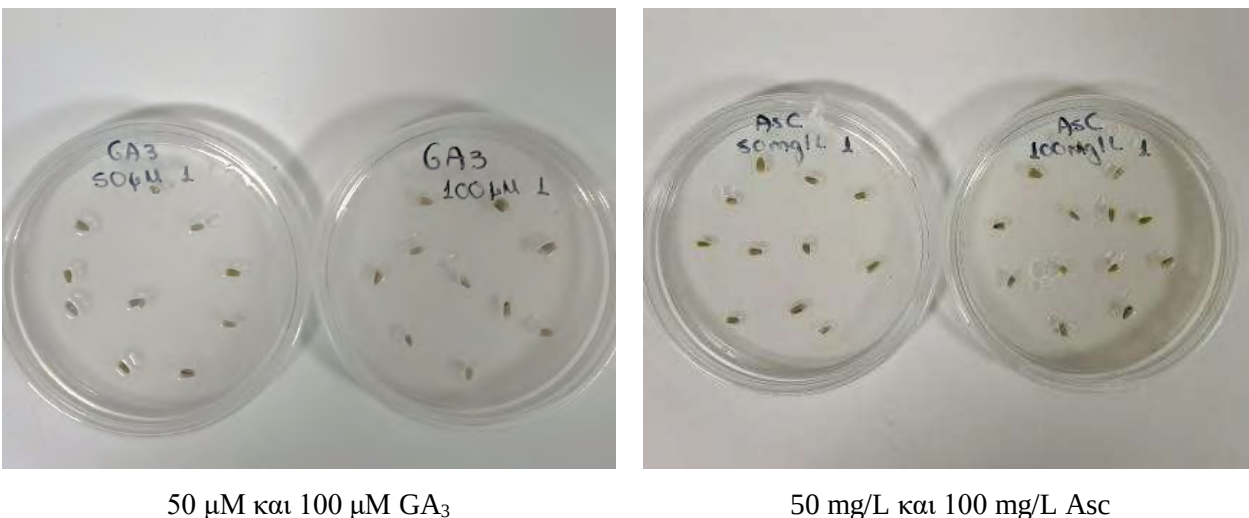
Το πειραματικό σχέδιο ήταν πλήρως τυχαιοποιημένο με 4 επαναλήψεις των 10 σπόρων. Δηλαδή, κάθε μεταχείριση περιελάμβανε 4 τριβλία με 10 σπόρους. Επιπρόσθετα, σε 4 τριβλία τοποθετήθηκαν απολυμασμένοι σπόροι, οι οποίοι δεν υπέστησαν καμία μεταχείριση και αποτέλεσαν τους «μάρτυρες» (control). Τα τριβλία σφραγίστηκαν κατά τα $\frac{3}{4}$ με parafilm, ώστε να διατηρηθεί στο εσωτερικό το επιθυμητό επίπεδο υγρασίας και, παράλληλα, να εισέρχεται το απαραίτητο οξυγόνο, και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών ελεγχόμενων συνθηκών (25 °C, 16h φως / 8h σκοτάδι) για διάστημα 14 ημερών. Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε τράπεζα νηματικής ροής, η οποία αποστειρωνόταν για 20 λεπτά με ακτινοβολία UV πριν από οποιαδήποτε πειραματική διεργασία.



dH₂O



50 mM και 100 mM NaCl



Εικόνα 2.2: Τοποθέτηση των προ-επεξεργασμένων σπόρων του είδους *Echinacea purpurea* (L.) σε τριβλία που περιέχουν υπόστρωμα βλάστησης.

Οι παράμετροι αξιολόγησης της επίδρασης των διεγερτών που εφαρμόστηκαν είναι οι εξής:

1) Ποσοστό βλάστησης των σπόρων (GP) (%): Το ποσοστό βλάστησης των σπόρων (GP) προσδιορίστηκε βάσει του αριθμού των σπόρων που βλάστησαν τις πρώτες 7 ημέρες ύστερα από την τοποθέτηση των σπόρων στα τριβλία (ως ημέρα 1η ορίζεται η επομένη της τοποθέτησης των σπόρων στα τριβλία και στον θάλαμο ανάπτυξης). Ως βλαστημένοι θεωρήθηκαν οι σπόροι που κατά την περίοδο λήψης παρατηρήσεων είχαν ελάχιστο μήκος ριζιδίου 2 mm. Το ποσοστό βλάστησης δίνεται από τον τύπο **GP = (Αριθμός σπόρων που βλάστησαν) / (Συνολικός αριθμός σπόρων) x 100**.

2) Ρυθμός βλάστησης των σπόρων (GR): Προέκυψε από τις παρατηρήσεις βλάστησης που λήφθηκαν από την 1η μέχρι και την 7η ημέρα και υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο **GR = $\Sigma [(Gi - Gi_{-1})/i]$** , όπου Gi ο αριθμός των σπόρων που βλάστησαν την ημέρα i και Gi_{-1} ο αριθμός των σπόρων που βλάστησαν την ημέρα $i-1$. Ο τύπος απλοποιήθηκε στη μορφή **GR = $\Sigma (Gi / i)$** , όπου Gi = ο αριθμός των σπόρων που βλάστησαν την ημέρα i .

3) Μέσος χρόνος βλάστησης των σπόρων (MGT): Προέκυψε από τις παρατηρήσεις βλάστησης που λήφθηκαν από την 1η μέχρι και την 7η ημέρα και υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο **MGT = $1 / GR$** , όπου MGT εκφράζεται σε μέρες (d).

4) Μήκος ρίζας και βλαστού: Το μήκος της ρίζας και του βλαστού μετρήθηκε με τη χρήση διαβαθμισμένου χάρακα σε cm. Το μήκος τόσο της ρίζας όσο και του βλαστού προσδιορίστηκαν την 7^η, 14^η και 20^η ημέρα.

5) Δείκτης ευρωστίας σποροφύτων (SVI) (%): Για τον προσδιορισμό του δείκτη ευρωστίας των σποροφύτων (SVI) χρησιμοποιήθηκε ο τύπος **SVI = ποσοστό βλάστησης x μήκος σπορόφυτου (cm)**. Όσον αφορά το μήκος του σποροφύτου λήφθηκαν υπόψη οι μετρήσεις της 7^{ης} και της 14^{ης} ημέρας.

6) Νωπό (FW) και ξηρό βάρος (DW) σποροφύτων: Προσδιορίστηκε με τη χρήση ζυγού ακριβείας την 20^η ημέρα. Το ξηρό βάρος των σπόρων προσδιορίστηκε ύστερα από παραμονή των σποροφύτων στο ξηραντήριο για 48 ώρες σε συνθήκες θερμοκρασίας 70°C.

7) Ποσοστό περιεχόμενης υγρασίας των σποροφύτων (WC)(%): Το ποσοστό περιεχόμενης υγρασίας των σποροφύτων υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο **WC (%) = (FW - DW / DW) x 100**, όπου FW= το νωπό βάρος και DW= το ξηρό βάρος των σποροφύτων. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε μία φορά κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους, πραγματοποιήθηκε ξήρανση 3 σποροφύτων για κάθε επανάληψη (συνολικά 12 σποροφύτων) στους 70 °C για 2 ημέρες.

2.3 Εφαρμογή καταπόνησεων ξηρασίας και υψηλής αλατότητας

Προκειμένου να εξεταστεί ο τρόπος επίδρασης της υδατικής καταπόνησης και της καταπόνησης αλατότητας στο σύνολο των παραγόμενων φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων στα φυτά του είδους *Echinacea purpurea* (L), τα φυτά εκτέθηκαν σε δύο επίπεδα της καταπόνησης. Για τη δημιουργία συνθηκών καταπόνησης ξηρασίας χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα πολυαιθυλενικής γλυκόλης PEG-6000 σε περιεκτικότητα 5% (5 g·L⁻¹) και 10% (10 g·L⁻¹). Για κάθε επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας, πραγματοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις.

Η αξιολόγηση της επίδρασης της καταπόνησης αλατότητας στο βιοχημικό προφίλ των φυτών εχινάκειας αφορούσε την έκθεσή τους σε δύο επίπεδα καταπόνησης αλατότητας. Για την προσομοίωση της καταπόνησης αλατότητας χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα χλωριούχου νατρίου NaCl σε συγκεντρώσεις 25 mM (1,461 g·L⁻¹ H₂O) και 75 mM (4,383 g·L⁻¹ H₂O). Για κάθε επίπεδο καταπόνησης αλατότητας, πραγματοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις.

Επιπλέον, για την εκβλάστηση των σπόρων και την αρχική ανάπτυξη των σποροφύτων σε τριβλία προετοιμάστηκαν τα κατάλληλα υποστρώματα ανάπτυξης, των οποίων η σύνθεση καταγράφεται αναλυτικά στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Σύνθεση υποστρωμάτων καταπόνησης ξηρασίας και αλατότητας για την βλάστηση των σπόρων και την αρχική ανάπτυξη των σποροφύτων.

Επίπεδο καταπόνησης	Συστατικά
Μάρτυρας	2,5 g Agar 500 mL dH ₂ O
Χαμηλό επίπεδο αλατότητας (pH = 5,6-5,8)	2,5 g Agar 500 mL dH ₂ O 0,7305 g NaCl
Μεσαίο επίπεδο αλατότητας (pH = 5,6-5,8)	2,5 g Agar 500 mL dH ₂ O 2,1915 g NaCl
Χαμηλό επίπεδο ξηρασίας (pH = 5,6-5,8)	2,5 g Agar 500 mL dH ₂ O 2,5 g PEG-6000
Υψηλό επίπεδο ξηρασίας (pH = 5,6-5,8)	2,5 g Agar 500 mL dH ₂ O 5 g PEG-6000

Για την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας, οι σπόροι υπέστησαν αρχικά επιφανειακή απολύμανση για την αποφυγή μολύνσεων. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα χλωρίνης 30% (15 mL χλωρίνης σε 50 mL dH₂O) που περιείχε Tween-20. Οι σπόροι αναδεύτηκαν στο διάλυμα για 5 λεπτά και στη συνέχεια, ακολούθησαν 3 πλύσεις με αποστειρωμένο dH₂O προκειμένου να απομακρυνθεί η χλωρίνη. Κάθε πλύση διήρκεσε 5 λεπτά. Στη συνέχεια, οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα, πλαστικά κυκλικά τριβλία όπου είχε προστεθεί το κατάλληλο υπόστρωμα ανάπτυξης, ανάλογα με το είδος και το επίπεδο της καταπόνησης. Η τοποθέτηση των σπόρων στα τριβλία έγινε με χρήση αποστειρωμένης λαβίδας σε θάλαμο νηματικής ροής, αφού προηγουμένως η τράπεζα εργασίας είχε αποστειρωθεί με ακτινοβολία UV για 20 λεπτά. Τα τριβλία σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης υπό ελεγχόμενες συνθήκες στους 25 °C, 16h φως / 8h σκοτάδι. Τα νεαρά σπορόφυτων παρέμειναν στα τριβλία για περίπου 3 εβδομάδες, μέχρι να αναπτυχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό το ριζικό σύστημα (Εικόνα 2.3). Στη συνέχεια, τα νεαρά φυτά μεταφέρθηκαν προσεκτικά σε καθαρά φυτοδοχεία χωρητικότητας 3L, στα οποία είχε

προσθεθεί καθαρό υπόστρωμα βερμικουλίτη. Τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών ελεγχόμενων συνθηκών (25 °C, 16h φως/ 8h σκοτάδι), όπου και παρέμειναν για διάστημα 8 εβδομάδων. Για όλο το χρονικό διάστημα, τα φυτάρια αρδεύονταν αποκλειστικά με τα προαναφερθέντα διαλύματα, ανά δύο ημέρες. Στο τέλος, μόλις ολοκληρώθηκε ο κύκλος των καταπονήσεων, τα φυτά συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν προστατευμένα με αλουμινόχαρτο σε θάλαμο βαθιάς κατάψυξης (-80 °C) προς αποφυγή μετασυλλεκτικών αλλοιώσεων, μέχρι να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός του συνόλου των φαινολικών ουσιών. Σημειώνεται πως ταυτόχρονα με την ανάπτυξη των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης, αναπτύχθηκαν φυτά στις ίδιες συνθήκες περιβάλλοντος, τα οποία αρδεύονταν αποκλειστικά με νερό βρύσης μέχρι την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας. Τα φυτά αυτής της μεταχείρισης (control) αποτέλεσαν τα φυτά «μάρτυρες» του πειράματος. Για το σύνολο των μεταχειρίσεων, πραγματοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις.



Φυτά «μάρτυρες» - Control



Χαμηλό επίπεδο καταπόνησης αλατότητας - 25 mM NaCl



Μεσαίο επίπεδο καταπόνησης αλατότητας - 75 mM NaCl



Χαμηλό επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας - 5%
PEG



Χαμηλό επίπεδο καταπόνησης ξηρασίας - 10%
PEG

Εικόνα 2.3: Φυτάρια του είδους *Echinacea purpurea* (L.) που υποβλήθηκαν σε διαφορετικά επίπεδα καταπόνησης ξηρασίας και υψηλής αλατότητας.

2.4 Γενετικός μετασχηματισμός με τη χρήση του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*

2.4.1 Προετοιμασία φυτικού υλικού

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε επιφανειακή απολύμανση των σπόρων εχινάκειας με στόχο την αποφυγή μολύνσεων σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν. Για την απολύμανση, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα χλωρίνης 30% (15 mL χλωρίνης σε 50 mL dH₂O) που περιείχε Tween-20. Οι σπόροι αναδεύτηκαν στο διάλυμα για 5 λεπτά και ακολούθησαν 3 πλύσεις με αποστειρωμένο dH₂O προκειμένου να απομακρυνθεί η χλωρίνη. Κάθε πλύση διήρκεσε 5 λεπτά. Στη συνέχεια, οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα, πλαστικά κυκλικά τριβλία με υπόστρωμα βλάστησης που περιείχε 1% άγαρ. Σημειώνεται πως για το υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε μόνο άγαρ, και όχι κάποια πηγή σακχάρων, με σκοπό την αποφυγή ανάπτυξης μυκήτων και βακτηρίων και το pH ρυθμίστηκε σε 5,6-5,8. Τέλος, τα τριβλία σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης υπό ελεγχόμενες συνθήκες στους 25°C, 16 ώρες φωτός / 8 ώρες σκοτάδι. Τα φυτάρια αναπτύχθηκαν για 10 ημέρες πριν την πραγματοποίηση του μετασχηματισμού. Όλες οι διαδικασίες απολύμανσης και τοποθέτησης των σπόρων στα αποστειρωμένα τριβλία πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής, αφού προηγουμένως η τράπεζα εργασίας είχε αποστειρωθεί με ακτινοβολία UV για 20 λεπτά.

2.4.2 Βακτηριακά στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes*

Τα βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν για τον γενετικό μετασχηματισμό των φυταρίων εχινάκειας ήταν τα R1000 και K599. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας σε υγρό θρεπτικό μέσο (LB) που περιείχε τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή ανακίνησης, σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 28 °C (Εικόνα 2.4). Η ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας διήρκεσε 2 ημέρες, μέχρι να αποκτήσουν $OD_{600} = 0,6-1,0$.

Συγκεκριμένα για το στέλεχος R1000, τοποθετήθηκαν 10 mL LB σε φιαλίδιο τύπου Falcon (50 mL), 10 μ L ναλιδιξικού οξέος (ND) και 700 μ L βακτηριακών κυττάρων. Αντίστοιχη ήταν η προετοιμασία για το βακτηριακό στέλεχος K599, με μόνη διαφορά τη χρήση του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη σε ποσότητα 10 μ L (SP). Στη συνέχεια, τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε συσκευή ανακίνησης. Όταν η βακτηριακή καλλιέργεια απέκτησε $OD_{600} = 0,6-1,0$, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας αποτέλεσε ουσιαστικά μία επανάληψη της διαδικασίας που προαναφέρθηκε. Τέλος, ακολούθησε η δημιουργία των εμβολίων για το γενετικό μετασχηματισμό.



Εικόνα 2.4: Ανάπτυξη των βακτηριακών καλλιεργειών σε μηχανικό αναδευτήρα, 160rpm

Για την παραλαβή των βακτηριακών κυττάρων, σε φιαλίδια τύπου Falcon 15 mL τοποθετήθηκαν 11 mL από την ανακαλλιέργεια κάθε βακτηριακού στελέχους και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5 min, στις 350 rpm και θερμοκρασία 5 °C. Ακολούθησε λήψη του ιζήματος (pellet) και απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος (Εικόνα 2.5). Στη συνέχεια, στο κάθε φιαλίδιο Falcon, που περιείχε το βακτηριακό ίζημα, προστέθηκαν 11 mL MS, με σκοπό την επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα φιαλίδια επανατοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο και επαναλήφθηκε η διαδικασία. Μετά τη 2η φυγοκέντρηση, λήφθηκε το καθαρό ίζημα και

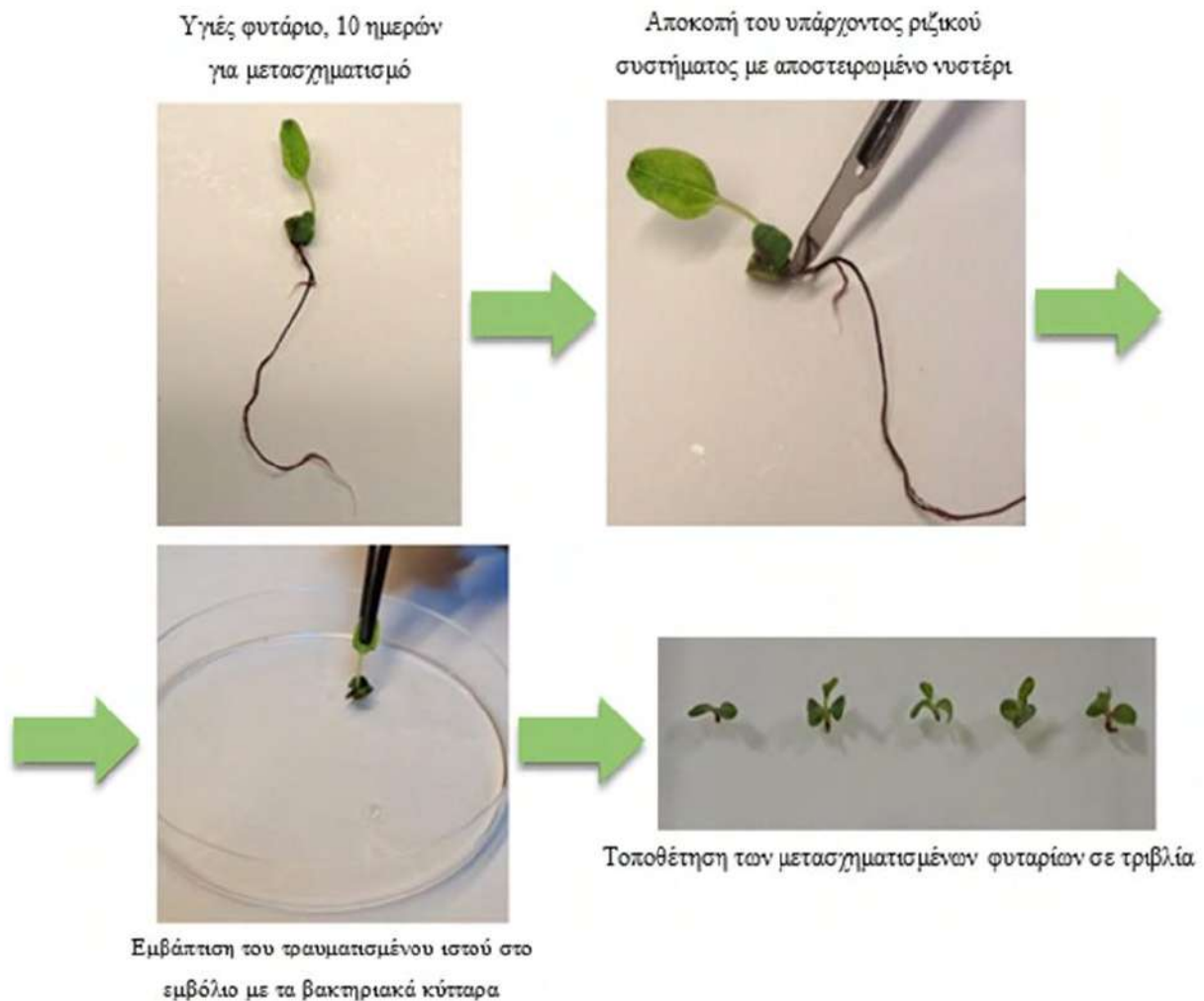
ακολούθησε επαναδιάλυση σε 400 μ L MS ώστε το εμβόλιο να έχει υψηλή συγκέντρωση κυττάρων και αυξημένη μολυσματικότητα.



Εικόνα 2.5: Δημιουργία ιζήματος κατά τη φυγοκέντρωση της βακτηριακής καλλιέργειας στις 350 rpm (αριστερά). Παραλαβή καθαρού εμβολίου ύστερα από τη 2^η φυγοκέντρωση (δεξιά).

2.4.3 Γενετικός μετασχηματισμός φυταρίων εχινάκειας

Ο γενετικός μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου των Pavli και Skaracis (2010) με ορισμένες τροποποιήσεις, με σκοπό την καλύτερη προσαρμογή του στο υπό μελέτη είδος και την εξασφάλιση της επιτυχίας του μετασχηματισμού. Ύστερα από 10 ημέρες, επιλέχθηκαν τα υγιή φυτάρια που είχαν αναπτυχθεί και αποτέλεσαν τα έκφυτα για την επαγωγή των διαγονιδιακών ριζών. Οι υπάρχουσες ρίζες αποκόπηκαν με αποστειρωμένο νυστέρι, ακριβώς κάτω από την περιοχή του υποκοτύλιου. Στη συνέχεια, ο τραυματισμένος ιστός εμβάπτιστηκε στα βακτηριακά κύτταρα του εμβολίου. Μετά το πέρας της εμβάπτισης, τα εμβολιασμένα φυτάρια τοποθετήθηκαν σε τετράγωνα, αποστειρωμένα τριβλία Petri, στα οποία είχε τοποθετηθεί προηγουμένως υπόστρωμα συγκαλλιέργειας (Πίνακας 2.3) (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6: Διαδικασία γενετικού μετασχηματισμού του είδους *Echinacea purpurea* (L.) με τη χρήση του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*.

Τα τριβλία σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης υπό ελεγχόμενες συνθήκες στους 25 °C, 16h φως / 8h σκοτάδι. Τα εμβολιασμένα σπορόφυτα αναπτύχθηκαν για 2 ημέρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε νέα, τετράγωνα, αποστειρωμένα τριβλία Petri, που περιείχαν υπόστρωμα ριζοβολίας (Πίνακας 2.3). Στο υπόστρωμα επαγωγής ριζών είχε προστεθεί το αντιβιοτικό σεφοταξίμη (cefotaxime, 250 mg/L) ώστε να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη των βακτηρίων στο υπόστρωμα. Τα φυτάρια παρέμειναν στα τριβλία για περίπου 20 ημέρες, εντός του θαλάμου ανάπτυξης, και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε τετράγωνα τριβλία Petri με ίδιο υπόστρωμα επαγωγής ριζοβολίας. Σημειώνεται πως τα τριβλία ήταν τοποθετημένα κατακόρυφα εντός του θαλάμου, ώστε να διευκολυνθεί ο γεωτροπισμός των ριζών. Τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα διατηρήθηκαν στα τελικά τριβλία εντός του θαλάμου ανάπτυξης για όλο το διάστημα

λήψης των παρατηρήσεων. Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής, αφού προηγουμένως η τράπεζα εργασίας είχε αποστειρωθεί με ακτινοβολία UV για 20 λεπτά.

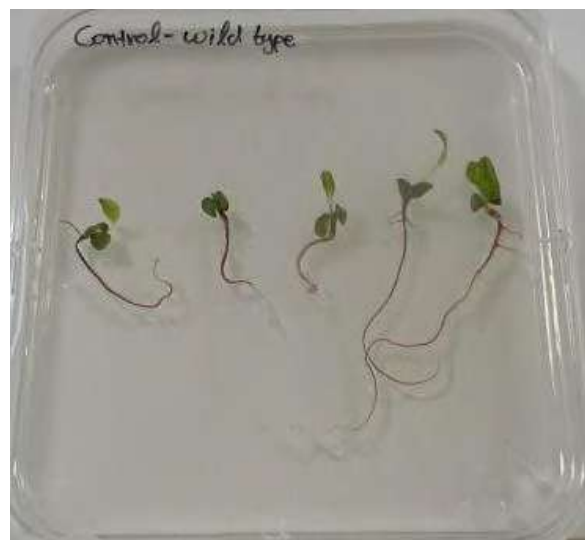
Πίνακας 2.3: Σύνθεση υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στον γενετικό μετασχηματισμό του είδους *Echinacea purpurea* (L.) με τη χρήση του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*.

Υποστρώματα	Συστατικά
Υπόστρωμα βλάστησης	2,5 g Agar 500 mL dH ₂ O
Υπόστρωμα συγκαλλιέργειας (pH = 5,6-5,8)	1,225 g MS 15 g Sucrose 4 g Agar 50 µL Ακετοσυριγκόνη 500 mL dH ₂ O
Υπόστρωμα επαγωγής ριζών (pH = 5,6-5,8)	1,225 gr MS 10 g Sucrose 4 g Agar 125 mg Σεφοταξίμη (250 mg/L) 500 mL dH ₂ O
MS Liquid για τη δημιουργία του εμβολίου (pH = 5,6-5,8)	0,49 g MS 3 g Sucrose 100 mL dH ₂ O

Τελικά, υπήρχαν 4 διαφορετικές μεταχειρίσεις, οι οποίες περιλάμβαναν: i) εμβολιασμένα φυτά με το βακτηριακό στέλεχος R1000, ii) εμβολιασμένα φυτά με το βακτηριακό στέλεχος K599, iii) φυτά μάρτυρες control, στα οποία πραγματοποιήθηκε αποκοπή του ριζικού συστήματος, χωρίς να προσβληθούν με κάποιο βακτηριακό στέλεχος και iv) φυτά μάρτυρες wild type, των οποίων η ανάπτυξη του αρχικού ριζικού συστήματος συνεχίστηκε κανονικά, χωρίς την αποκοπή του (Εικόνα 2.7). Όλα τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ίδιες συνθήκες και όμοιας σύστασης υποστρώματα και πως κάθε τριβλίο περιλάμβανε 5 νεαρά φυτά. Η λήψη των παρατηρήσεων που σχετίζεται με τη φαινοτυπική αξιολόγηση του μετασχηματισμού ξεκίνησε με την εμφάνιση του νέου ριζικού συστήματος (11 ημέρες μετά τον μετασχηματισμό) και διήρκεσε 4 εβδομάδες.



Φυτάρια «μάρτυρες», όπου έγινε αποκοπή του υπάρχοντος ριζικού συστήματος



Φυτάρια «μάρτυρες» αγρίου τύπου, όπου δεν πραγματοποιήθηκε αποκοπή του ριζικού συστήματος



Μετασχηματισμένα φυτάρια με το βακτηριακό στέλεχος R1000



Μετασχηματισμένα φυτάρια με το βακτηριακό στέλεχος K599

Εικόνα 2.7: Οι διαδικασίες του γενετικού μετασχηματισμού συνολικά περιλάμβαναν 4 μεταχειρίσεις: i) εμβολιασμένα φυτά με το βακτηριακό στέλεχος R1000, ii) εμβολιασμένα φυτά με το βακτηριακό στέλεχος K599, iii) φυτά μάρτυρες όπου πραγματοποιήθηκε αποκοπή του ριζικού συστήματος, χωρίς να πραγματοποιηθεί εμβολιασμός με το βακτήριο και iv) φυτά μάρτυρες wild type, των οποίων η ανάπτυξη του αρχικού ριζικού συστήματος συνεχίστηκε κανονικά, χωρίς να μεσολαβήσει αποκοπή του ριζικού συστήματος.

2.4.4 Επίδραση διαλυμάτων ορμονών

Ένας πρόσθετος ερευνητικός στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης φυτοορμονών στο φαινότυπο των μετασχηματισμένων φυταρίων αλλά και των φυτών μαρτύρων. Η εφαρμογή ορμονών επιχειρήθηκε ως μέσο ενίσχυσης της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος, με απώτερο σκοπό τη μεγιστοποίηση των ποσοτήτων των ενώσεων ενδιαφέροντος στο εσωτερικό των ιστών. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε η συνθετική αυξίνη NAA (1-ναφθαλινο-οξικό οξύ), η οποία προστέθηκε στο υπόστρωμα της επαγωγής των ριζών ορισμένων τριβλίων όλων των μεταχειρίσεων κατά την τελευταία μεταφορά τους σε τετράγωνα, αποστειρωμένα τριβλία Petri. Για την προετοιμασία του stock διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν 4 g NAA, τα οποία προστέθηκαν σε αποστειρωμένο ποτήρι ζέσεως και διαλύθηκαν σταδιακά με 20 mL διαλύματος NaOH. Για την πλήρη διάλυση της ορμόνης χρησιμοποιήθηκε μαγνητικός αναδευτήρας. Μόλις το διάλυμα απέκτησε διαυγή όψη, απομακρύνθηκε από τη συσκευή και φιλτραρίστηκε με τη βοήθεια ενσωματωμένου φίλτρου σε σύριγγα. Τέλος, το διάλυμα αναμίχθηκε με 20 mL αποστειρωμένου dH₂O. Από το stock solution που προετοιμάστηκε, προστέθηκαν 5 mL σε 500 mL του υποστρώματος ριζοβολίας.

2.5 Προσδιορισμός συνολικών φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων

2.5.1 Προσδιορισμός συνολικών φαινολικών ενώσεων

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων, ακολουθήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu, σύμφωνα με την οποία η ποσότητα των φαινολικών ουσιών εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Οι μεταχειρίσεις που αξιολογήθηκαν ήταν i) τα φυτά που υπέστησαν την καταπόνηση της ξηρασίας και της αλατότητας σε όλα τα υπό μελέτη επίπεδα στρες καθώς και τα αντίστοιχα φυτά «μάρτυρες», ii) τα προσβεβλημένα φυτάρια με το βακτήριο R1000, τα οποία εμφάνισαν το χαρακτηριστικό φαινότυπο των μετασχηματισμένων ριζών. Τα φυτά που μετασχηματίστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος K599 δεν αξιολογήθηκαν, λόγω απουσίας του επιθυμητού φαινοτύπου και περιορισμένης ποσότητας του φυτικού ιστού που δεν επαρκούσε για το σύνολο των επαναλήψεων.

Αρχικά, για την προετοιμασία του ιστού ζυγίστηκαν 0,250 g ριζικού ιστού κάθε μεταχείρισης. Η ζυγισμένη ποσότητα του φυτικού ιστού τοποθετήθηκε σε πορσελάνινο γουδί μαζί με 3,5 mL

μεθανόλης και πολτοποιήθηκε. Το εκχύλισμα που παραλήφθηκε φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 5000 r/min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, παραλήφθηκε το υπερκείμενο και τοποθετήθηκε σε πωματιζόμενους σωλήνες. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την προετοιμασία των δειγμάτων καθώς επίσης και τα πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος για τη δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης. Αρχικά, δημιουργήθηκε το διάλυμα Folin-Ciocalteu με τη χρήση 25 mL του εμπορικού αντιδραστήριου, τα οποία διαλύθηκαν με 225 mL dH₂O. Αντιστοίχως, παρασκευάστηκε διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃) 7,5% με χρήση 75 g άνυδρου Na₂CO₃ που διαλύθηκαν σε 925 mL dH₂O.

Ακολούθως παρασκευάστηκε το stock διάλυμα γαλλικού οξέος, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως βάση για τη σύνθεση των πρότυπων διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων. Για τη δημιουργία του πυκνού stock διαλύματος 0,5 g γαλλικού οξέος προστέθηκε σε dH₂O έως τελικού όγκου 100 mL. Στον Πίνακα 2.4 καταγράφεται αναλυτικά ο τρόπος παρασκευής των πρότυπων διαλυμάτων για τη δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης.

Πίνακας 2.4: Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος για τη δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης/

Δημιουργία πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος		
Συγκέντρωση (mg%)	mL πυκνού stock διαλύματος	mL dH ₂ O
2,5	0,25	50
5	0,5	49,5
7,5	0,75	49,25
10	1	49
15	1,5	48,5

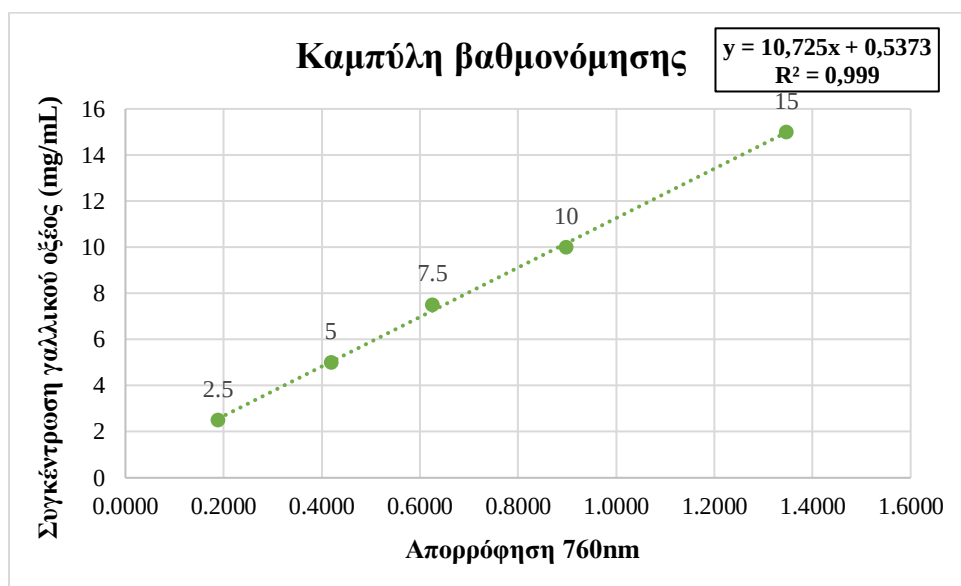
Ακολούθησε η προετοιμασία των δειγμάτων για τη φασματοφωτομέτρηση. Για κάθε δείγμα παραλήφθηκαν 2 mL από το κάθε εκχύλισμα και τοποθετήθηκαν σε γυάλινο, πωματιζόμενο σωλήνα. Στη συνέχεια, σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 2 mL dH₂O, 10 mL του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu καθώς και 8 mL του διαλύματος Na₂CO₃. Παρομοίως δημιουργήθηκαν και 5 δείγματα, στα οποία αντί για το εκχύλισμα, προστέθηκαν 2 mL από κάθε πρότυπο διάλυμα (Εικόνα 2.8). Σημειώνεται πως υπήρξε και ένα δείγμα blank (λευκό δείγμα) που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια της αντίδρασης αλλά, αντί για εκχύλισμα ή πρότυπο διάλυμα, περιείχε dH₂O και

χρησιμοποιήθηκε για τον μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου. Ακολούθως, όλα τα δείγματα ανακινήθηκαν σε συσκευή Vortex και τοποθετήθηκαν σε συνθήκες πλήρους σκότους για 1 ώρα.



Εικόνα 2.8: Πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος (αριστερά) και δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης (από αριστερά προς τα δεξιά): R1000 – 10% PEG – 5% PEG 5 – 75 mM NaCl – 25 mM NaCl – Control.

Μετά το πέρας της μιας ώρας, από κάθε δείγμα λήφθηκαν 3 mL και τοποθετήθηκαν σε γυάλινες κυψελίδες στο φασματοφωτόμετρο, όπου μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 760 nm. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων ήταν 18, περιλαμβάνοντας 3 επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση. Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε από τη μέτρηση της απορρόφησης των πρότυπων δειγμάτων και βάσει της οποίας έγινε ο προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων στα άγνωστα διαλύματα παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 2.1.



Διάγραμμα 2.1: Καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών ενώσεων.

Η ποσότητα των ολικών φαινολικών στον ριζικό ιστό εκφράστηκε σε mg γαλλικού οξέος ανά g νωπού βάρους.

2.5.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας

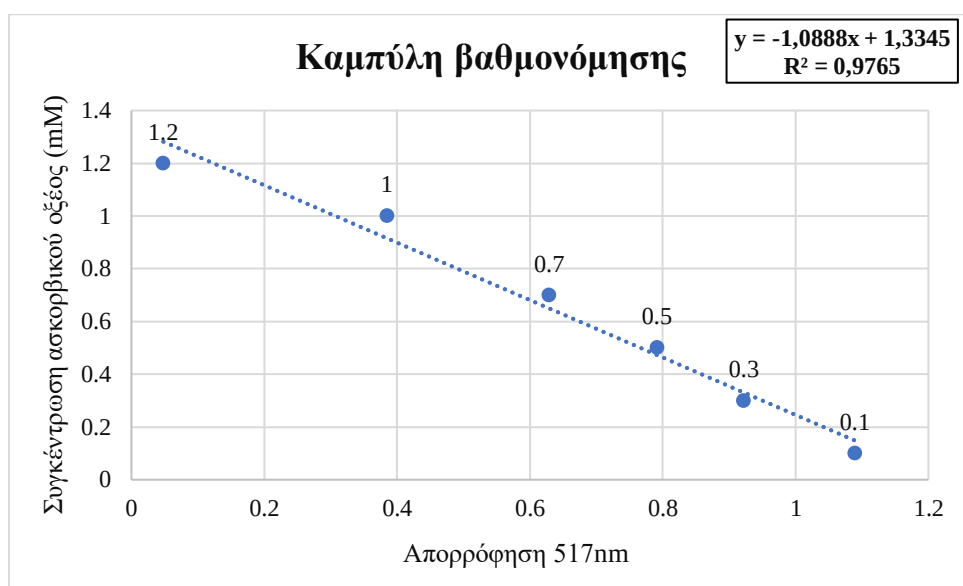
Για τον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου, ακολουθήθηκε η μέθοδος DPPH. Χρησιμοποιήθηκε ποσότητα από τα προϋπάρχοντα εκχυλίσματα, των οποίων η δημιουργία αναφέρθηκε προηγουμένως, με την προσθήκη διαφορετικών αντιδραστηρίων. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το διάλυμα DPPH, συγκέντρωσης 100 μM , για το οποίο απαιτήθηκαν 0,019716 g DPPH διαλυμένα σε 100 mL καθαρής μεθανόλης. Επιπλέον, παρασκευάστηκαν το πυκνό stock (0,176 g ασκορβικού οξέος διαλυμένα σε 100 mL μεθανόλης) και το αραιό stock (5 mL πυκνού stock διαλύματος αραιωμένα σε 50 mL μεθανόλης) διάλυμα ασκορβικού οξέος. Ακολούθως, με τις απαραίτητες αραιώσεις, προέκυψαν τα πρότυπα διαλύματα ασκορβικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης. Στον Πίνακα 2.5 καταγράφεται αναλυτικά ο τρόπος παρασκευής των πρότυπων διαλυμάτων για τη δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης.

Πίνακας 2.5: Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων ασκορβικού οξέος για τη δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης.

Δημιουργία πρότυπων διαλυμάτων ασκορβικού οξέος		
Συγκέντρωση (μM)	mL stock διαλύματος	mL μεθανόλης
0,1	0,5 (αραιό stock)	4,5
0,3	1,5 (αραιό stock)	3,5
0,5	2,5 (αραιό stock)	2,5
0,7	3,5 (αραιό stock)	1,5
1	0,5 (πυκνό stock)	4,5
1,2	0,6 (πυκνό stock)	4,4

Στη συνέχεια, ακολούθησε η προετοιμασία των δειγμάτων για τη φασματοφωτομέτρηση. Για κάθε δείγμα, παραλήφθηκαν 100 μL από το κάθε εκχύλισμα και τοποθετήθηκαν σε γυάλινο, πωματιζόμενο σωλήνα. Στη συνέχεια, σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 2,9 mL του αντιδραστηρίου DPPH καθώς και 100 μL μεθανόλης. Παρομοίως, δημιουργήθηκαν και 7 δείγματα, στα οποία αντί

για το εκχύλισμα, προστέθηκαν 100 mL από κάθε πρότυπο διάλυμα. Σημειώνεται πως υπήρξε και ένα δείγμα blank (λευκό δείγμα), που περιείχε 100 μ L μεθανόλης και 2,9 mL DPPH και χρησιμοποιήθηκε για τον μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου. Ακολούθως, όλα τα δείγματα ανακινήθηκαν σε συσκευή Vortex και τοποθετήθηκαν σε συνθήκες πλήρους σκότους για 30 λεπτά. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, από κάθε δείγμα λήφθηκαν 3 mL και τοποθετήθηκαν σε γυάλινες κυψελίδες στο φασματοφωτόμετρο, όπου μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 7517 nm. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων ήταν 18, περιλαμβάνοντας 3 επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση. Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε από τη μέτρηση της απορρόφησης των πρότυπων δειγμάτων και βάσει της οποίας έγινε ο προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών στα άγνωστα διαλύματα παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 2.2.



Διάγραμμα 2.2: Καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Σημειώνεται πως η αντιοξειδωτική ικανότητα στον ριζικό ιστό εκφράστηκε σε μmol ασκορβικού οξέος ανά g νωπού βάρους.

2.6 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του στατιστικού πακέτου JMP v.18. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με one-way ANOVA ($p \leq 0.05$), βάσει του πειραματικού σχεδίου, συνδυάζοντας τα επίπεδα καταπόνησης και τους υπό μελέτη γονότυπους.

Οι διαφορές μεταξύ των Μ.Ο. συγκρίθηκαν με τη χρήση της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς LSD test ($p \leq 0.05$).

3. Αποτελέσματα

3.1 Ενίσχυση της βλάστησης με τη χρήση διεγερτών – «Seed priming»

Οι σπόροι του είδους *Echinacea purpurea* (L.) υποβλήθηκαν σε τέσσερις μεταχειρίσεις επεξεργασίας, φυσικής και χημικής φύσεως, με σκοπό την ενίσχυση της βλάστησης των σπόρων και της ευρωστίας των σποροφύτων. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταχειρίσεις αφορούσαν σε i) ενυδάτωση (hydropriming), ii) οσμωτική επαγωγή (NaCl), iii) εφαρμογή γιββερλικού οξέος (GA₃) και iv) ασκορβικού οξέος (Ascorbic acid). Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν σπόροι που δεν υπέστησαν καμία μεταχείριση («μάρτυρες») και αναπτύχθηκαν στις ίδιες συνθήκες με τους υπό εξέταση σπόρους. Για την ορθή διεξαγωγή της στατιστικής ανάλυσης το σύνολο των τριβλίων ανάπτυξης που αφορούν τη μεταχείριση της ενυδάτωσης χωρίστηκε σε δύο επιμέρους μεταχειρίσεις, που, όμως, αφορούν την ίδια προεπεξεργασία των σπόρων πριν την τοποθέτηση στα τριβλία με το υπόστρωμα ανάπτυξης. Οι επιδράσεις των διαφορετικών εφαρμογών διέγερσης αξιολογήθηκαν βάσει γνωρισμάτων που σχετίζονται με τη βλάστηση και την ανάπτυξη των σποροφύτων. Πιο συγκεκριμένα, οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της επίδρασης των διαφορετικών μεταχειρίσεων ήταν το ποσοστό βλάστησης των σπόρων (GP%), ο ρυθμός βλάστησης (GR) και ο μέσος χρόνος (MGT) βλάστησης των σπόρων, το μήκος του αναπτυσσόμενου βλαστού και του ριζικού συστήματος, ο δείκτης ευρωστίας των σποροφύτων (SVI%) καθώς και η περιεχόμενη υγρασία των σποροφύτων (WC%).

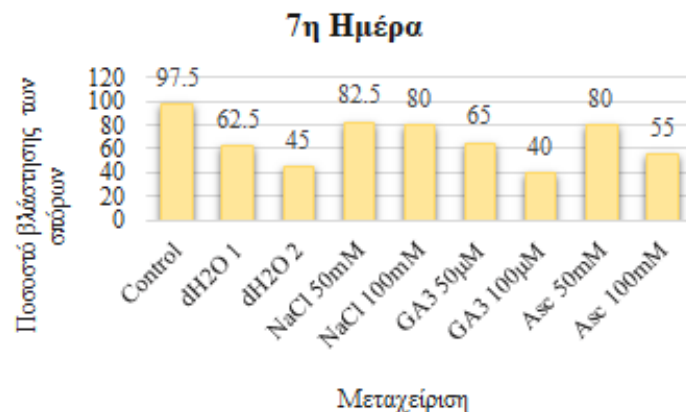
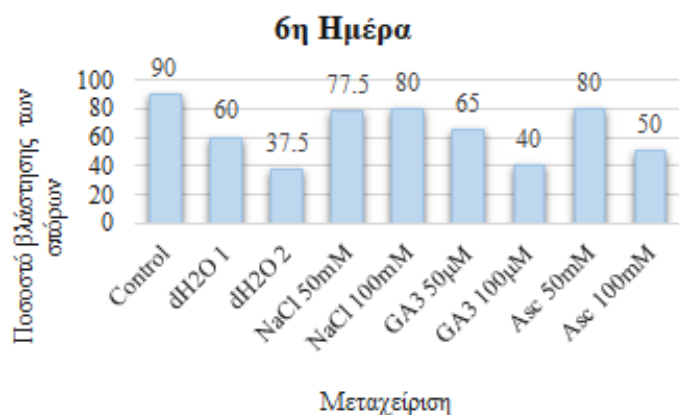
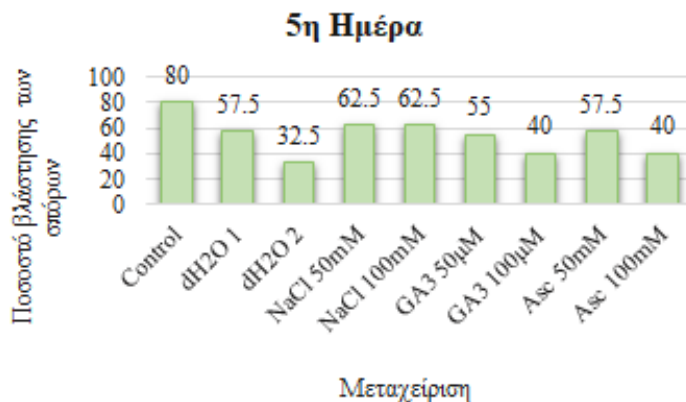
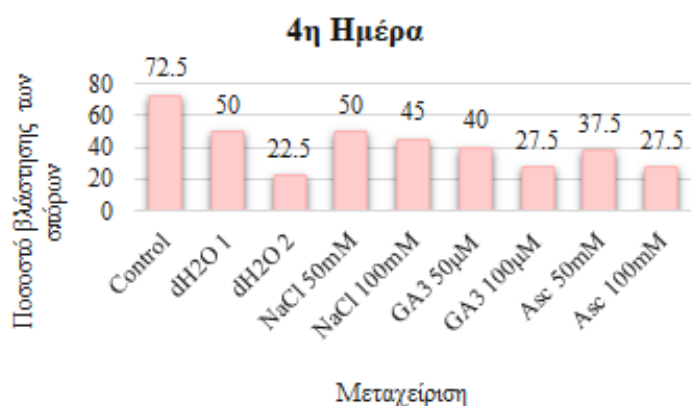
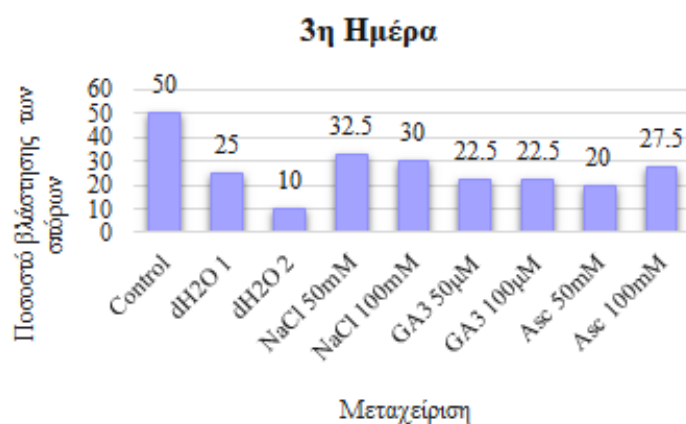
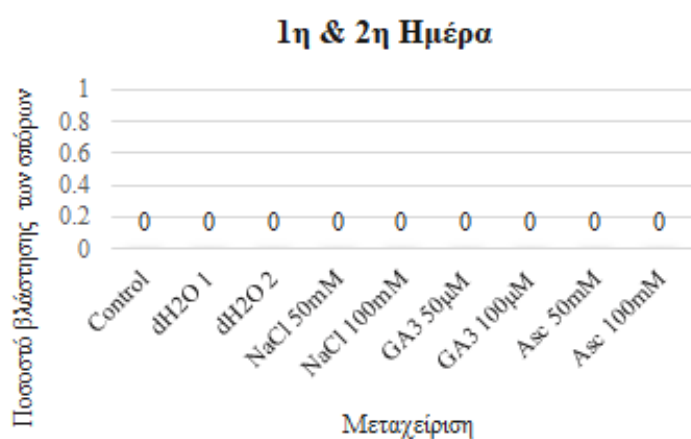
3.1.1 Επίδραση των διεγερτών στο ποσοστό βλάστησης (GP%) των σπόρων

Για τον υπολογισμό του ποσοστού βλάστησης (GP%) των σπόρων πραγματοποιήθηκε καταγραφή του αριθμού των σπόρων που βλάστησαν τις πρώτες 7 ημέρες ύστερα από την τοποθέτηση των σπόρων στα τριβλία. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων υπογραμμίζουν τη σημαντική επίδραση των διαφορετικών διεγερτών στην τελική βλάστηση των σπόρων. Μέχρι την 7η ημέρα λήψης των παρατηρήσεων, το μεγαλύτερο ποσοστό βλάστησης παρατηρήθηκε στο μάρτυρα, ενώ υψηλό ποσοστό σημειώθηκε και στους σπόρους που είχαν προηγουμένως επεξεργαστεί με διάλυμα NaCl, με καλύτερα αποτελέσματα να εμφανίζει η συγκέντρωση 50 mM NaCl. Επίσης, η χαμηλή συγκέντρωση ασκορβικού οξέος (50 mM) ευνόησε

τη βλάστηση των σπόρων. Αντίθετα, η εφαρμογή του γιββερλικού οξέος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις καθώς και το επίπεδο των 100 mM ασκορβικού οξέος επέδρασαν αρνητικά στη βλάστηση των σπόρων. Το μικρότερο ποσοστό βλάστησης παρατηρήθηκε στους σπόρους που είχαν προηγουμένως παραμείνει σε διάλυμα 100 μ M γιββερλικού οξέος. Τέλος, παρατηρήθηκε πως το ποσοστό βλάστησης των σπόρων που είχε προηγηθεί ενυδάτωση (hydropriming) ήταν αισθητά μειωμένο συγκριτικά με τον μάρτυρα και τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Η πορεία ανάπτυξης των σπόρων και έναρξη της βλάστησης αναλύεται στον Πίνακα και τα Διαγράμματα 3.1.

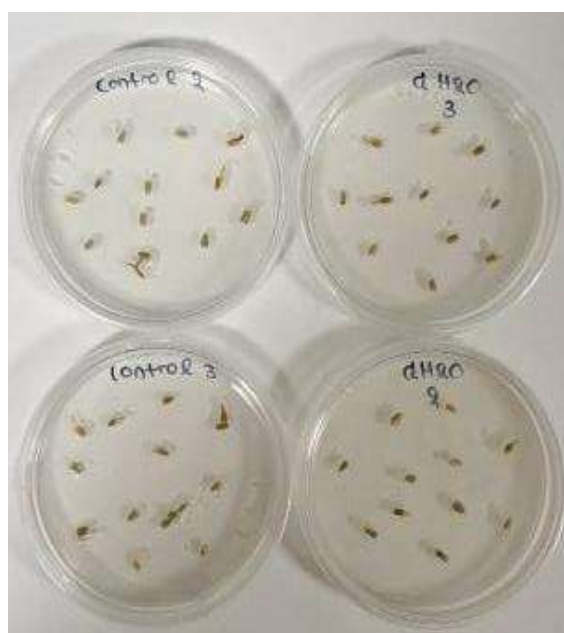
Πίνακας 3.1: Ποσοστό βλάστησης των σπόρων (GP %) από την 1^η έως την 7^η ημέρα λήψης των παρατηρήσεων.

Ποσοστό βλάστησης των σπόρων						
Μεταχείριση	1 ^η & 2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα	6 ^η ημέρα	7 ^η ημέρα
Control	0	<u>50,00a</u>	<u>72,50a</u>	<u>80,00a</u>	<u>90,00a</u>	<u>97,50a</u>
dH ₂ O 1	0	25,00bc	50,00b	57,50bcd	60,00bcd	62,50bc
dH ₂ O 2	0	<u>10,00c</u>	<u>22,50d</u>	<u>32,50c</u>	<u>37,50d</u>	45,00c
50 mM NaCl	0	32,50ab	50,00b	62,50b	77,50abc	82,50ab
100 mM NaCl	0	30,00b	45,00bc	62,50b	80,00ab	80,00ab
50 μ M GA ₃	0	22,50bc	40,00bcd	55,00abc	65,00abcd	65,00bc
100 μ M GA ₃	0	22,50bc	27,50bc	40,00bc	40,00d	<u>40,00c</u>
50 mg/L Asc	0	20,00bc	37,50bcd	57,50abc	80,00ab	80,00ab
100 mg/L Asc	0	27,50bc	27,50cd	40,00bc	50,00cd	55,00bc

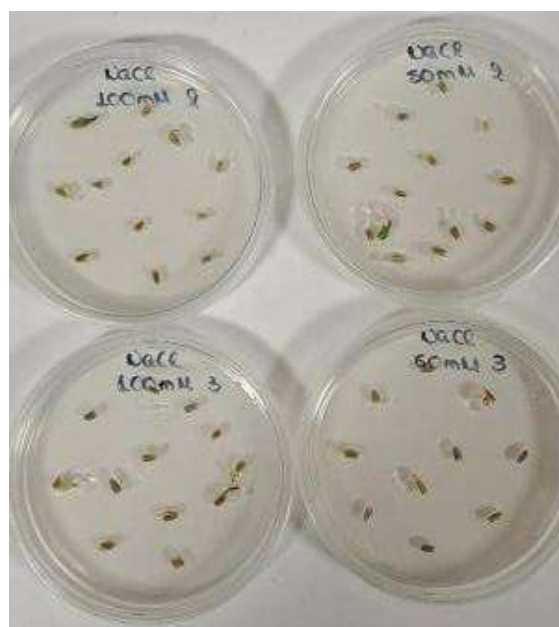


Διάγραμμα 3.1: Ποσοστό βλάστησης των σπόρων (GP %) από την 1^η έως την 7^η ημέρα.

Παράλληλα, στην Εικόνα 3.1 απεικονίζεται το δυναμικό βλάστησης, την 3η ημέρα ύστερα από την τοποθέτησή τους στα τριβλία με το υπόστρωμα ανάπτυξης.



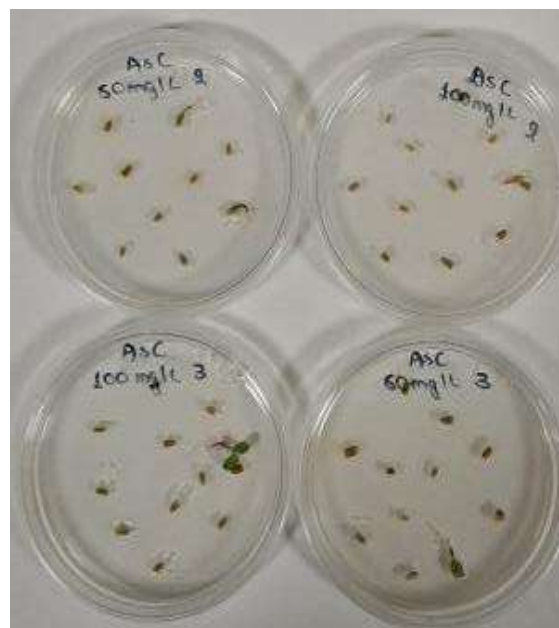
Control & hydropriming dH₂O



50 mM & 100 mM NaCl



50 μM & 100 μM GA₃



50 mg/L & 100 mg/L AsC

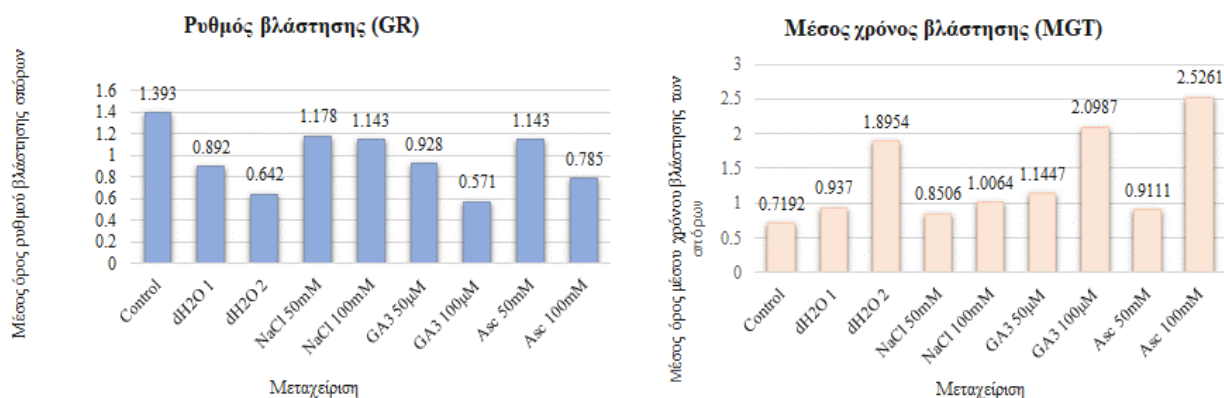
Εικόνα 3.1: Δυναμικό βλάστησης των σπόρων που δέχθηκαν διαφορετικές μεταχειρίσεις διέγερσης, την 3^η ημέρα έπειτα από την τοποθέτηση των σπόρων στα τριβλία.

3.1.2 Επίδραση των διεγερτών στο ρυθμό βλάστησης (GR) και στο μέσο χρόνο βλάστησης (MGT)

Ο ρυθμός βλάστησης (GR) των σπόρων υπολογίστηκε βάσει του ποσοστού βλάστησης κατά την 7η ημέρα και αποτελεί μέγεθος ανάλογο του ποσοστού βλάστησης. Βάσει των σχετικών ευρημάτων, ο υψηλότερος ρυθμός βλάστησης αφορούσε στα φυτά «μάρτυρες», ενώ αντίθετα ο χαμηλότερος ρυθμός βλάστησης παρατηρήθηκε στους σπόρους όπου είχε προηγηθεί επεξεργασία με 100 μM GA₃. Αντίθετα, ο μέσος χρόνος βλάστησης (MGT) προκύπτει από τη σχέση $\text{MGT} = 1/\text{GR}$ και προσδιορίζεται σε ημέρες. Το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε για τη βλάστηση αφορούσε στους σπόρους όπου έγινε εφαρμογή 100 mg/L ασκορβικού οξέος, ενώ ο μικρότερος μέσος χρόνος σημειώθηκε στους μάρτυρες (Πίνακας 3.2, Διάγραμμα 3.2).

Πίνακας 3.2: Μέσος ρυθμός βλάστησης των σπόρων (GR) και μέσος χρόνος βλάστησης των σπόρων (MGT) για όλες τις μεταχειρίσεις.

Μεταχείριση	Ρυθμός βλάστησης (GR)	Μέσος χρόνος βλάστησης (MGT)
	M.O. GR	M.O. MGT
Control	<u>1,3929a</u>	<u>0,7192b</u>
dH ₂ O 1	0,8929bc	0,9370ab
dH ₂ O 2	0,6429c	1,8954ab
50 mM NaCl	1,1786ab	0,8506b
100 mM NaCl	1,1429ab	1,0064ab
50 μM GA ₃	0,9286bc	1,1447ab
100 μM GA ₃	<u>0,5714c</u>	2,0987ab
50 mg/L Asc	1,1429ab	0,9111b
100 mg/L Asc	0,7857bc	<u>2,5261a</u>



Διάγραμμα 3.2: Ρυθμός βλάστησης των σπόρων (GR) και Μέσος χρόνος βλάστησης των σπόρων (MGT) για όλες τις μεταχειρίσεις.

3.1.3 Επίδραση των διεγερτών στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και του βλαστικού τμήματος των σποροφύτων

Σημαντική ήταν επίσης η επίδραση των διαφορετικών διεγερτών που χρησιμοποιήθηκαν στη δευτερογενή ανάπτυξη των σποροφύτων και, συγκεκριμένα, στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και του υπέργειου μέρους. Για τον εκτίμηση της επίδρασης των μεταχειρίσεων, λήφθηκαν παρατηρήσεις σε τρία χρονικά διαστήματα, κατά την 7η, 14η και 20ή ημέρα ύστερα από την τοποθέτηση των σπόρων στα τριβλία. Αναφορικά με την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, οι σημαντικότερες διαφοροποιήσεις εντοπίστηκαν κατά την 20ή ημέρα λήψης των παρατηρήσεων. Αντίστοιχο μοτίβο παρατηρήθηκε και στην ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος, παρόλο που οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων δεν ήταν τόσο έντονες.

Πίνακας 3.3: Μέσος όρος μήκους ριζικού συστήματος την 7^η, 14^η και 20^η ημέρα ανάπτυξης των σποροφύτων για όλες τις μεταχειρίσεις.

Μήκος ρίζας σποροφύτων (cm)			
Μεταχείριση	7η ημέρα	14^η ημέρα	20^η ημέρα
Control	<u>1,566a</u>	<u>2,991a</u>	4,050ab
dH ₂ O 1	0,583b	1,466bc	1,933cd
dH ₂ O 2	0,375b	<u>0,716c</u>	1,106d
50 mM NaCl	0,466b	2,308ab	<u>4,300a</u>
100 mM NaCl	<u>0,725b</u>	2,183ab	3,341ab
50 μM GA ₃	0,691b	1,466bc	2,816bc
100 μM GA ₃	0,691b	1,050c	<u>1,041d</u>
50 mg/L Asc	0,358b	1,016c	<u>1,041d</u>
100 mg/L Asc	<u>0,308b</u>	2,325ab	3,000abc

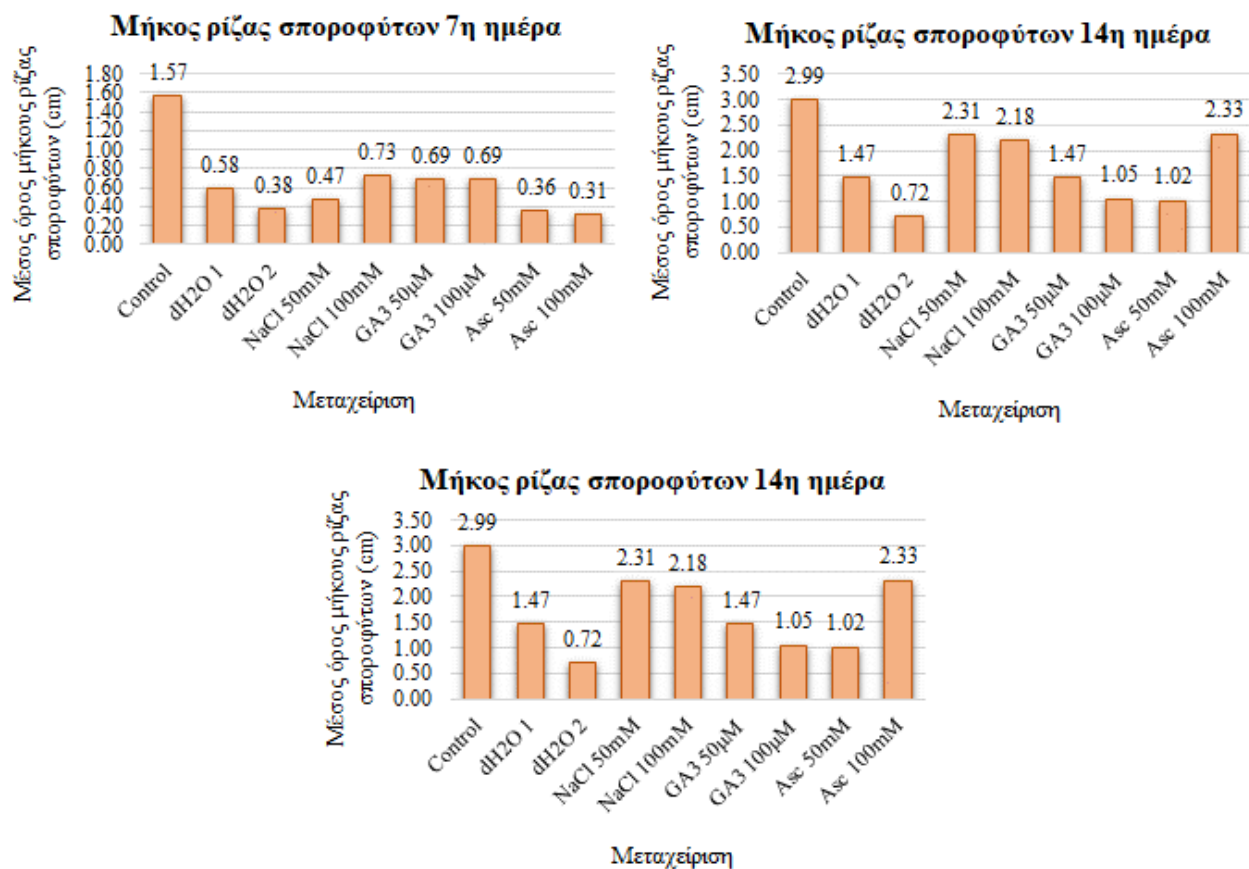
Αναφορικά με την ανάπτυξη της κύριας ρίζας, κατά την 7η ημέρα ανάπτυξης των νεαρών φυταρίων, το μεγαλύτερο μήκος καταγράφηκε στο μάρτυρα, το οποίο διέφερε στατιστικά σημαντικά με όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Μεταξύ των διεγερτών, η υψηλότερη αύξηση του ριζιδίου εντοπίστηκε στα σπορόφυτα της μεταχείρισης 100 mM NaCl. Αντίθετα, τα ριζίδια των φυταρίων της μεταχείρισης 100 mg/L Asc εμφάνισαν υποτυπώδη ανάπτυξη (Πίνακας 3.3, Διάγραμμα 3.3).

Στη συνέχεια, οι διαφοροποιήσεις των μηκών των σποροφύτων μεταξύ των μεταχειρίσεων ήταν πιο εμφανείς και διακριτές, εμφανίζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, τη

14η ημέρα ανάπτυξης των νεαρών φυταρίων, τα σπορόφυτα με το πιο ανεπτυγμένο ριζικό σύστημα απαντήθηκαν στα τριβλία του μάρτυρα. Σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις που λήφθηκαν την 7η ημέρα, τα φυτά της μεταχείρισης 100 mg/L Asc παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αύξηση. Ταυτόχρονα, ικανοποιητική ήταν η ριζική ανάπτυξη των φυταρίων των μεταχειρίσεων 50 και 100 mM NaCl, η οποία δε διέφερε στατιστικά σημαντικά με αυτή της μεταχείρισης 100 mg/L Asc. Τα ριζίδια των φυταρίων που δεν εμφάνισαν ιδιαίτερη αύξηση ανήκαν στη μεταχείριση της ενυδάτωσης, ενώ περιορισμένη ήταν και η ριζική αύξηση των σποροφύτων στις μεταχειρίσεις μεταχειρίσεων 100 μ M GA₃ και 50 mg/L Asc (Πίνακας 3.3, Διάγραμμα 3.3).

Την τελευταία ημέρα λήψης των παρατηρήσεων καταγράφηκε ραγδαία αύξηση του αναπτυσσόμενου ριζικού συστήματος των φυταρίων όλων των μεταχειρίσεων. Οι μεταβολές των μηκών παρουσίασαν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικές διαφορές. Αντίθετα με τις παρατηρήσεις της 7ης και της 14ης ημέρας, από τους σπόρους που είχαν υποστεί οσμωτική επαγωγή με διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 50 mM προέκυψαν τα σπορόφυτα με το μεγαλύτερο ριζικό σύστημα, το οποίο μάλιστα, πέραν του μεγάλου μήκους, παρουσίασε και πολυάριθμες διακλαδώσεις. Πιο περιορισμένη, αλλά εξίσου ικανοποιητική, ήταν και η ριζική ανάπτυξη των σποροφύτων και στο επίπεδο 100 mM NaCl. Παράλληλα, σημαντικό ριζικό μήκος καταγράφηκε και στα φυτά «μάρτυρες», ενώ η τελική ριζική έκπτυξη των νεαρών φυτών των μεταχειρίσεων 100 μ M GA₃ και 50 mg/L Asc ήταν η μικρότερη.

Σημειώνεται πως συνολικά οι μεγαλύτερες ποσότητες των διεγερτών κατά την προεπεξεργασία των σπόρων δεν ενόησαν σημαντικά την αρχική ανάπτυξη των σποροφύτων, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις την κατέστειλαν. Τέλος, στα φυτά της μεταχείρισης της ενυδάτωσης δεν σημειώθηκε περαιτέρω ριζική αύξηση και το τελικό ριζικό μήκος διέφερε σημαντικά τόσο με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις όσο και με τους μάρτυρες (Πίνακας 3.3, Διάγραμμα 3.3).



Διάγραμμα 3.3: Μέσος όρος μήκους ριζικού συστήματος κατά την 7^η, 14^η και 20^η ημέρα ανάπτυξης των σποροφύτων για όλες τις μεταχειρίσεις.

Σε αντίθεση με τη ριζική ανάπτυξη, η επιμήκυνση των βλαστικών τμημάτων δεν ήταν τόσο έντονη μεταξύ των ημερών παρακολούθησης των σποροφύτων και οι παρατηρήσεις που λήφθηκαν μεταξύ των μεταχειρίσεων δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά την 7η και τη 14η ημέρα των μετρήσεων. Πιο συγκεκριμένα, κατά την 7^η ημέρα λήψης των παρατηρήσεων, το μεγαλύτερο μήκος βλαστού εντοπίστηκε στα φυτά που προέκυψαν από σπόρους που προηγουμένως εφαρμόστηκε διάλυμα ασκορβικού οξέος συγκέντρωσης 50 mg/L. Αντίθετα, η επίδραση του διαλύματος 100 μM GA₃ φάνηκε να είχε την αντίθετη επίδραση στην έκπτυξη των νεαρών βλαστών. Μεγαλύτερο μήκος βλαστών καταγράφηκε και στα φυτά «μάρτυρες», ενώ η ενυδάτωση των σπόρων με dH₂O δεν ευνόησε την αρχική βλαστική ανάπτυξη (Πίνακας 3.4, Διάγραμμα 3.4).

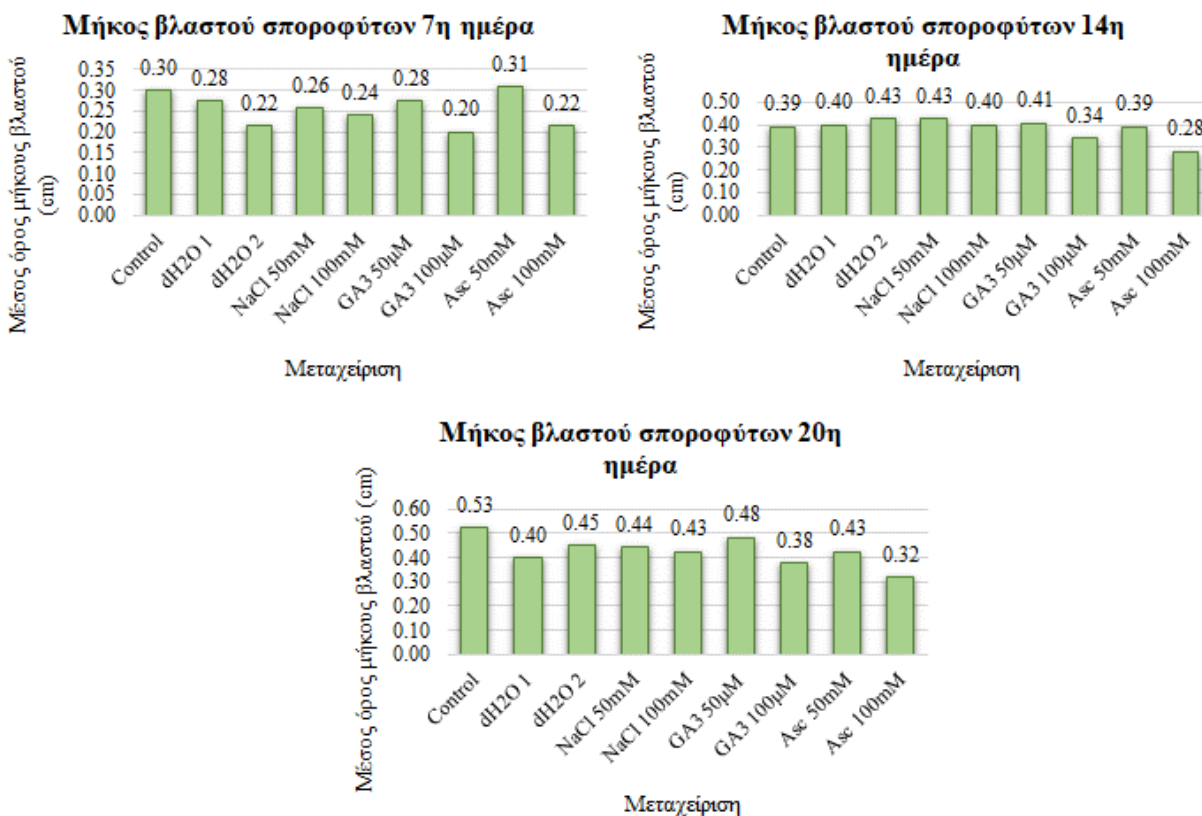
Πίνακας 3.4: Μέσος όρος μήκους βλαστικού τμήματος την 7^η, 14^η και 20^η ημέρα ανάπτυξης των σποροφύτων για όλες τις μεταχειρίσεις.

Μήκος βλαστού σποροφύτων (cm)			
Μεταχείριση	7η ημέρα	14η ημέρα	20η ημέρα
Control	<u>0,300a</u>	0,391a	<u>0,525a</u>
dH ₂ O 1	0,275a	0,400a	0,400ab
dH ₂ O 2	0,216a	<u>0,425a</u>	0,450ab
50 mM NaCl	0,258a	<u>0,425a</u>	0,441ab
100 mM NaCl	0,241a	0,400a	0,425ab
50 μM GA ₃	0,275a	0,408a	0,483a
100 μM GA ₃	<u>0,200a</u>	0,341a	0,375ab
50 mg/L Asc	0,303a	0,391a	0,425ab
100 mg/L Asc	0,216a	<u>0,283a</u>	<u>0,316b</u>

Παρομοίως, οι μετρήσεις που λήφθηκαν και την 14η ημέρα ανάπτυξης των σποροφύτων δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων. Το μεγαλύτερο μήκος των στελεχών καταγράφηκε στα τριβλία των μεταχειρίσεων NaCl και των δύο συγκεντρώσεων. Επιπλέον, η επίδραση του hydropriming στην αύξηση των βλαστικών τμημάτων των φυταρίων ήταν ιδιαίτερα θετική, ενώ η εφαρμογή των διαφορετικών διαλυμάτων του γιββερλικού οξέος στους σπόρους ευνόησε τη βλαστική έκπτυξη 2 εβδομάδες μετά την προεπεξεργασία των σπόρων. Αντίθετα, η δράση του ασκορβικού οξέος, σε συγκέντρωση 100 mg/L, δεν ενίσχυσε τη βλαστική ανάπτυξη, ενώ η συγκέντρωση 50 mg/L οδήγησε σε βλαστική ανάπτυξη που κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα με τα φυτά «μάρτυρες» (Πίνακας 3.4, Διάγραμμα 3.4).

Τέλος, οι μεγαλύτερες αποκλίσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων σημειώθηκαν την τελευταία ημέρα παρακολούθησης των σποροφύτων. Τα μεγαλύτερα στελέχη αντιστοιχούσαν στα φυτά «μάρτυρες». Μεταξύ των μεταχειρίσεων του «seed priming», η επίδραση των 50 μM GA₃ υπήρξε ευνοϊκή στη βλαστική ανάπτυξη, παρά το γεγονός ότι οι μετρήσεις των προηγούμενων παρατηρήσεων δεν ήταν θετικές. Η επιμήκυνση των βλαστικών μερών των σποροφύτων ακολούθησε ανοδική πορεία σε όλες τις μεταχειρίσεις και δεν σημειώθηκαν έντονες διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα διαφορετικά τριβλία. Τέλος, όπως και τη 14η ημέρα ανάπτυξης των φυταρίων, τα μικρότερα στελέχη παρατηρήθηκαν στα πειραματικά τριβλία της μεταχείρισης 100 mg/L Asc. Σημειώνεται πως η επίδραση των διεγερτών στην έκπτυξη των βλαστικών τμημάτων ήταν αντίστοιχη με αυτή στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, καθώς φαίνεται πως

οι υψηλές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων δεν ενίσχυσαν την ανάπτυξη των σποροφύτων (Πίνακας 3.4, Διάγραμμα 3.4). Αντίθετα, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις υπήρξαν περισσότερο ευνοϊκές στην ανάπτυξη τόσο του υπόγειου όσο και του υπέργειου μέρους των σποροφύτων.

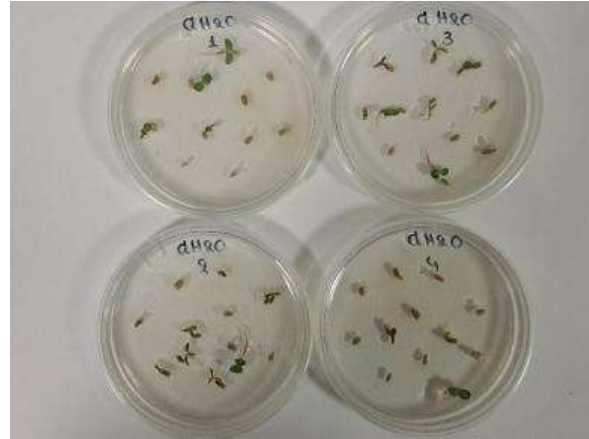


Διάγραμμα 3.4: Μέσος όρος μήκους ριζικού συστήματος κατά την 7^η, 14^η και 20^η ημέρα ανάπτυξης των σποροφύτων για όλες τις μεταχειρίσεις.

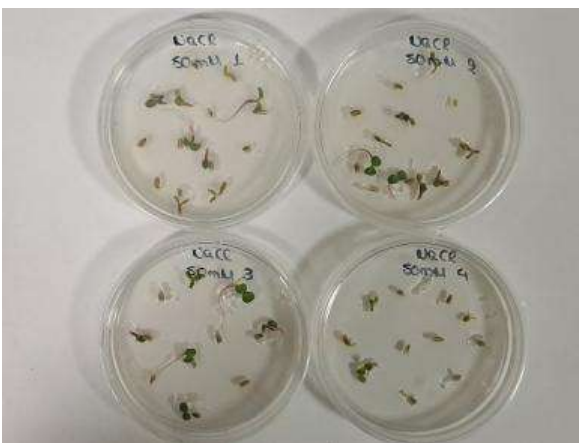
Στις Εικόνες 3.2 – 3.4 απεικονίζεται η ανάπτυξη των σποροφύτων στο πέρασμα των 3 εβδομάδων λήψης των παρατηρήσεων ανά μεταχείριση. Στις εικόνες γίνονται φαινοτυπικά διακριτές κυρίως οι διαφοροποιήσεις αναφορικά με την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, καθώς τα βλαστικά τμήματα δεν αναπτύχθηκαν επαρκώς, ώστε να διακρίνεται εμφανώς η επίδραση των των διαφορετικών μεταχειρίσεων.



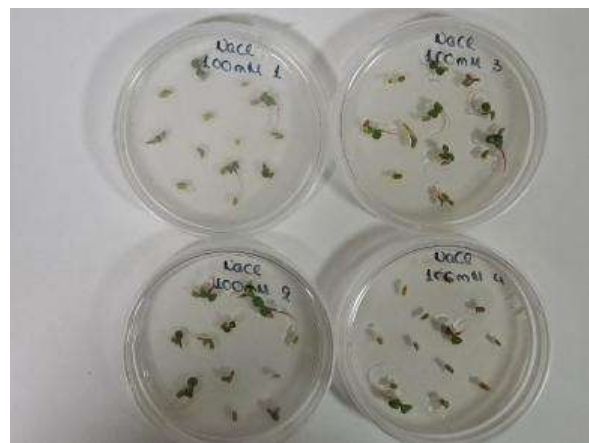
Control



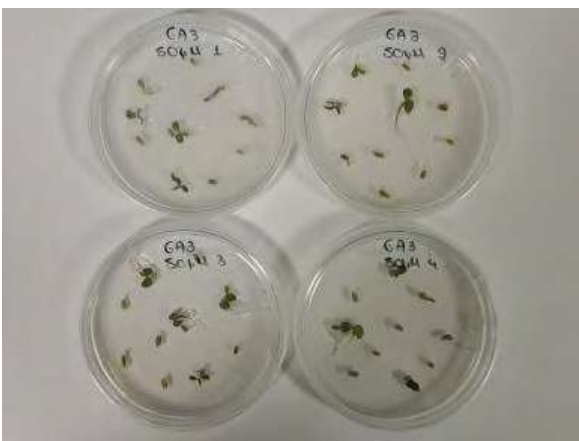
dH₂O



50 mM NaCl



100 mM NaCl



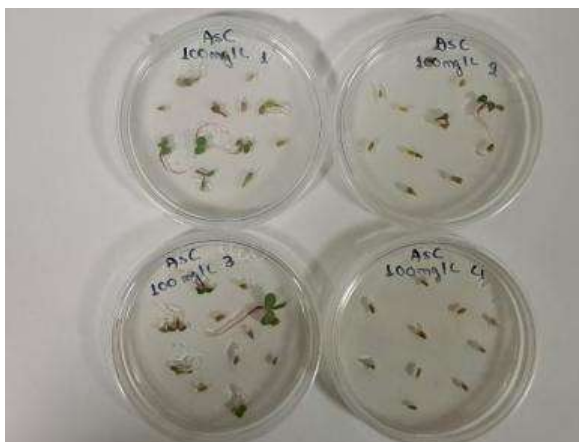
50 μ M GA₃



100 μ M GA₃

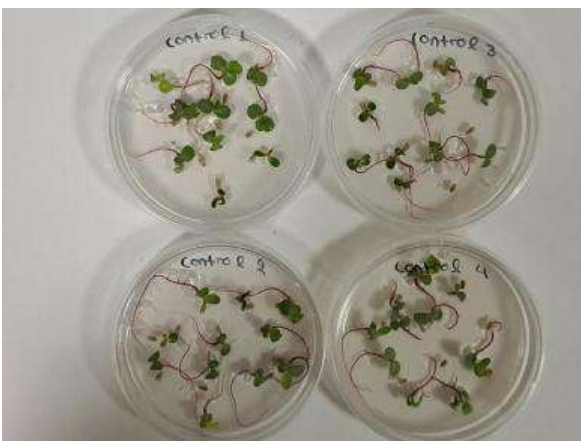


50 mg/L Asc



100 mg/L Asc

Εικόνα 3.2: Συγκριτική απεικόνιση των σποροφύτων στις υπό μελέτη μεταχειρίσεις, την 7 ημέρα.



Control



dH₂O



50 mM NaCl



100 mM NaCl



50 μM GA_3



100 μM GA_3



50 mg/L Asc



100 mg/L Asc

Εικόνα 3.3: Συγκριτική απεικόνιση των σποροφύτων στις υπό μελέτη μεταχειρίσεις, την 14 ημέρα.



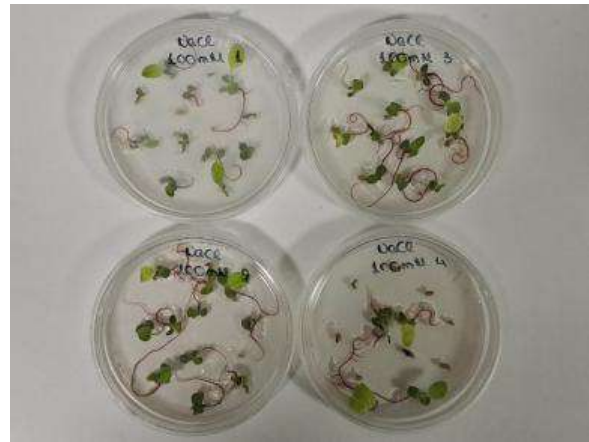
Control



dH₂O



50 mM NaCl



100 mM NaCl



50 μ M GA₃



100 μ M GA₃



50 mg/L Asc



100 mg/L Asc

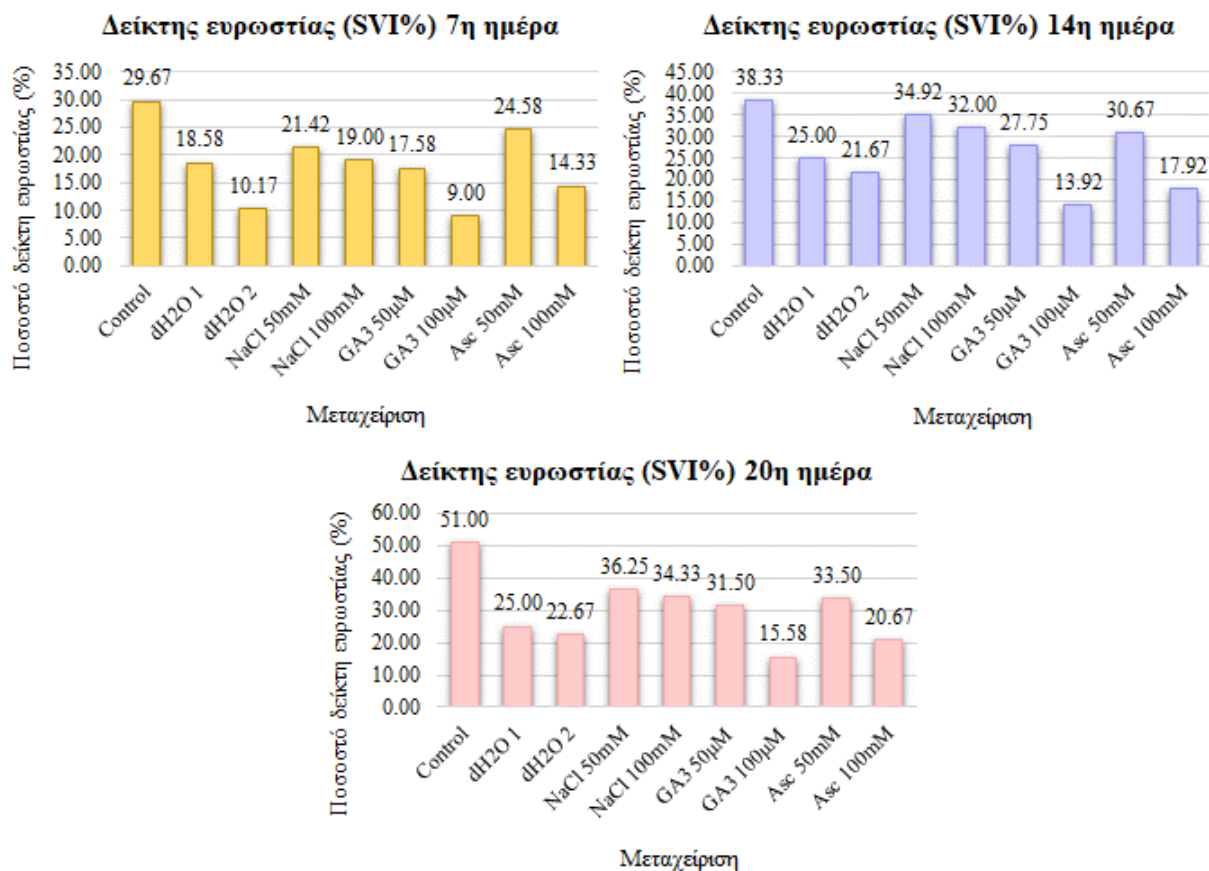
Εικόνα 3.4: Συγκριτική απεικόνιση των σποροφύτων στις υπό μελέτη μεταχειρίσεις, την 20 ημέρα.

3.1.4 Επίδραση των διεγερτών στον δείκτη ευρωστίας των σποροφύτων (SVI)

Ο δείκτης ευρωστίας (SVI) υπολογίζεται βάσει του ποσοστού βλάστησης και του μήκους του στελέχους του σποροφύτου (cm). Συνεπώς, οι τιμές που προέκυψαν κατά τους υπολογισμούς συνάδουν με τις αποκλίσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων που καταγράφηκαν σχετικά με το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και το μήκος των βλαστικών τμημάτων. Πιο συγκεκριμένα, λόγω του υψηλού ποσοστού βλάστησης καθώς και του μεγάλου μέσου μήκους των βλαστών στους μάρτυρες που δεν υπέστησαν καμία μεταχείριση, οι υψηλότερες τιμές SVI αφορούσαν στους μάρτυρες. Ακολούθως, υψηλές ήταν οι τιμές των μεταχειρίσεων 50 mM και 100 mM NaCl, οι οποίες, ωστόσο, διέφεραν στατιστικά με τα φυτά «μάρτυρες». Αντίστοιχες ήταν και οι τιμές των σποροφύτων που προέκυψαν ύστερα από εφαρμογή 50 μ M GA₃ και 50 mg/L Asc. Αντίθετα, όπως ήταν αναμενόμενο, οι τιμές των μεταχειρίσεων ενυδάτωσης hydropriming δεν ήταν ιδιαίτερα υψηλές, ενώ οι χαμηλότερες τιμές SVI αφορούσαν στις μεταχειρίσεις 100 μ M GA₃ και 100 mg/L Asc (Πίνακας 3.5, Διάγραμμα 3.5).

Πίνακας 3.5: Μέσος όρος δείκτη ευρωστίας (SVI%) κατά την 7^η ημέρα ανάπτυξης των σποροφύτων για όλες τις μεταχειρίσεις.

Δείκτης ευρωστίας (SVI%)			
Μεταχείριση	7η ημέρα	14η ημέρα	20η ημέρα
Control	<u>29,667a</u>	<u>38,333a</u>	<u>51,000a</u>
dH ₂ O 1	18,583abcd	25,000abcd	25,000bcd
dH ₂ O 2	10,167cd	21,667bcd	22,667bcd
50 mM NaCl	21,417abc	34,917ab	36,250ab
100 mM NaCl	19,000abcd	32,000abc	34,333bc
50 μ M GA ₃	17,583abcd	27,750abcd	31,500bc
100 μ M GA ₃	<u>9,000d</u>	<u>13,917d</u>	<u>15,583d</u>
50 mg/L Asc	24,583ab	30,667abc	33,500bc
100 mg/L Asc	14,333bcd	17,917cd	20,667cd



Διάγραμμα 3.5: Μέσος όρος δείκτη ευρωστίας κατά την 7^η ημέρα ανάπτυξης των σποροφύτων όλων των μεταχειρίσεων

3.1.5 Επίδραση των διεγερτών στο ποσοστό περιεχόμενης υγρασίας των σποροφύτων (WC%)

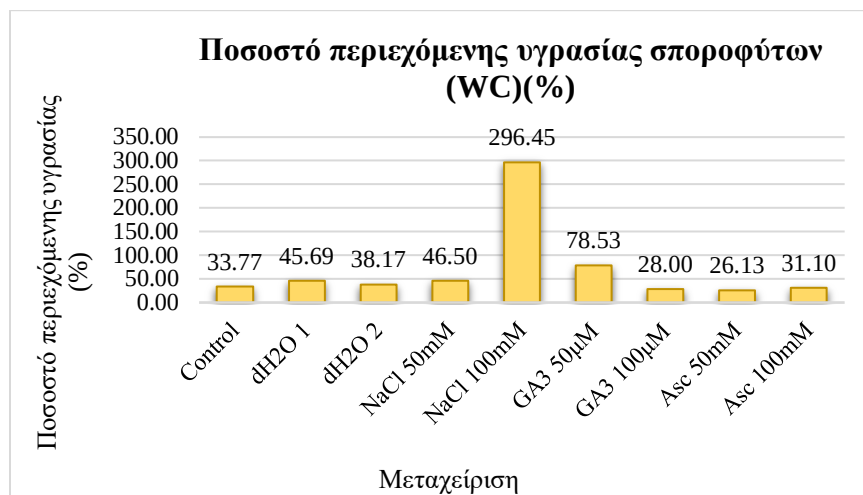
Το ποσοστό περιεχόμενης υγρασίας είναι ένας σημαντικός δείκτης της ευρωστίας και της υγείας των νεαρών σποροφύτων και σε αρχικά στάδια του βιολογικού κύκλου πρέπει να βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα, προκειμένου να διασφαλιστεί η ομαλή περαιτέρω ανάπτυξη των φυτών. Για να υπολογιστεί ο συγκεκριμένος δείκτης, προσδιορίστηκε την 20^ή ημέρα ανάπτυξης των φυταρίων, με τη χρήση ζυγού ακριβείας, το νωπό βάρος των σποροφύτων των μεταχειρίσεων και, στη συνέχεια, αφαιρέθηκε από αυτό το ξηρό τους βάρος (το ξηρό βάρος προσδιορίστηκε με τη χρήση του ζυγού ακριβείας ύστερα από παραμονή των σποροφύτων στους 70°C για 48 ώρες).

Μεταξύ των μεταχειρίσεων, δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, καθώς όλα τα σπορόφυτα χαρακτηρίστηκαν από μέτρια ως χαμηλά ποσοστά υγρασίας. Εξαιρέση αποτελεί η

μεταχείριση 100 mM NaCl, όπου η περιεχόμενη υγρασία των σποροφύτων κυμάνθηκε σε εξαιρετικά υψηλά επίπεδα. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα προφανώς σχετίζεται με την επίδραση του χλωριούχου νατρίου στον μεταβολισμό των σπόρων και τη φυσιολογική τους αντίδραση σε στρεσογόνες συνθήκες. Το NaCl λειτούργησε ως ήπιος στρεσογόνος παράγοντας, ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς άμυνας των σποροφύτων, ώστε να αντεπεξέλθουν σε συνθήκες καταπόνησης αλατότητας. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την καλύτερη κατακράτηση νερού και διατήρηση της εσωτερικής υγρασίας των σποροφύτων, με αποτέλεσμα το τελικό ποσοστό περιεχόμενης υγρασίας να είναι υψηλότερο. Τέλος, το μικρότερο ποσοστό εντοπίστηκε στα σπορόφυτα της μεταχείρισης 50 mg/L ασκορβικού οξέος. Μπορεί να θεωρηθεί πως ο αντιοξειδωτικός χαρακτήρας του διαλύματος μείωσε τις υδατικές ανάγκες των φυταρίων, με αποτέλεσμα να απορροφήσουν λιγότερο νερό από το υπόστρωμα (Πίνακας 3.6, Διάγραμμα 3.6).

Πίνακας 3.6: Μέσος όρος ποσοστού περιεχόμενης υγρασίας (WC%) των σποροφύτων για όλες τις μεταχειρίσεις.

Ποσοστό περιεχόμενης υγρασίας (WC%)	
Μεταχείριση	M.O. WC%
Control	33,77 b
dH ₂ O 1	45,69 b
dH ₂ O 2	38,17 b
50 mM NaCl	46,50 b
100 mM NaCl	<u>296,45a</u>
50 μM GA ₃	78,53 ab
100 μM GA ₃	28,00 b
50 mg/L Asc	<u>26,13b</u>
100 mg/L Asc	31,10 b



Διάγραμμα 3.6: Μέσος όρος ποσοστού περιεχόμενης υγρασίας (WC%) σποροφύτων για όλες τις μεταχειρίσεις.

3.2 Παραγωγή διαγονιδιακών ριζών μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*

Μία πολλά υποσχόμενη *in vitro* τεχνική που αποσκοπεί στην ενίσχυση της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος και στην αύξηση του αριθμού ριζικών διακλαδώσεων είναι ο γενετικός μετασχηματισμός με τη χρήση του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*, το οποίο απαντάται και φυσικά στο έδαφος. Η προσβολή του φυτού από το συγκεκριμένο είδος έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του γενετικού του υλικού, λόγω της ενσωμάτωσης και της έκφρασης των *rol* γονιδίων που εδράζουν στο πλασμίδιο Ti του αγροβακτηρίου. Η μεταβολή αυτή οδηγεί σε ταχεία ανάπτυξη των ριζών, μεγάλη παραγωγή βιομάζας και παραγωγή μεγάλης κλίμακας βιοδραστικών ενώσεων με φαρμακευτικό ενδιαφέρον.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε συγκριτικά η επίδραση δύο διαφορετικών στελεχών του βακτηρίου, R1000 και K599, τα οποία αποτέλεσαν φορείς μετασχηματισμού σε νεαρά σπορόφυτα του είδους *Echinacea purpurea* (L.). Η αξιολόγηση αφορούσε τόσο στο φαινότυπο των σποροφύτων όσο και στο βιοχημικό προφίλ των ριζών, αναφορικά με το περιεχόμενό τους σε ολικές φαινολικές ενώσεις και αντιοξειδωτικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από φαρμακευτική δράση και αξιοποιούνται εκτεταμένα στη φαρμακοβιομηχανία για την παραγωγή σκευασμάτων ενίσχυσης του ανοσοποιητικού.

Συγκεκριμένα, ο γενετικός μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε σε νεαρά φυτάρια εχινάκειας ηλικίας 10 ημερών, μέσω εμφάνισης του τραυματισμένου υποκοτύλιου σε βακτηριακές καλλιέργειες των στελεχών R1000 και K599. Η αξιολόγηση του γενετικού μετασχηματισμού αφορά στις φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των εμβολιασμένων φυτών και των φυτών «μαρτύρων» καθώς και στις μεταβολές στο βιοχημικό προφίλ των ριζών. Σημειώνεται πως, λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας του φυτικού ιστού από τις διαγονιδιακές ρίζες των φυταρίων που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος K599 οι οποίες εμφάνισαν μυκητολογικές προσβολές, η βιοχημική αξιολόγηση αφορά μόνο τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000.

3.2.1 Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών μετά τον μετασχηματισμό

Μετά τη διαδικασία του εμβολιασμού, ακολούθησε καθημερινή παρατήρηση και καταγραφή των μεταβολών στο ριζικό σύστημα των φυταρίων. Τα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη K599 και R1000 εμφάνισαν έκπτυξη νέων ριζών 5 ± 1 και 7 ± 1 ημέρες έπειτα από τον εμβολιασμό, αντίστοιχα. Αρχικά, το νεοεκπτυσσόμενο ριζικό σύστημα των μετασχηματισμένων φυταρίων δε διέφερε σημαντικά με αυτό των φυτών «μαρτύρων», με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η αρχική εκτίμηση της συχνότητας μετασχηματισμού (Εικόνα 3.5).



Control



Σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό
στέλεχος R1000



Σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό
στέλεχος K599

Εικόνα 3.5: Συγκριτική απεικόνιση των σποροφύτων, 1 εβδομάδα μετά το γενετικό μετασχηματισμό.

Παρά το γεγονός ότι η εμφάνιση των ριζών στα φυτάρια που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος R1000 έγινε μεταγενέστερα, η μετέπειτα ανάπτυξη των ριζιδίων ήταν ταχύτερη, συγκριτικά με εκείνα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος K599.

3.2.2 Συγκριτική φαινοτυπική αξιολόγηση των μετασχηματισμένων φυταρίων

Για τις επόμενες 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των σποροφύτων, πραγματοποιήθηκε συνεχής παρατήρηση των μεταβολών του ριζικού συστήματος. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν τυχόν φαινοτυπικές ομοιότητες των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών με το χαρακτηριστικό φαινότυπο των γενετικά μετασχηματισμένων φυτών, ενώ ταυτόχρονα καταγράφηκε ανά εβδομάδα το μήκος της κύριας ρίζας καθώς και ο αριθμός και το μήκος των σχηματιζόμενων διακλαδώσεων.

Αρχικά, στο σημείο εμβολιασμού των φυτών που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος R1000 παρατηρήθηκε εξαρχής έκπτυξη πρωτευουσών και δευτερευουσών ριζών, οι οποίες με την πάροδο του χρόνου εμφάνιζαν ραγδαία αύξηση. Η ανάπτυξη των ριζών ήταν μερικώς πλαγιοτροπική και ταυτιζόταν απόλυτα με τα συμπτώματα της προσβολής από το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes*. Επιπλέον, η βιομάζα των νέων ριζών ήταν σαφώς αυξημένη συγκριτικά με την αντίστοιχη των φυτών μαρτύρων. Αντίθετα, ο σχηματισμός νέων ριζών καθώς και η ανάπτυξή τους υστερούσαν σαφώς στα σπορόφυτα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος K599. Αν και ο αριθμός των διακλαδώσεων ήταν αυξημένος, το μήκος τους ήταν περιορισμένο, συγκριτικά με αυτό των φυταρίων που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000, ενώ ο φαινότυπός τους στερούνταν θυσσανώδους μορφής, χωρίς αυτό ωστόσο να συνεπάγεται ανεπιτυχή μετασχηματισμό.

Σχετικά με την ανάπτυξη της κύριας ρίζας, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο βακτηριακών στελεχών, με τη μεγαλύτερη αύξηση να αφορά στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το R1000 (Πίνακας 3.7). Αναφορικά με το μέσο όρο του αριθμού των πρωτευουσών ριζών των φυταρίων, ο μεγαλύτερος αριθμός εντοπίστηκε στα σπορόφυτα που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος R1000, χωρίς ωστόσο να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων (Πίνακας 3.8). Αντίστοιχα, ο μεγαλύτερος αριθμός των δευτερευουσών ριζών παρατηρήθηκε στα φυτάρια που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος R1000, όπου καταγράφηκε σχεδόν διπλάσιος αριθμός δευτερευουσών ριζών κατά την 4^η εβδομάδα λήψης των παρατηρήσεων συγκριτικά με τα φυτά «μάρτυρες» και τα φυτά που μετασχηματίστηκαν με το K599 (Πίνακας

3.9). Τέλος, τα φυτά «μάρτυρες» παρουσίασαν στο τέλος της 4ης εβδομάδας το ελάχιστο μήκος των πρωτενουσών ριζών και τον πιο περιορισμένο σχηματισμό ριζιδίων (Πίνακας 3.10).

Στους Πίνακες 3.7 – 3.9 παρατίθενται αναλυτικά οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ως προς την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος στο διάστημα των 4 εβδομάδων μετά τον εμβολιασμό.

Πίνακας 3.7: Μέσος όρος μήκους κύριας ρίζας (cm) ανά μεταχείριση και ανά εβδομάδα ανάπτυξης.

Μέσος όρος μήκους κύριας ρίζας ανά μεταχείριση και ανά εβδομάδα ανάπτυξης				
Μεταχείριση	1^η εβδομάδα	2^η εβδομάδα	3^η εβδομάδα	4^η εβδομάδα
<u>Control</u>	0,34400a	0,34800a	0,39000ab	0,42333b
<u>R1000</u>	0,4200a	0,41067a	0,45200a	<u>0,61600a</u>
<u>K599</u>	0,21600b	0,23200b	0,32800b	0,36400b

Πίνακας 3.8: Μέσος όρος αριθμού πρωτενουσών ριζών των φυταρίων ανά μεταχείριση και ανά εβδομάδα ανάπτυξης.

Μέσος όρος αριθμού πρωτενουσών ριζών των φυταρίων ανά μεταχείριση και ανά εβδομάδα ανάπτυξης				
Μεταχείριση	1^η εβδομάδα	2^η εβδομάδα	3^η εβδομάδα	4^η εβδομάδα
<u>Control</u>	3,32a	4,68a	4,45a	5,21a
<u>R1000</u>	3,84a	4,2a	5,24a	<u>8,14a</u>
<u>K599</u>	2,8a	3,64a	4,12a	4,6a

Πίνακας 3.9: Μέσος όρος αριθμού δευτερενουσών ριζών των φυταρίων ανά μεταχείριση και ανά εβδομάδα ανάπτυξης.

Μέσος όρος αριθμού δευτερενουσών ριζών των φυταρίων ανά μεταχείριση και ανά εβδομάδα ανάπτυξης				
Μεταχείριση	1^η εβδομάδα	2^η εβδομάδα	3^η εβδομάδα	4^η εβδομάδα
<u>Control</u>	2,36a	4,28a	5,86a	6,88a
<u>R1000</u>	1,24a	4,08ab	4,38a	<u>13,25a</u>
<u>K599</u>	0,12a	0,24a	3,28a	5,44a

Πίνακας 3.10: Μέσος όρος ελάχιστου μήκους των πρωτενουσών ριζών των φυταρίων ανά μεταχείριση και ανά εβδομάδα ανάπτυξης.

Μέσος όρος ελάχιστου μήκους των πρωτενουσών ριζών των φυταρίων ανά μεταχείριση και ανά εβδομάδα ανάπτυξης				
Μεταχείριση	1^η εβδομάδα	2^η εβδομάδα	3^η εβδομάδα	4^η εβδομάδα
<u>Control</u>	0,24	0,3	0,32	0,38
<u>R1000</u>	0,28	0,36	0,56	0,7
<u>K599</u>	0,1	0,18	0,32	0,48

Στο τέλος του διαστήματος λήψης παρατηρήσεων, την 4^η εβδομάδα, ήταν ξεκάθαρη η φαινοτυπική διάκριση των μεταχειρίσεων. Στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος R1000 παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή βιομάζας του ριζικού συστήματος. Επιπλέον, τα εν λόγω φυτά εμφάνισαν τη θυσσανώδη ριζική μορφή που συνοδεύει χαρακτηριστικά τα επιτυχώς μετασχηματισμένα σπορόφυτα. Αναφορικά με τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος K599, αν και ο αριθμός των πρωτενουσών και των δευτερευουσών ριζών ήταν μικρότερος συγκριτικά με αυτό των φυτών «μαρτύρων», η συνολική αύξηση του μήκους τους ήταν μεγαλύτερη (Πίνακας 3.11).

Στις Εικόνες 3.6 – 3.8 φαίνονται σαφώς οι διακριτοί φαινότυποι των φυταρίων που αντιστοιχούν στις διαφορετικές μεταχειρίσεις.

Πίνακας 3.11: Μέσος όρος μέγιστου μήκους των πρωτενουσών ριζών των φυταρίων ανά μεταχείριση και ανά εβδομάδα ανάπτυξης.

Μέσος όρος μέγιστου μήκους των πρωτενουσών ριζών των φυταρίων ανά μεταχείριση και ανά εβδομάδα ανάπτυξης				
Μεταχείριση	1^η εβδομάδα	2^η εβδομάδα	3^η εβδομάδα	4^η εβδομάδα
<u>Control</u>	2,12	2,54	2,94	3,4
<u>R1000</u>	3,02	3,32	5,2	6,34
<u>K599</u>	0,86	2,04	3,22	4,78



Εικόνα 3.6: Φυτά που μετασχηματίστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος R1000.



Εικόνα 3.7: Φυτά που μετασχηματίστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος K599.



Εικόνα 3.8: Μη-μετασχηματισμένα φυτά – «Μάρτυρας».

3.2.3 Συχνότητα μετασχηματισμού

Η συχνότητα του μετασχηματισμού χρησιμοποιείται προκειμένου να αξιολογηθεί το ποσοστό των φυταρίων που μετασχηματίστηκαν επιτυχώς και ανέπτυξαν διαγονιδιακές ρίζες. Η εκτίμηση της συχνότητας μετασχηματισμού βασίστηκε αποκλειστικά στην παρατήρηση του φαινοτύπου, χωρίς να έχει προηγουμένως επιβεβαιωθεί η επιτυχής ένθεση του γονιδίου *rol*, που εδράζει στη μεταφερόμενη περιοχή του πλασμιδίου Ri, στο φυτικό γονιδίωμα. Η συχνότητα μετασχηματισμού υπολογίστηκε βάσει του τύπου **C (%) = αριθμός εκφύτων που εμφάνισαν διαγονιδιακές ρίζες / αριθμός εμβολιασμένων φυταρίων x 100**. Παρόλο που και τα δύο στελέχη ήταν ικανά να επάγουν το σχηματισμό διαγονιδιακών ριζών, παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων καθώς ο αριθμός των εμβολιασμένων φυτών με το στέλεχος K599 που εμφάνισε τον τυπικό φαινότυπο της προσβολής ήταν σημαντικά μικρότερος συγκριτικά με αυτόν της μεταχείρισης του βακτηριακού στελέχους R1000. Η συχνότητα του μετασχηματισμού υπολογίστηκε σύμφωνα με τη φαινοτυπική παρατήρηση των εκφύτων την 4^η εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό (Πίνακας 3.12).

Πίνακας 3.12: Επίδραση των στελεχών του *Agrobacterium rhizogenes* στον χρόνο εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών και στην συχνότητα του μετασχηματισμού.

Βακτηριακά στελέχη	Συνολικός αριθμός εμβολιασμένων φυτών	Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών (dpt)	Αριθμός εκφύτων που εμφάνισαν τριχωτές ρίζες	Συχνότητα μετασχηματισμού (%)
<u>R1000</u>	25	7 ± 1	12	48
<u>K599</u>	25	5 ± 1	6	24

Βάσει του συνόλου των ευρημάτων, είναι σαφής η υπεροχή του βακτηριακού στελέχους R1000 ως προς την ικανότητα επαγωγής θυσσανωδών διαγονιδιακών ριζών. Αναφέρεται ωστόσο ότι ο περιορισμένος αριθμός των εκφύτων με τον επιθυμητό φαινότυπο στην περίπτωση του μετασχηματισμού με το στέλεχος K599 δε συνεπάγεται αποτυχία του μετασχηματισμού. Στην

περίπτωση αυτή, η επιτυχία του μετασχηματισμού αξιολογείται με PCR, η οποία επιτρέπει την αξιόπιστη εκτίμηση σχετικά με την ένθεση των γονιδίων *rol*.

3.4 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών στο ριζικό σύστημα

Στοχεύοντας στη μελέτη της επίδρασης του γενετικού μετασχηματισμού στο βιοχημικό προφίλ των μετασχηματισμένων ριζών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ώστε να προσδιοριστεί το περιεχόμενό τους σε φαινολικές ενώσεις, συγκριτικά με το αντίστοιχο των μη-μετασχηματισμένων ριζών που αναπτύχθηκαν στα φυτά «μάρτυρες». Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις των ριζών που προέκυψαν έπειτα από μετασχηματισμό με το βακτηριακό στέλεχος R1000 του *A. rhizogenes*. Τα φυτά που μετασχηματίστηκαν με το στέλεχος K599 δε συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση, λόγω ανεπαρκούς ποσότητας ιστού των ριζών.

Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση των καταπονήσεων αλατότητας και ξηρασίας σε αναπτυσσόμενα φυτά σε ελεγχόμενο περιβάλλον. Με δεδομένο ότι η επίδραση των αβιοτικών καταπονήσεων αυξάνει τη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών, όπως οι φαινολικές ενώσεις, λήφθηκε ιστός από το ριζικό σύστημα των φυτών που υπέστησαν καταπόνηση αλατότητας και ξηρασίας και προσδιορίστηκε το περιεχόμενό τους σε ολικές φαινολικές ενώσεις, συγκριτικά με φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία καταπόνησης (φυτά «μάρτυρες»).

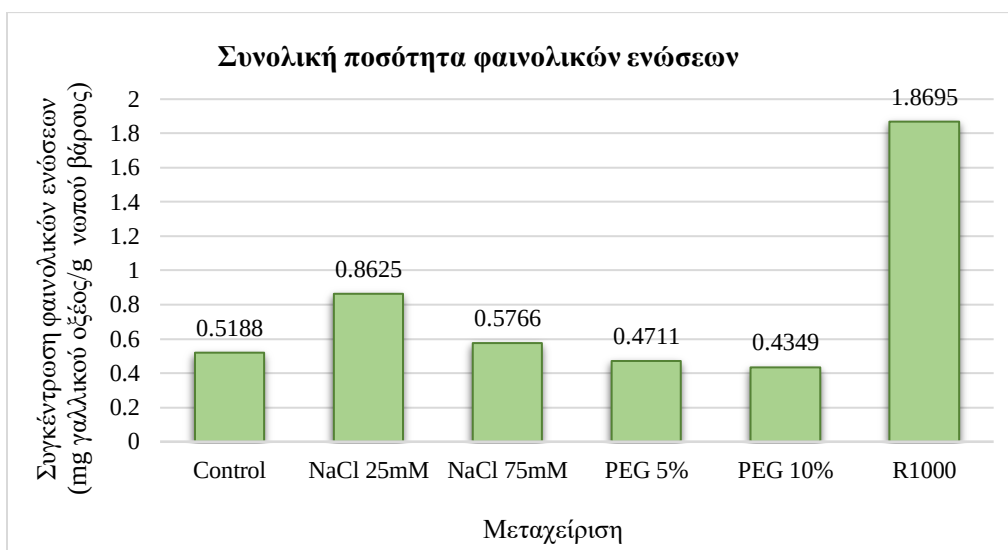
Στον Πίνακα 3.13 παρουσιάζεται η ποσότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος/g νωπού ιστού που προσδιορίστηκε σε 0,250 g ριζικού ιστού:

Πίνακας 3.13: Συνολική ποσότητα φαινολικών ενώσεων στο ριζικό σύστημα εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος/g νωπού ιστού.

Συνολική ποσότητα φαινολικών ενώσεων (mg γαλλικού οξέος/g νωπού ιστού)	
Μεταχείριση	M.O. Συνολικής ποσότητας φαινολικών ουσιών
Control	0,518b
NaCl 25mM	0,862b
NaCl 75mM	0,576b
PEG 5%	0,471b
PEG 10%	0,434b
R1000	<u>1,869a</u>

Η ανάλυση κατέδειξε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των προσβεβλημένων φυτών με το βακτηριακό στέλεχος R1000 και των υπόλοιπων μεταχειρίσεων, καθώς στο ριζικό σύστημα εντοπίστηκε περίπου τριπλάσια ποσότητα φαινολικών ενώσεων συγκριτικά με τις ρίζες των φυτών που υπέστησαν τις καταπονήσεις και τα φυτά «μάρτυρες» (Πίνακας 3.13, Διάγραμμα 3.7). Η αυξημένη συσσώρευση φαινολικών, έπειτα από μετασχηματισμό με το *Agrobacterium rhizogenes*, είναι ενδεικτική της δυνατότητας βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού με απώτερο σκοπό την αύξηση των δευτερογενών μεταβολιτών στον ιστό των ριζών.

Ταυτόχρονα, συγκριτικά με τους μάρτυρες, αυξημένη είναι η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών στα φυτά που υπέστησαν την καταπόνηση της αλατότητας, με μεγαλύτερο ενδιαφέρον να εμφανίζει η μέτρηση των φυτών στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης (25 mM NaCl). Αντίθετα, η υδατική καταπόνηση δεν οδήγησε σε αυξημένη σύνθεση φαινολικών ενώσεων στο ριζικό σύστημα των σποροφύτων, γεγονός που πιθανώς υποδεικνύει πως η ένταση της υδατικής καταπόνησης δεν ήταν επαρκής προκειμένου να μεταβληθεί η βιοχημική απόκριση των νεαρών φυτών (Πίνακας 3.13, Διάγραμμα 3.7).



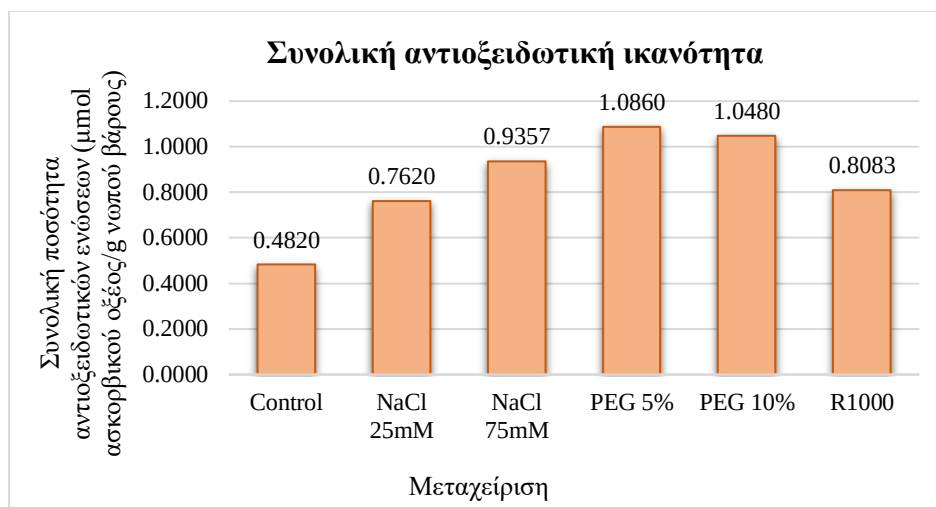
Διάγραμμα 3.7: Συνολική ποσότητα φαινολικών ενώσεων στο ριζικό σύστημα εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος/g νοπού ιστού.

3.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών του ριζικού συστήματος

Αντίστοιχα με τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών στο ριζικό σύστημα, μετρήθηκε το σύνολο των αντιοξειδωτικών ενώσεων στις ρίζες τόσο των σποροφύτων που μετασχηματίστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος R1000 όσο και αυτών που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας και αλατότητας. Σε αντίθεση με το προφίλ συσσώρευσης φαινολικών ενώσεων, ο εντονότερος αντιοξειδωτικός χαρακτήρας εμφανίστηκε στα φυτά που υπέστησαν υδατική καταπόνηση, ενώ αντίστοιχα υψηλή ήταν η ποσότητα των αντιοξειδωτικών στα φυτά που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση αλατότητας. Αξίζει να σημειωθεί πως τα φυτά που υποβλήθηκαν στο χαμηλό επίπεδο καταπόνησης εμφάνισαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τα φυτά του μεσαίου επιπέδου. Επιπλέον, σχεδόν διπλάσια ήταν η ποσότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων στον ιστό της ρίζας των μετασχηματισμένων εκφύτων από το στέλεχος R1000 του *A. rhizogenes* συγκριτικά με τα φυτά «μάρτυρες». Όπως αναμενόταν, η χαμηλότερη ποσότητα αντιοξειδωτικών εντοπίστηκε στα φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία καταπόνησης. Στον Πίνακα 3.14 παρουσιάζεται η ποσότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων εκφρασμένη σε μmol ασκορβικού οξέος /g νωπού ιστού που προσδιορίστηκε σε 0,250 g ριζικού ιστού, ενώ στο Διάγραμμα 3.8 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών στις διαφορετικές κατηγορίες φυτών.

Πίνακας 3.14: Συνολική ποσότητα αντιοξειδωτικών ενώσεων στο ριζικό σύστημα εκφρασμένη σε μmol ασκορβικού οξέος/g νωπού ιστού

Συνολική ποσότητα αντιοξειδωτικών ενώσεων (μmol ασκορβικού οξέος/g νωπού ιστού)	
Μεταχείριση	M.O. Συνολικής ποσότητας αντιοξειδωτικών ενώσεων
Control	0,4820 b
NaCl 25mM	0,7620 ab
NaCl 75mM	0,9357 a
PEG 5%	<u>1,0860</u> a
PEG 10%	1,0480 a
R1000	0,8083 ab



Διάγραμμα 3.8: Συνολική ποσότητα αντιοξειδωτικών ενώσεων στο ριζικό σύστημα εκφρασμένη σε μmol ασκορβικού οξέος/g νωπού ιστού.

3.6 Ενίσχυση της ριζοβολίας με τη χρήση φυτοορμονών

Στοχεύοντας στην ενίσχυση της βιομάζας του ριζικού συστήματος και την αντίστοιχη αύξηση των φυτοχημικών ενώσεων σε *in vitro* συνθήκες, επιχειρήθηκε η χρήση του ρυθμιστή αύξησης 1-Ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) ως μέσου επαγωγής της ριζογένεσης. Ο ρυθμιστής αύξησης προστέθηκε στο υπόστρωμα ανάπτυξης των νεαρών φυταρίων. Ωστόσο, λόγω αποτυχίας εμφάνισης του φυσιολογικού φαινοτύπου ύστερα από την εφαρμογή των φυτοορμονών δεν λήφθηκαν οι απαραίτητες παρατηρήσεις σχετικά με την αξιολόγηση της επίδρασης των ρυθμιστών αύξησης και κρίθηκε ως αναγκαία η επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας με στόχο τη βελτιστοποίηση της μεθόδου ώστε να επιτευχθεί φυσιολογική ριζική ανάπτυξη.

4. Συζήτηση και Συμπεράσματα

4.1 Ενίσχυση της βλάστησης με τη χρήση διεγερτών – «seed priming»

Τα τελευταία χρόνια εξετάζονται έντονα οι δυνατότητες αξιοποίησης εκτάσεων όπου η μειωμένη γονιμότητα και η επικράτηση δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών δρουν περιοριστικά στην ομαλή βλάστηση των σπόρων και στην απρόσκοπτη ανάπτυξη των σποροφύτων, με σκοπό την εντατικοποίηση της γεωργίας για την κάλυψη των ανθρώπινων αναγκών. Ταυτόχρονα, έχει ενταθεί η τάση αξιοποίησης των φυτών με φαρμακευτικές ιδιότητες από τη φαρμακοβιομηχανία, με στόχο την παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων με φυτική βάση και την εύρεση εναλλακτικών φυτικών φαρμάκων για τη θεραπεία ποικίλων ασθενειών. Στο πλαίσιο αυτό, η έμφαση μετατοπίζεται προς την αύξηση της παραγωγής βιομάζας με φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Ένα από τα προβλήματα που συνοδεύουν την καλλιέργεια πολλών φαρμακευτικών φυτών είναι η ανεπαρκής και ανομοιόμορφη βλάστηση των σπόρων ή/και η περιορισμένη ανάπτυξη των νεαρών φυτών, τα οποία συνδυαστικά επιδρούν αρνητικά στην εγκατάσταση της καλλιέργειας. Η εύρεση λύσεων στους ανωτέρω περιορισμούς είναι καίριας σημασίας αφενός μεν για την καλύτερη αξιοποίηση των ιδιοτήτων των φαρμακευτικών φυτών και αφετέρου για την άμβλυνση των επιπτώσεων που προκαλούνται από την υπερεκμετάλλευση των εν λόγω ειδών, μέσω συλλογής από το φυσικό περιβάλλον ανάπτυξής τους, που οδηγεί στη διατάραξη των οικοσυστημάτων και εγείρει κινδύνους εξαφάνισης σπάνιων ειδών.

Μεταξύ των φαρμακευτικών ειδών με πολύτιμες λειτουργικές ιδιότητες είναι το είδος *Echinacea purpurea* (L.), το οποίο κατέχει εξέχουσα θέση λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων φαινολικών και αντιοξειδωτικών ουσιών στα διαφορετικά φυτικά μέρη και ιδιαίτερα στο ριζικό σύστημα. Στην εχινάκεια, όπως και σε άλλα είδη φαρμακευτικού ενδιαφέροντος εξετάζονται πλέον συστηματικά ποικίλες μέθοδοι που ενδέχεται να ενισχύσουν το ποσοστό βλάστησης των σπόρων και να εξασφαλίσουν την ταχεία και ομαλή ανάπτυξη της καλλιέργειας (Benincasa et al., 2016; Khalaki et al., 2021; Nawaz et al., 2013). Απώτερο σκοπό αποτελεί η διατήρηση της βιοποικιλότητας των φυσικών οικοσυστημάτων αλλά και η ταυτόχρονη εξασφάλιση της απαιτούμενης ποσότητας βιομάζας με βιοδραστικό δυναμικό ώστε να καλυφθούν οι σχετικές ανάγκες της βιομηχανίας.

Μία από τις μεθόδους ενίσχυσης της βλάστησης είναι η εφαρμογή τεχνικών διέγερσης, φυσικών ή χημικών, στους σπόρους πριν την τοποθέτησή τους σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας ή αγρού. Η

μέθοδος, που αναφέρεται με τον όρο «seed priming», ενδέχεται να αφορά τη χρήση θρεπτικών μέσων (nutritional priming), ορμονών (hormonal priming), οσμωτικών ουσιών (osmopriming), όπως το χλωριούχο νάτριο ή απλώς τη χρήση νερού (hydropriming) για την ενυδάτωση των σπόρων προ της βλάστησης. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν και οι τέσσερις προαναφερθέντες μέθοδοι ενίσχυσης της βλάστησης στο είδος *Echinacea purpurea* (L.), ενώ η αξιολόγηση της επίδρασής τους στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων και στην αρχική ανάπτυξη των σποροφύτων έγινε συγκριτικά με φυτάρια που προέκυψαν από σπόρους που δεν υπέστησαν καμία μεταχείριση και αναπτύχθηκαν στις ίδιες ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος. Τα ευρήματα της μελέτης παρατίθενται συγκριτικά με αντίστοιχα αποτελέσματα ερευνών που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η εφαρμογή διεγερτών βλάστησης σε ποικίλα φαρμακευτικά φυτά είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού βλάστησης καθώς και την ενίσχυση της ανάπτυξης των φυταρίων. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε πως τα σπορόφυτα των σπόρων όπου προηγήθηκε «seed priming» εμφάνισαν μεγαλύτερη ευρωστία και αντεπεξήλθαν καλύτερα σε δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξης, όπως αυτές της καταπόνησης αλατότητας και υγρασίας, συγκριτικά με φυτά «μάρτυρες». Πιο συγκεκριμένα, η χρήση διαλυμάτων γιββερλικού οξέος και χλωριούχου νατρίου σε σπόρους μελισσόχορτου και κύμινου καθώς και η ενυδάτωση των σπόρων με απιονισμένο νερό αύξησε σημαντικά το ποσοστό βλάστησης των σπόρων, ενώ ταυτόχρονα καταγράφηκε υψηλότερος δείκτης ευρωστίας στα υπό μελέτη φυτάρια, συγκριτικά με τα σπορόφυτα του «μάρτυρα» (Younesi και Maradi , 2014). Αντίστοιχα ευρήματα αναφέρονται στην αλθαία και στο αφσκόμηλο, όπου η εφαρμογή γιββερλικού και ασκορβικού οξέος επέδρασε θετικά στην ενίσχυση της ικανότητας βλάστησης (Rezaie et al., 2013). Ταυτόχρονα, υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη θετική επίδραση της ενυδάτωσης των σπόρων (hydropriming) στο είδος *Salvia officinalis* L., όπου καταγράφηκε σημαντική αύξηση του ποσοστού βλάστησης, σε σύγκριση με τους σπόρους που δεν δέχτηκαν κάποια μεταχείριση, καθώς και μείωση του μέσου χρόνου βλάστησης και μεγαλύτερη ομοιομορφία στην ανάπτυξη των σποροφύτων (Dastanpoor et al., 2013).

Στο είδος *Echinacea purpurea* (L.) δεν έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες αναφορικά με τη χρήση διεγερτών στους σπόρους με στόχο την ενίσχυση του δυναμικού βλάστησης, καθώς συνήθως σε ευνοϊκά περιβάλλοντα ανάπτυξης τα ποσοστά βλάστησης των σπόρων είναι

ικανοποιητικά. Ωστόσο, έχουν διεξαχθεί μελέτες σχετικά με την επίδραση των μεθόδων «seed priming» στην ικανότητα φυτρώματος και στην ευρωστία των σποροφύτων υπό συνθήκες καταπόνησης και σε *in vitro* καλλιέργεια. Στο πλαίσιο αυτό, οι Ansari et al. (2021) εξέτασαν την επίδραση της παραμονής των σπόρων σε διάλυμα γιββεριλικού οξέος και σε απιονισμένο νερό για 12h και 24h στη βλάστησή τους σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι το σύνολο των μεταχειρίσεων ευνόησαν το ποσοστό, την ταχύτητα και το ρυθμό βλάστησης, συγκριτικά με τους «μάρτυρες», με τα καλύτερα αποτελέσματα να καταγράφονται στους σπόρους που παρέμειναν 12h σε dH₂O. Παραπλήσια ήταν και τα αποτελέσματα των πειραμάτων των Bayat et al. (2014), όπου η χρήση dH₂O και NaCl ως διεγερτών επηρέασαν θετικά τη βλάστηση των σπόρων. Σημειώνεται πως στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ελέγχθηκε η βλάστηση των σπόρων και η εξέλιξη των σποροφύτων ύστερα από εφαρμογή των διαλυμάτων των διεγερτών για περιορισμένο χρονικό διάστημα (3h και 6h). Τέλος, οι Miri και Mirjalili (2013) αξιολόγησαν τη βλάστηση και την ανάπτυξη των φυταρίων ύστερα από οσμωτική επαγωγή των σπόρων, χρησιμοποιώντας διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την υπεροχή της χαμηλής συγκέντρωσης NaCl, η οποία σχετίστηκε με αυξημένο μήκος ριζών και ικανότητα διατήρησης μεγαλύτερου ποσοστού υγρασίας στο εσωτερικό των ιστών, συγκριτικά με τα φυτά «μάρτυρες», οι οποίοι εμφάνισαν υπεροχή ως προς την ανάπτυξη των βλαστών.

Τα ευρήματα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής βρίσκονται σε πλήρη ευθυγράμμιση με τα αποτελέσματα των Miri και Mirjalili (2013), υπογραμμίζοντας ότι η εφαρμογή 50 mM NaCl συμβάλλει σε έντονη αύξηση του ριζικού συστήματος, συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις, ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση NaCl αύξησε το ριζικό μήκος και το περιεχόμενο ποσοστό υγρασίας των φυτικών ιστών. Ωστόσο, σημειώθηκαν διαφορές αναφορικά με την επίδραση της εφαρμογής γιββεριλικού οξέος και dH₂O ως διεγερτών καθώς στην παρούσα μελέτη οι εν λόγω μεταχειρίσεις δεν επέδρασαν θετικά στο δυναμικό βλάστησης και στην ευρωστία των φυτών, συγκριτικά με τους «μάρτυρες» και τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Μάλιστα, οι χαμηλότερες τιμές των δεικτών αξιολόγησης καταγράφηκαν στα σπορόφυτα της μεταχείρισης 100 μM GA₃, ενώ μέτρια ήταν η απόκριση των φυτών έπειτα από ενυδάτωση των σπόρων. Η βασική διαφορά μεταξύ των πρωτοκόλλων που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία και του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη έγκειται στον χρόνο παραμονής των σπόρων στα διαλύματα των διεγερτών. Μελλοντικά, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η επανάληψη της διαδικασίας,

στην οποία το priming των σπόρων θα διαρκέσει λιγότερο, τουλάχιστον για τις μεταχειρίσεις του dH₂O και 100 μ M GA₃.

Μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων, τα ευρήματα παρέχουν ισχυρές ενδείξεις σχετικά με την υπεροχή της εφαρμογής NaCl, η οποία συνέβαλε στην αύξηση του ποσοστού βλάστησης και στην ενίσχυση του δυναμικού ανάπτυξης των σποροφύτων, ιδιαίτερα στους ιστούς της ρίζας. Παράλληλα, η παρατηρηθείσα ικανότητα διατήρησης του νερού στο εσωτερικό των ιστών πιθανόν να διασφάλιζε την περαιτέρω ανάπτυξη των σποροφύτων στα επόμενα στάδια του βιολογικού κύκλου. Σχετικά με τη συγκέντρωση των διαλυμάτων, αναδείχθηκε η υπεροχή της χαμηλής συγκέντρωσης (50 mM NaCl). Επιπλέον, θετική υπήρξε η επίδραση του ασκορβικού οξέος (50 mg/L και 100 mg/L) τόσο στη βλάστηση όσο και στην πρωτογενή ανάπτυξη των σποροφύτων, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Ειδικότερα, η χαμηλή συγκέντρωση ασκορβικού οξέος (50 mg/L) οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των σπόρων που βλάστησαν και εξασφάλισε την ανάπτυξη του βλαστού, ενώ αντίθετα η υψηλή συγκέντρωση (100 mg/L) ευνόησε το ριζικό σύστημα, οδηγώντας σε μεγαλύτερη επιμήκυνση της κύριας ρίζας και στην αύξηση του αριθμού των πρωτευουσών ριζών. Σημειώνεται πως η επίδραση του ασκορβικού οξέος δεν συγκρίθηκε με αντίστοιχα ευρήματα της διεθνούς βιβλιογραφίας, λόγω έλλειψης σχετικών αναφορών.

Τέλος, όπως προαναφέρθηκε, η χρήση του γιββεριλικού οξέος και η ενυδάτωση των σπόρων δεν επέδρασαν θετικά στην ικανότητα βλάστησης των σπόρων αλλά και την ευρωστία των σποροφύτων. Είναι ενδιαφέρον ότι η ενυδάτωση των σπόρων (hydropriming) υπερείχε της ορμονικής επαγωγής με GA₃ (hormonal priming), ενώ μεταξύ των μεταχειρίσεων του γιββεριλικού οξέος, η χαμηλή συγκέντρωση (50 μ M GA₃) διευκόλυνε τη βλάστηση και την πρωταρχική φυτική ανάπτυξη. Συνολικά, γίνεται σαφές ότι οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις των διεγερτών λειτούργησαν πιο αποτελεσματικά σε σχέση με τις αντίστοιχες υψηλές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, σχετικά με τη βλάστηση, την ανάπτυξη των στελεχών και, συνεπώς, την τελική ευρωστία των σποροφύτων, ο «μάρτυρας» εμφάνισε καλύτερη απόκριση, χωρίς ωστόσο να σημειώνονται διαφορές με τη μεταχείριση 50 mM NaCl. Συμπερασματικά, προκύπτει ότι οι μέθοδοι της ορμονικής, θρεπτικής και ενυδατικής επαγωγής (hormonal-, nutritional- και hydro-priming) θα μπορούσαν να επανεξεταστούν σε σπόρους εχινάκειας με ορισμένες προσαρμογές στον χρόνο παραμονής των σπόρων στα διαλύματα ή/και ενδεχομένως στις συγκεντρώσεις των

εφαρμοζόμενων διεγερτών. Επιπλέον, η επίδραση της επεξεργασίας των σπόρων με οσμωτική επαγωγή NaCl, τόσο στη χαμηλή όσο και στην υψηλή συγκέντρωση (100 mM NaCl, 50 mM NaCl), ως προς τη βλάστηση και την ανάπτυξη των σποροφύτων θα μπορούσε να μελετηθεί και σε συνθήκες καταπόνησης αλατότητας, όπου η προετοιμασία των σπόρων συμβάλλει στην ενεργοποίηση των φυσιολογικών μηχανισμών άμυνας των φυτών ώστε να αντεπεξέλθουν στις συνθήκες καταπόνησης.

4.2 Γενετικός μετασχηματισμός του είδους *E. purpurea* μέσω του *A. rhizogenes*

Σχετικά με την ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών μέσω γενετικού μετασχηματισμού με διαφορετικά στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes*, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών υπογραμμίζει τις δυνατότητες παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα βιομάζας ριζών με αντίστοιχα αυξημένο περιεχόμενο σε βιοδραστικά συστατικά σε πληθώρα φυτικών ειδών. Ορισμένα μόνο από τα παραδείγματα επιτυχούς μετασχηματισμού σε φυτά με βιοδραστικές ιδιότητες είναι ο βασιλικός, η μπελαντόνα και το φασκόμηλο (Niazian et al., 2013). Μάλιστα, μελέτες αναφέρουν ότι ο επιτυχής μετασχηματισμός με στελέχη του *A. rhizogenes* συμβάλλει σε σημαντική αύξηση της βιομάζας των ριζών, επιτυγχάνοντας παράλληλα αύξηση του περιεχομένου τους σε φαινολικές και αντιοξειδωτικές ενώσεις. Η έρευνα στα είδη της εχινάκειας περιλαμβάνει τη διεξαγωγή μελετών σχετικά με την αποτελεσματικότητα των πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού, βελτιστοποιώντας το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιείται ως φορέας, τα θρεπτικά υποστρώματα καθώς και τις συνθήκες του μετασχηματισμού και της μετέπειτα ανάπτυξης των φυτών. Επίσης, αντικείμενο συστηματικής μελέτης αποτελεί η επίδραση του μετασχηματισμού στο φαινολικό και αντιοξειδωτικό περιεχόμενο των διαγονιδιακών ριζών. Αναφορικά με το βακτηριακό στέλεχος, το οποίο αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στις διαδικασίες γενετικού μετασχηματισμού, προηγούμενες μελέτες έχουν αναδείξει την συμβατότητα του είδους *E. purpurea* (L.) με το στέλεχος R1000 (Wang et al., 2006), το οποίο οδήγησε σε ταχεία και εκτεταμένη αύξηση του ριζικού συστήματος, χωρίς ωστόσο να επιδρά σημαντικά στην ποσότητα των φαινολικών. Αντίθετα, η χρήση του στελέχους ATCC43057 ενίσχυσε σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή των φαινολικών ουσιών στο ριζικό σύστημα (Demirci et al., 2020; Liu et al., 2006; Matamedi et al., 2013).

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης παρέχουν περαιτέρω ενδείξεις σχετικά με την καταλληλότητα του στελέχους R1000 να επάγει έντονη ριζογένεση σε νεαρά φυτάρια, προσδίδοντας το

χαρακτηριστικό φαινότυπο των θυσσανωδών ριζών με αφθονία ριζικών διακλαδώσεων που συνολικά αυξάνουν δραστικά τη βιομάζα των ριζών. Παράλληλα, οι μετασχηματισμένες ρίζες χαρακτηρίστηκαν από σημαντικά αυξημένο περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, υπερβαίνοντας κατά πολύ το αντίστοιχο των φυτών «μαρτύρων» αλλά ακόμη και αυτό των φυτών που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση ξηρασίας και αλατότητας. Επιπλέον, ο αντιοξειδωτικός χαρακτήρας των μετασχηματισμένων ριζών ήταν αυξημένος, παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά με τους μάρτυρες. Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των ευρημάτων, προκύπτει σαφώς ότι ο γενετικός μετασχηματισμός του είδους *Echinacea purpurea* (L.) με τη χρήση του στελέχους R1000 αποτελεί μία εξαιρετικά αποτελεσματική προσέγγιση καθώς συμβάλλει συνδυαστικά σε σημαντική αύξηση της βιομάζας των ριζών και βελτίωσης του βιοχημικού τους προφίλ. Η χρήση του R1000 ενίσχυσε σημαντικά τη συσσώρευση φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων, προσφέροντας δυνατότητες αξιοποίησής του στη γενετική τροποποίηση του είδους *Echinacea purpurea* (L.).



Εικόνα 4.1: Διαγονιδιακές ρίζες που αναπτύχθηκαν έπειτα από γενετικό μετασχηματισμό με το βακτηριακό στέλεχος R1000 του *A. rhizogenes*.

4.3 Επίδραση των αβιοτικών καταπονήσεων στο βιοχημικό προφίλ των ριζών

Η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτικά είδη με φαρμακευτικές ιδιότητες αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης τα τελευταία χρόνια, λόγω της διευρυμένης χρήσης τους

από τους κλάδους της φαρμακοβιομηχανίας, την κοσμετολογία και τη βιομηχανία τροφίμων. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως τα αλκαλοειδή, οι φαινολικές ενώσεις και τα τερπενοειδή, έχουν αποδεδειγμένα αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες με εξαιρετικά ευεργετική δράση στην ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, συνήθως η φυσικά παραγόμενη ποσότητα των ενώσεων με φαρμακευτικό χαρακτήρα στους φυτικούς ιστούς είναι εξαιρετικά περιορισμένη, καθώς η σύνθεση πολλών από αυτές εξαρτάται σημαντικά από το περιβάλλον ανάπτυξης των φυτών. Παράλληλα, ορισμένες βιοδραστικές ουσίες παράγονται σε συγκεκριμένα στάδια του βιολογικού κύκλου, με αποτέλεσμα η συνολική παραγωγή κατά την καλλιεργητική περίοδο να είναι αμελητέα. Συνεπώς, η αύξηση της παραγωγής τους στα φαρμακευτικά φυτά είναι κρίσιμη για την εξασφάλιση επαρκών ποσοτήτων για τη βιομηχανική χρήση και την κάλυψη της συνεχώς αυξανόμενης ζήτησης σε φαρμακευτικά σκευάσματα φυτικής προέλευσης. Για τον σκοπό αυτό, η έμφαση μετατοπίζεται στην ανάπτυξη νέων μεθόδων που συμβάλλουν στην ενίσχυση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών με αποδοτικό τρόπο, χωρίς ωστόσο να συντελείται μείωση της τελικής απόδοσης σε βιομάζα.

Μεταξύ των προσεγγίσεων που λειτουργούν αποτελεσματικά είναι η κατευθυνόμενη ανάπτυξη σποροφύτων σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, όπως η αλατότητα και η ξηρασία. Τα φυτά, όταν εκτίθενται σε συνθήκες στρες, ενεργοποιούν μια σειρά από αμυντικούς μηχανισμούς προκειμένου να ανταπεξέλθουν στο αντίξοο περιβάλλον ανάπτυξής τους. Σημαντικό μέρος της απόκρισης των φυτών σε συνθήκες αβιοτικού στρες είναι η αύξηση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι συμβάλλουν στη προσαρμογή των φυτών στις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, ενισχύοντας παράλληλα την προστασία των φυτικών ιστών από την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται υπό το καθεστώς της καταπόνησης. Με δεδομένη τη συσσώρευση βιοδραστικών ενώσεων ως απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης έχουν αναπτυχθεί ποικίλα πρωτόκολλα καταπόνησης που ενισχύουν αποτελεσματικά το φυτοχημικό προφίλ διαφόρων φαρμακευτικών φυτικών ειδών. Παράλληλα, μία προσφιλή μέθοδος που χρησιμοποιείται και εξελίσσεται διαρκώς για την ενίσχυση του βιοχημικού προφίλ των φυτών είναι η επαγωγή της ανάπτυξης θυσσανωδών ριζών μέσω γενετικού μετασχηματισμού με στελέχη του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*. Η ενσωμάτωση και η έκφραση των *rol* γονιδίων, που εδράζουν στην T-DNA περιοχή του Ri-πλασμιδίου, στο φυτικό γονιδίωμα έχει ως αποτέλεσμα τη ραγδαία αύξηση του ριζικού συστήματος, τον ενισχυμένο σχηματισμό ριζιδίων και τη συσσώρευση βιοδραστικών συστατικών

σε μεγάλη κλίμακα (Chandra et al., 2013; Faraz et al., 2020; Gharbanpour και Varma; 2017; Kleinwächter και Selmar, 2017)

Οι προαναφερθείσες μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί σε ένα μεγάλο φυτικό εύρος, συμπεριλαμβανομένου του είδους *Echinacea purpurea* (L.). Σχετικά με την επίδραση των αβιοτικών καταπονήσεων, και ειδικότερα αυτή της αλατότητας, η χρήση διαλυμάτων NaCl σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για προσομοίωση συνθηκών αλατότητας στον αγρό έχει αναδειχθεί ως κατάλληλη για αύξηση της συσσώρευσης ολικών φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων σε φυτά του είδους *Thymus vulgaris*, με τις μεγαλύτερες ποσότητες να απαντώνται στα φυτά που υποβλήθηκαν σε καταπόνηση υψηλής έντασης (Bistgani et al., 2019). Αντίστοιχη απόκριση διαπιστώθηκε σε φυτά μέντας που, έπειτα από έκθεση σε καταπόνηση αλατότητας, εμφάνισαν αυξημένη συγκέντρωση φαινολικών και αντιοξειδωτικών, με την αύξηση να είναι ανάλογη της έντασης της καταπόνησης (Oueslati et al., 2010). Σε άλλες μελέτες, ωστόσο, που αφορούν σε υποβολή φυτών του γένους *Salvia* σε καταπόνηση αλατότητας, αναδείχθηκε ότι η μεγιστοποίηση της συσσώρευσης δευτερογενών μεταβολιτών επιτυγχάνεται στο χαμηλό επίπεδο στρες, συγκριτικά με τα υψηλότερα επίπεδα καταπόνησης, παρέχοντας ενδείξεις ότι η ποσότητα των βιοδραστικών συστατικών στους φυτικούς ιστούς βελτιστοποιείται σε επίπεδο είδους ή ακόμη και γονοτύπου (Valiford et al., 2014).

Σε αντίστοιχες μελέτες στο είδος *Echinacea purpurea* (L.), η επίδραση της καταπόνησης αλατότητας συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση της ποσότητας φαινολικών στο ριζικό σύστημα, ενώ η υψηλή ένταση στρες ενίσχυσε παράλληλα και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Taghipour et al., 2021). Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα των Khorasaninejad et al. (2020), όπου το χαμηλότερο επίπεδο στρες οδήγησε σε αύξηση της ποσότητας των φαινολικών ενώσεων. Επιπλέον, τα ευρήματά τους υπέδειξαν πως το έντονο στρες ενδυνάμωσε την αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτού, όπως υπογράμμισαν και οι έρευνες των Sabra et al. (2012). Τέλος, η έρευνα των Ahmadi et al. (2022) ανέδειξε πως η καταπόνηση μέσης έντασης βελτίωσε τη σύνθεση των φαινολικών και των αντιοξειδωτικών συστατικών, σε αντίθεση με την υψηλή ένταση που περιόρισε τη συγκέντρωσή τους.

Σχετικά με τη συγκέντρωση φαινολικών και αντιοξειδωτικών στις ρίζες των φυτών που υποβλήθηκαν σε αβιοτική καταπόνηση, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συνάδουν πλήρως με προηγούμενες αναφορές. Στο πλαίσιο αυτό, αναδείχθηκε πως η υποβολή των φυτών σε

καταπόνηση αλατότητας (25 mM, 75 mM NaCl) συμβάλλει σε αύξηση του περιεχομένου των ριζών σε φαινολικές ενώσεις, συγκριτικά με τις αντίστοιχες των φυτών «μαρτύρων». Μάλιστα, διαπιστώθηκε ότι η χαμηλής έντασης καταπόνηση δρα περισσότερο αποτελεσματικά στην αύξηση της συσσώρευσης φαινολικών ενώσεων, όπως εξάλλου προτάθηκε και στη μελέτη των Ahmadi et al. (2022). Επιπλέον, η καταπόνηση αλατότητας επέδρασε θετικά στη συσσώρευση αντιοξειδωτικών ουσιών, η οποία υπήρξε αυξημένη και στα δύο επίπεδα στρες, συγκριτικά με το μάρτυρα, σημειώνοντας ωστόσο μεγαλύτερη αύξηση στο υψηλότερο επίπεδο καταπόνησης (75 mM NaCl), ισχυροποιώντας περαιτέρω τα αποτελέσματα των Baatour et al (2012) που υπογραμμίζουν ότι στη ρίγανη η υψηλής έντασης καταπόνηση αλατότητας ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα των ιστών.

Σε αντιστοιχία με τα ανωτέρω ευρήματα, η υποβολή των φυτών σε υδατική καταπόνηση οδήγησε σε σημαντική μεταβολή του βιοχημικού τους προφίλ, επιφέροντας τροποποιημένη συσσώρευση φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων. Η περιορισμένη διαθεσιμότητα νερού έχει αναδειχθεί ως μέσο ενίσχυσης της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών και της αντιοξειδωτική ικανότητα σε ένα εύρος φυτών με φαρμακευτικό ενδιαφέρον, όπως ο κράταιγος, το θυμάρι (Selmar και Kleinwächter 2013), η μέντα (Chiappero et al., 2019; Figueras-Perèz et al., 2014) και διάφορα είδη λεβάντας (Shabankareh et al., 2021). Στο πλαίσιο αυτό, σημαντικά ήταν τα ευρήματα των Najja et al. (2018) αναφορικά με την επίδραση της ξηρασίας στο προφίλ φαινολικών ενώσεων διαφόρων φυτικών τμημάτων και στην αντιοξειδωτική ικανότητα στο είδος *Allium roseum*. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε εκθετική αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών και αντιοξειδωτικών συστατικών, ανάλογη με την ένταση της καταπόνησης, με τη μεγιστοποίησή τους να αφορά στα φυτά που υποβλήθηκαν στο υψηλότερο επίπεδο καταπόνησης. Σχετικά με τη μεταβολή της βιοχημικής σύστασης των ριζών, όπου συγκεντρώνεται μεγάλο ποσοστό των φαινολικών συστατικών, η υδατική καταπόνηση διαφόρων εντάσεων οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ποσότητας φαινολικών στοιχείων σε φυτά μελισσόχορτου, βασιλικού και στελλάριας (Albergaria et al., 2020).

Το είδος *Echinacea purpurea* (L.), λόγω του έντονου φαρμακευτικού χαρακτήρα του, έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης αναφορικά με τις επιδράσεις της υδατικής καταπόνησης στο φαινολικό του προφίλ, με τα αποτελέσματα των σχετικών ερευνών να παρουσιάζουν σημαντική διάσταση ως προς την απόκριση των φυτών στην καταπόνηση. Στο πλαίσιο αυτό, υπάρχουν

αναφορές που υποστηρίζουν ότι η ξηρασία δεν επιδρά στην παραγωγή των φαινολικών ουσιών, ανεξαρτήτως της έντασης της καταπόνησης (Gray et al., 2003), ενώ σε άλλες έρευνες καταγράφηκε μείωση του ποσοστού των ολικών φαινολικών στο ριζικό σύστημα και αύξηση στα άνθη (Tavosi et al., 2024). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι η επίδραση της καταπόνησης ξηρασίας στο δευτερογενή μεταβολισμό σχετίζεται με το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών, επιφέροντας σημαντικές μεταβολές σε ανεπτυγμένα φυτά (ριζικό σύστημα ηλικίας 2-3 ετών) αλλά όχι σε νεαρά σπορόφυτα (Seemannova et al., 2006). Παρά τις αντικρουόμενες σχετικές αναφορές, τα τελευταία χρόνια ένας αυξανόμενος αριθμός ερευνών παρέχει σημαντικές ενδείξεις ότι η ελαφρώς περιορισμένη υδατική διαθεσιμότητα ενδυναμώνει το αντιοξειδωτικό προφίλ της εχινάκειας (Heidari et al., 2017; Darvizheh et al., 2019; Hossieinpour et al., 2020).

Στην παρούσα μελέτη, η ξηρασία είχε αρνητική επίδραση στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο ριζικό σύστημα της εχινάκειας. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης (5%, 10% PEG-6000) εμφάνισαν μειωμένη συσσώρευση ολικών φαινολικών στις ρίζες, σε σύγκριση με τους μάρτυρες, γεγονός που συνάδει με αντίστοιχες αναφορές στο συγκεκριμένο είδος (Tavosi et al., 2024). Αντίθετα, παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση των αντιοξειδωτικών ουσιών, ειδικότερα στα φυτά που υποβλήθηκαν στο υψηλότερο επίπεδο καταπόνησης (10% PEG), όπου η αντιοξειδωτική ικανότητα σχεδόν τριπλασιάστηκε συγκριτικά με το μάρτυρα. Αξίζει επιπλέον να αναφερθεί ότι η ξηρασία οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση της συσσώρευσης αντιοξειδωτικών ουσιών στις ρίζες συγκριτικά με την καταπόνηση της αλατότητας. Στο σύνολό τους, τα ανωτέρω ευρήματα υποδεικνύουν πως η καταπόνηση της αλατότητας ευνόησε την παραγωγή των συνολικών φαινολικών περισσότερο σε σχέση με την υδατική καταπόνηση, η τελευταία ωστόσο συνοδεύτηκε από σημαντικότερη ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ριζών.

Συμπεράσματα

Το είδος *Echinacea purpurea* (L.) αποτελεί ένα φυτό με πολυάριθμες φαρμακευτικές ιδιότητες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα και ποικιλοτρόπως στον τομέα της φαρμακοβιομηχανίας. Η εύρεση τεχνικών για τη μεγιστοποίηση των παραγόμενων δευτερογενών μεταβολιτών θα επιτρέψει την περαιτέρω χρήση και ένταξη της εχινάκειας σε πληθώρα φαρμακευτικών σκευασμάτων, προς όφελος της ανθρώπινης υγείας και ευεξίας. Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, προκύπτει ότι η χρήση συγκεκριμένων μεθόδων «seed priming» μπορεί να συμβάλλει μερικώς στην ενίσχυση της ικανότητας βλάστησης και αρχικής ανάπτυξης των νεαρών φυτών, προσφέροντας προοπτικές βελτίωσης της εγκατάστασης της καλλιέργειας σε εργαστηριακές ή/και σε συνθήκες πεδίου. Επιπροσθέτως, τόσο η μέθοδος του γενετικού μετασχηματισμού με το βακτήριο του *Agrobacterium rhizogenes* όσο και η κατευθυνόμενη ανάπτυξη των σποροφύτων σε ελεγχόμενες συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης μπορούν να αξιοποιηθούν εκτενώς για την ενίσχυση του βιοχημικού προφίλ των ριζών, όπως διαπιστώθηκε μέσω της αυξημένης συσσώρευσης φαινολικών και αντιοξειδωτικών ουσιών. Σημειώνεται πως τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για τη βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων «seed priming», του γενετικού μετασχηματισμού και της ελεγχόμενης αβιοτικής καταπόνησης στην εχινάκεια, ενώ ταυτόχρονα θα μπορούσαν να αποτελέσουν μία κατευθυντήρια αρχή για την εφαρμογή των αντίστοιχων τεχνικών ιστοκαλλιέργειας σε άλλα φαρμακευτικά είδη.

5. Βιβλιογραφία

1. Aarland, R. C., Bañuelos-Hernández, A. E., Fragoso-Serrano, M., Sierra-Palacios, E. D. C., Díaz de León-Sánchez, F., Pérez-Flores, L. J., ... & Mendoza-Espinoza, J. A. (2017). Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycaemic and antiproliferative activities of *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* extracts. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 649-656. Διαθέσιμο σε: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13880209.2016.1265989>
2. Abbasi Khalaki, M., Moameri, M., Asgari Lajayer, B., & Astatkie, T. (2021). Influence of nano-priming on seed germination and plant growth of forage and medicinal plants. *Plant growth regulation*, 93(1), 13-28. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s10725-020-00670-9&casa_token=KMQD1HjHNDQAAAAA:PjbgYkM2h9X8_e8zpc-Rv9VpUkNGvJ-PSWCsqX7D0yb7m9ntnzYfU4tSbefieJtDuonudLq0GH_-ImOVA
3. Abbasi, B. H., Saxena, P. K., Murch, S. J., & Liu, C. Z. (2007). *Echinacea* biotechnology: challenges and opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 481-492. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-007-9057-2&casa_token=x4tmZlX22GUAAAAA:CO7RkwqlsM9ybWkahpXbA8FI-KZHHfEGH1xlbkbn4FHya-11hX9n_WSL5UltGf1J1AxvSPGvwOWnE1Ybyg
4. Abbasi, B. H., Tian, C. L., Murch, S. J., Saxena, P. K., & Liu, C. Z. (2007). Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Reports*, 26, 1367-1372. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-007-0344-5&casa_token=4jjGe16B7rkAAAAA:L5hWdJHlZu1Sqs6G6-S7Vyw8zQhPWF2WO6RNNGs5bTdQndzf8S7FsQ5Fh83qHu-xPg-FxQaxnHYFyvYHQ
5. Abrahamian, P., Hammond, R. W., & Hammond, J. (2020). Plant virus-derived vectors: applications in agricultural and medical biotechnology. *Annual Review of Virology*, 7(1), 513-535. Διαθέσιμο σε: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-virology-010720-054958>
6. Açıkgoz, M. A., Kara, Ş. M., Ay, E. B., & Odabaş, S. (2018). Effect of light on biosynthesis of alkamide, caffeic acid derivatives and echinacoside in *Echinacea purpurea* L. callus

- cultures. *Akademik Ziraat Dergisi*, 7(2), 179-184. Διαθέσιμο σε: <https://dergipark.org.tr/en/pub/azd/issue/40046/476349>
7. Acquaah, G. (2015). Conventional plant breeding principles and techniques. *Advances in plant breeding strategies: Breeding, biotechnology and molecular tools*, 115-158. Διαθέσιμο σε: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-22521-0_5
 8. Ahmadi, F., Kariman, K., Mousavi, M., & Rengel, Z. (2024). Echinacea: Bioactive Compounds and Agronomy. *Plants*, 13(9), 1235. Διαθέσιμο σε: <https://www.mdpi.com/2223-7747/13/9/1235>
 9. Ahmadi, F., Samadi, A., Sepehr, E., Rahimi, A., & Shabala, S. (2022). Morphological, phytochemical, and essential oil changes induced by different nitrogen supply forms and salinity stress in Echinacea purpurea L. *Bio Agric Biotechnol* 43: 102396. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818122001232?casa_token=vaXzb05hrfIAAAAA:gB4zwwqao-u65eqipydi5IkmlJLDnCFpysnlMvXQUKzCx7RSJik8POyytUIT6ORBxSNw_i2DohCcQ
 10. Ahmadi, F., Samadi, A., Sepehr, E., Rahimi, A., & Shabala, S. (2023). Potassium homeostasis and signaling as a determinant of Echinacea species tolerance to salinity stress. *Environmental and Experimental Botany*, 206, 105148. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098847222003707?casa_token=WaqVAT07w4AAAAA:jZjLcFMHTBmRqeG4dSCSAT3bfUYfrtc7tHe48TOP-q8rmHwIvCNugyQw_1Hyo5dnV5BUl9okS0s
 11. Ahmadi, F., Samadi, A., Sepehr, E., Rahimi, A., & Shabala, S. (2022). Morphological, phytochemical, and essential oil changes induced by different nitrogen supply forms and salinity stress in Echinacea purpurea L. *Bio Agric Biotechnol* 43: 102396. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818122001232?casa_token=T4z1V7KZiEsAAAAA:GDugxAHf7PZ8Yo8KrPUclqIBto4lyXK-LxnGXEl6ieRQNiEINe1Y6fY-HJjyde1bct3brV-K9cc
 12. Akçay, U. Ç., & Göktürk Baydar, N. (2020). Physical and biochemical differences in Agrobacterium rhizogenes-mediated transgenic hairy root lines of Echinacea purpurea. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 56, 875-881. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-020-10090-

[z&casa_token=5kT5JyVdUYwAAAAA:g4wmcB5jRX0jtiWHdomZ86u_ljXbLSxIMycr6NcorCQ6M4sTtK-wIn3JnWffU9Edvcj0qhymmYaxZbcLFQ](#)

13. Albergaria, E. T., Oliveira, A. F. M., & Albuquerque, U. P. (2020). The effect of water deficit stress on the composition of phenolic compounds in medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 131, 12-17. Διαθέσιμο σε: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629919321246>
14. Anderson, N. O. (Ed.). (2006). Flower breeding and genetics: issues, challenges and opportunities for the 21st century. Διαθέσιμο σε: https://books.google.com/books?hl=el&lr=&id=twH6eWz6rB8C&oi=fnd&pg=PP21&dq=FLOWER+BREEDING+AND+GENETICS+anderson&ots=p4D8tVoQyG&sig=Rt-QP7Da2Uuxbd_5Bi11p5baYMc
15. Ansari, K., Salehi, A., Dehnavi, M. M., & Heydari, S. (2016). Effect of different seed priming on germination characteristics and some antioxidant enzymes activity of *Echinacea purpurea*. Διαθέσιμο σε: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20219901028>
16. Attarzadeh, M., Balouchi, H., Rajaie, M., Dehnavi, M. M., & Salehi, A. (2020). Improving growth and phenolic compounds of *Echinacea purpurea* root by integrating biological and chemical resources of phosphorus under water deficit stress. *Industrial Crops and Products*, 154, 112763. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669020306804?casa_token=pXsgOjklvDoAAAAA:pICNlgMaY7MUtEs7xhP_8ThxnWeVcuSjG_1D5NRupc-79WcW5hGdpR_NxpyA4H6pw2GI_VUjVi0
17. Axiotis, E., Halabalaki, M., & Skaltsounis, L. A. (2018). An ethnobotanical study of medicinal plants in the Greek islands of North Aegean region. *Frontiers in pharmacology*, 9, 409. Διαθέσιμο σε: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00409/full>
18. Azizi-Dargahlou, S., & Pouresmaeil, M. (2024). Agrobacterium tumefaciens-mediated plant Transformation: a review. *Molecular Biotechnology*, 66(7), 1563-1580. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s12033-023-00788-x&casa_token=EmL-OzV2tFMAAAAA:G36P4ud3VeoIXmq5-w-poo1LWAqWSxS3UGew4V4KlcmjpWV_jkyybSZe_H97o36bsd4Eaj8cu3GEEL7ZKA

19. Baâtour, O., Tarchoun, I., Nasri, N., Kaddour, R., Harrathi, J., Drawi, E., ... & Lachaâl, M. (2012). Effect of growth stages on phenolics content and antioxidant activities of shoots in sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) varieties under salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 11(99), 16486-16493. Διαθέσιμο σε: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/129982>

20. Bahramnejad, B., Naji, M., Bose, R., & Jha, S. (2019). A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnology Advances*, 37(7), 107405. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975019300953?casa_token=p9A1xqJ19r4AAAAA:hFJkSnYAft6cPP4hVYUytiGuFSp7VCBkzK_BAqrFyGafpudy93ATZBFcq_PstCm_QyerjaSS8g

21. Barnes, J., Anderson, L. A., Gibbons, S., & Phillipson, J. D. (2005). Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell, *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt, *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(8), 929-954. Διαθέσιμο σε: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1211/0022357056127>

22. Barrett, B. (2003). Medicinal properties of Echinacea: a critical review. *Phytomedicine*, 10(1), 66-86. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711304701993?casa_token=xz03ISPO08kAAAAA:f8OJnVyh7tzMuDamHhWv_Wn9qEOiFOrdro-4DdlDCh4tylPI-TIz9-pDMDCDn9Sk6asEjS_7ZcA

23. Bayat, M., Rahmani, A., Amirnia, R., & Siney, S. M. A. (2014). Determine the best method and time of priming of echinacea purpurea seed in vitro and pot conditions. Διαθέσιμο σε: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20219900878>

24. Bergeron, C., & Gafner, S. (2007). Quantitative Analysis of the Polysaccharide and Glycoprotein Fractions in *Echinacea purpurea*. and *Echinacea angustifolia*. by HPLC-ELSD for Quality Control of Raw Material. *Pharmaceutical Biology*, 45(2), 98-105. Διαθέσιμο σε: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13880200601112893>

25. Binns, S. E., Baum, B. R., & Arnason, J. T. (2002). A taxonomic revision of Echinacea (Asteraceae: Heliantheae). *Systematic Botany*, 27(3), 610-632. Διαθέσιμο σε: <https://bioone.org/journals/systematic-botany/volume-27/issue-3/0363-6445-27.3.610/A->

26. Birt, D. F., Widrlechner, M. P., LaLone, C. A., Wu, L., Bae, J., Solco, A. K., ... & Price, J. P. (2008). Echinacea in infection. *The American journal of clinical nutrition*, 87(2), 488S-492S. Διαθέσιμο σε: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002916523235029>

27. Bishnoi, U. R., Willis, J. E., & Mentreddy, S. R. (2010). Methods to improve seed germination of purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench). *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(3), 185-188. Διαθέσιμο σε: https://www.researchgate.net/profile/Rao-Mentreddy/publication/269830262_Methods_to_improve_seed_germination_of_purple_coneflower_Echinacea_purpurea_L_Moench/links/593f3488458515a6216b8ff7/Methods-to-improve-seed-germination-of-purple-coneflower-Echinacea-purpurea-L-Moench.pdf

28. Bistgani, Z. E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F., & Morshedloo, M. R. (2019). Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*, 135, 311-320. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666901930305X?casa_token=4byauQItxqcAAAAA:N-5BpgQtKrrY3jh2jytj46qHHqZl4swconOgMIXCKP5SiyVRwkV-Ri1u-gFDim8xS7jeL1y0o6s

29. Bodinet, C., & Beuscher, N. (1991). Antiviral and immunological activity of glycoproteins from *Echinacea purpurea* radix. *Planta Medica*, 57(S 2), A33-A34. Διαθέσιμο σε: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/s-2006-960283.pdf>

30. Boligon, A. A., & Athayde, M. L. (2014). Importance of HPLC in analysis of plants extracts. *Austin Chromatogr*, 1(3), 2. Διαθέσιμο σε: https://www.researchgate.net/profile/Isam-Eldin-Elgailani/post/What_HPLC_conditions_to_use_for_analysis_of_Plant_Extracts/attachment/5b806d6ccfe4a76455ee12ca/AS%3A663253122314240%401535143275865/download/fulltext-chromatography-v1-id1011.pdf

31. Bonomelli, C., Cisterna, D., & Reciné, C. (2005). Effect of nitrogen fertilization on *Echinacea purpurea* mineral composition. *Cien. Inv. Agr*, 32(2), 85-91. Διαθέσιμο σε: https://www.researchgate.net/profile/Claudia-Bonomelli-2/publication/228651486_Effect_of_nitrogen_fertilization_on_Echinacea_purpurea_mineral_composition/links/53e2b7430cf275a5fdda5878/Effect-of-nitrogen-fertilization-on-Echinacea-purpurea-mineral-composition.pdf

32. Burlou-Nagy, C., Bănică, F., Jurca, T., Vicaș, L. G., Marian, E., Muresan, M. E., & Pallag, A. (2022). *Echinacea purpurea* (L.) Moench: Biological and pharmacological properties. A review. *Plants*, 11(9), 1244. Διαθέσιμο σε: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/9/1244>
33. Cadar, R. L., Amuza, A., Dumitras, D. E., Mihai, M., & Pocol, C. B. (2021). Analysing clusters of consumers who use medicinal and aromatic plant products. *Sustainability*, 13(15), 8648. Διαθέσιμο σε: <https://www.mdpi.com/2071-1050/13/15/8648>
34. Cardarelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., Spano, L., Capone, I., & Costantino, P. (1987). *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Molecular and General Genetics MGG*, 209, 475-480. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/BF00331152&casa_token=45Z6sKdZoBAAAAAA:73 VWdj9Z-UQyo4PmtGrZIGs3aIESruIMpWtRBxoRgJk4O3APvjyXqKdets96NMLpy0hhcGHJB22VH9TzA
35. Chabaud, M., Boisson-Dernier, A., Zhang, J., Taylor, C. G., Yu, O., & Barker, D. G. (2006). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. *The Medicago truncatula handbook, version November*. Διαθέσιμο σε: [https://www.researchgate.net/profile/Houda-Kawas/post/Best method and time of rhizobium incubation in Alfalfa in pot experiment/attachment/59d63eb479197b807799b470/AS%3A424938185203715%401478324566554/download/AgrobacteriumRhizogenes.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Houda-Kawas/post/Best%20method%20and%20time%20of%20rhizobium%20incubation%20in%20Alfalfa%20in%20pot%20experiment/attachment/59d63eb479197b807799b470/AS%3A424938185203715%401478324566554/download/AgrobacteriumRhizogenes.pdf)
36. Chandra, S. (2013). *Biotechnology for medicinal plants*. Springer-Verlag. Διαθέσιμο σε: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-642-29974-2.pdf>
37. Cheminal, A., Kokkoris, I. P., Strid, A., & Dimopoulos, P. (2020). Medicinal and aromatic Lamiaceae plants in Greece: Linking diversity and distribution patterns with ecosystem services. *Forests*, 11(6), 661. Διαθέσιμο σε: <https://www.mdpi.com/1999-4907/11/6/661>
38. Chen, S. L., Yu, H., Luo, H. M., Wu, Q., Li, C. F., & Steinmetz, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese medicine*, 11, 1-10. Διαθέσιμο σε: <https://link.springer.com/article/10.1186/S13020-016-0108-7>
39. Chiappero, J., del Rosario Cappellari, L., Alderete, L. G. S., Palermo, T. B., & Banchio, E. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in *Mentha piperita*

- grown under drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content. *Industrial Crops and Products*, 139, 111553. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669019305643?casa_token=iSN--QPpZ-0AAAAA:cTHByGbn5wfOC4VZ2y63X5kYoC3atbQlrI3ksVl7g2wyvzxw9TZ_CxczMDM3zasZW6O80tjKwJw
40. Chiu, K. Y., Chuang, S. J., & Sung, J. M. (2006). Both anti-oxidation and lipid-carbohydrate conversion enhancements are involved in priming-improved emergence of *Echinacea purpurea* seeds that differ in size. *Scientia Horticulturae*, 108(2), 220-226. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423806000513?casa_token=km-LIFR43iIAAAAA:hVzxep7UT_bY8BpBPMkem1wlYWLLvbLYdoZQ83mlWHQ3Y365boEoHVUXaDJgdNwgEJmFKDp6eT0
 41. Coker, P. S., & Camper, N. D. (2000). In vitro culture of *Echinacea purpurea* L. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 7(4), 1-7. Διαθέσιμο σε: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J044v07n04_01?casa_token=YV2pEKBduvsAAAA:pnwFXgtQhG_S8gNJd3HE3O9CtnDpp191hz0_0xNTkQ_K-NNL0gmoJfFASeTNhGIZEI6swAEkQd_n8w
 42. Dajic-Stevanovic, Z., & Pljevljakusic, D. (2015). Challenges and decision making in cultivation of medicinal and aromatic plants. *Medicinal and Aromatic Plants of the World: Scientific, Production, Commercial and Utilization Aspects*, 145-164. Διαθέσιμο σε: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-9810-5_8
 43. Darvizheh, H., Zahedi, M., Abbaszadeh, B., & Razmjoo, J. (2019). Changes in some antioxidant enzymes and physiological indices of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) in response to water deficit and foliar application of salicylic acid and spermine under field condition. *Scientia horticulturae*, 247, 390-399. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423818309208?casa_token=FpS5XBj-O0oAAAAA:T7n4bSCWAD7BDvXnSk0PpEND678eMLWMKuAwbZDRh-IHQ3h-X6ezz1lfvWS6B5SMURgvRnPlb5U
 44. Dass, S., & Mathur, M. (2009). *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (pp. 7-32). K. G. Ramawat (Ed.). Berlin, Germany: Springer. Διαθέσιμο σε: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-540-79116-4.pdf>

45. Dastanpoor, N., Fahimi, H., Shariati, M., Davazdahemami, S., & Hashemi, S. M. M. (2013). Effects of hydropriming on seed germination and seedling growth in sage (*Salvia officinalis* L.). *African Journal of Biotechnology*, 12(11), 1223-1228. Διαθέσιμο σε: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/130951>
46. Dikova, B., & Djourmanski, A. Influence of Virus Diseases on the Yield of the Medicinal Plant *Echinacea purpurea*. *ACTA MICROBIOLOGICA BULGARICA*, 66. Διαθέσιμο σε: <https://www.actamicrobio.bg/archive/issue-2-2019/amb-2-2019-article-5.pdf>
47. Dong, M. (2013). The essence of modern HPLC: advantages, limitations, fundamentals, and opportunities. Διαθέσιμο σε: <https://www.chromatographyonline.com/view/essence-modern-hplc-advantages-limitations-fundamentals-and-opportunities>
48. Dosoky, N. S., Kirpotina, L. N., Schepetkin, I. A., Khlebnikov, A. I., Lisonbee, B. L., Black, J. L., ... & Quinn, M. T. (2023). Volatile composition, antimicrobial activity, and in vitro innate immunomodulatory activity of *Echinacea purpurea* (L.) Moench essential oils. *Molecules*, 28(21), 7330. Διαθέσιμο σε: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/21/7330>
49. Druțu, A. C., Gherasim Leonte, A., Pochișcanu, S. F., & Buburuz, A. A. (2013). Researches concerning the influence of organic fertilizers over production and quality at *Echinacea purpurea* Moench. (L.). Διαθέσιμο σε: <https://repository.uaiasi.ro/handle/20.500.12811/2337>
50. Dufault, R. J., Rushing, J., Hassell, R., Shepard, B. M., McCutcheon, G., & Ward, B. (2003). Influence of fertilizer on growth and marker compound of field-grown *Echinacea* species and feverfew. *Scientia Horticulturae*, 98(1), 61-69. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423802002182?casa_token=DneUz2-7SvoAAAAA:ylXgNmsVvdvy5f6kOt5EoJQa5St6nCKwIq_GTgIKq0_wijtDoYZrh7CFfn4276K9LuK1wHOr-Y
51. Elufioye, T. O., Habtemariam, S., & Adejare, A. (2020). Chemistry and pharmacology of alkylamides from natural origin. *Revista brasileira de farmacognosia*, 30, 622-640. Διαθέσιμο σε: <https://link.springer.com/article/10.1007/s43450-020-00095-5>
52. Erkoyuncu, M. T., & Yorgancilar, M. (2021). Optimization of callus cultures at *Echinacea purpurea* L. for the amount of caffeic acid derivatives. *Electronic Journal of Biotechnology*, 51, 17-27. Διαθέσιμο σε: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345821000075>

53. Faraz, R., Gokhale, M., & Gothalwa, R. (2020). Hairy root culture through agrobacterium rhizogenes for enhancement of secondary metabolites production in medicinal plants: A review. *Journal of Advanced Microbiology*, 4(1), 45-58. Διαθέσιμο σε: <https://hkbpublications.com/index.php/jam/article/view/6>
54. Faraz, R., Gokhale, M., & Gothalwa, R. (2020). Hairy root culture through agrobacterium rhizogenes for enhancement of secondary metabolites production in medicinal plants: A review. *Journal of Advanced Microbiology*, 4(1), 45-58. Διαθέσιμο σε: <https://hkbpublications.com/index.php/jam/article/view/6>
55. Fariman, Z. K., Azizi, M., & Noori, S. (2011). Seed germination and dormancy breaking techniques for echinacea purpurea L. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 5(13). Διαθέσιμο σε: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/497742>
56. Figlan, S., & Makunga, N. P. (2017). Genetic transformation of the medicinal plant *Salvia runcinata* L. f. using *Agrobacterium rhizogenes*. *South African Journal of Botany*, 112, 193-202. Διαθέσιμο σε: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629917304933>
57. Figueroa-Pérez, M. G., Rocha-Guzmán, N. E., Pérez-Ramírez, I. F., Mercado-Silva, E., & Reynoso-Camacho, R. (2014). Metabolite profile, antioxidant capacity, and inhibition of digestive enzymes in infusions of peppermint (*Mentha piperita*) grown under drought stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(49), 12027-12033. Διαθέσιμο σε: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf503628c?casa_token=0AQpPtOyfAsAAAAA:lZwUHHOg8VjqHLThhjWyXp3MScYMPL4BhalBUTg-FO9uAwjcSpY2_aB8keSR6RU8XYRFsIHBMhJxyl-A
58. Flagel, L. E., Rapp, R. A., Grover, C. E., Widrlechner, M. P., Hawkins, J., Grafenberg, J. L., ... & Wendel, J. F. (2008). Phylogenetic, morphological, and chemotaxonomic incongruence in the North American endemic genus *Echinacea*. *American Journal of Botany*, 95(6), 756-765. Διαθέσιμο σε: <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3732/ajb.0800049>
59. Freund Saxhaug, K., Jungers, J. M., Wyse, D. L., Sheaffer, C. C., & Hegeman, A. D. (2024). Field production of purple coneflower for beneficial phytochemicals. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 99(2), 198-211. Διαθέσιμο σε: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14620316.2023.2243946?casa_token=WQVNwRt26wQAAAAA:TyOXPsOFVOB6bCmDozheRpHGuZu7xVxUwv-by5WRKWMBPzuenW-R5po2zZbjLuvB7pKacZ0QF6FMQ

60. Georgiev, M., Georgiev, V., Weber, J., Bley, T., Ilieva, M., & Pavlov, A. (2008). Agrobacterium rhizogenes-mediated genetic transformations: a powerful tool for the production of metabolites. *Genetically Modified Plants. Nova Science, Hauppauge*, 99-126. Διαθέσιμο σε: https://www.researchgate.net/profile/Jost-Weber-2/publication/269401026_Georgiev-P-final/links/5489b6510cf214269f1ab8f0/Georgiev-P-final.pdf

61. Georgieva, S. S., Christova-Bagdassarian, V. L., & Atanassova, M. S. (2014). Comparative evaluation of the polyphenol composition and antioxidant capacity of propolis and Echinacea purpurea. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 4(1), 51-56. Διαθέσιμο σε: <https://www.academia.edu/download/88620567/01bc823c9e53df7554f72ee6b2209e94eb1e.pdf>

62. Ghatas, Y. A. A., & Abdallah, W. H. (2016). Effect of some fertilization and micro-nutrients treatments on growth and chemical constituents of Echinacea purpurea plant. *Journal of Plant Production*, 7(7), 709-719. Διαθέσιμο σε: https://jpp.journals.ekb.eg/article_46143.html

63. Ghorbani, A., & Esmailizadeh, M. (2017). Pharmacological properties of Salvia officinalis and its components. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(4), 433-440. Διαθέσιμο σε: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2225411017300056>

64. Gonzales-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gomes-Serranillos, M. P. (2011). Sideritis spp.: uses, chemical composition and pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2), 209-225. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111001498?casa_token=2FQfypTJwfAAAAAA:l57p5VuTqBfjvIEkh3vsHfxzpU2kS6JsF-uIsOHumJ-n7ivigLJdjwoFCFnGYNt5RipmmuHDGo

65. Gorgini Shabankareh, H., Khorasaninejad, S., Soltanloo, H., & Shariati, V. (2021). Physiological response and secondary metabolites of three lavender genotypes under water deficit. *Scientific reports*, 11(1), 19164. Διαθέσιμο σε: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-98750-x>

66. Gray, D. E., Pallardy, S. G., Garrett, H. E., & Rottinghaus, G. E. (2003). Acute drought stress and plant age effects on alkalamide and phenolic acid content in purple coneflower roots. *Planta Medica*, 69(01), 50-55. Διαθέσιμο σε: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-2003-37026>

67. Gray, D. E., Pallardy, S. G., Garrett, H. E., & Rottinghaus, G. E. (2003). Acute drought stress and plant age effects on alkamide and phenolic acid content in purple coneflower roots. *Planta Medica*, 69(01), 50-55. Διαθέσιμο σε: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-2003-37026>

68. Grzegorzcyk, I., Królicka, A., & Wysokińska, H. (2006). Establishment of *Salvia officinalis* L. hairy root cultures for the production of rosmarinic acid. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(5-6), 351-356. Διαθέσιμο σε: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/znc-2006-5-609/html>

69. Gupta, A., Yadav, A. K., Rajan, N., Kulshrestha, V., Singh, H., Priya, K. S., & Upadhyay, N. K. UNFORGETTABLE IMPRESSIONS: A CAPTIVATING REVIEW OF ECHINACEA (PURPLE CONEFLOWER). Διαθέσιμο σε: https://www.researchgate.net/profile/Nitin-Rajan-4/publication/373050175_UNFORGETTABLE_IMPRESSIONS_A_CAPTIVATING_REVIEW_OF_ECHINACEA_PURPLE_CONEFLOWER/links/64d62065b684851d3d9f1985/UNFORGETTABLE-IMPRESSIONS-A-CAPTIVATING-REVIEW-OF-ECHINACEA-PURPLE-CONEFLOWER.pdf

70. Hasan Beigi, H., Mohammadi, M., & Saidi, M. (2021). The improvement growth indices and seed germination of *Echinacea purpurea* by some of pre-harvest and priming treatments of seeds. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 34(2), 346-358. Διαθέσιμο σε: https://plant.ijbio.ir/article_1705_en.html?amp;lang=en&lang=fa

71. Heidari, S., Fotouhi, R., Zavareh, M., & Kafi, M. (2019). Flowering, physiological and biochemical responses of two *Echinacea* species to drought stress. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 84(3), 263-270. Διαθέσιμο σε: <https://hrcak.srce.hr/225540>

72. Hosseinpour, M., Ebadi, A., Habibi, H., Nabizadeh, E., & Jahanbakhsh, S. (2020). Enhancing enzymatic and nonenzymatic response of *Echinacea purpurea* by exogenous 24-epibrassinolide under drought stress. *Industrial crops and products*, 146, 112045. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669019310556?casa_token=l1sXXIaSj6cAAAAA:VGQFzBk5IIKSaQ29394j9xHgLX0fCnpAAh243gQfOnhlEzt2N_w9jEoUgGLKYH8N-kJpEiR4X4A

73. Hostettmann, K. (2003). Geschichte einer Pflanze am Beispiel von *Echinacea*. *Complementary Medicine Research*, 10(Suppl. 1), 9-12. Διαθέσιμο σε: <https://karger.com/fkm/article-pdf/10/Suppl.%201/9/4127439/000071678.pdf>

74. Hou, R., Xu, T., Li, Q., Yang, F., Wang, C., Huang, T., & Hao, Z. (2020). Polysaccharide from *Echinacea purpurea* reduce the oxidant stress in vitro and in vivo. *International journal of biological macromolecules*, 149, 41-50. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019395704?casa_token=V6xjcTk2t1oAAAAA:iigEnROJJae_-zROAo1cBICpST5J_-Lad7bXHC_H1v3eMc1l1AKHRh5HvFtzayRHDqYW_hOg4Fg

75. Hudaib, M., Cavrini, V., Bellardi, M. G., & Rubies-Autonell, C. (2002). Characterization of the essential oils of healthy and virus infected *Echinacea purpurea* (L.) Moench Plants. *Journal of Essential Oil Research*, 14(6), 427-430. Διαθέσιμο σε: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2002.9699911?casa_token=6v1M7_xMQa0AAAAA:2iQO8jikA3cGj18pDX5KpEEW3rbnZD7AFC8rbLxmCJ83otBnEPOI_-QBB86tBWKBlvqN6nR29CJUrq

76. Hwang, H. H., Yu, M., & Lai, E. M. (2017). Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications. *The arabidopsis book*, 15. Διαθέσιμο σε: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6501860/>

77. Iordache, A., Culea, M., Gherman, C., & Cozar, O. (2009). Characterization of some plant extracts by GC–MS. *Nuclear instruments and methods in physics research section B: beam interactions with materials and atoms*, 267(2), 338-342. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X08011622?casa_token=3GxiLrSJv4YAAAAA:A-v6f7zo-r0Byd2cdoWIjL9ZjlHZCByd7w62E5TpgMzQLLeQf17lCFwfNaly2PzE_456ocHXAL9k

78. Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2017). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology*, 7(1), 1-7. Διαθέσιμο σε: <https://herbmedpharmacol.com/PDF/jhp-7-1.pdf>

79. Jang, Y. S., Cui, H. Y., Lee, E. J., Kim, H. W., & Paek, K. Y. (2012). Auxin affects on production of adventitious roots and secondary metabolites in *Echinacea angustifolia*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 20(6), 479-486. Διαθέσιμο σε: <https://koreascience.kr/article/JAKO201205061573985.page>

80. Jbilou, R., Matteo, R., Bakrim, A., Bouayad, N., & Rharrabe, K. (2024). Potential use of *Origanum vulgare* in agricultural pest management control: a systematic review. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 131(2), 347-363. Διαθέσιμο σε:

https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s41348-023-00839-0&casa_token=6FT03oB_gHcAAAAA:ulVUII18MnqRQOgMKq_Z6LR1PA6Z_hXh2W4s7RUFYff6Nfcw1ayYyVL9ugUSIuH477GrxczifBH6d0IaOA

81. Keller, H. W. (2014). The genus Echinacea (Asteraceae) floral, stem, and petiole morphology. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 8(1), 87-126. Διαθέσιμο σε: <https://www.jstor.org/stable/26549344>

82. Khajeh Hosseini, M. (2014). Evaluation of seed dormancy in forty medicinal plant species. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 7. Διαθέσιμο σε: <https://profdoc.um.ac.ir/paper-abstract-1042487.html>

83. Khalili, S., Moieni, A., & Abdoli, M. (2014). Influence of different strains of Agrobacterium rhizogenes, culture medium, age and type of explant on hairy root induction in Echinacea angustifolia. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 3(1), 56-49. Διαθέσιμο σε: https://ijgpb.journals.ikiu.ac.ir/article_684_3.html?lang=en

84. Khorasaninejad, S., & Hemmati, K. (2020). Effects of silicon on some phytochemical traits of purple coneflower (Echinacea purpurea L.) under salinity. *Scientia Horticulturae*, 264, 108954. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423819308404?casa_token=gEJ-9fOPX48AAAAA:KTowLE4sx9XjypFT4n8_LDOP-7K2HGhAEuMLgdON8XaJWGEQxKZq9jAo0ICs2ni95YQdR4cwzzA

85. Khorasaninejad, S., & Hemmati, K. (2020). Effects of silicon on some phytochemical traits of purple coneflower (Echinacea purpurea L.) under salinity. *Scientia Horticulturae*, 264, 108954. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423819308404?casa_token=9BH3cVW-ZgAAAAA:UnOpw4Wqt5FdDgOEsN-NbNwIm2mwYFQJIEwhgs_pkrmd78LwLpVESX8QIplrV7IHShe1o46X_zI

86. Kim, H. O., Durance, T. D., Scaman, C. H., & Kitts, D. D. (2000). Retention of caffeic acid derivatives in dried Echinacea purpurea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4182-4186. Διαθέσιμο σε: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf000245v?casa_token=P8YIpE27WRgAAAAA:Zc0e6K

5nKq7Rf53rk7n81BbCZZQCt9PRH5SKMxUCpW-Pu7iSsdTlh8fEfquG9wVhvA-t2T3nATayvq

87. Kindscher, K. (2006). The conservation status of Echinacea species. *Report to the US Forest Service*, 247. Διαθέσιμο σε: <https://uodiyala.edu.iq/uploads/PDF%20ELIBRARY%20UODIYALA/EL34/The%20Conservation%20Status%20of%20Echinacea%20Species.pdf>
88. Kindscher, K. (Ed.). (2016). *Echinacea: Herbal medicine with a wild history*. Springer. Διαθέσιμο σε: https://books.google.com/books?hl=el&lr=&id=pQBkDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=Kelly+Kindscher+echinacea++Herbal+Medicine+with+a+Wild+History+&ots=3VKJzf9j8f&sig=ZOowXIVJfqBYb5_VVRrSbxbzR8k
89. Kleinwächter, M., & Selmar, D. (2015). New insights explain that drought stress enhances the quality of spice and medicinal plants: potential applications. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, 121-131. Διαθέσιμο σε: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13593-014-0260-3>
90. Koroch, A. R., Park, C., Kapteyn, J., Juliani, H. R., & Simon, J. E. (2008). In vitro shoot multiplication of Echinacea purpurea. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 13(4), 105-110. Διαθέσιμο σε: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10496470801946117?casa_token=og_nId4xTWYAAAAA:tLeypUecy6HgZUV6c5W_exNZvrA8-MWkWKAFnkIxR25HvpX75mgPcU2meHqRNHmRbjaCAYBO---MRg
91. Koroch, A., Juliani, H. R., Kapteyn, J., & Simon, J. E. (2002). In vitro regeneration of Echinacea purpurea from leaf explants. *Plant cell, tissue and organ culture*, 69, 79-83. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015042032091&casa_token=ktuKtWe2MOsAAAAA:6FO2BR4-x6LW5w_WUK07QjXCfCN_x2nlTkNdimxuqfbp6PCih1jbqMVySeUfWlWDtf9jCDZmi4_lFxodw
92. Kumar, K. M., & Ramaiah, S. (2011). Pharmacological importance of Echinacea purpurea. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(4), 304-314. Διαθέσιμο σε: <https://www.academia.edu/download/52753132/echinacea.pdf>

93. Kurkin, V. A., Akushskaya, A. S., Avdeeva, E. V., Velmyaikina, E. I., Daeva, E. D., & Kadentsev, V. I. (2011). Flavonoids from *Echinacea purpurea*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 37, 905-906. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1134/S1068162011070120&casa_token=Wg2RNUa25gIAAAAA:G0HeGDQSZLC5c98_v17LMS7Y8qY3Jo17sa3UnSXJKklOCm13gMtLA8xadNT8ucHno3X5Lt9o4dIyWnk1tg
94. Leszczuk, A., Kalaitzis, P., Kulik, J., & Zdunek, A. (2023). structure and modifications of arabinogalactan proteins (AGPs). *BMC Plant Biology*, 23(1), 45. Διαθέσιμο σε: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12870-023-04066-5>
95. Letchamo, W., Polydeonny, L. V., Gladisheva, N. O., Arnason, T. J., Livesey, J., & Awang, D. V. C. (2002). Factors affecting *Echinacea* quality. *Trends in new crops and new uses*, 514-521. Διαθέσιμο σε: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=d15dceb545b5aea8688cf5fb7717ba154a88bbbe>
96. Li, P., Wu, H., Geng, S. L., Wang, X., Lu, W., Yang, Y., & Zhang, N. (2007). Germination and dormancy of seeds in *Echinacea purpurea* (L.) Moench (Asteraceae). *Seed Science and Technology*, 35(1), 9-20. Διαθέσιμο σε: <https://www.ingentaconnect.com/contentone/ista/sst/2007/00000035/00000001/art00002>
97. Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant physiology and biochemistry*, 148, 80-89. Διαθέσιμο σε: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942820300061>
98. Lin, X. J., Lai, Z. S. Y., Luo, Q., Kong, M., Liang, M. J., Wu, H., & Bai, M. (2023). Correlation between Polyphenol Contents and Antioxidant Activities in Different *Echinacea Purpurea* Varieties. *Current Medical Science*, 43(4), 831-837. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s11596-022-2647-8&casa_token=jNyA3n8PFEAAAAA:ZLPDI3pxT0df716Z1VWQullJh5NJryWDpQhHJXk2JzVUpOH95UQNID5RY70zLVjHZ6FJDFfi3CCMwzCBg
99. Liu, C. Z., Abbasi, B. H., Gao, M., Murch, S. J., & Saxena, P. K. (2006). Caffeic acid derivatives production by hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. *Journal of agricultural and food*

- chemistry*, 54(22), 8456-8460. Διαθέσιμο σε:
https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf061940r?casa_token=-o_xHFaN3jgAAAAA:G6cinRxxW-ts6adXz5Asl6rfCT-Q-96DjzV9cFMnAHFIY_hDUSqem3J9gqNKjNE_bVyBqhgZts2Rpg55
- 100.** Lutts, S., Benincasa, P., Wojtyla, L., Kubala, S., Pace, R., Lechowska, K., ... & Garnczarska, M. (2016). Seed priming: new comprehensive approaches for an old empirical technique. *New challenges in seed biology-basic and translational research driving seed technology*, 46(10.5772), 64420. Διαθέσιμο σε:
<https://books.google.com/books?hl=el&lr=&id=QXaQDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Seed+Priming:+New+Comprehensive+Approaches+for+an++Old+Empirical+Technique&ots=Ey0To6wmaz&sig=xHEfPANOhNkwtqNEQ3Z8fjdLMrQ>
- 101.** Macchia, M., Angelini, L. G., & Ceccarini, L. (2001). Methods to overcome seed dormancy in *Echinacea angustifolia* DC. *Scientia Horticulturae*, 89(4), 317-324. Διαθέσιμο σε:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423800002685?casa_token=o255f5H4lcAAAAA:5BSfNp-EuKITqCTV7NvD8n3HPiKqYGbSTsWpM66XXH_TY6MQh41gpERtAt1UYkXix16TGHZ9OA4
- 102.** McKeown, K. A. (1999). A review of the taxonomy of the genus *Echinacea*. *Perspectives on new crops and new uses*, 482, 489. Διαθέσιμο σε:
<https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=2904cc5ed6af9c8dc82603f143002f0cbb597932>
- 103.** Mei, B., Xie, H., Xing, H., Kong, D., Pan, X., Li, Y., & Wu, H. (2020). Changes of phenolic acids and antioxidant activities in diploid and tetraploid *Echinacea purpurea* at different growth stages. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30, 510-518. Διαθέσιμο σε:
https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s43450-020-00069-7&casa_token=Gvoz-cN5TDgAAAAA:gTXwBu63g0b6N6_lwfUJdt4lZB59e6x_NpIj36p9ZvdLTUuZDTjctbKdxS_CJ-Pwk7znBgVQiFebZRWdSNQ
- 104.** Melchart, D., Clemm, C., Weber, B., Draczynski, T., Worku, F., Linde, K. ... & Saller, R. (2002). Polysaccharides isolated from *Echinacea purpurea* herba cell cultures to counteract undesired effects of chemotherapy—a pilot study. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product*

Derivatives, 16(2), 138-142. Διαθέσιμο σε:
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.888?casa_token=YhkuOX-APAAAAAA:z3Kyb6G2vtRWEp71YL9zD7-J7yvutkp7scmi2nHqoU_XpraE_2K4V5J1Iidj6D3KhLDNa4VXimS8ANnJ

105. Miri, Y., & Mirjalili, S. A. (2013). Effects of salinity stress on seed germination and some physiological traits in primary stages of growth in purple coneflower (*Echinacea purpurea*). Διαθέσιμο σε: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20133059499>
106. Mišan, A., Mimica-Dukić, N., Mandić, A., Sakač, M., Milovanović, I., & Sedej, I. (2011). Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Open Chemistry*, 9(1), 133-142. Διαθέσιμο σε: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11532-010-0126-8/html>
107. Mistríková, I., & Vaverková, Š. (2007). Morphology and anatomy of *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida* and *Parthenium integrifolium*. *Biologia*, 62(1), 2-5. Διαθέσιμο σε: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11756-007-0006-7/html>
108. Moltó, J., Valle, M., Miranda, C., Cedeno, S., Negredo, E., Barbanoj, M. J., & Clotet, B. (2011). Herb-drug interaction between *Echinacea purpurea* and darunavir-ritonavir in HIV-infected patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(1), 326-330. Διαθέσιμο σε: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aac.01082-10>
109. Motamedi, M. J., Zebarjadi, A. R., Ismaili, A., & Taravat, E. (2013). Agrobacterium mediated transformation and HPLC analysis of important alkaloids in hairy roots of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Διαθέσιμο σε: <https://www.sid.ir/FileServer/SE/411E201302121.pdf>
110. Najjaa, H., Boubakri, A., Arfa, A. B., Zouari, N., & Neffati, M. (2018). Salinity and drought stresses improve antioxidant potential of *Allium roseum* L., an edible medicinal plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(11), 195. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-018-2774-9&casa_token=rxMci5e2FoUAAAAA:uAD9CMm8k_pdzdKQ0_DLIYQR0Xsero2c_QfraVd_WS_l4EHgxHwVQKdDKA2nBwrMtw15d-IMwe3EpllyFg
111. Nawaz, J., Hussain, M., Jabbar, A., Nadeem, G. A., Sajid, M., Subtain, M. U., & Shabbir, I. (2013). Seed priming a technique. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 6(20),

1373. Διαθέσιμο σε: https://www.researchgate.net/profile/Imran-Shabbir/publication/305755218_Seed_Priming_A_Technique/links/579f46d208ae6a2882f6016e/Seed-Priming-A-Technique.pdf
112. Neuhaus, G., & Spangenberg, G. (1990). Plant transformation by microinjection techniques. *Physiologia Plantarum*, 79(1), 213-217. Διαθέσιμο σε: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05890.x?casa_token=6MXoCOLFHTMAAAAA:AN-LJa4Z1uFe6_oKRNYN6eNQRE3NF94X0wHCpT9HuksIZoR2d4FQsqRLXoQpdHULjqXIFHFN_h09h-1C
113. Niazian, M. (2019). Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. *Planta*, 249, 953-973. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/S00425-019-03099-1&casa_token=71lKlgJ20d0AAAAA:JyxWUiIdV_rW2KlzElxw-ND-jxjaT9FAiiMuNsGahvV5deM33LxcGvwD6rNxQ_g4h1z2sP9jqHfB_HogA
114. Otten, L. (2018). How *Agrobacterium*, a natural genetic engineer, became a tool for modern agriculture. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 86, pp. 17-44). Academic Press. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065229617300745?casa_token=TNYS0gWE9bEAAAAA:EfdDTeAemoYpFLfqZCKbSS8BPMkQv52upfxBhXibcqiPEBDnnYJLeOPGmqk5UI3veNSKR7zCY
115. Oueslati, S., Karray-Bouraoui, N., Attia, H., Rabhi, M., Ksouri, R., & Lachaal, M. (2010). Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32, 289-296. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-009-0406-0&casa_token=xc4QPyjWk5UAAAAA:yHl8Y5BBmYrMC1k8I2GvjPef2ZL2vgL05PIBCppv_eghKH5UssqvvVXcbpFFiKU0yvHr_qzOGHypry3x3TQ
116. Ozyigit, I. I., & Yucebilgili Kurtoglu, K. (2020). Particle bombardment technology and its applications in plants. *Molecular biology reports*, 47(12), 9831-9847. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-020-06001-

5&casa_token=va51BIsMIUIAAAAA:4jZdiwoijcxNyPPMako2AhKPJSZz6ZrEhyaN6w5z_O
OvsqrgSSrMkmBcRzi4fgZv-USMMjz6XrNKinY8kA

- 117.** Ozyigit, I. I., Dogan, I., & Artam Tarhan, E. (2013). Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation and its biotechnological applications in crops. *Crop improvement: new approaches and modern techniques*, 1-48. Διαθέσιμο σε: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-7028-1_1
- 118.** Parsons, J. L., Cameron, S. I., Harris, C. S., & Smith, M. L. (2018). Echinacea biotechnology: advances, commercialization and future considerations. *Pharmaceutical biology*, 56(1), 485-494. Διαθέσιμο σε: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13880209.2018.1501583>
- 119.** Parsons, J. L., Liu, R., Smith, M. L., & Harris, C. S. (2018). Echinacea fruit: Phytochemical localization and germination in four species of Echinacea. *Botany*, 96(7), 461-470. Διαθέσιμο σε: <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/cjb-2017-0229>
- 120.** Petrova, M., Miladinova-Georgieva, K., & Geneva, M. (2024). Influence of Abiotic and Biotic Elicitors on Organogenesis, Biomass Accumulation, and Production of Key Secondary Metabolites in Asteraceae Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4197. Διαθέσιμο σε: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/8/4197>
- 121.** Pill, W. G., & Haynes, J. G. (1996). Gibberellic acid during priming of Echinacea purpurea (L.) Moench seeds improves performance after seed storage. *Journal of Horticultural Science*, 71(2), 287-295. Διαθέσιμο σε: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14620316.1996.11515407>
- 122.** Pill, W. G., Crossan, C. K., Frett, J. J., & Smith, W. G. (1994). Matric and osmotic priming of Echinacea purpurea (L.) Moench seeds. *Scientia horticulturae*, 59(1), 37-44. Διαθέσιμο σε: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304423894900892>
- 123.** Pimentel, D., Hunter, M. S., LaGro, J. A., Efroymsen, R. A., Landers, J. C., Mervis, F. T., ... & Boyd, A. E. (1989). Benefits and risks of genetic engineering in agriculture. *BioScience*, 39(9), 606-614. Διαθέσιμο σε: <https://www.jstor.org/stable/1311090>
- 124.** Proestos, C., Sereli, D., & Komaitis, M. J. F. C. (2006). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food chemistry*, 95(1), 44-52. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605000294?casa_token=BoSpm26

2iScAAAAA:FqofgPYRhPTYvNVZc05zgfCH2Nkmkww-IG47SFx1f1lPNhKmaQ-93LfQoEVrlPGXKJr16h1fng

125. Rawat, J. M., Bhandari, A., Raturi, M., & Rawat, B. (2019). Agrobacterium rhizogenes mediated hairy root cultures: a promising approach for production of useful metabolites. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 103-118). Elsevier. Διαθέσιμο σε: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444635044000086>
126. Rezaie, E. E., Haghighikhah, M., Ghorbani, S., & Kafi, M. (2013). Effect of seed priming on seed germination properties of two medicinal species in the presence of salinity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(18), 1234-1238. Διαθέσιμο σε: https://academicjournals.org/article/article1380708405_Rezaie%20et%20al.pdf
127. Rios, M. Y., & Olivo, H. F. (2014). Natural and synthetic alkamides: applications in pain therapy. *Studies in natural products chemistry*, 43, 79-121. Διαθέσιμο σε: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444634306000035>
128. Ron, M., Kajala, K., Pauluzzi, G., Wang, D., Reynoso, M. A., Zumstein, K., ... & Brady, S. M. (2014). Hairy root transformation using Agrobacterium rhizogenes as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. *Plant physiology*, 166(2), 455-469. Διαθέσιμο σε: <https://academic.oup.com/plphys/article-abstract/166/2/455/6113236>
129. Ross, S. M. (2016). Echinacea purpurea: A Proprietary Extract of: Echinacea purpurea: Is Shown to be Safe and Effective in the Prevention of the Common Cold. *Holistic nursing practice*, 30(1), 54-57. Διαθέσιμο σε: https://journals.lww.com/hnpjournal/fulltext/2016/01000/Echinacea_purpurea_A_Proprietary_Extract_of.9.aspx?casa_token=noh2UberZ_QAAAAA:8Upo9KY1K5klgf8u_5Erudo-ls3KEXEhx5eBBGTGysW6YBc-V6inPp7DtHMIfnr-WNr2TcVa0JMthqyyFxBMFwiOYeQaeWfo4KkUA
130. Runkle, E. S., Heins, R. D., Cameron, A. C., & Carlson, W. H. (2001). Photocontrol of flowering and stem extension of the intermediate-day plant Echinacea purpurea. *Physiologia plantarum*, 112(3), 433-441. Διαθέσιμο σε: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1034/j.1399-3054.2001.1120318.x?casa_token=PnBo-cDNyEoAAAAA:Ect1rmzITl4Lrtpcz8IT4Sr5pmmfw_TG2klV3PMkHqt5J93UedQy-DGZJCltyZY9PIQAF0DYZzcrHwnW

131. Sabra, A., Daayf, F., & Renault, S. (2012). Differential physiological and biochemical responses of three Echinacea species to salinity stress. *Scientia horticulturae*, 135, 23-31. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423811006200?casa_token=FVmKbg_y8sAcAAAAA:nkYwjgHs5JTILASs-IFleU6jPMt8LyiyTAAxgIgCRjQVqcht6qnuhwrHIsRU38PsBWuU6pzciE

132. Sabra, A., Daayf, F., & Renault, S. (2012). Differential physiological and biochemical responses of three Echinacea species to salinity stress. *Scientia horticulturae*, 135, 23-31. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423811006200?casa_token=xMqsy8K1-IUAAAAA:nKGGEICZ1hc6b4p4f1WfpBHrge61Sxr4LAfgVEG7ia-nujELdq0wII6kxRWEjtdIvBQJCJpZJIY

133. Sahil, K., Prashant, B., Akanksha, M., Premjeet, S., & Devashish, R. (2011). Gas chromatography-mass spectrometry: applications. *International journal of pharmaceutical & biological archives*, 2(6), 1544-1560. Διαθέσιμο σε: <https://www.academia.edu/download/81701982/314.pdf>

134. Schnorf, M., Neuhaus-Url, G., Galli, A., Iida, S., Potrykus, I., & Neuhaus, G. (1991). An improved approach for transformation of plant cells by microinjection: molecular and genetic analysis. *Transgenic research*, 1, 23-30. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/BF02512993&casa_token=Fh4mMs-xXHEAAAAA:PUCBDn2izBDxua7cBS4UNEYhKR5hSZRIBFVH5TRmTHV7YjSzo-7y-BeoLwgBrjxZ6gbaziimvO_1zS2Qow

135. Seemannova, Z., Mistrikova, I., & Vaverkova, S. (2006). Effects of growing methods and plant age on the yield, and on the content of flavonoids and phenolic acids in Echinacea purpurea (L.) Moench. *Plant Soil and Environment*, 52(10), 449. Διαθέσιμο σε: <https://www.agriculturejournals.cz/pdfs/pse/2006/10/03.pdf>

136. Selmar, D., & Kleinwächter, M. (2013). Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 42, 558-566. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669012003421?casa_token=vOpKIEqRDG4AAAAA:HUS0nMKuvB00xN-7uILztBone86DzeI_rqRcIlWfL6v-NMVU5bZqFcG3Dih6r6UtnJyJOf3J8Tk

137. Sen, T., & Samanta, S. K. (2015). Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Biotechnological applications of biodiversity*, 59-110. Διαθέσιμο σε: https://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2014_273

138. Sevón, N., & Oksman-Caldentey, K. M. (2002). Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Medica*, 68(10), 859-868. Διαθέσιμο σε: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-2002-34924>

139. Shakya, A. K. (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. *International journal of herbal medicine*, 4(4), 59-64. Διαθέσιμο σε: https://www.researchgate.net/profile/Arvind-Shakya-2/publication/305305647_Medicinal_plants_Future_source_of_new_drugs/links/5787683f08aed99bcf34c0dc/Medicinal-plants-Future-source-of-new-drugs.pdf

140. Shakya, A. K. (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. *International journal of herbal medicine*, 4(4), 59-64. Διαθέσιμο σε: https://www.researchgate.net/profile/Arvind-Shakya-2/publication/305305647_Medicinal_plants_Future_source_of_new_drugs/links/5787683f08aed99bcf34c0dc/Medicinal-plants-Future-source-of-new-drugs.pdf

141. Sharifi-Rad, M., Mnayer, D., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Bezerra, C. F., Coutinho, H. D. M., ... & Sharifi-Rad, J. (2018). Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1653-1663. Διαθέσιμο σε: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.6101?casa_token=eC6UlmLvoPgAAAAA:E_N4oL7V7iDMOEFSLxMpkLj1ie7kbsXNJiwWPVtu7PMmM4xQ_CSDwUYTVGcJzVo76mMpTcYFf-4YbbfY

142. Sheshbahreh, M. J., Dehnavi, M. M., Salehi, A., & Bahreininejad, B. (2019). Effect of irrigation regimes and nitrogen sources on biomass production, water and nitrogen use efficiency and nutrients uptake in coneflower (*Echinacea purpurea* L.). *Agricultural Water Management*, 213, 358-367. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378377418310151?casa_token=3pW9J_TzfyIAAAAA:ScbieVI7BXpBaS9axUztBSHpYGZSqwo7wqUH3pBFDzMhFjqw70d4zeFo7o7FvyXIZJhUZZdFags

143. Sheshbahreh, M. J., Dehnavi, M. M., Salehi, A., & Bahreininejad, B. (2019). Physiological and yield responses of purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) to nitrogen sources at different levels of irrigation. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(1), 177. Διαθέσιμο σε: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6352526/>
144. Sidhiq, D. F., Widiyastuti, Y., Subositi, D., Pujiasmanto, B., & Yunus, A. (2020). Morphological diversity, total phenolic and flavonoid content of *Echinacea purpurea* cultivated in Karangpandan, Central Java, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(3). Διαθέσιμο σε: <https://smujo.id/biodiv/article/view/5096>
145. Silva, D., Ferreira, M. S., Sousa-Lobo, J. M., Cruz, M. T., & Almeida, I. F. (2021). Anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* L. flower extract. *Cosmetics*, 8(2), 31. Διαθέσιμο σε: <https://www.mdpi.com/2079-9284/8/2/31>
146. Sinkar, V. P., Pythoud, F., White, F. F., Nester, E. W., & Gordon, M. P. (1988). rolA locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic tobacco plants. *Genes & development*, 2(6), 688-697. Διαθέσιμο σε: <https://genesdev.cshlp.org/content/2/6/688.short>
147. Solomou, A. D., Martinos, K., Skoufogianni, E., & Danalatos, N. G. (2016). Medicinal and aromatic plants diversity in Greece and their future prospects: A review. *Agricultural Science*, 4(1), 9-21. Διαθέσιμο σε: <https://www.academia.edu/download/109671817/as.v4i1p09.pdf>
148. Soltanbeigi, A., & Maral, H. (2022). Agronomic yield and essential oil properties of Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L. Moench) with different nutrient applications. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 38(2), 164-175. Διαθέσιμο σε: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0719-38902022000200164&script=sci_arttext&tlng=en
149. Steinmann, D., & Ganzera, M. (2011). Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55(4), 744-757. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708510006588?casa_token=aVQgUNHLnRAAAAAA:u0WVvfj3dKooRgWMB5Cyc4SQMeIrBtQE1fgKnDvbiBYmSo9SnLsPYrS3g6DSFA36RdFbIcmIs4s
150. Sunil Kumar, S. K., & Ashwani Kumar, A. K. (2015). Role of genetic engineering in agriculture. Διαθέσιμο σε: [http://www.plantarchives.org/PDF%2015%20-%201/1-6%20\(2950\).pdf](http://www.plantarchives.org/PDF%2015%20-%201/1-6%20(2950).pdf)

151. Süntar, I. (2020). Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, 19(5), 1199-1209. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/S11101-019-09629-9&casa_token=i2TtJ5mNySQAAAAA:u8JaEzLnRFa43HsonlVmCDZmz6HvGYUVLO0yOXJ5_Ei8alcV_zalNA9TDoDTmSl5I9ASG1eqbd-5o2lywA
152. Tafazoli, A. (2020). Echinacea for cancer patients: To give or not to give. *Complementary Medicine Research*, 27(2), 112-116. Διαθέσιμο σε: <https://karger.com/cmr/article/27/2/112/67820>
153. Taghipour, M., Shokrpour, M., & Hakimi, Y. (2021, December). Investigation of the physiological and biochemical responses of Echinacea purpurea under salinity stress. *In Biology and Life Sciences Forum* (Vol. 11, No. 1, p. 51). MDPI. Διαθέσιμο σε: <https://www.mdpi.com/2673-9976/11/1/51>
154. Tavosi, R., Sayyari, M., & Azizi, A. (2024). Impact of drought stress on some growth and phytochemical characteristics of the coneflower (Echinacea purpurea L.). *Environmental Stresses in Crop Sciences*. Διαθέσιμο σε: https://escs.birjand.ac.ir/article_2857_en.html
155. Tavosi, R., Sayyari, M., & Azizi, A. (2024). Impact of drought stress on some growth and phytochemical characteristics of the coneflower (Echinacea purpurea L.). *Environmental Stresses in Crop Sciences*. Διαθέσιμο σε: https://escs.birjand.ac.ir/article_2857_en.html
156. Tepfer, D. (1990). Genetic transformation using Agrobacterium rhizogenes. *Physiologia Plantarum*, 79(1), 140-146. Διαθέσιμο σε: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05876.x?casa_token=eJlxNiYkS3YAAAAA:ofjQvXMsJPJ5lbyz82VUS8Ft7Fp-A-VbR2-pHjlhWOxSCPKPLEs6opxWfWGfSjDvaTPm5x1Lx8vZdHuK
157. Thomas, C. M. (2000). Paradigms of plasmid organization. *Molecular microbiology*, 37(3), 485-491. Διαθέσιμο σε: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2958.2000.02006.x>
158. Thomsen, M. O. (2012). *The impact of cultivation techniques and induced stress on bioactive compounds in Echinacea species*. Διαθέσιμο σε:

[https://pure.au.dk/portal/files/48761202/The impact of cultivation techniques and induced stress on bioactive compounds afhandling MOTH.pdf](https://pure.au.dk/portal/files/48761202/The_impact_of_cultivation_techniques_and_induced_stress_on_bioactive_compounds_afhandling_MOTH.pdf)

159. Thomsen, M. O., Christensen, L. P., & Grevsen, K. (2018). Harvest strategies for optimization of the content of bioactive alkaloids and caffeic acid derivatives in aerial parts and in roots of *Echinacea purpurea*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(44), 11630-11639. Διαθέσιμο σε: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.8b03420?casa_token=3kaKW4dH0n8AAAAA:xkniybcQ3G8ZiruRRMINhsWqxwzcdDLS0-fBR5YbSCL8WAJUrdkj2dp8XCAARZR-2KPX2j5ukXep-cP
160. Trypsteen, M., Van Lijsebettens, M., Van Severen, R. O. B. E. R. T., & Van Montagu, M. (1991). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Echinacea purpurea*. *Plant cell reports*, 10, 85-89. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/BF00236463&casa_token=XvJOnnzWPtkAAAAA:GEOYr25qPEgMCbUJEVAKepPKNzSY4Pg8XV5gQbgv5FRedAkhd379pBhb7MUJHPWKS8TuTKGpUsC-THcJUw
161. Tsai, Y. L., Chiou, S. Y., Chan, K. C., Sung, J. M., & Lin, S. D. (2012). Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1), 169-176. Διαθέσιμο: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643811003379>
162. Tsioutsiou, E. E., Amountzias, V., Vontzalidou, A., Dina, E., Stevanović, Z. D., Cheilari, A., & Aligiannis, N. (2022). Medicinal plants used traditionally for skin related problems in the south Balkan and east Mediterranean region—a review. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 936047. Διαθέσιμο σε: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.936047/full>
163. Valifard, M., Mohsenzadeh, S., Kholdebarin, B., & Rowshan, V. (2014). Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii*. *South African Journal of Botany*, 93, 92-97. Διαθέσιμο σε: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629914000702>
164. Van De Velde, W., Karimi, M., Den Herder, G., Van Montagu, M., Holsters, M., & Goormachtig, S. (2003). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of plants. In *Genetic Transformation of Plants* (pp. 23-44). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Διαθέσιμο σε: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-662-07424-4_2?pdf=chapter%20toc

- 165.** Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 383-403. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-007-9096-8&casa_token=4Euc4zatbcwAAAAA:NTgi9T2dUeLh1sc4dVIATKbYQd7rzIdOZMPyCRm5mil8M9-veMN02WMoI9PSmVnx6YfM5SU9PmKVslPvjg
- 166.** Vincelli, P. (2016). Genetic engineering and sustainable crop disease management: opportunities for case-by-case decision-making. *Sustainability*, 8(5), 495. Διαθέσιμο σε: <https://www.mdpi.com/2071-1050/8/5/495>
- 167.** Wang, B., Zhang, G., Zhu, L., Chen, L., & Zhang, Y. (2006). Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(1), 101-104. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776506002530?casa_token=s8u9rfUdLNkAAAAA:PZ5mAOfLGTv1l3sEpVPoREtUTzd1zk5rC0scFIG-Bv6iZQqV88ET88SZAc3cpbBm5SPXxRWPgs
- 168.** Wang, J. W., Grandio, E. G., Newkirk, G. M., Demirer, G. S., Butrus, S., Giraldo, J. P., & Landry, M. P. (2019). Nanoparticle-mediated genetic engineering of plants. *Molecular plant*, 12(8), 1037-1040. Διαθέσιμο σε: [https://www.cell.com/molecular-plant/fulltext/S1674-2052\(19\)30231-X](https://www.cell.com/molecular-plant/fulltext/S1674-2052(19)30231-X)
- 169.** Woelkart, K., & Bauer, R. (2007). The role of alkaloids as an active principle of *Echinacea*. *Planta medica*, 73(07), 615-623. Διαθέσιμο σε: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-2007-981531>
- 170.** Xu, W., Cheng, Y., Guo, Y., Yao, W., & Qian, H. (2022). Effects of geographical location and environmental factors on metabolite content and immune activity of *Echinacea purpurea* in China based on metabolomics analysis. *Industrial Crops and Products*, 189, 115782. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669022012651?casa_token=cumUEo

1HgAAAAA:nQS-kog9ugUVfrATi-Mc3QU7RVvyxFC 5OGdQq7WevNvjDZQWD-KJJdx91cnUvFiCCNFtJT8CD4

171. Yang, G., Li, K., Liu, C., Peng, P., Bai, M., Sun, J. ... & Wu, H. (2018). A comparison of the immunostimulatory effects of polysaccharides from tetraploid and diploid *Echinacea purpurea*. *BioMed research international*, 2018(1), 8628531. Διαθέσιμο σε: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1155/2018/8628531>
172. Younesi, O., & Moradi, A. (2014). Effect of different priming methods on germination and seedling establishment of two medicinal plants under salt stress conditions. Διαθέσιμο σε: <http://193.231.26.26/handle/20.500.12811/1539>
173. Yousefi, F., Siahpoush, A., Bakhshandeh, A., & Mousavi, S. A. (2021). The effect of hormone seed priming using gibberellic acid on seed germination characteristics and seedling growth of Coneflower (*Echinacea purpurea*). Διαθέσιμο σε: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20210441243>
174. Zadeh, J. B., Kor, N. M., & Kor, Z. M. (2014). Chamomile (*Matricaria recutita*) as a valuable medicinal plant. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(3), 823-829. Διαθέσιμο σε: <https://odontoanamaria.com/artigos/camomila06.pdf>
175. Zaidi, S. S. E. A., & Mansoor, S. (2017). Viral vectors for plant genome engineering. *Frontiers in Plant Science*, 8, 539. Διαθέσιμο σε: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00539/full>
176. Zakerian, M., Haghiyan, I., & Karkaj, E. S. (2021). Evaluation of drought stress on growth traits of *Echinacea purpurea* (L.) Monch. Διαθέσιμο σε: https://www.researchgate.net/profile/Iman-Haghiyan-2/publication/353339272_Evaluation_of_drought_stress_on_growth_traits_of_Echinacea_purpurea_L_Monch/links/60f58496fb568a7098bfd541/Evaluation-of-drought-stress-on-growth-traits-of-Echinacea-purpurea-L-Monch.pdf
177. Zebarjadi, A. R., Najafi, S. H., Ghasempour, H. R., & Motamedi, J. (2011). Establishment of a practical tissue culture for producing hairy roots of *Valeriana officinalis* L. via *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(20), 4984-4992. Διαθέσιμο σε: https://academicjournals.org/article/article1380785231_Zebarjadi%20et%20al.pdf

178. Zhang, J., Klueva, N. Y., Wang, Z., Wu, R., Ho, T. H. D., & Nguyen, H. T. (2000). Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36, 108-114. Διαθέσιμο σε: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-000-0022-6&casa_token=WFX4VUijx0AAAAA:tZffyhvsjNlnldi_YIFzVuE0LU8ZGs_4Mf_d3EXhlKK_uo01D99g-QZps1RWTLZZ8EVTf2z6eU2kE5ZY_2Q
179. Zheng, Y., Dixon, M., & Saxena, P. K. (2006). Growing environment and nutrient availability affect the content of some phenolic compounds in *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia*. *Planta medica*, 72(15), 1407-1414. Διαθέσιμο σε: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-2006-951720>
180. Ziemienowicz, A. (2014). Agrobacterium-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 95-102. Διαθέσιμο σε: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818113001175?casa_token=WbWBvFsg_0sAAAAA:kQSD2_s-7rVdIStRhpgk-QeAbsl9YdKMTAPiQSG2tjNjKZ-NYvn2ABgnHlbU9ZY6jcbXRzCVLI
181. Κουτσός Θ. Β., (2006). *Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά: Βοτανική ταξινόμηση, Οικολογία, Καλλιεργητικές οδηγίες, Χρήσεις*. Εκδόσεις Ζήτη

Βιβλιογραφία Εικόνων

- Εικόνα 1.1:** Καλλιεργούμενες εκτάσεις φαρμακευτικών φυτών σε παγκόσμια κλίμακα. Διαθέσιμη σε: https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2Fs12231-022-09554-7&psig=AOvVaw18QWezw2K9Z3wppcXQKY2p&ust=1722798167779000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBQQjhXqFwoTCKC_z7jB2YcDFQAAAAAdAAAAABAE
- Εικόνα 1.2 (a):** Φύλλωμα του είδους *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Διαθέσιμη σε: https://www.google.com/imgres?q=echinacea%20purpurea%20leaf&imgurl=https%3A%2F%2Fi2.wp.com%2Fmgmv.org%2Fwp-content%2Fuploads%2F2021%2F01%2FEchinacea_purpurea_leaves-with-ciliate-margins_Jul_MMF-1024x1024.jpg%3Fssl%3D1%26resize%3D2000%252C2000&imgrefurl=https%3A%2F%2F

[mgnv.org%2Fplants%2Fnative-plants%2Fperennials%2Fechinacea-purpurea%2F&docid=jh9McnYixThoM&tbnid=E3Bi9AHWEpZjxM&vet=12ahUKEwi-062QwtmHAxXxhP0HHfxOFIYQM3oECG0QAA..i&w=2000&h=2000&hcb=2&ved=2ahUKEwi-062QwtmHAxXxhP0HHfxOFIYQM3oECG0QAA](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fmgnv.org%2Fplants%2Fnative-plants%2Fperennials%2Fechinacea-purpurea%2F&docid=jh9McnYixThoM&tbnid=E3Bi9AHWEpZjxM&vet=12ahUKEwi-062QwtmHAxXxhP0HHfxOFIYQM3oECG0QAA..i&w=2000&h=2000&hcb=2&ved=2ahUKEwi-062QwtmHAxXxhP0HHfxOFIYQM3oECG0QAA)

Εικόνα 1.2 (b): Φυλλική επιφάνεια του είδους *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Διαθέσιμη σε: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwildeherb.com%2F2010%2F07%2F15%2Fechinacea-the-purple-coneflower-perennial%2Fcomment-page-1%2F&psig=AOvVaw2JwBKIVC3yRSfgGy6iM4aa&ust=1722798782758000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCPiakN D2YcDFQAAAAAdAAAAABA W>

Εικόνα 1.3 (a): Ριζικό σύστημα του είδους *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Διαθέσιμη σε: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fpowo.science.kew.org%2Ftaxon%2Furn%3Aalsid%3Aipni.org%3Anames%3A1174497-2%2Fgeneral-information&psig=AOvVaw3PjsJ8s2uiN-CYeoGWmDpJ&ust=1722799007628000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCMCd7cjE2YcDFQAAAAAdAAAAABAE>

Εικόνα 1.3 (b): Ριζικό σύστημα του είδους *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Διαθέσιμη σε: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.alamy.com%2Fstock-photo%2Fechinacea-root.html&psig=AOvVaw3PjsJ8s2uiN-CYeoGWmDpJ&ust=1722799007628000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCMCd7cjE2YcDFQAAAAAdAAAAABAK>

Εικόνα 1.4 (a): Άνθη του είδους *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Διαθέσιμη σε: <https://encrypted-tbn2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRXB4ojKFEA3GgVdZaOtU9CIEbJ3nZsHFR-N19gUJBanXVB6gcd>

Εικόνα 1.4 (b): Άνθος του είδους *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Διαθέσιμη σε: <https://encrypted-tbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSayYGfBC2SoFDfmLnhaegveD7Tl4mIOgjetSpHtKQ7bqXjqvXG>

Εικόνα 1.5: Κατανομή των βιοδραστικών ενώσεων στα φυτικά όργανα του είδους *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Διαθέσιμη σε: <https://www.shutterstock.com/search/botanical-illustration-echinacea>

Εικόνα 1.6: Γενετικός μετασχηματισμός με τη χρήση του αγροβακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*. Διαθέσιμη σε: <https://encrypted-tbn2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTPNH1T0TUHYrqYPzv3KctXKwWY5MNkNBCBqpKt9CPgXFBSYahB>

Εικόνα 1.7: Απεικόνιση του πλασμιδίου Ri του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*. Διαθέσιμη σε: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ti-Plasmid.svg>

Εικόνα 1.8: Διαδικασία μόλυνσης φυτικού ιστού από το *Agrobacterium rhizogenes*. Διαθέσιμη σε: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444635044000086>

Εικόνα 1.9 (a): Ριζικό σύστημα του είδους *Echinacea purpurea* (L.) Moench ύστερα από προσβολή του *Agrobacterium rhizogenes*. Διαθέσιμη σε: <https://www.sciencephoto.com/media/26989/view/purple-coneflower-roots>

Εικόνα 1.9 (b): Ριζικό σύστημα του είδους *Echinacea purpurea* (L.) Moench ύστερα από προσβολή του *Agrobacterium rhizogenes*. Διαθέσιμη σε: <https://www.alamy.com/root-of-the-echinacea-medicinal-use-image602042.html>