

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών και Περιβάλλοντος
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου

Π. Μ. Σ. Επιστήμες & Συστήματα Φυτικής Παραγωγής
«Κηπευτικές Καλλιέργειες & Ανθοκομία»

Διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού του *Arbutus unedo* var. *rubra* και συγκριτική μελέτη της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών του με άλλων ειδών *Arbutus*



Μεταπτυχιακή Μελέτη

Αργυρώ Α. Παπαγιάννη

Επιβλέπουσα: Καθ. Μαρία Παπαφωτίου

ΑΘΗΝΑ 2018

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών και Περιβάλλοντος
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου

Π. Μ. Σ. Επιστήμες & Συστήματα Φυτικής Παραγωγής
«Κηπευτικές Καλλιέργειες & Ανθοκομία»

Διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού του *Arbutus unedo* var. *rubra* και συγκριτική μελέτη της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών του με άλλων ειδών *Arbutus*



Μεταπτυχιακή Μελέτη

Αργυρώ Α. Παπαγιάννη

Επιβλέπουσα: Καθ. Μαρία Παπαφωτίου

ΑΘΗΝΑ 2018

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών και Περιβάλλοντος
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου



Π. Μ. Σ. Επιστήμες & Συστήματα Φυτικής Παραγωγής
«Κηπευτικές Καλλιέργειες & Ανθοκομία»

**Διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού του *Arbutus unedo*
var. *rubra* και συγκριτική μελέτη της συγκέντρωσης των
ολικών φαινολικών του με άλλων ειδών *Arbutus***

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Αργυρώ Α. Παπαγιάννη

Επιβλέπουσα: Καθ. Μαρία Παπαφωτίου

Εξεταστική Επιτροπή

Παπαφωτίου Μαρία - Καθηγήτρια

Ταραντίλης Πέτρος - Καθηγητής

Τσαντίλη Ελένη - Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ 2018

Στην οικογένεια μου...

Ελένη, Βίκυ & Αχιλλέα

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Κατ' αρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα Μαρία Παπαφωτίου, Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α., Πρόεδρο του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή επιστημονική καθοδήγησή της αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε τόσο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης όσο και κατά τη συγγραφή και διόρθωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κο Π. Ταραντίλη, Καθηγητή και Πρόεδρο του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, για τη φιλοξενία του στο Εργαστήριο Χημείας, την πολύτιμη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια των αναλύσεων, αλλά και για το χρόνο που αφιέρωσε για την επεξεργασία και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κα Ε. Τσαντίλη, Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Δενδροκομίας, για το χρόνο που αφιέρωσε για την ανάγνωση και εξέταση της παρούσας μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Ι. Καραπάνο, Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Κηπευτικών Καλλιεργειών, για τη φιλοξενία του στο οικείο εργαστήριο.

Πολύτιμη ήταν και η συμβολή του διδάκτορα Κων/νου Μπερτσουκλή, ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, στην εκπόνηση της μελέτης με τις συμβουλές και τις υποδείξεις του, αλλά και με την προθυμία και τη βοήθειά του στη συλλογή του φυτικού υλικού.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Κατερίνα Μαρτίνη και τις συναδέλφους Γεωργία Βλάχου, Μαρίνα Τρίγκα και Αλεξάνδρα Καραθάνου για τη βοήθεια που μου προσέφεραν καθ' όλη την πειραματική διαδικασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Συντομογραφίες	9
Περίληψη	10
Abstract	12
Σκοπός της μελέτης	14
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1 Μεσογειακά οικοσυστήματα	15
1.1.1 Η χλωρίδα και η βλάστηση των δασών της Ελλάδας	15
1.1.2 Καταπόνηση των μεσογειακών οικοσυστημάτων από πυρκαγιές	18
1.1.2.1 Αίτια της πυρκαγιάς	18
1.1.2.2 Στρατηγικές αντιμετώπισης των επιπτώσεων των πυρκαγιών	18
1.1.2.3 Αναγέννηση με αναβλάστηση	19
1.2 Η οικογένεια Ericaceae και το γένος <i>Arbutus</i>	20
1.2.1 <i>Arbutus unedo</i> var. <i>rubra</i> – Συστηματική κατάταξη	22
1.2.2 Βοτανική περιγραφή του <i>A. unedo</i> var. <i>rubra</i>	22
1.2.3 Πολλαπλασιασμός των ειδών του γένους <i>Arbutus</i>	24
1.2.3.1 Η ιστοκαλλιέργεια στο γένος <i>Arbutus</i> και την οικογένεια Ericaceae	25
1.2.4 Εχθροί και ασθένειες των ειδών του γένους <i>Arbutus</i>	28
1.2.5 Γενικές χρήσεις των ειδών του γένους <i>Arbutus</i>	31
1.2.5.1 Φαρμακευτική χρήση των <i>A. unedo</i> και <i>A. andrachne</i>	33
1.2.5.2 Χρήση των ειδών του γένους <i>Arbutus</i> στην Αρχιτεκτονική Τοπίου - Εδώδιμα τοπία	34
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	36
2.1 Φυτικό υλικό	36
2.2 Υποστρώματα in vitro καλλιέργειας	36
2.2.1 Υλικά των θρεπτικών υποστρωμάτων in vitro καλλιέργειας	36
2.2.2 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων	36
2.2.3 Μέθοδος παρασκευής «stock» διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών	38
2.3 Δοχεία και υλικά κάλυψης	38
2.3.1 Δοχεία in vitro καλλιέργειας και υλικά κάλυψης	38
2.3.2 Δοχεία εγκλιματισμού φυταριών	39

2.4	Μέθοδοι αποστείρωσης και απολύμανσης	39
2.4.1	Απολύμανση εκφύτων	39
2.4.2	Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας	40
2.5	Εγκατάσταση φυτικού υλικού σε καλλιέργεια	41
2.5.1	Βλάστηση σπόρων και συνθήκες επώασης	41
2.5.2	Εγκατάσταση εκφύτων αρχικής καλλιέργειας <i>in vitro</i>	41
2.5.2.1	Εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας από αυτοφυή βλάστηση	41
2.5.2.2	Εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας από ιστούς σποροφύτων	42
2.5.3	Εγκατάσταση εκφύτων καλλιεργειών πολλαπλασιασμού	42
2.5.4	Εγκατάσταση μικροβλαστών για ριζοβολία <i>in vitro</i>	42
2.5.5	Εγκατάσταση ριζοβολημένων μικροβλαστών <i>ex vitro</i>	43
2.6	Συνθήκες καλλιέργειας	43
2.6.1	Συνθήκες <i>in vitro</i> καλλιέργειας	43
2.6.2	Συνθήκες <i>ex vitro</i> καλλιέργειας	44
2.7	Στατιστική ανάλυση – Εκτίμηση αποτελεσμάτων	44
3	ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ <i>Arbutus unedo</i> var. <i>rubra</i>	46
3.1	<i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός από κόμβους σποροφύτων	46
3.1.1	Υλικά και Μέθοδοι	46
3.1.1.1	Φυτικό υλικό	46
3.1.1.2	Συλλογή, καθαρισμός, αποθήκευση και βλάστηση σπόρων	47
3.1.1.3	Υποστρώματα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	48
3.1.2	Αποτελέσματα	48
3.1.2.1	Βλαστικότητα σπόρων <i>in vitro</i> – Εγκατάσταση μητρικής καλλιέργειας	48
3.1.2.2	Αρχική καλλιέργεια <i>in vitro</i>	50
3.1.2.3	Πολλαπλασιασμός καλλιεργειών <i>in vitro</i>	51
3.1.2.3.1	Πρώτη υποκαλλιέργεια	51
3.1.2.3.2	Δεύτερη υποκαλλιέργεια	53
3.1.2.3.3	Τρίτη υποκαλλιέργεια	55
3.1.2.3.4	Τέταρτη υποκαλλιέργεια	57
3.1.2.3.5	Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των τεσσάρων υποκαλλιεργειών	59
3.1.2.4	Ριζοβολία μικροβλαστών	60
3.1.2.4.1	Πρώτο πείραμα ριζοβολίας	60

3.1.2.4.2	Δεύτερο πείραμα ριζοβολίας	62
3.1.2.5	Εγκλιματισμός φυταρίων	63
3.2	<i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός από ενήλικο αυτοφυές φυτό	66
3.2.1	Υλικά και Μέθοδοι	66
3.2.1.1	Φυτικό υλικό	66
3.2.1.2	Υποστρώματα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	66
3.2.2	Αποτελέσματα	67
3.2.2.1	Αρχική καλλιέργεια <i>in vitro</i>	67
3.2.2.2	Πολλαπλασιασμός καλλιεργειών <i>in vitro</i>	68
3.2.2.2.1	Πρώτη υποκαλλιέργεια	68
3.2.2.2.2	Δεύτερη υποκαλλιέργεια	69
3.2.2.2.3	Τρίτη υποκαλλιέργεια	70
3.2.2.2.4	Τέταρτη υποκαλλιέργεια	71
3.2.2.2.5	Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των τεσσάρων υποκαλλιεργειών	72
3.2.2.3	Ριζοβολία μικροβλαστών	74
3.2.2.4	Εγκλιματισμός φυταρίων	74
3.3	Συζήτηση – Συμπεράσματα	76
3.3.1	<i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός από ιστούς σποροφύτων	76
3.3.2	<i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός από ενήλικο αυτοφυές φυτό	81
3.4	Γενικό συμπέρασμα	84
4	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>Arbutus</i>	85
4.1	Εισαγωγή	85
4.1.1	Τα κυρίαρχα είδη του γένους <i>Arbutus</i>	85
4.1.2	Δευτερογενείς μεταβολίτες	87
4.1.3	Φαινολικές ενώσεις	87
4.1.4	Ο ρόλος των φαινολικών ενώσεων στην πρόληψη ασθενειών και ο τρόπος δράσης τους	88
4.1.5	Χημική και διατροφική σύσταση των <i>A. unedo</i> και <i>A. andrachne</i>	89
4.1.6	Φαρμακευτικές ιδιότητες των <i>A. unedo</i> και <i>A. andrachne</i>	91
4.1.7	Συντήρηση του φυτικού υλικού	93
4.1.7.1	Ξήρανση - Λυοφιλίωση (Freeze-drying)	93
4.1.8	Τεχνικές εκχύλισης για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων	94

4.1.8.1	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound-assisted Extraction) – υπέρηχοι και δράση αυτών κατά την εκχύλιση	95
4.1.8.2	Διαλύτες εκχύλισης φαινολικών συστατικών	96
4.1.9	Μέθοδος Folin-Ciocalteu για τον ποσοτικό προσδιορισμό ολικών φαινολικών συστατικών	96
4.2	Υλικά και Μέθοδοι	98
4.2.1	Φυτικό υλικό – Συλλογή και αποθήκευση	98
4.2.2	Προετοιμασία δειγμάτων	98
4.2.3	Παραλαβή των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με υπερήχους (USE)	98
4.2.4	Μέτρηση ολικών φαινολικών συστατικών	99
4.3	Αποτελέσματα - Συζήτηση	100
4.4	Γενικό συμπέρασμα	104
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	105
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	117
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I	118
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II	126
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III	132
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV	134

Συντομογραφίες

AND	Anderson's Rhododendron Medium
BA	6-benzyladenine
B5	Gamborg's B-5 basal salt mixture
FS	De Fossard Medium
GA₃	Gibberillic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
MS	Murashige and Skoog Medium
NAA	1-naphthelene acetic acid
PAL	Phenylalanine ammonia lyase
TDZ	Thidiazuron
USE	Ultrasound assisted extraction
WPM	McCown's Woody Plant Medium
ZEA	Trans-zeatin

Περίληψη

Το *Arbutus unedo* var. *rubra* Aiton (f. Ericaceae, Συν. var. *croomii*) είναι μία φυσική ποικιλία του *Arbutus unedo* L. και είναι επίσης γνωστό με την ονομασία Pink strawberry tree ή ρόδινη κουμαριά. Είναι φυτό ιδιαίτερα εντυπωσιακό και ελκυστικό όπως και το *Arbutus unedo*, από τον Οκτώβριο έως και τον Ιανουάριο, με την ιδιαιτερότητα ότι την εποχή αυτή, ταυτόχρονα με τους πορτοκαλοκόκκινους καρπούς, σχηματίζει ρόδινα άνθη, έναντι των λευκών ανθέων του *A. unedo*. Η διαφοροποίηση αυτή του προσδίδει ιδιαίτερη καλλωπιστική αξία και θα μπορούσε να σχηματίσει πολύ εντυπωσιακές συνθέσεις, σε συνδυασμό με τα άλλα είδη *Arbutus*, στο αστικό και περιαστικό τοπίο και επίσης θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στην ανθοκομία για την παραγωγή δρεπτόν κλάδων. Επιπλέον, όπως και τα άλλα είδη του γένους *Arbutus*, μπορεί να αξιοποιηθεί σε αναδασώσεις λόγω της ικανότητας τους να αναβλαστάνουν γρήγορα μετά από πυρκαγιά αλλά και στη φαρμακοβιομηχανία λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε ολικά φαινολικά που παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα των φύλλων του. Στη βιβλιογραφία δεν βρέθηκαν αναφορές σχετικά με οποιαδήποτε μέθοδο πολλαπλασιασμού της ποικιλίας *A. unedo* var. *rubra*. Έτσι, στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μία πλήρης μέθοδος για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του φυτού ξεκινώντας από ενήλικο αυτοφύες φυτό που φύονταν σε δάσος αείφυλλων σκληρόφυλλων στην περιοχή της Βαρυμπόμπης του Ν. Αττικής και από σπορόφυτα ανεπτυγμένα *in vitro*. Η πρώτη προσπάθεια εγκατάστασης καλλιιεργειών έγινε με έκφυτα προερχόμενα από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα και διερευνήθηκε η επίδραση τόσο των κυτοκινινών, ZEA και TDZ (σε συγκεντρώσεις 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ και 0,2 ή 2,0 mg l⁻¹, αντίστοιχα), όσο και των θρεπτικών υποστρωμάτων, MS και WPM, στην *in vitro* βλαστογένεση της ποικιλίας. Τα αποτελέσματα της μελέτης, υποδεικνύουν τη ZEA ως αποτελεσματική φυτορυθμιστική ουσία, ανεξαρτήτως δοκιμασθείσας συγκέντρωσης, ενώ το TDZ κρίθηκε ακατάλληλο, καθώς προκάλεσε το σχηματισμό παραμορφωμένων, μικρού μήκους βλαστών και τη δημιουργία κάλου. Ακολούθησαν υποκαλλιέργειες κατά τις οποίες διερευνήθηκε, και στο στάδιο αυτό, η επίδραση του είδους του θρεπτικού υποστρώματος (WPM και MS) και η αποτελεσματικότητα της ZEA στην παραγωγή βλαστών, σε ποικίλες συγκεντρώσεις 0,5, 2,5 και 5,0 mg l⁻¹, αλλά και η συνδυασμένη επίδραση 2,5 mg l⁻¹ ZEA με NAA σε συγκέντρωση 0,1 mg l⁻¹, με στόχο την επίτευξη επιμήκυνσης των μικροβλαστών. Σε όλα τα υποστρώματα σημειώθηκε υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης, ενώ σε υπόστρωμα MS με 5,0 mg l⁻¹ ZEA σχηματίστηκαν περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο. Το μήκος

των παραγόμενων βλαστών ήταν μικρό σε όλες τις μεταχειρίσεις και η προσθήκη ΝΑΑ στο υπόστρωμα δεν συνετέλεσε στην επιμήκυνση τους.

Για τον μικροπολλαπλασιασμό του *A. unedo* var. *rubra* με χρήση μητρικού υλικού από ενήλικο αυτοφύες φυτό η αρχική εγκατάσταση ήταν επιτυχής και σημειώθηκε αρκετά υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA ενώ μικρότερη συγκέντρωση ZEA (0,5 mg l⁻¹) προτείνεται για το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών, η οποία επέφερε παρόμοια παραγωγή βλαστών με τη χρήση ZEA σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Η ριζοβολία των μικροβλαστών έγινε σε πολύ υψηλά ποσοστά που άγγιζαν το 100% σε μισής συγκέντρωσης WPM με 1 mg l⁻¹ IBA, ανεξάρτητα της ενήλικης ή νεανικής προέλευσης των μικροβλαστών και ο εγκλιματισμός των φυταρίων σε *ex vitro* συνθήκες ήταν απόλυτα επιτυχής σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v).

Επίσης, στην παρούσα μελέτη, έγινε φωτομετρικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών των τριών κυρίαρχων ειδών *Arbutus* που απαντώνται στην Ελληνική χλωρίδα (*A. unedo*, *Arbutus andrachne* L. και του φυσικού τους υβριδίου *Arbutus x andrachnoides*) καθώς και της ποικιλίας *A. unedo* var. *rubra* σε δείγματα φύλλων που συλλέχθηκαν το Μάιο από την κορυφή των βλαστών (νέα βλάστηση) και από χαμηλότερα στο βλαστό (παλαιά βλάστηση). Επίσης, συλλέχθηκαν κατά το στάδιο της ανθοφορίας δείγματα φύλλων ακριβώς κάτω από την ταξιανθία, δηλαδή Απρίλιο από το *A. andrachne* και Δεκέμβριο από τα άλλα taxa. Ανεξάρτητα από το στάδιο συλλογής, και τα τέσσερα taxa ήταν πλούσια σε ολικά φαινολικά συστατικά. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν διακύμανση της συγκέντρωσης ανάμεσα στα είδη. Το *A. unedo* var. *rubra* εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών συγκριτικά με τα άλλα τρία είδη, χωρίς σημαντική διαφορά από το *A. unedo* L. Λαμβάνοντας υπόψιν το στάδιο ανάπτυξης και την ηλικία της βλάστησης, υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε σε φύλλα νέας βλάστησης του *A. unedo* var. *rubra* σχεδόν σε διπλάσια ποσότητα από αυτή της παλαιάς. Στα *A. unedo* και *A. x andrachnoides* παρατηρήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών σε φύλλα παλαιάς βλάστησης σε σχέση με τα φύλλα νέας βλάστησης, ενώ στο *A. Andrachne* δεν υπήρξε σημαντική διαφορά.

Abstract

Arbutus unedo var. *rubra* Aiton (f. Ericaceae, syn. var. *croonii*) is a pink-flowered form of *Arbutus unedo* L. and it's also known as Pink strawberry tree. It is a very impressive and attractive plant like *Arbutus unedo* L., from October to January, while it forms rosery flowers, instead of white flowers of *A. unedo*, along with its orange-red strawberry-like fruits at the same time. This differentiation gives it a great ornamental value and the plant could form very impressive compositions, combined with the other species of *Arbutus*, in the urban and suburban landscapes and could also be used in floriculture to produce cut foliage. Furthermore, it can be used in reforestations because of its ability to re-sprout easily after fire, like other species of the genus *Arbutus*, as well as in the pharmaceutical industry due to its high concentration in total phenolic compounds observed in its leaf extracts. In literature, there are no reports on any propagation method of *A. unedo* var. *rubra*. Thus, in the present study an efficient protocol for the *in vitro* propagation of the plant was developed for the first time starting from a wild, adult plant located on the southeast side of mount Parnitha, Varympompi, Attiki and from seedlings cultured *in vitro*. The first attempt for cultures establishment was carried out with explants derived from seedlings. Both the effectiveness of cytokinins, ZEA and TDZ (at concentrations of 2,5 or 5,0 mg l⁻¹ and 0,2 or 2,0 mg l⁻¹, respectively), and the type of medium, MS and WPM, were investigated. Our results indicate the effectiveness of ZEA regardless of its concentration. TDZ was considered inappropriate while it formed short, deformed shoots and induced callus formation. At the following subcultures, the effectiveness of medium type (WPM and MS) and ZEA at various concentrations 0,5, 2,5 and 5,0 mg l⁻¹ and ZEA at 2,5 mg l⁻¹ in combination with NAA at 0,1 mg l⁻¹ were also tested. In all treatments, explants produced shoots at high percentage and more shoots per explant were formed on MS medium supplemented with 5,0 mg l⁻¹ ZEA. Shoot length was small in all treatments and the addition of NAA to the medium did not manage to induce longer shoots. Considering cultures established from an adult plant, it was totally successful and WPM with 2,5 mg l⁻¹ ZEA formed shoots in high percentages. ZEA at lower concentration (0,5 mg l⁻¹) was recommended for the shoot multiplication stage. Rooting percentage was high, almost 100 %, on half strength WPM supplemented with 1 mg l⁻¹ IBA independently of the origin of the microshoots. *Ex vitro* acclimatization of plantlets was 100% successful on peat: perlite (1:1, v/v).

Moreover, in the present study, total phenolic content of the three predominant *Arbutus* species (*A. unedo* L., *Arbutus andrachne* L. and their natural hybrid *Arbutus x andrachnoides*), as well as *A. unedo* var. *rubra* was determined. Samples of leaves were collected in May from the top of the stem (new vegetation) and from lower to the stem (old vegetation). Leaves were also collected at the flowering stage, just below the inflorescence, in April from *A. andrachne* and in December from the other taxa. Regardless of the collection stage, all four taxa were rich in total phenolic compounds. The results of the present study showed a variation in the concentration among the species. *A. unedo* var. *rubra* presented the highest concentration of total phenols compared to the other three species, with no significant difference from *A. unedo* L. Considering the growth stage and the age of the vegetation, the highest concentration was observed in new vegetation leaves of *A. unedo* var. *rubra* and it was almost twice as much as that of the old one. Old vegetation leaves of *A. unedo* and *A. x andrachnoides* showed higher concentration of total phenols than that of new vegetation leaves, while in *A. andrachne* there was no significant difference.

Σκοπός της Μελέτης

Το *A. unedo* var. *rubra* Aiton (f. Ericaceae) είναι ποικιλία του είδους *A. unedo* L., γνωστό ως pink strawberry tree ή ρόδινη κουμαριά. Είναι φυτό ιδιαίτερα εντυπωσιακό και ελκυστικό όπως και το *A. unedo*, από τον Οκτώβριο έως και τον Ιανουάριο, με την ιδιαιτερότητα ότι την εποχή αυτή, ταυτόχρονα με τους πορτοκαλοκόκκινους καρπούς, σχηματίζει ρόδινα άνθη, έναντι των λευκών ανθέων του *A. unedo*. Η διαφοροποίηση αυτή του προσδίδει ιδιαίτερη καλλωπιστική αξία και θα μπορούσε να σχηματίσει πολύ εντυπωσιακές συνθέσεις, σε συνδυασμό με τα άλλα είδη *Arbutus*, στο αστικό και περιαστικό τοπίο και ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα με ξηροθερμικές συνθήκες. Επίσης θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στην επιχειρηματική ανθοκομία για την παραγωγή δρεπτών κλάδων.

Με στόχο την εισαγωγή του είδους στην Ανθοκομία και την Αρχιτεκτονική Τοπίου ως καλλωπιστικό φυτό, διερευνήθηκε για πρώτη φορά ο *in vitro* πολλαπλασιασμός του είδους ξεκινώντας από ενήλικο αυτοφυές φυτό που φύονταν σε δάσος αείφυλλων σκληρόφυλλων στην περιοχή της Βαρυμπόμπης του Ν. Αττικής και από σπορόφυτα ανεπτυγμένα *in vitro*. Έγινε συγκριτική μελέτη της αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων και φυτορρυθμιστικών ουσιών και αναπτύχθηκε ένα ολοκληρωμένο πρωτόκολλο μικροπολλαπλασιασμού.

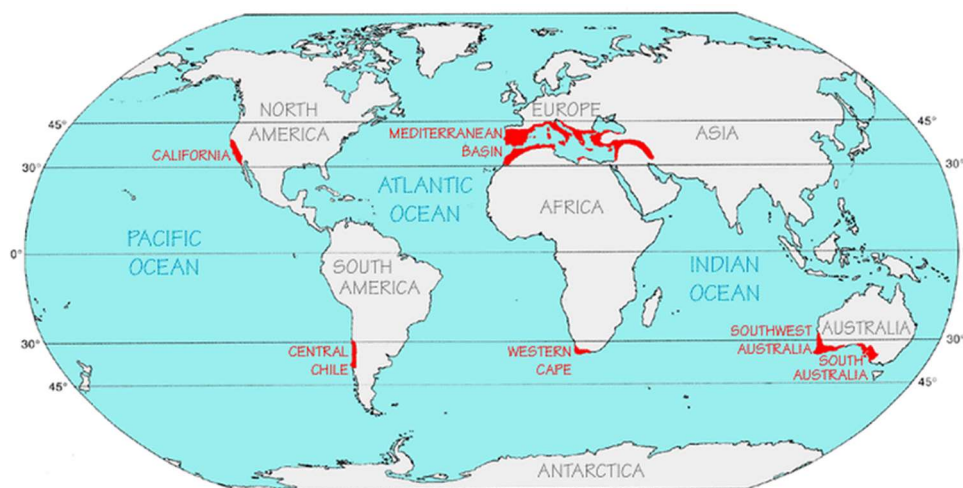
Παράλληλα, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε συγκριτικά η περιεκτικότητα των τεσσάρων taxa *Arbutus* που απαντώνται στην Ελλάδα σε ολικά φαινοτικά, σε διάφορα στάδια ανάπτυξής τους, με στόχο την εξεύρεση μιας μεθόδου που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί τόσο για τις ανάγκες ταξινόμησης και μελέτης των αυτοφυών πληθυσμών *Arbutus*, όσο και για την αξιοποίηση γονοτύπων με φαρμακευτικό ενδιαφέρον.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεσογειακά οικοσυστήματα

Τα μεσογειακά οικοσυστήματα χαρακτηρίζονται από ιδιόμορφη βλάστηση στην οποία κυριαρχούν είδη αείφυλλων σκληρόφυλλων φυτών, τα οποία έχουν προσαρμοστεί στο ιδιαίτερο κλιματικό καθεστώς: ήπιοι βροχεροί χειμώνες διαδέχονται τα θερμά, άνυδρα και ηλιόλουστα καλοκαίρια (Sánchez-Mata and Tardío, 2016).

Παρόμοιες κλιματικές συνθήκες επικρατούν σε πέντε διαφορετικές και απομακρυσμένες μεταξύ τους παραθαλάσσιες περιοχές του πλανήτη. Οι περιοχές αυτές εντοπίζονται στις νότιες- νοτιοδυτικές ακτές των ηπείρων και περιορίζονται σε γεωγραφικά πλάτη μεταξύ 30° και 45°, είτε στο βόρειο είτε στο νότιο ημισφαίριο. Καταλαμβάνουν ένα μικρό μόνο ποσοστό της ξηράς του πλανήτη (περίπου 2%), ενώ η παραμεσόγειος περιοχή καταλαμβάνει περισσότερο από το μισό της συνολικής έκτασης των περιοχών αυτών. Παρόλο που οι περιοχές αυτές είναι πλήρως απομονωμένες μεταξύ τους και η χλωριδική τους σύνθεση είναι εντελώς διαφορετική, τα φυτά παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. (Καραμπουρνιώτης και Λιακόπουλος, 2009) (Εικ. 1).



Εικ. 1. Οι πέντε περιοχές του πλανήτη στις οποίες επικρατούν συνθήκες μεσογειακού κλίματος.

1.1.1 Η χλωρίδα και η βλάστηση των δασών της Ελλάδας

Η βλάστηση μιας ευρύτερης περιοχής είναι αποτέλεσμα συνεπίδρασης πολλών παραγόντων, όπως του κλίματος, της γεωμορφολογίας και του αναγλύφου, της ανθρώπινης επίδρασης κ.λ.π. (Φοίτος *et al.*, 2009). Ιδιαίτερα, η μακρόχρονη

ανθρώπινη επέμβαση στην ελληνική φύση είναι φανερή στη μορφή και κατανομή της βλάστησης. Παρά το γεγονός αυτό η περισσότερο ή λιγότερο φυσική βλάστηση που εμφανίζεται στην Ελλάδα σήμερα παρουσιάζει μοναδική ποικιλία για την ευρωπαϊκή ήπειρο και τη Μεσόγειο. Αντίστοιχα πλούσια και σημαντική είναι η ελληνική χλωρίδα, η οποία περιλαμβάνει στοιχεία από την Ευρώπη, την Ασία και τη Μεσόγειο και παρουσιάζει υψηλά ποσοστά ενδημισμού. Έτσι, σήμερα η νότια απόληξη της βαλκανικής χερσονήσου, αναλογικά με την έκτασή της, αποτελεί την περιοχή με τη μεγαλύτερη ποικιλία σε τύπους βλάστησης στην Ευρώπη και, ταυτόχρονα, την πλουσιότερη, χλωριδικά, περιοχή της (Κοράκης, 2015).

Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα, η χλωρίδα της Ελλάδας συντίθεται από 6.600 ταξινομικές μονάδες (taxa), στις οποίες περιλαμβάνονται 5.752 αυτοφυή ή επιγενή είδη (Dimopoulos *et al.*, 2016). Οι αριθμοί αυτοί, όπως και το ποσοστό ενδημισμού που ανέρχεται σε 22% (αντιστοιχεί σε 1.462 taxa) είναι ιδιαίτερα υψηλοί για τη χλωρίδα μιας σχετικά μικρής σε έκταση χώρας της Ευρώπης και της Μεσογείου (Κοράκης, 2015).

Η δασική βλάστηση της Ελλάδας ακολουθεί την κλασική ταξινόμηση σε ζώνες, όπως προτάθηκε από τον Ντάφη (1973) και η οποία αποτελεί προσαρμογή της ταξινόμησης των Glavač *et al.* (1972) και Horvat *et al.* (1974) για τη βλάστηση της ΝΑ Ευρώπης. Οι πέντε κύριες ζώνες δασικής βλάστησης που προκύπτουν από την ταξινόμηση διακρίνονται σαφώς μεταξύ τους χλωριδικά, οικολογικά, φυσιογνωμικά και διαχειριστικά και είναι οι ακόλουθες: α) ευμεσογειακή ζώνη βλάστησης, β) παραμεσογειακή ζώνη βλάστησης, γ) ζώνη βλάστησης οξιάς-ελάτης και ορεινών παραμεσόγειων κωνοφόρων, δ) ζώνη βλάστησης ψυχρόβιων κωνοφόρων και ε) ανωδασική ζώνη βλάστησης (Φοίτος *et al.*, 2009; Κοράκης, 2015).

Η ευμεσογειακή βλάστηση εμφανίζει τις μεγαλύτερες ιδιαιτερότητες αναφορικά με τη φυσιογνωμία και τη σύνθεση, σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους τύπους βλάστησης της Ελλάδας. Περιλαμβάνει φυτοκοινότητες που διακρίνονται για την ποικιλία της δομής τους και την πλουσιότατη χλωρίδα τους. Η υψηλή δασική βλάστηση στον χώρο αυτό συνίσταται από αειθαλή δάση κωνοφόρων και πλατύφυλλων δένδρων.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα δάση χαλεπίου και τραχείας πεύκης. Τα δάση χαλεπίου πεύκης (*Pinus halepensis*) σχηματίζουν διάσπαρτες αμιγείς συστάδες, ανεξάρτητα από το εδαφικό υπόστρωμα, στην ηπειρωτική Ελλάδα, τα πεδινά και παράλια του Αιγαίου και του Ιονίου, την Εύβοια και τις Σποράδες. Στην Κρήτη, τα

νησιά του ανατολικού Αιγαίου και τη Θράκη, η χαλέπιος αντικαθίσταται από την τραχεία πεύκη (*Pinus brutia*).

Τα υψηλά δάση σκληρόφυλλων (αιθαλών) πλατύφυλλων στην ευμεσογειακή ζώνη είναι, σήμερα, αρκετά σπάνια και αποτελούν υπολείμματα μιας παλαιότερης ευρύτερης εξάπλωσης. Σχηματίζονται κυρίως από την αριά (*Quercus ilex*), ένα είδος που ευνοείται ιδιαίτερα σε υγρά παραθαλάσσια κλίματα, ενώ συμμετέχουν το πουρνάρι (*Quercus coccifera*), η δάφνη (*Laurus nobilis*), το αιθαλές σφενδάμι (*Acer sempervirens*), το φιλλύκι (*Phillyrea latifolia*) κ.ά. Εκτός από τη χερσόνησο του Άθω, αείφυλλη βλάστηση με υψηλή ανάπτυξη παρατηρείται στην υγρότερη δυτική ηπειρωτική Ελλάδα, καθώς και ανατολικά, στα παράλια της κεντρικής και βόρειας Ελλάδας (Β. Εύβοια, Θεσσαλία, Χαλκιδική). Τα άλλοτε κυρίαρχα δάση *Quercus* υπέστησαν, από την έντονη ανθρώπινη δραστηριότητα, την υπερβόσκηση και την διάβρωση του εδάφους, σημαντική υποβάθμιση. Αυτό, είχε ως αποτέλεσμα τον σταδιακό περιορισμό τους και την αντικατάστασή τους από θαμνώδη βλάστηση (Φοίτος *et al.*, 2009). Η βλάστηση αυτή μπορεί να διακριθεί σε τρεις φυσιογνωμικούς τύπους, ανάλογα με το ύψος των φυτών: την τυπική βλάστηση αείφυλλων σκληρόφυλλων (μακία βλάστηση), τους θάμνους μετρίου ύψους και τα φρύγανα που το ύψος τους δεν ξεπερνά τα 0.6 m (Καραμπουρνιώτης και Λιακόπουλος, 2009). Η μακκία βλάστηση αποτελείται από αείφυλλους θαμνώνες (*maquis*) ύψους 2-6 μέτρων, συχνά πυκνούς και αδιαπέραστους. Τα μακί απαντούν κυρίως σε όξινα εδαφικά υποστρώματα, σπάνια μακριά από τη θάλασσα, και είναι προσαρμοσμένα στη χειμερινή-εαρινή αύξηση με περίοδο λήθαργου το καλοκαίρι. Η χαρακτηριστική ξυλώδης χλωρίδα των μακί περιλαμβάνει το πουρνάρι (*Q. coccifera*), την αριά (*Q. ilex*), τον σχίνο (*Pistacia lentiscus*), την κουμαριά (*A. unedo* L.), τη γλιστροκουμαριά (*A. andrachne*), τον ράμνο (*Rhamnus alaternus*), το ρείκι (*Erica arborea*), τη μυρτιά (*Myrtus communis*), το φυλλίκι (*P. latifolia*), το σπάρτο (*Spartium junceum*), τη λαγομηλιά (*Ruscus aculeatus*). Συχνά, τα υψηλά μακί, λόγω μακρόχρονης υποβάθμισης που οφείλεται, κυρίως, σε υπερβόσκηση, υποκαθίστανται από θαμνώνες χαμηλού ύψους (0,5-1,5 m), με χαρακτηριστική ανοιχτή συγκόμωση, όπου κυριαρχούν τα είδη *Q. coccifera*, *P. latifolia*, *Pistacia terebinthus*, *Calicotome villosa*, *Globularia alypum* κ.ά. Σε περιπτώσεις όξινων, υποβαθμισμένων εδαφών, στις υποκατάστατες θαμνώδεις διαπλάσεις, κυριαρχούν είδη λαδανιάς (*Cistus creticus*, *Cistus. salviifolius*, *Cistus. monspeliensis*) και το χαμορείκι (*Erica manipuliflora*). Η ιδιαίτερη αυτή, φυσιογνωμικά, βλάστηση αποδίδεται με τον όρο *garrigue* (Κοράκης,

2015). Ο όρος *garigue* χρησιμοποιείται για τους χαμηλούς θαμνώδεις σχηματισμούς της Δ. Μεσογείου, ιδιαιτέρως στην Ισπανία, στους οποίους κυριαρχεί η υποβαθμισμένη μορφή της αριάς (Φοίτος *et al.*, 2009).

1.1.2 Καταπόνηση των μεσογειακών οικοσυστημάτων από πυρκαγιές

1.1.2.1 Αίτια της πυρκαγιάς

Τα συχνά περιστατικά πυρκαγιών έχουν αποτελέσει έναν σημαντικό οικολογικό παράγοντα που διαμόρφωσε καταλυτικά τη φυσιογνωμία και τη σύνθεση της βλάστησης της μεσογειακής λεκάνης.

Οι υψηλές θερμοκρασίες που επικρατούν κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, σε συνδυασμό με τη χαμηλή διαθεσιμότητα νερού, αλλά και την επικράτηση ισχυρών ανέμων σε ορισμένες τουλάχιστον περιοχές, ευνοούν τα συχνά περιστατικά πυρκαγιών. Επιπλέον, η ανεπάρκεια νερού στο έδαφος επιφέρει ξήρανση των ετήσιων ποωδών ειδών και αποβολή φύλλων ή άλλων οργάνων των θάμνων με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια εξαιρετικά εύφλεκτη στρωμνή. Η πυρκαγιά ευνοείται επίσης λόγω της πυκνής διάταξης των φυτών αλλά και λόγω της ύπαρξης εύφλεκτων ουσιών (αιθέρια έλαια στα φρύγανα, ρητίνη στα κωνοφόρα) τόσο στα φύλλα της κόμης όσο και στη στρωμνή. Όσο αυξάνεται η ηλικία των φυτών αυξάνεται και η ποσότητα των εύφλεκτων ουσιών στη στρωμνή και τη βιομάζα των φυτών. Επομένως, η συχνότητα εμφάνισης πυρκαγιών και η έκταση των περιοχών που καίγονται αυξάνονται σε δάση μακκίας βλάστησης που ξεπερνούν την ηλικία των 30 ετών. Τα περιστατικά πυρκαγιάς εμφανίζονται συχνά σε όλα τα μεσογειακά οικοσυστήματα με εξαίρεση εκείνου της Χιλής (Καραμπουρνιώτης και Λιακόπουλος, 2009). Στην Ελλάδα το 90% της έκτασης που καίγεται κάθε χρόνο αντιστοιχεί σε μεσογειακά οικοσυστήματα. Το 24% αφορά τα πευκοδάση και το υπόλοιπο 66% αφορά σε φρύγανα και μακί (Αριανούτσου, 1996).

1.1.2.2 Στρατηγικές αντιμετώπισης των επιπτώσεων των πυρκαγιών

Τα περισσότερα είδη θάμνων, φρυγάνων αλλά και ορισμένων δένδρων της μεσογειακής χλωρίδας έχουν προσαρμοστεί κατάλληλα ώστε να εξασφαλίζουν επιτυχημένη αναπαραγωγική δραστηριότητα μετά από ένα περιστατικό πυρκαγιάς. Όπως σε όλες τις περιπτώσεις καταπονήσεων, η επιβίωση ή/και η απρόσκοπτη αναπαραγωγή των ειδών έναντι της καταπόνησης αντιμετωπίζεται μέσω μηχανισμών και στρατηγικών που έχουν αναπτύξει τα φυτικά είδη. Ορισμένα φυτά, όπως και τα

αείφυλλα σκληρόφυλλα, ακολουθούν την στρατηγική της αποφυγής καθώς ορισμένα όργανα αναπαραγωγής τους δεν έρχονται σε επαφή με υψηλές θερμοκρασίες. (Καραμπουρνιώτης και Λιακόπουλος, 2009).

1.1.2.3 Αναγέννηση με αναβλάστηση

Τα αείφυλλα σκληρόφυλλα είδη, αλλά και ορισμένα φρύγανα, παρουσιάζουν την ικανότητα αναβλάστησης των καμένων ατόμων. Η αναβλάστηση παρατηρείται στη βάση των κατεστραμμένων βλαστών από ληθαργικούς οφθαλμούς οι οποίοι βρίσκονται σε ένα βάθος εδάφους ικανό να τους παρέχει προστασία από τις υψηλές θερμοκρασίες την ώρα της πυρκαγιάς ή από υπόγειες κονδυλώδεις κατασκευές. Τα αναβλαστημένα φυτά αναπτύσσονται ταχέως και είναι αναπαραγωγικά ικανά σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η ικανότητα ταχείας αναβλάστησης οφείλεται και στο γεγονός ότι οι υπόγειες δομές περιέχουν επαρκή αποθέματα αμύλου ώστε να είναι ικανές να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της νέας υπέργειας βλάστησης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ορισμένα αείφυλλα σκληρόφυλλα της μεσογειακής λεκάνης όπως είδη του γένους *Phillyrea*, *Rhamnus*, *Arbutus*, *Pistacia* κ.ά και φρύγανα του γένους *Erica* και *Genista* (Καραμπουρνιώτης και Λιακόπουλος, 2009).

Τα φυτά του γένους *Arbutus* έχουν μεγάλη ικανότητα για αναβλάστηση (Naveh, 1975, Canadell *et al.*, 1991, Chávez and Moya, 1997, Paula *et al.*, 2016) καθώς στη βάση του βλαστού αναπτύσσονται εξειδικευμένα υπόγεια όργανα. Τα όργανα αυτά είναι λιγνινοποιημένοι κόνδυλοι, που ονομάζονται “lignotubers” ή “burl” (Mesleard and Lepart, 1989, Paula *et al.*, 2016), και πρόκειται για διογκωμένες ξυλώδης δομές μεγέθους 2.5 – 1000 cm. Οι δομές αυτές εξασφαλίζουν τη ζωνή αναβλάστηση μετά την καταστροφή του υπέργειου μέρους του φυτού από πυρκαγιά καθώς διαθέτουν ένα σύνολο προστατευμένων λανθανόντων οφθαλμών (Paula *et al.*, 2016). Αποτελούν, επίσης, σημαντικά αποθηκευτικά όργανα υδατανθράκων, σακχάρων και θρεπτικών στοιχείων που κινητοποιούνται μετά την πυρκαγιά και υποστηρίζουν την αρχική αναβλάστηση του φυτού (Canadell and López-Soria, 1998).

Οι Paula *et al.* (2016) συλλέγοντας δεδομένα σχετικά με την ύπαρξη λιγνινοποιημένων κονδύλων σε 14 ξυλώδη είδη της μεσογειακής λεκάνης, διαπίστωσαν ότι η οικογένεια Ericaceae είναι εκείνη που περιλαμβάνει τα περισσότερα είδη που διαθέτουν τις δομές αυτές, τουλάχιστον 8 είδη μεταξύ των οποίων τα *A. unedo* και *A. andrachne*.

1.2 Η οικογένεια Ericaceae και το γένος *Arbutus*

Η οικ. Ericaceae (heath family) περιλαμβάνεται στην τάξη Ericales του φυτικού βασιλείου. Το όνομά της προέρχεται από το γένος *Erica* και την ελληνική λέξη ερείκη (φρυγανοειδής θάμνος) (Liddell and Scott, 2007). Η οικ. Ericaceae είναι μία μεγάλη ομάδα των ευδικοτυλήδων φυτών που απαριθμεί, ανάλογα με τον συγγραφέα, 90 με 151 γένη και έως 3554 taxa. Κατά τον Porter (1967) η οικογένεια περιλαμβάνει 90 γένη και περισσότερα από 1700 είδη, ενώ ο Zomlefer (1994) αυξάνει τα γένη σε 99 και τα είδη σε 2245. Οι Hickey and King (1998) αναφέρουν ότι στην οικ. Ericaceae περιλαμβάνονται 103 γένη και 3350 είδη, ο Kubitzki (2004) αναφέρει 124 γένη, ενώ σύμφωνα με τον Cronquist (1981) τα γένη ανέρχονται σε 125 με 3500 είδη. Στον οργανισμό The Plant List (Διαδίκτυο 1) αναφέρονται 151 αναγνωρισμένα γένη και 3554 είδη. Κατά τον Cronquist τα κυριότερα γένη της οικογένειας είναι τα *Rhododendron* με 1000 και περισσότερα είδη και *Erica* με περισσότερα από 500 είδη. Ακολουθούν τα γένη *Vaccinium* (450), *Gaultheria* (150) και *Cavendishia* (150). Στο γένος *Erica* ανήκουν είδη με κέντρο εμφάνισης και εξέλιξης τη νότια Αφρική. Στην Ευρώπη απαντούν 16 είδη και από αυτά 4 στην Ελλάδα: *Erica Arborea* (ρείκι), *Erica Carnea* (Βόρεια Πίνδο), *Erica Manipuliflora* (σουσούρα) και *Erica multiflora* (Νησιά του Ιονίου πελάγους) (Κοράκης, 2015).

Όντας μία τόσο μεγάλη οικογένεια δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί ένα σύνολο κοινών χαρακτηριστικών σε όλα τα είδη. Παρόλα αυτά, τα περισσότερα μέλη της οικογένειας είναι αναρριχώμενα, θάμνοι ή μικρά δένδρα αναπτυσσόμενα σε όξινα εδάφη. Τα φύλλα είναι συνήθως αειθαλή και απλά, συχνά παρουσιάζουν ξηροφυτικά χαρακτηριστικά κάτι που βοηθά τα φυτά να ανταπεξέλθουν τις δύσκολες συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται. Τα άνθη είναι αρκετά διαφορετικά ως προς τη μορφολογία και το χρώμα, ειδικά των γενών *Rhododendron* (*Azalea*). Εντούτοις, ένα κοινό χαρακτηριστικό είναι η ανεστραμμένη θέση των ανθών που συμβαίνει κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του άνθους (Kubitzki, 2004, Martins *et al.*, 2016) (Εικ. 2). Τα άνθη των περισσότερων ειδών της οικογένειας έχουν χρώμα ανοιχτό λευκό ή κρέμ, συχνά με αποχρώσεις του ροζ, όμως πολλά τροπικά είδη του γένους *Vaccinium* έχουν κόκκινα άνθη. Το πορτοκαλί, το κίτρινο, το μπλε και το μωβ είναι λιγότερο συνηθισμένα (Kubitzki, 2004).



Εικ. 2. Τομή του άνθους του *Arbutus unedo* var. *rubra* στο οποίο διακρίνεται το στίγμα (α), ο στύλος (β) και οι ανεστραμμένοι ανθήρες (γ).

Ο καρπός είναι συνήθως κάψα ενώ των ειδών του γένους *Vaccinium*, *Arbutus* και *Corema* είναι ράγα που περικλείει πολυάριθμα σπέρματα. Το γένος *Vaccinium* περιλαμβάνει είδη των οποίων οι καρποί είναι εδώδιμοι και μεγάλης εμπορικής σημασίας όπως τα blueberry, cranberry, bilberry, lingonberry κ.ά. (Hickey and King, 1998). Επίσης, ορισμένα είδη του γένους *Arbutus* παράγουν εδώδιμους καρπούς. Παρόλο που δεν είναι τόσο δημοφιλής, όσο οι καρποί των ειδών του γένους *Vaccinium*, σε ορισμένες περιοχές καταναλώνονται νωποί και επεξεργάζονται για την παρασκευή διάφορων προϊόντων που βοηθούν στην τοπική οικονομία. Ένα από τα κυριότερα είδη του γένους είναι το *A. unedo* L., κοινώς κουμαριά.

Η οικ. Ericaceae διαχωρίζεται σε οχτώ υποοικογένειες: Enkianthoideae, Monotropoideae, Arbutoideae, Cassiopoideae, Ericoideae, Harrimanelloideae, Styphelioideae και Vaccinioideae. Η υποοικογένεια Arbutoideae περιλαμβάνει τα εξής γένη: *Arbutus*, *Arctostaphylos*, *Arctius*, *Comarostaphylos*, *Ornithostaphylos* και *Xylococcus* (Kubitzki, 2004).

Το γένος *Arbutus* περιλαμβάνει αειθαλείς θάμνους ή μικρά δένδρα με ελκυστικό φλοιό και χαρακτηρίζεται από τους σφαιρικούς αδενώδης καρπούς που φέρουν επιφανειακά πολυάριθμα φυμάτια (Κοράκης, 2015). Ο αριθμός των ειδών του γένους *Arbutus* ποικίλει ανάλογα με τον συγγραφέα. Οι Καββάδας (1956), Mitchell (1992), The European Garden Flora (1997), Hileman *et al.* (2001), Κοράκης (2015) αναφέρουν 12 είδη, ενώ υπάρχουν αναφορές για 20 είδη (Reader's Digest Encyclopedia of Garden Plants and Flowers, 1988, Αραμπατζής, 1998, Preston, 2002). Στη μεσόγειο απαντούν 4 είδη του γένους και 2 υβρίδια (Miguel *et al.*, 2014): *A. unedo* L., *A. andrachne* (Ανατολική Μεσόγειος), *A. pavarii* Pampanini (Ακτές της

Λιβύης), *A. canariensis* Veill. (Κανάριοι Νήσοι), *A. x andrachnoides* Link (*A. unedo* x *A. andrachne*, Ανατολική Μεσόγειος) και *A. x androsterilis* Salas, Acebes & Arco (*A. unedo* x *A. canariensis*, Κανάριοι Νήσοι). Στην Ελλάδα απαντούν τα είδη: *A. unedo* (κουμαριά), *A. andrachne* (γλιστροκουμαριά). Σε περιοχές που τα δύο είδη συνυπάρχουν εμφανίζονται υβρίδια με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά *A. x andrachnoides* Link (Κοράκης, 2015). Στη χώρα μας απαντά και η ποικιλία του είδους *A. unedo* var. *rubra* Aiton, η οποία μελετήθηκε στην παρούσα εργασία.

1.2.1 *Arbutus unedo* var. *rubra* – Συστηματική κατάταξη

Βοτανική ταξινόμηση

Σύστημα κατάταξης: Cronquist, 1981

Kingdom	<i>Plantae</i>	Φυτά
Subkingdom	<i>Tracheobionta</i>	Αγγειώδη Φυτά
Superdivision	<i>Spermatophyta</i>	Σπερματοφύτα
Διαίρεση	<i>Magnoliophyta</i>	Αγγειόσπερμα
Κλάση	<i>Magnoliopsida</i>	Δικότυλα
Υποκλάση	<i>Dilleniidae</i>	Διλλενίδες
Τάξη	<i>Ericales</i>	Ερεικώδη, Δίκερα
Οικογένεια	<i>Ericaceae</i>	Ερεικίδες, Heath Family
Υποοικογένεια	<i>Arbutoideae</i>	
Γένος	<i>Arbutus</i>	
Είδος	<i>Arbutus unedo</i>	
Ποικιλία	<i>Arbutus unedo</i> var. <i>rubra</i>	

1.2.2 Βοτανική περιγραφή του *A. unedo* var. *rubra*

Το *A. unedo* var. *rubra* Aiton (f. *Ericaceae*, Συν. var. *Croomii*) είναι μία φυσική ποικιλία του *A. unedo* L. και είναι επίσης γνωστό με την ονομασία Pink Strawberry tree ή ρόδινη κουμαριά (Reader's Digest Encyclopedia of Garden Plants and Flowers, 1988). Το φυτό ανακαλύφθηκε από τον Σκωτσέζο βοτανολόγο William Aiton το 1785 και η πρώτη καταγραφή της παρουσίας του στη φύση έγινε στην Ιρλανδία κοντά στο χωριό Glengarriff στη νοτιοδυτική ακτή του Κορκ το 1835 (Harrison, 2009, Mount, 2015).

Το φυτό είναι αειθαλής θάμνος ή μικρό δένδρο ύψους 1,5-3,0 m. Τα φύλλα είναι εναλλασσόμενα, δερματώδη, πολύ στιλπνά στην άνω επιφάνεια, πριονωτά,

μήκους 4-11 cm (Bartels, 2011). Τα άνθη είναι σταμόμορφα, με μήκος 8-9 mm, ρόδινα και φέρονται επάκρια σε βραχείς, σύνθετους βότρες. Το φυτό είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακό και ελκυστικό από τον Οκτώβριο έως και τον Ιανουάριο, καθώς την περίοδο αυτή μαζί με τα ρόδινα άνθη σχηματίζονται ταυτόχρονα και οι πορτοκαλί-κόκκινοι καρποί του. Τα ρόδινα άνθη προσδίδουν στο φυτό μεγάλη καλλωπιστική αξία και αποτελούν τη μοναδική μορφολογική διαφορά της ποικιλίας σε σχέση με το είδος, που φέρει λευκά άνθη. Ο καρπός, όπως και του είδους, είναι σχεδόν σφαιρικός, με διάμετρο περίπου 2 cm, εδώδιμος, και ωριμάζει κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου (Martins *et al.*, 2016).



Εικ. 3. Μητρικό φυτό *A. unedo* var. *rubra* κατά την περίοδο της ανθοφορίας στην περιοχή της Βαρυμπόμπης (α), άνθη και καρποί του φυτού (β) και καρποί κατά το στάδιο συλλογής τους (γ).

Όταν οι καρποί είναι ανώριμοι έχουν ανοιχτό πράσινο χρώμα, με το πέρασμα του χρόνου μετατρέπεται σε κίτρινο-πορτοκαλί και κατά την ωρίμανση αποκτά ένα ελκυστικό κόκκινο χρώμα το οποίο προσελκύει όχι μόνο τους καταναλωτές αλλά και τα πουλιά που βοηθούν στην εξάπλωση των σπόρων. Επίσης, οι καρποί της κουμαριάς μοιάζουν με φράουλα και σε αυτό οφείλεται και η ονομασία του “Strawberry tree” (Hillier, 1993, Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001, Gomes, 2011, Miguel *et al.*, 2014) (Εικ. 3).

1.2.3 Πολλαπλασιασμός των ειδών του γένους *Arbutus*

Τα φυτά του γένους *Arbutus* πολλαπλασιάζονται στη φύση μέσω της μεταφοράς των σπόρων από διάφορα πτηνά και θηλαστικά (Herrera, 1987). Άλλα είδη της οικογένειας Ericaceae που παράγουν εδώδιμους καρπούς τύπου ράγα, όπως είδη του γένους *Vaccinium*, πολλαπλασιάζονται με τον ίδιο τρόπο. Σε προσπάθεια του Hammami *et al.* (2005) να πολλαπλασιάσει το *A. unedo* με σπόρους, παρατηρήθηκαν χαμηλά ποσοστά βλαστικότητας, που κυμάνθηκαν από 4,2% έως 19,2%, ανάλογα με τη μεταχείριση. Επιπλέον, ο εγγενής πολλαπλασιασμός δεν εξασφαλίζει γενετική ομοιομορφία και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ενός συγκεκριμένου γονότυπου μπορούν να αλλοιωθούν ή και να χαθούν. Επομένως, εφαρμόζονται πλέον τεχνικές αγενούς πολλαπλασιασμού όπως τα μοσχεύματα και ο μικροπολλαπλασιασμός (Hartman *et al.*, 1997). Αγενής ή βλαστικός πολλαπλασιασμός είναι ο τρόπος εκείνος πολλαπλασιασμού των φυτών, κατά τον οποίο τα νέα παραγόμενα φυτά έχουν ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με εκείνα των μητρικών φυτών (Ποντίκης, 2006).

Οι Al-Salem & Karam (2001) χρησιμοποιώντας μοσχεύματα βάσης και κορυφής κατάφεραν να πολλαπλασιάσουν το *A. andrachne*, επιτυγχάνοντας ποσοστό ριζοβολίας έως και 72%. Συχνά, όμως, το ποσοστό ριζοβολίας των μοσχευμάτων της κουμαριάς είναι χαμηλό, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται ώριμα μοσχεύματα (Mereti *et al.*, 2002, Metaxas *et al.*, 2004). Σε πιο πρόσφατη έρευνα των Sulusoglu *et al.* (2012) ημιξυλώδη μοσχεύματα του *A. unedo* L. ριζοβόλησαν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 87% έπειτα από μεταχείριση τους με ποικίλες συγκεντρώσεις IBA. Παρατηρήθηκε ότι η εποχή λήψης των μοσχευμάτων επέδρασε σημαντικά τόσο στην ικανότητα ριζοβολίας όσο και εγκλιματισμού των φυταρίων. Μοσχεύματα που λήφθηκαν τον Ιούλιο ριζοβόλησαν σε υψηλότερα ποσοστά σε σύγκριση με εκείνα που λήφθηκαν τον Νοέμβριο και απαιτούσαν υψηλότερες συγκεντρώσεις IBA. Τα αποτελέσματα της έρευνας, σχετικά με την επίδραση της εποχής λήψης των μοσχευμάτων, συμφωνούν με παλαιότερες έρευνες που έκαναν λόγο για υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας σε μοσχεύματα που είχαν ληφθεί τον Ιούλιο (Metaxas *et al.*, 2008, Şeker *et al.*, 2010). Επιπλέον, η επιτυχής ριζοβολία των μοσχευμάτων εξαρτάται από τον γονότυπο. Αρκετοί ερευνητές, μελετώντας διαφορετικούς γονοτύπους, έχουν παρατηρήσει ότι ορισμένοι γονότυποι ριζοβολούν σε υψηλά ποσοστά ενώ άλλοι όχι (Metaxas *et al.*, 2004, Sulusoglu *et al.* 2012). Προκειμένου να ξεπεραστούν οι περιορισμοί αυτοί, τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί εκτενέστερα η ικανότητα των ειδών του γένους να πολλαπλασιάζονται με την τεχνική του *in vitro*

πολλαπλασιασμού. Μέχρι στιγμής, ο εμβολιασμός δεν έχει εφαρμοστεί ακόμα συστηματικά για τον πολλαπλασιασμό του *A. unedo* L. (Martins *et al.*, 2016).

1.2.3.1 Η ιστοκαλλιέργεια στο γένος *Arbutus* και την οικογένεια Ericaceae

Παρά τον μεγάλο αριθμό ειδών της οικογένειας Ericaceae και την τεράστια οικονομική σημασία τους, ο αριθμός των μελετών σχετικά με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό ή την εφαρμογή άλλων βιοτεχνολογικών μεθόδων είναι ιδιαίτερα χαμηλός (Ratnaparkhe, 2007, Cavuşoglu *et al.*, 2015). Ακόμα και σε είδη του γένους *Rhododendron* και *Vaccinium* ο μικροπολλαπλασιασμός έχει περιοριστεί μόνο σε ορισμένα είδη.

Αρκετές τεχνικές μικροπολλαπλασιασμού, όπως η σωματική εμβρυογένεση, η οργανογένεση και η καλλιέργεια εκφύτων κόμβων από μασχαλαίους οφθαλμούς, έχουν χρησιμοποιηθεί για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό πολλών ξυλωδών φυτών. Ανάμεσα σε αυτές, η τελευταία είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη στα είδη της οικογένειας Ericaceae (Gomes and Canhoto, 2009). Στα μέλη της οικογένειας που έχουν πολλαπλασιαστεί με επιτυχία με τη μέθοδο του μικροπολλαπλασιασμού περιλαμβάνονται τα είδη *Arbutus xalapensis* (Mackay, 1996), *A. unedo* (Morini and Fiaschi, 2000, Λιμνιάτης *et al.*, 2001, Mereti *et al.*, 2002, Gomes and Canhoto, 2009, Gomes *et al.*, 2010, El-Sayed El-Mahrouk *et al.*, 2010, Papafotiou *et al.*, 2013, Bertsouklis and Papafotiou, 2017), *A. andrachne* (Bertsouklis and Papafotiou, 2009, Mostafa *et al.*, 2010, Papafotiou *et al.*, 2013, Aljabari *et al.*, 2014, Bertsouklis and Papafotiou, 2017), *A. x andrachnoides* (Bertsouklis and Papafotiou, 2011, Papafotiou *et al.*, 2013, Bertsouklis and Papafotiou, 2017), *Kalmia latifolia* (Kloyd and McCown, 1980), *Oxydendrum arboretum* (Banko and Stefani, 1989), *Rhododendron* (Anderson, 1984), και αρκετά είδη του γένους *Vaccinium* (Isutsa *et al.*, 1994, Gajdošova *et al.*, 2007, Ostrolucka *et al.*, 2007). Η μέθοδος της ιστοκαλλιέργειας σε είδη της οικογένειας Ericaceae έχει χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για τον πολλαπλασιασμό των φυτών σε εμπορική κλίμακα, αλλά και για λόγους διατήρησης ορισμένων ειδών (Almeida *et al.*, 2005, Pereira, 2006, Mao *et al.*, 2011, Pereira, 2014).

Παρόλο που υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με τον μικροπολλαπλασιασμό ειδών του γένους *Arbutus*, με έκφυτα προερχόμενα είτε από ενήλικα μητρικά φυτά είτε από σπορόφυτα, δεν υπάρχουν καθόλου αναφορές για τον πολλαπλασιασμό, και συγκεκριμένα με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας, του *A. unedo*

var. *rubra*. Οι βιβλιογραφικές αναφορές αφορούν κυρίως το *A. unedo* και *A. andrachne* και δευτερευόντως το *A. xalapensis* (Mackay, 1996).

Ο Mackay (1996) ερευνώντας τον μικροπολλαπλασιασμό του *A. xalapensis* παρατήρησε ότι υπόστρωμα με άλατα WPM με βιταμίνες MS και 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ BA, χωρίς προσθήκη αυξίνης, έδωσε τα θετικότερα αποτελέσματα. Οι Bertsoouklis and Papafotiou (2009) για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του *A. andrachne* χρησιμοποίησαν έκφυτα κόμβων από βλαστούς ενήλικου αυτοφυούς φυτού που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ BA. Κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών δοκιμάστηκαν διάφορες κυτοκινίνες σε ποικίλες συγκεντρώσεις. Οι ερευνητές αναφέρουν πως η πιο αποτελεσματική φυτορυθμιστική ουσία ήταν η ζεατίνη. Σε άλλη έρευνα, οι Mostafa *et al.* (2010) χρησιμοποίησαν σπορόφυτα ανεπτυγμένα *in vitro* για τον πολλαπλασιασμό του είδους. Σπόροι του *A. andrachne* βλάστησαν επιτυχώς σε υπόστρωμα νερού-άγαρ με 2,0 mg l⁻¹ GA₃, ενώ σε υπόστρωμα MS η βλαστικότητα ήταν μηδενική. Στη συνέχεια μελέτησαν την επίδραση του τύπου θρεπτικού υποστρώματος (MS ή B5) και διάφορων κυτοκινινών σε ποικίλες συγκεντρώσεις (0-8 mg l⁻¹) στη βλαστογένεση *in vitro* και διαπίστωσαν την υπεροχή του θρεπτικού υποστρώματος MS με 6 mg l⁻¹ ZEA. Οι Aljabari *et al.* (2012) κατάφεραν με τη σειρά τους να πολλαπλασιάσουν το φυτό καλλιεργώντας και εκείνοι έκφυτα από σπορόφυτα σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM. Μελετώντας τις κυτοκινίνες ZEA και 2ip σε διάφορες συγκεντρώσεις παρατήρησαν, όπως και οι Mostafa *et al.* (2010), ότι η ZEA σε συγκέντρωση 6 mg l⁻¹ έδωσε τα θετικότερα αποτελέσματα. Για τη ριζοβολία του *A. andrachne* προτείνετε από τους Bertsoouklis and Papafotiou (2009) και από τους Aljabari *et al.* (2012) υπόστρωμα WPM με 1,0 ή 1,5 mg l⁻¹ IBA, αντίστοιχα, καθώς παρατήρησαν ποσοστό ριζοβολίας 90-100%. Οι Mostafa *et al.* (2010) αναφέρουν ποσοστό ριζοβολίας 40% σε υπόστρωμα μισής δύναμης (½ MS) που περιείχε 1,0 mg l⁻¹ NAA. Αντίστοιχα, και οι Papafotiou *et al.* (2013) παρατήρησαν χαμηλό ποσοστό ριζοβολίας σε υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης με 1,0 ή 2,0 mg l⁻¹ IBA (41 και 43%, αντίστοιχα).

Από τις πρώτες μελέτες που διεξήχθησαν σχετικά με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. unedo* ήταν η μελέτη των Morini and Fiaschi (2000). Οι ερευνητές αναφέρουν ως κατάλληλο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού, υπόστρωμα με μακροστοιχεία QL, μικροστοιχεία MS, βιταμίνες Mullin και 2,5 mg l⁻¹ BA, 0,2 mg l⁻¹ GA₃ και 0,06 mg l⁻¹ IBA, χωρίς όμως να παρατηρήσουν ιδιαίτερα υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού. Οι Rodrigues *et al.* (2001) μελέτησαν την επίδραση της μεθόδου

κοπής των εκφύτων στη διακοπή του ληθάργου των οφθαλμών. Χρησιμοποίησαν έναν τεμαχιστή λέιζερ CO₂, αντί για νυστέρι, και τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με 1 mg l⁻¹ BAP. Ο τεμαχιστής ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικός κατά τους χειμερινούς μήνες, από τον Οκτώβριο έως τον Ιανουάριο. Σε άλλη έρευνα, οι Λιμνιάτης *et al.* (2001) αναφέρουν ως κατάλληλο υπόστρωμα για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. unedo* WPM με 5 mg l⁻¹ BA και 0,75 mg l⁻¹ NAA.

Οι Mereti *et al.* (2002) προτείνουν υπόστρωμα WPM με 5,0 mg l⁻¹ BA καθώς έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα. Μικροβλαστοί ριζοβόλησαν σε υψηλά ποσοστά σε υπόστρωμα WPM με προσθήκη IAA και μίγμα τύρφης:περλίτη και εγκλιματίστηκαν επιτυχώς.

Στη συνέχεια, οι Gomes and Canhoto (2009) για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. unedo* χρησιμοποίησαν επικορμικούς βλαστούς έξι διαφορετικών γονοτύπων. Από τα πιο σημαντικά αποτελέσματα της έρευνας είναι η διαπίστωση της επίδρασης του γονότυπου στον πολλαπλασιασμό του είδους. Παρόλο που δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές όσον αφορά το ποσοστό βλαστογένεσης, ορισμένοι γονότυποι ήταν δύσκολο να πολλαπλασιαστούν λόγω της μη ικανοποιητικής επιμήκυνσης των βλαστών. Παράλληλα έλεγξαν την επίδραση τριών τροποποιημένων υποστρωμάτων AND. Το (1) περιελάμβανε άλατα Anderson (Anderson, 1974), μικροστοιχεία MS και οργανικά στοιχεία FS (DeFossard *et al.*, 1974), το (2) είχε την ίδια σύσταση αλλά με ½ μακροστοιχείων MS και το (3) με μακροστοιχεία FS. Ως καταλληλότερο μέσο διαπίστωσαν το υπόστρωμα FS και ως καταλληλότερα έκφυτα, έκφυτα κόμβων. Η ριζοβολία των μικροβλαστών ήταν αρκετά εύκολη, καθώς μικροβλαστοί ριζοβόλησαν ακόμα και σε υπόστρωμα χωρίς την παρουσία αυξίνης. Μικροβλαστοί ορισμένων γονοτύπων δεν προωθήθηκαν για ριζοβολία λόγω μη ικανοποιητικού μήκους. Οι Gomes *et al.* (2010) κατά την ίδια έρευνα μελέτησαν επίσης την επίδραση διάφορων συγκεντρώσεων BA στον πολλαπλασιασμό του *A. unedo* καθώς επίσης και την επίδραση άλλων κυτοκινινών. Ορμόνη BA σε συγκέντρωση 2 mg l⁻¹ έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε όλα τα εκτιμώμενα χαρακτηριστικά, χωρίς να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από την απόδοση ίδιας συγκέντρωσης ZEA ή KIN. Η προσθήκη TDZ ή NAA στο θρεπτικό υπόστρωμα δεν επέδρασε θετικά στον πολλαπλασιασμό του είδους και σε συγκεντρώσεις άνω των mg l⁻¹ προκάλεσε το σχηματισμό κάλλου.

Οι El-Sayed El-Mahrouk *et al.* (2010) μελέτησαν την επίδραση του TDZ σε διάφορες συγκεντρώσεις (0-4 mg l⁻¹) σε θρεπτικό υπόστρωμα MS. Η συγκέντρωση των 3 mg l⁻¹ έδωσε τους περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο, ενώ μεγαλύτερο μήκος βλαστών και περισσότερα φύλλα παρατηρήθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς TDZ. Υαλωμένοι βλαστοί σχηματίστηκαν σε έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 4 mg l⁻¹ TDZ. Τα φυτά αναπτύχθηκαν τελικά σε ποσοστό 95% σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες.

Ο Μπερτσουκλής (2012), κατά την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του *A. unedo*, *A. andrachne* και του φυσικού τους υβριδίου *A. x andrachnoides* από ενήλικα αυτοφυή φυτά, μελέτησε την επίδραση της εποχής εγκατάστασης των εκφύτων (άνοιξη- φθινόπωρο) καθώς και την επίδραση τεσσάρων κυτοκινινών (ZEA, BA, KIN, 2iP) σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹. Ως κατάλληλο υπόστρωμα καλλιέργειας προτείνει υπόστρωμα WPM με βιταμίνες Mullin και 2,5 mg l⁻¹ ZEA και ως καταλληλότερη εποχή την άνοιξη. Κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού μελετήθηκαν αρκετές φυτορρυθμιστικές ουσίες, τόσο κυτοκινίνες όσο και αυξίνες, και για ακόμη μία φορά παρατηρήθηκε η υπεροχή της ZEA.

Επίσης, οι Parafotiou *et al.* (2013) για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας και των τριών παραπάνω ειδών χρησιμοποίησαν έκφυτα κόμβου από σπορόφυτα ανεπτυγμένα *in vitro*. Κατά τη μελέτη διερεύνησαν την επίδραση των θρεπτικών υποστρωμάτων (MS και WPM) και των κυτοκινινών ZEA και TDZ σε δύο συγκεντρώσεις. Οι ερευνητές αναφέρουν πως για την εγκατάσταση της καλλιέργειας προτιμάται είτε υπόστρωμα MS είτε WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA, ενώ για το στάδιο του πολλαπλασιασμού υπόστρωμα MS με ίδια συγκέντρωση ZEA. Η προσθήκη TDZ στο θρεπτικό υπόστρωμα επέδρασε αρνητικά καθώς προκάλεσε το σχηματισμό κάλλου και βλαστών με δυσμορφίες. Οι μικροβλαστοί ριζοβόλησαν επιτυχώς σε υπόστρωμα WPM με 1 mg l⁻¹ IBA και εγκλιματίστηκαν σε ποσοστό 92-100% σε μίγμα compost ή τύρφη και περλίτη σε αναλογία 1:1 (v/v).

1.2.4 Εχθροί και ασθένειες των ειδών του γένους *Arbutus*

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες αναφορές σχετικά με την ευαισθησία του *A. unedo* var. *rubra* αλλά και της κοινής κουμαριάς, *A. unedo* L., σε εχθρούς και ασθένειες. Το γένος *Arbutus* αναφέρεται ως ξενιστής του λεπιδόπτερου *Lymantria dispar* L. το οποίο προσβάλλει περισσότερα από 250 είδη πλατύφυλλων και κωνοφόρων δένδρων. Οι προνύμφες του μπορεί να προκαλέσουν εκτεταμένη

αποφύλλωση τόσο σε οπωροφόρα όσο και σε δασικά δένδρα και να τα καταστήσουν ευπαθή σε δευτερογενείς προσβολές από άλλα έντομα. Έχει παρατηρηθεί στην Ευρώπη, την Ασία και την Αφρική και τα τελευταία χρόνια έχει εισαχθεί στη Βόρεια Αμερική. Στην Κύπρο παρατηρείται αρκετά συχνά και προσβάλλει κυρίως τα *Quercus infectoria* ssp. *Veneris*, *Quercus alnifolia*, *A. andrachne* και *P. terebinthus*, υποβαθμίζοντας την αισθητική τους αξία (Overview of forest pests, 2008). Το κοκκοειδές *Gonocerus acuteangulatus* Goeze, κν. ο κοριός των φουντουκιών, προκαλεί αξιόλογες ζημιές εκτός από τις φουντουκίες και σε είδη του γένους *Arbutus* (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003). Το 2008 οι Masten Milek and Simala δημοσίευσαν μία λίστα με 132 είδη εντόμων από 71 γένη που ανήκουν σε 12 διαφορετικές οικογένειες. Η λίστα βασίστηκε σε παλαιότερα δεδομένα από βιβλιογραφικές αναφορές και σε δεδομένα από προσωπική τους έρευνας που διεξήγαγαν σε 21 πόλεις της Κροατίας. Στη λίστα αυτή το *A. unedo* var. *rubra* αναφέρεται ως ξενιστής δύο ειδών της οικογένειας *Coccidae*, το *Saissetia oleae* (Olivier) και το *Coccus hesperidum* Linnaeus. Το *Saissetia oleae*, κν. λεκάνιο της ελιάς ή μαύρη ψώρα, είναι είδος πολυφάγο και προσβάλλει πολλά και ποικίλα δένδρα και θάμνους αλλά και ποώδη φυτά. Οι ξενιστές του ξεπερνούν τους 100. Στη χώρα μας προκαλεί σοβαρές ζημιές στην ελιά και στα εσπεριδοειδή. Το κοκκοειδές αυτό προσβάλλει κυρίως φύλλα, τρυφερούς βλαστούς ή μικρούς κλάδους. Στα φύλλα συνήθως βρίσκεται στα νεύρα ή κοντά σε αυτά και τα μελιτώδη αποχωρήματά του ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων της καπνιάς, που επιτείνουν την άμεση ζημιά των δέντρων από την απώλεια χυμών (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003). Το *Coccus hesperidum* L. είναι πολυφάγο και προσβάλλει είδη που ανήκουν σε 23 τουλάχιστον οικογένειες. Εκτός από τα εσπεριδοειδή των οποίων είναι εχθρός, προσβάλλει πολλά άλλα φυτά, όπως η συκιά, η μουριά, η δάφνη, η γαρυφαλλιά, οπωροφόρα Rosaceae καθώς και το *A. andrachne*. Οι προνύμφες πηγαίνουν στο ακραίο τμήμα των κλαδίσκων και στα νεαρά φύλλα και λιγότερο συχνά σε καρπούς (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003). Στη λίστα των Masten Milek and Simala τρία κοκκοειδή της οικογένειας *Diaspididae* αναφέρεται ότι προσβάλλουν το *A. unedo*, τα *Aspidiotus nerii*, *Chrysomphalus dictyospermi* και *Targionia vitis*. Το *Aspidiotus nerii* είναι εξαιρετικά πολυφάγο και προκαλεί αξιόλογες ζημιές κυρίως σε καλλωπιστικά δένδρα και θάμνους αλλά και σε καρποφόρα δένδρα ή ακόμα και σε πώση φυτά. Επίσης, η κοινή κουμαριά αναφέρεται ως ξενιστής του λεπιδόπτερου *Euproctis chrysorrhoea* L.. Το *Chrysomphalus dictyospermi* είναι είδος πολυφάγο και

αποτελεί αξιόλογο εχθρό των εσπεριδοειδών και ορισμένων ειδών *Ficus* και φοινίκων. Μεταξύ των πολλών φυτών-ξενιστών του είναι το αμπέλι, η ελιά, το γιασεμί, η δάφνη κ.ά. Οι προνύμφες του λεπιδόπτερου είναι πολυφάγες και τρέφονται με περίπου 26 γένη που ανήκουν σε 13 διαφορετικές οικογένειες. Το μεγαλύτερο μέρος του έτους το περνά στο στάδιο της προνύμφης και διαχειμάζουν ως νεαρές προνύμφες μέσα σε ομαδικές φωλιές. Η μεγαλύτερη ζημιά προκαλείται την άνοιξη από τις προνύμφες που διαχείμασαν οι οποίες τρώνε όχι μόνο το έλασμα των φύλλων αλλά και τους ανθοφόρους οφθαλμούς. Κατά συνέπεια η ανάπτυξη του φυτού μειώνεται και μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε νέκρωση του δένδρου (Διαδίκτυο 2, Paine and Lieutier, 2016). Από το 1991 έως το 1994 βρισκόταν σε επιδημική κατάσταση στην Ικαρία (Καϊλίδης, 1996). Μικρά έντομα, όπως οι θρίπες, προσβάλλουν τα φύλλα και τους νεαρούς βλαστούς και πέρα από τις άμεσες ζημιές που προκαλούν μπορούν να συμβάλουν και στη διάδοση παθογόνων μυκήτων. Ωστόσο, δεν υπάρχουν λεπτομερείς μελέτες σχετικά με την επίδραση των εντόμων αυτών στην ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των φυτών (Martins *et al.*, 2016).

Οι Moralejo *et al.*, (2012) έχουν απομονώσει διάφορα είδη του γένους *Phytophthora* σε γλαστρικές κουμαριές. Ο μύκητας *Phytophthora taxon Pgchlamydo* έχει παρατηρηθεί σε αρκετά καλλωπιστικά και δασικά είδη συμπεριλαμβανομένων των *Arctostaphylos* sp., *Camelia* spp., *Laurus nobilis*, *Rhododendron* sp. και *A. unedo* στη βόρεια Ευρώπη και Αμερική. Προκαλεί ζημιές που δεν μπορούν να διακριθούν εύκολα από εκείνες του μύκητα *Phytophthora ramorum* (Blomquist *et al.*, 2012). Πλέον ο μύκητας έχει μετονομαστεί σε *Phytophthora chlamydospora* (Hansen *et al.*, 2015). Στην Ισπανία έχουν παρατηρηθεί νεκρωτικές κηλίδες σε φύλλα *A. unedo* από προσβολές του μύκητα *Pestalotiopsis maculans* (Trapero *et al.*, 2003), ενώ στη Β. Ιταλία οι Polizzi and Catara (2001) παρατήρησαν για πρώτη φορά νεκρωτικές κηλίδες που προκλήθηκαν από τον μύκητα *Cylindrocladium pauciramosum*. Οι Linaldeddu *et al.* (2010), στην Ιταλία, αναφέρουν για πρώτη φορά προσβολές του μύκητα *Diplodia scrobiculata* σε πληθυσμούς του *A. unedo*. Ο μύκητας προκαλεί, συνήθως, καρκίνο και νέκρωση βραχιόνων. Στον Ελλαδικό χώρο, ο Καϊλίδης (1996) έχει καταγράψει προσβολές στην κοινή κουμαριά από τους μύκητες *Phytophthora microstictum*, *Corryneum microstictum*, *Griphosphaeria corticola* και *Phyllosticta* spp.. Την άνοιξη του 1997 και 1998 στην περιοχή της Χαλκιδικής, στη βόρεια Ελλάδα, οι ερευνητές Tsahouridou and Thanassoulouropoulos (2000) παρατήρησαν καφέ νεκρωτικές κηλίδες σε φύλλα κουμαριάς. Όταν τα συμπτώματα ήταν ιδιαίτερα έντονα παρατηρήθηκε και

εκτεταμένη αποφύλλωση. Από τα φύλλα απομονώθηκε ο μύκητας *Neofusicoccum mangiferae* και διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για την πρώτη προσβολή του μύκητα σε πληθυσμούς του *A. unedo* στην Ευρώπη. Στα προσβεβλημένα φυτά δεν παρατηρήθηκαν όγκοι, συχνό σύμπτωμα του μύκητα σε κουμαριές στις Ηνωμένες Πολιτείες. Όπως και σε άλλα είδη της οικογένειας Ericaceae, η σκωρίωση και η ανθράκωση έχουν αναφερθεί σποραδικά και σε πληθυσμούς του *A. unedo*. Παρόλα αυτά, όπως και στην περίπτωση των εχθρών, δεν υπάρχουν αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με την επίδραση των ασθενειών αυτών (Martins *et al.*, 2016).

1.2.5 Γενικές χρήσεις των ειδών του γένους *Arbutus*

Οι καρποί της κουμαριάς είναι πολύ εύγεστοι όταν είναι πλήρως ώριμοι και μπορούν να καταναλωθούν νωποί (Oliviera and Franco, 2015). Όταν δεν έχουν ωριμάσει πλήρως οι καρποί είναι λίγο στυφοί και δυσάρεστοι στη γεύση για όσους δεν έχουν συνηθίσει να τους καταναλώνουν. Λόγω μιας παλιάς πεποίθησης ότι οι καρποί είναι πλούσιοι σε αιθανόλη, καταναλώνονται μόνο σε μικρές ποσότητες και ως εκ τούτου σπάνια μπορούμε να τους βρούμε στην αγορά (Gomes *et al.*, 2010). Το όνομα “unedo” προέρχεται από το λατινικό “unum edo”, που σημαίνει “τρώω μόνο ένα”. Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει ότι η πεποίθηση αυτή δεν είναι τίποτε περισσότερο από έναν αστικό μύθο (Botelho *et al.*, 2015) και η κατανάλωση των κούμαρων είναι τόσο ασφαλής όσο και η κατανάλωση άλλων καρπών τύπου berries. Το μόνο πρόβλημα σχετικά με την κατανάλωση φρέσκων καρπών κουμαριάς φαίνεται να είναι οι μετασυλλεκτικοί χειρισμοί των καρπών, εξαιτίας της γρήγορης φθοράς τους. Η συγκομιδή των καρπών πριν από το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης θα μπορούσε να ήταν μία καλή λύση για το πρόβλημα αυτό. Παρόλα αυτά, τα κούμαρα δεν ωριμάζουν καλά όταν αποκοπούν από το φυτό ενώ είναι ακόμα ανώριμα. Επιτυχημένες προσπάθειες για να αυξηθεί η μετασυλλεκτική ζωή των καρπών, έως και 15 ημέρες, έχουν πραγματοποιηθεί από τους Guerreiro *et al.* (2013), χρησιμοποιώντας χαμηλές θερμοκρασίες (0° C).

Επίσης, τα κούμαρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή ενός παραδοσιακού, ιδιαίτερα αρωματικού, οινοπνευματώδους ποτού που προκύπτει από την απόσταξή τους (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001, Gomes and Canhoto, 2009, Botelho *et al.*, 2015). Στην Πορτογαλία το ποτό αυτό είναι γνωστό με το όνομα “aguardente de medronho” (mendroneiro), στην Ιταλία ως “Corbezzolo” και στην Ελλάδα ως “Κούμαρο” (Miguel *et al.*, 2014). Κύρια συστατικά του “aguardente de medronho”

είναι η μεθανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας. Παρόλα αυτά, τα επίπεδα της μεθανόλης δεν έχουν υπερβεί ποτέ τις συγκεντρώσεις που προβλέπονται από το νόμο. Αλκοόλες, εστέρες, οξέα και αρωματικές ενώσεις είναι τα κύρια συστατικά του ελληνικού ποτού “κούμαρο”. Η μεθανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας επικράτησαν και στα αλκοολούχα ποτά που προέκυψαν από την απόσταξη κούμαρων στην Ισπανία. Το “mendroneiro” είναι αρκετά δυνατό (περιλαμβάνει 40% αλκοόλ) και καταναλώνεται κατά κόρον σε περιοχές της Μεσογείου. Πωλείται σε υψηλή τιμή, περίπου 20€/ μπουκάλι ανάλογα με την ποιότητα, το έτος και τον παραγωγό (Martins *et al.*, 2016).

Στην Ευρώπη τα κούμαρα χρησιμοποιούνται, ακόμη, για την παρασκευή κρασιού, κονιάκ και ενός ηδύποτου που ονομάζεται κουμαρόκρεμα “crème d’arbouse”, που βοηθά στην πέψη. Στην Ελλάδα τα κούμαρα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τσίπουρου. Ιδιαίτερα στη βόρεια Ελλάδα και την Πιερία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του περίφημου παραδοσιακού τσίπουρου από κούμαρα του Ολύμπου. Τα κούμαρα συλλέγονται τον Δεκέμβρη, από τους πρόποδες του Ολύμπου, και ακολουθώντας τη μέθοδο της ζύμωσης αποστάζονται τον Μάιο (Soufleros *et al.*, 2005).

Εκτός από την παρασκευή αλκοολούχων ποτών, τα κούμαρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παρασκευή μαρμελάδας, ζελέ φρούτων και γλυκό του κουταλιού. Μπορούν, επίσης, να ενσωματωθούν σε γιαουρτάκια είτε σε κομμάτια είτε ως γεύση και να χρησιμοποιηθούν στη ζαχαροπλαστική όπως σε πίτες, κρέμες ζαχαροπλαστικής κ.ά. (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001, Soufleros *et al.*, 2005, Pallauf *et al.*, 2008, Serçe *et al.*, 2010, Miguel *et al.*, 2014).

Η κουμαριά ανήκει, επίσης, στα μελισσοκομικά φυτά που υπάρχουν στην Ελλάδα (Χαριζάνης, 1996). Το μέλι της κουμαριάς είναι γνωστό προϊόν της μεσογείου και χαρακτηρίζεται από την πικρή του γεύση και το σκούρο κίτρινο χρώμα του (Miguel *et al.*, 2014). Είναι τονωτικό τόσο για τους ανθρώπους όσο και για τις μέλισσες και για το λόγο αυτό οι μελισσοκόμοι το αφήνουν στην κυψέλη για το ξεχειμώνιασμα του μελισσιού (Χαριζάνης, 1996).

Πιο πρόσφατες χρήσεις σχετίζονται με τη βιομάζα για την παραγωγή ενέργειας και την ανθοκομία, καθώς το φύλλωμα της κουμαριάς χρησιμοποιείται ευρέως στις ανθοσυνθέσεις για τη δημιουργία ελκυστικών μπουκέτων λουλουδιών (Gomes and Canhoto, 2009). Συχνά διακοσμούν εσωτερικούς χώρους κυρίως την περίοδο των Χριστουγέννων.

Τέλος, η κουμαριά όπως και η κόκκινη ποικιλία της έχει ιδιαίτερη καλλωπιστική αξία η οποία οφείλεται τόσο στα πολυπληθή, όμορφα άνθη της και στους εντυπωσιακούς καρπούς της όσο και στο ωραίο φύλλωμα και την πυκνή βλάστησή της. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια έχει ενταχθεί στην κηποτεχνία και μπορεί να φυτευτεί είτε μεμονωμένα σε κάποιο σημείο του κήπου είτε για τη δημιουργία φράκτη ελεύθερης ανάπτυξης.

1.2.5.1 Φαρμακευτική χρήση των *A. unedo* και *A. andrachne*

Οι φαρμακολογικές ιδιότητες τόσο του *A. unedo* όσο και του *A. andrachne* έχουν μελετηθεί εκτενώς εδώ και αρκετά χρόνια. Τον τελευταίο καιρό έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στους καρπούς των δύο ειδών, καθώς είναι υψηλής διατροφικής αξίας με θρεπτικά συστατικά που βοηθούν στην πρόληψη και τη θεραπεία διάφορων ασθενειών.

Αναλυτικότερα, οι καρποί του *A. unedo* παρουσιάζουν αντισηπτικές, διουρητικές και καθαρτικές ιδιότητες (Fiorentino *et al.*, 2007, Oliviera *et al.*, 2009, Mendes *et al.*, 2011). Και βοηθούν σημαντικά στη θεραπεία γαστρεντερικών και δερματολογικών παθήσεων (Bouchefa *et al.*, 2015). Από την άλλη πλευρά, τα φύλλα του φυτού χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική για τις στυπτικές, αντισηπτικές του ουροποιητικού συστήματος, αντιδιαρροικές, διουρητικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδης ιδιότητές τους και πιο πρόσφατα για την πρόληψη και τη θεραπεία της υπέρτασης και του διαβήτη (Fiorentino *et al.*, 2007, Marrioto *et al.*, 2008, Oliviera *et al.*, 2009, Mendes *et al.*, 2011, Malheiro *et al.*, 2012, Ziani *et al.*, 2015, Moualek *et al.*, 2016, El Haouari and Mekhfi, 2017). Τα τελευταία χρόνια, επίσης, έχουν διερευνηθεί εκτενώς και οι αντικαρκινικές ιδιότητες του φυτού (Carcache-Blanco *et al.*, 2006, Mariotto *et al.*, 2008, El Haouari and Mekhfi, 2017). Το *A. andrachne* είναι και αυτό μία πολύ καλή πηγή αντιοξειδωτικών και εκχυλίσματα φύλλων, ριζών και καρπών του φυτού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη και τη θεραπεία διάφορων ασθενειών που συνδέονται με τη σωστή λειτουργία της καρδιάς. Γενικά, οι φαρμακαλογικές ιδιότητες των ειδών συνδέονται άμεσα με τις υψηλές συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών συστατικών που έχουν προσδιοριστεί σε εκχυλίσματα διαφόρων μερών των φυτών, όπως οι ταννίνες, τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα κ.ά. (Males *et al.*, 2006, Pallauf *et al.*, 2008, Seçre *et al.*, 2010, Guendouze- Bouchefa *et al.*, 2015, Abidi *et al.*, 2016a, b, El Haouari and Mekhfi, 2017)

1.2.5.2 Χρήση των ειδών του γένους *Arbutus* στην Αρχιτεκτονική Τοπίου - Εδώδιμα τοπία

Εδώδιμα τοπία (Edible landscapes), διαρκή παραγωγικά αστικά τοπία (CPUL, Continuous Productive Urban Landscape), σχεδιασμός αισθητικών διατροφικών τοπίων (AFD, Aesthetic Foodscape Design) είναι μερικές από τις ονομασίες που έχουν δοθεί από τους επιστήμονες για να ορίσουν την ενσωμάτωση παραγωγικών φυτών στα τοπία με σκοπό τη διατροφή του ανθρώπου (Bohn and Vilijoen, 2011; Zeunert, 2012). Ο όρος, λοιπόν, εδώδιμα τοπία χρησιμοποιείται για να περιγράψει την πρακτική χρήση φυτών με εδώδιμους καρπούς για καλλωπιστικό σκοπό, αντικαθιστώντας τα κοινά καλλωπιστικά φυτά.

Όταν οι άνθρωποι πρόκειται να καλλιεργήσουν τρόφιμα σε αστικές περιοχές, το πρώτο πράγμα που σκέφτονται είναι να κρύψουν το λαχανόκηπο στην πίσω αυλή. Τα εδώδιμα τοπία προσφέρουν μια εναλλακτική λύση στα συμβατικά οικιστικά τοπία, καθώς μπορεί να είναι εξίσου ελκυστικά φέροντας ωραίους, ζουμερούς καρπούς. Κάποιος μπορεί να εγκαταστήσει εξ ολοκλήρου ένα βρώσιμο τοπίο ή να ενσωματώσει ορισμένα βρώσιμα φυτά σε υπάρχοντες κήπους (OSU). Τελευταία, εκτός από τους ιδιωτικούς χώρους, εδώδιμα τοπία έχουν αρχίσει να εγκαθίστανται και σε δημόσιους χώρους (πλατείες, πάρκα, νησίδες δρόμων). Τα εδώδιμα τοπία μπορούν να εμπεριέχουν την εποχικότητα στη φύτευση, την ανάμιξη λαχανικών με ανθοφόρα καλλωπιστικά φυτά, βοτανικά είδη και παραδοσιακές ποικιλίες φυτών όλα συνδυασμένα με τις αρχές της αρχιτεκτονικής τοπίου. Η εποχικότητα των φυτών δίνει στον παρατηρητή την αίσθηση της αλλαγής των εποχών μέσα από την ωρίμανση των φρούτων και των λαχανικών.

Οι αρχιτέκτονες τοπίου χρησιμοποιούν τα φυτά για να πετύχουν αρμονικές και καλαίσθητες συνθέσεις. Η επιλογή και η τοποθέτηση, όμως, των φυτών ακολουθούν ορισμένες αρχές σχεδιασμού και γίνονται με βάση τη λειτουργία που επιτελούν, τις φυσιολογικές απαιτήσεις των φυτών, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους και το επιθυμητό αισθητικό αποτέλεσμα ανάλογα με το μέγεθος του κήπου. Επιπλέον, ο σχεδιασμός ενός εδώδιμου κήπου προϋποθέτει την εκτίμηση της θέσης (τοποθεσία, γειτονικοί χώροι, κλίμα, μικρόκλιμα, διαθεσιμότητα φυσικών πόρων κ.ά), την εκτίμηση των χρηστών (επιθυμίες και ανάγκες του χρήστη, δυνατότητα συντήρησης και φροντίδας) και τέλος εκτίμηση της λειτουργίας του χώρου (εκτός της παραγωγικής χρήσης του).

Η αστική γεωργία είναι μία δραστηριότητα αρκετά διαδεδομένη στις χώρες του δυτικού κόσμου κυρίως λόγω της έντονης αστικοποίησης. Στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια, με αφορμή την οικονομική κρίση και την αναζήτηση υγιεινών και ασφαλών τροφίμων, η αστική γεωργία έχει γνωρίσει ιδιαίτερη ανάπτυξη. Παλαιότερα, η έννοια της παραγωγής τροφίμων για τα νοικοκυριά υπήρχε κυρίως στις επαρχιακές πόλεις αλλά και στις μεγάλες πόλεις, με τη διαφορά ότι η αστικοποίηση δεν ήταν τόσο έντονη. Ήταν συνηθισμένο φαινόμενο η ύπαρξη λαχανόκηπων στις αυλές των κατοικιών, κυρίως στις μικρές πόλεις. Σήμερα, οι άνθρωποι αναγκάστηκαν να οργανωθούν είτε μεμονωμένα είτε ομαδικά και να καλλιεργήσουν φυτά σε δημόσιους χώρους όπως πλατείες, αναξιοποίητους ανοιχτούς χώρους, πάρκα, ταράτσες κατοικιών κ.ά. Σε ποιο οργανωμένο επίπεδο έχουν κινηθεί τον τελευταίο καιρό και αρκετοί δήμοι της Ελλάδας που πήραν πρωτοβουλία και δημιούργησαν δημοτικούς λαχανόκηπους, όπως ο δήμος Ελληνικού, Αμαρουσίου, Αλεξανδρούπολης, Λάρισας κ.ά.

Οι διάφορες κλιματικές συνθήκες, οι διατροφικές συνήθειες, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και διάφοροι άλλοι παράγοντες σχετικά με την τοποθεσία καθορίζουν την καλλιέργεια και τις πρακτικές της. Στο αστικό περιβάλλον προτιμώνται μονοετείς ή μικρής διάρκειας καλλιέργειες ενώ στο περιαστικό μεγάλης διάρκειας, κυρίως δενδροκομικές καλλιέργειες. Γενικότερα, τα καλλιεργούμενα είδη διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή και επηρεάζονται κατά κύριο λόγο από τις τοπικές παραδόσεις (Tixier and Bon, 2006). Ανάμεσα στα δένδρα και τους θάμνους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εδωδιμους κήπους, τόσο για κατανάλωση όσο και για την καλλωπιστική τους αξία, είναι και η κουμαριά καθώς από τον Οκτώβριο έως και τον Δεκέμβριο φέρει, μαζί με τους πορτοκαλί κόκκινους καρπούς, λευκά ή ροζ, στην περίπτωση της ποικιλίας *rubra*, άνθη.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

2.1 Φυτικό υλικό

Ως φυτικό υλικό για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. unedo* var. *rubra* χρησιμοποιήθηκαν βλαστοί από ενήλικο, αυτοφυές φυτό στη Βαρυμπόμπη του Ν. Αττικής, καθώς και σπορόφυτα που προήλθαν από την εκβλάστηση σπόρων του ίδιου αυτοφυούς φυτού (Εικ. 8). Το μητρικό φυτό ήταν αντιπροσωπευτικό της ποικιλίας και χρησιμοποιήθηκε για όλα τα πειράματα *in vitro* καλλιέργειών.

2.2 Υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειας

2.2.1 Υλικά των θρεπτικών υποστρωμάτων *in vitro* καλλιέργειας

Τα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας των εκφύτων στα διάφορα πειράματα περιείχαν τα εξής συστατικά:

- α) Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog Medium) της εταιρείας Duchefa Bio-chem σε μορφή σκόνης (Murashige and Skoog, 1962), (Πίν.1).
- β) Υπόστρωμα WPM (McCown's Woody Plant Medium) της εταιρείας Duchefa Bio-chem σε μορφή σκόνης (McCown and Lloyd, 1981), (Πίν.1).
- γ) Σακχαρόζη εμπορίου (Sucrose).
- δ) Αυξίνες:
 - Ναφθαλινοξικό οξύ, NAA, (1-Naphthaleneacetic acid, MB= 186), της εταιρείας Sigma-Aldrich.
 - Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ, IBA, (Indole-3-butyric acid, MB= 230,24), της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- ε) Κυτοκινίνες:
 - Ζεατίνη, ZEA, (trans-zeatin, MB=219,24), της εταιρείας Duchefa Bio-chem.
 - Θειντιαζουρόν, TDZ, (thidiazuron, MB= 220,3), της εταιρείας Duchefa Bio-chem.
- στ) Άγαρ (Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά).

2.2.2 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων

Για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων, σε δοχείο ζέσεως προσθέτονταν αποσταγμένο νερό, όγκου λιγότερου του τελικού, θρεπτικό υπόστρωμα Murashige and Skoog (MS), 4,4 g l⁻¹ ή 2,2 g l⁻¹ στην περίπτωση καλλιέργειας σπόρων, ή Woody Plant Medium (WPM) 2,3 g l⁻¹. Επίσης προσθέτονταν σακχαρόζη εμπορίου

20 ή 30 g l⁻¹ και οι επιθυμητές κάθε φορά φυτορυθμιστικές ουσίες, από stock διαλύματα αυτών, και αναδεύονταν σε μαγνητικό αναδευτήρα έως ότου διαλυθούν πλήρως. Ακολουθούσε ογκομέτρηση του διαλύματος και προσθήκη αποσταγμένου νερού μέχρι τον τελικό όγκο, ρύθμιση του pH στην τιμή 5,7-5,8 της κλίμακας με τη βοήθεια διαλυμάτων 0,1 ή 1 N NaOH και 0,1 ή 1 N HCl. Τέλος, προστίθετο άγαρ στην απαιτούμενη ποσότητα (8 g l⁻¹) και ακολουθούσε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση, έως την πλήρη διαύγεια του. Το υπόστρωμα σε κάθε στάδιο καλλιέργειας τοποθετούνταν στα αντίστοιχα δοχεία (δοκιμαστικοί σωλήνες ή γυάλινα βάζα καλλιέργειας) και εν συνεχεία αποστειρώνονταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης. Η καλλιέργεια των σπόρων γινόταν σε πλαστικά τρυβλία petri, διαμέτρου 9 cm. Η πλήρωση των τρυβλίων με υπόστρωμα γινόταν στην τράπεζα νηματικής ροής αφού είχε προηγηθεί αποστείρωση σε χύτρα μέσα σε γυάλινες φιάλες όγκου 500 ή 1000 ml.

Πίνακας 1. Συστατικά (μακροστοιχεία, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες) των θρεπτικών υποστρωμάτων MS (Murashige and Skoog, 1962) και WPM (McCown and Lloyd, 1981).

Συστατικά	MS (mg l ⁻¹)	WPM (mg l ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1.650	400
CaCl ₂ * 2H ₂ O	332,2	96
Ca(NO ₃) ₂ * 4H ₂ O	-	556
MgSO ₄ * 7H ₂ O	370	370
KNO ₃	1.900	-
K ₂ SO ₄	-	990
KH ₂ PO ₄	170	170
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,025	-
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,025	0,25
Na ₂ EDTA	37,3	37,3
Fe SO ₄ * 7H ₂ O	27,8	27,8
MnSO ₄ * H ₂ O	1,69	22,3
KI	0,83	-
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,25	0,25
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	8,6	8,6
Myo-inositol	100	100
Glycine	2,0	2,0
Nicotinic acid	0,5	0,5
Pyridoxine HCl	0,5	0,5
Thiamine HCl	0,1	1,0

2.2.3 Μέθοδος παρασκευής «stock» διαλυμάτων φυτορυθμιστικών ουσιών

Κατά την παρασκευή των υποστρωμάτων καλλιέργειας ήταν απαραίτητη η παρασκευή stock διαλυμάτων που περιείχαν την κάθε φυτορυθμιστική ουσία σε ποσοστό 10 % κ.β. Για τον έλεγχο της επίδρασης του NAA παρασκευάστηκε επιπλέον stock διάλυμα 1 % κ.β.

1. Παρασκευή «stock» διαλύματος IBA. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg IBA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προσθέτοναν 100 ml αποσταγμένου νερού.
2. Παρασκευή «stock» διαλύματος ZEA. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg ZEA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτοναν 100 ml αποσταγμένου νερού.
3. Παρασκευή «stock» διαλύματος TDZ. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg TDZ, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτοναν 100 ml αποσταγμένου νερού.
4. Παρασκευή «stock» διαλύματος NAA. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg NAA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προσθέτοναν 100 ml αποσταγμένου νερού. Για την παρασκευή «stock» διαλύματος 1 %, γίνονταν λήψη 1 ml από «stock» διάλυμα 10 % και στη συνέχεια προσθέτοναν 9 ml αποσταγμένο νερό.

Μετά την παρασκευή τους όλα τα «stock» διαλύματα των φυτορυθμιστικών ουσιών αποθηκεύονταν σε οικιακό ψυγείο και σε θερμοκρασία 5 °C, για διάστημα περίπου 30 ημερών.

2.3 Δοχεία και υλικά κάλυψης

2.3.1 Δοχεία *in vitro* καλλιέργειας και υλικά κάλυψης

Στο στάδιο της εγκατάστασης των αρχικών καλλιεργειών από ενήλικα φυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μέσο καλλιέργειας δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 50 ml (25 x 100 mm), που περιείχαν 10 ml υποστρώματος ο κάθε ένας. Μετά το γέμισμα των σωλήνων με υπόστρωμα ακολουθούσε κάλυψη τους με αλουμινόχαρτο για να αποστειρωθούν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, ενώ μετά την τοποθέτηση των εκφύτων στην Τράπεζα

Νηματικής Ροής (Laminar Flow Cabinet) του Εργαστηρίου, ως υλικό κάλυψής τους χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη sanitas (πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος με το εμπορικό όνομα sanitas της εταιρείας Σαράντης Α.Ε., η οποία είχε τις εξής ιδιότητες: περατότητα σε οξυγόνο $8,5 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h, περατότητα σε διοξείδιο του άνθρακα $55.000 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h και περατότητα σε υδρατμούς 110 g m^{-2} σε 24 h). Κατά την εγκατάσταση *in vitro* αρχικών καλλιιεργειών από ιστούς σποροφύτων χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα βάζα όγκου 100 ml, τα οποία περιείχαν 25 ml υποστρώματος το κάθε ένα.

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

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

2.3.2 Δοχεία εγκλιματισμού φυταρίων

Στο στάδιο του εγκλιματισμού τα ριζοβολημένα φυτά μεταφυτεύθηκαν για περαιτέρω ανάπτυξη σε πλαστικά φυτοδοχεία όγκου 2 l. Τα φυτοδοχεία περιείχαν υπόστρωμα που αποτελείτο από 1 τύρφη : 1 περλίτη (v/v), ενώ η κάλυψή τους έγινε με πλαστική μεμβράνη sanitas, κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας, με σκοπό την μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυταρίων, όπου παρέμειναν στον θάλαμο σταθερών συνθηκών (20 °C) στο εργαστήριο και έπειτα μεταφέρθηκαν στην υδρονέφωση του θερμαινόμενου θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου.

2.4 Μέθοδοι αποστείρωσης και απολύμανσης

2.4.1 Απολύμανση εκφύτων

Πριν την τοποθέτηση των εκφύτων από αυτοφυή βλάστηση, στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν το θρεπτικό υπόστρωμα, έγινε επιφανειακή απολύμανση τους. Για τη λήψη φυτικού υλικού επιλέχθηκαν υγιείς βλαστοί μήκους περίπου 10 cm (Εικ. 4). Οι βλαστοί μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο μέσα σε μεγάλα

πλαστικά δοχεία με νερό, για την αποφυγή της αφυδάτωσης. Τεμάχια βλαστών του *Arbutus unedo* var. *rubra*, αφού αφαιρέθηκαν τα φύλλα τους και ξεπλύθηκαν πολύ καλά με άφθονο τρεχούμενο νερό βρύσης για 1 min περίπου, απολυμάνθηκαν με διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης 90% (Ethanol Absolute 99%, Scharlau) για 10 sec. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες που περιείχαν 30% υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (4,6% w/v NaClO) συνολικού όγκου 200 ml που αποτελούνταν από αποσταγμένο, αποστειρωμένο νερό και 0,1% Tween-20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene (20) sorbitan Monolaurate, MERCK) και ακολούθησε ανάδευση για 10 min. Ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα των βλαστών με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό υπό συνεχή ανάδευση.



Εικ. 4. Νεαροί βλαστοί τρέχουσας βλάστησης *A. unedo* var. *rubra* πριν τη λήψη των εκφύτων (α, β).

Οι σπόροι πριν την καλλιέργεια τους απολυμάνθηκαν σε 20% υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (4,5% w/v NaClO), με αποσταγμένο – αποστειρωμένο νερό και προσκολλητική ουσία 0,1% Tween 20. Οι σπόροι εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα και ακολούθησε συνεχής ανάδευση για χρονικό διάστημα 10 min. Ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποσταγμένο, αποστειρωμένο νερό και έπειτα τοποθετήθηκαν για βλάστηση *in vitro*.

2.4.2 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας

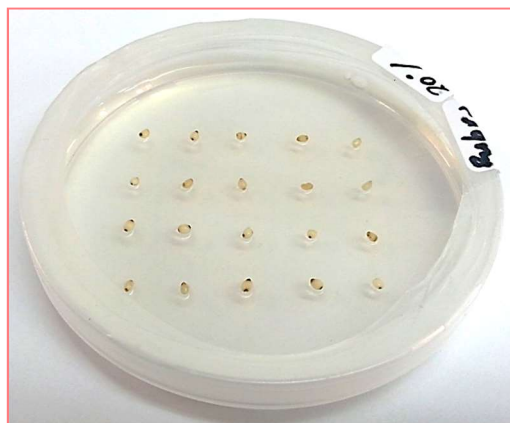
Για την εκτέλεση όλων των πειραμάτων ιστοκαλλιέργειας απαιτείται η αποστείρωση και απολύμανση όλων των εργαλείων και υλικών καλλιέργειας. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες και τα δοχεία καλλιέργειας με τα υποστρώματα, αλλά και όλα τα υλικά και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στις εμφυτεύσεις ή απολυμάνσεις, όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκια πάνω στα οποία γινόταν οι κοπές, φιάλες και δοχεία με νερό για την απολύμανση των εκφύτων, αποστειρώνονταν σε αυτόκλειστο κλίβανο

υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) για χρονικό διάστημα 20 min, σε θερμοκρασία 121 °C, υπό πίεση 1,1 atm, ή σε χύτρα υγρής αποστείρωσης για 15 min, σε θερμοκρασία 125 °C, υπό πίεση 1,1 atm. Κατά την αποστείρωση τα καπάκια όλων των δοχείων ήταν χαλαρά κλεισμένα. Μολυσμένοι σωλήνες και δοχεία καλλιέργειας πριν ανοιχτούν και πλυθούν αποστειρώνονταν για 40 min, σε θερμοκρασία 121 °C και σε πίεση 1,1 atm στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης.

2.5 Εγκατάσταση φυτικού υλικού σε καλλιέργεια

2.5.1 Βλάστηση σπόρων και συνθήκες επώασης

Μετά τη διαδικασία απολύμανσης, οι σπόροι καλλιεργήθηκαν σε πλαστικά τρυβλία petri, διαμέτρου 9 cm, με στερεό (8 g l^{-1} agar) θρεπτικό υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) υποδιπλασιασμένης δύναμης και 20 mg l^{-1} σακχαρόζη εμπορίου (Εικ. 4). Οι σπόροι τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε έξι διαφορετικές θερμοκρασίες 5, 10, 15, 20, 25 και 30 °C και 16 h φωτοπερίοδο, έντασης $37.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (4.000 lx fluorescent light) που προέρχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού, σε θαλάμους σταθερών συνθηκών.



Εικ. 5. *In vitro* καλλιέργεια σπόρων *A. unedo* var. *rubra*, σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS.

2.5.2 Εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας *in vitro*

2.5.2.1 Εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας από αυτοφυή βλάστηση

Μετά τη διαδικασία απολύμανσης των βλαστών στην τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμάνονταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80% και με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, οι βλαστοί τεμαχίστηκαν σε έκφυτα κόμβων μήκους περίπου 6-7 mm (με 1-2 οφθαλμούς) από την κορυφή (χωρίς το κορυφαίο μερίστωμα), έως τη βάση των βλαστών. Εκτός από τυχόν υπολείμματα φύλλων, αφαιρέθηκαν και τα δύο ακραία τμήματα του βλαστού που είχαν καταστραφεί

από την απολύμανση. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν πέντε τύποι εκφύτων, που αριθμήθηκαν ανάλογα με τη θέση τους στο βλαστό σε έκφυτα 1, 2, 3, 4, 5, ξεκινώντας την αρίθμηση από την κορυφή των βλαστών. Τα έκφυτα τοποθετήθηκαν στους δοκιμαστικούς σωλήνες (ένα έκφυτο ανά σωλήνα) που περιείχαν το θρεπτικό υπόστρωμα κατακόρυφα, πιέζοντας τα ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό και στη συνέχεια καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος με το εμπορικό όνομα sanitas (Σαράντης Α.Ε.).

2.5.2.2 Εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας από ιστούς σποροφύτων

Μετά το πέρας της περιόδου βλάστησης των σπόρων, τα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν για περαιτέρω ανάπτυξη σε γυάλινα βάζα όγκου 100 ml. Μετά την πάροδο ενός μήνα, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαίνονταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80% και με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, τα ανεπτυγμένα σπορόφυτα τεμαχίστηκαν σε έκφυτα 2-3 κόμβων. Τα έκφυτα τοποθετήθηκαν στα δοχεία καλλιέργειας (4 έκφυτα ανά δοχείο όγκου 100 ml) που περιείχαν το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα κατακόρυφα σε αυτό και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό.

2.5.3 Εγκατάσταση εκφύτων καλλιεργειών πολλαπλασιασμού

Σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που απολυμαίνονταν τακτικά με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80%, και χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο νυστέρι, μικροβλαστοί που είχαν σχηματισθεί *in vitro* τεμαχίζονταν σε έκφυτα κόμβων μήκους 6-7 mm, τα οποία περιελάμβαναν 1-3 οφθαλμούς, αφού προηγουμένως είχαν αφαιρεθεί τα φύλλα. Τα έκφυτα κόμβων τοποθετούνταν σε δοχεία καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα, κατακόρυφα, τέσσερα έκφυτα ανά δοχείο όγκου 100 ml και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό.

2.5.4 Εγκατάσταση μικροβλαστών για ριζοβολία *in vitro*

Βλαστοί που είχαν σχηματισθεί *in vitro* και είχαν μήκος μεγαλύτερο από 1 cm προωθούνταν για ριζοβολία. Μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαίνονταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80% και με αποστειρωμένο νυστέρι, οι βλαστοί αποκόπτονταν από τη βάση τους (από το έκφυτο) και αφαιρούνταν τα κατώτερα φύλλα τους. Στη συνέχεια τοποθετούνταν

στα δοχεία καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα ριζοβολίας, τέσσερις βλαστοί ανά δοχείο, κατακόρυφα και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό.

2.5.5 Εγκατάσταση ριζοβολημένων μικροβλαστών *ex vitro*

Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί του *A. unedo* var. *rubra* με καλά αναπτυγμένο ριζικό σύστημα (40 ημέρες μετά την εγκατάσταση στα υποστρώματα ριζοβολίας) τοποθετήθηκαν σε διάφανα πλαστικά δοχεία όγκου 2 l για εγκλιματισμό (οχτώ φυτάρια ανά δοχείο) σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη 1:1 v/v. Τα φυτάρια απομακρύνθηκαν από το υπόστρωμα ριζοβολίας, έγινε καλό πλύσιμο με τρεχούμενο νερό βρύσης, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το θρεπτικό υπόστρωμα από τις ρίζες τους, και στη συνέχεια μεταφυτεύθηκαν στα πλαστικά δοχεία.

Τα δοχεία με τα ριζοβολημένα φυτά καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος sanitas, με σκοπό την μείωση των απωλειών της υγρασίας στα πρώτα στάδια εγκατάστασης των φυταρίων. Κατά τις πρώτες 7 ημέρες της καλλιέργειας τους τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε θερμοκρασία 25 °C και 16 h φωτοπερίοδο υπό 37,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent φως. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στην υδρονέφωση ή σε 30% υγρασία στο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου. Ριζοβολημένα φυτάρια που προήλθαν από καλλιέργειες σποροφύτων μεταφέρθηκαν στο θερμοκήπιο για εγκλιματισμό από τον Νοέμβριο έως τον Φεβρουάριο, ενώ εκείνα που προήλθαν από καλλιέργειες ενήλικων φυτών τον Απρίλιο.

Οι μέσες μηνιαίες θερμοκρασίες που επικράτησαν στο θερμοκήπιο κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού των φυταρίων ήταν οι ακόλουθες: Νοέμβριος (min 15,5 – max 29,7 °C), Δεκέμβριος (min 15,1 – max 25,6 °C), Ιανουάριος (min 13,9 – max 32,3 °C), Φεβρουάριος (min 14,0 – max 32,4 °C) και Απρίλιος (min 15,29 – max 32,60 °C). Τα φυτάρια αρδεύονταν δύο φορές την εβδομάδα και λιπαίνονταν ανά 10 ημέρες με υδατοδιαλυτό λίπασμα Nutrileaf 20:20:20, (Miller Chemical and Fertilizer Corp., Hanover, PA, USA), σε αναλογία 2 g l⁻¹.

2.6 Συνθήκες καλλιέργειας

2.6.1 Συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας

Για τη βλάστηση των σπόρων, την ανάπτυξη των εκφύτων και τη ριζοβολία των μικροβλαστών, τα τρυβλία, οι δοκιμαστικοί σωλήνες και τα δοχεία καλλιέργειας με τα

έκφυτα και τους μικροβλαστούς αντίστοιχα επωάζονταν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, σε θερμοκρασία 15 °C τα τρυβλία για βλάστηση των σπόρων και 25±2 °C οι σωλήνες και τα δοχεία καλλιέργειας, με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 4000 lx ($37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού οι οποίοι βρίσκονταν στις πλαϊνές πλευρές του θαλάμου. Η επώαση διαρκούσε 40 ημέρες.

2.6.2 Συνθήκες *ex vitro* καλλιέργειας

Τα *in vitro* ριζοβολημένα φυτάρια εγκλιματίζονταν αρχικά σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών του εργαστηρίου στους 20 °C, με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4.000 lx fluorescent light) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού, για διάστημα επτά ημερών και ακολούθως μεταφέρονταν σε γυάλινο θερμαινόμενο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για περαιτέρω ανάπτυξη. Αρχικά, τοποθετούνταν στην υδρονέφωση για επτά ημέρες και έπειτα μεταφέρονταν στον πάγκο του θερμοκηπίου.

2.7 Στατιστική ανάλυση – Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα Jump 8.0 (SAS Institute Inc). Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (Analysis of Variance). Το κριτήριο που χρησιμοποιούμε για τη στατιστική αυτή δοκιμασία είναι το κριτήριο του F . Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Students σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Ανάλογα με την κάθε επιμέρους πειραματική διαδικασία και τους παράγοντες που εξετάστηκαν σε αυτή, σχεδιάστηκαν μονοπαραγοντικά ή και διπαραγοντικά πειράματα και εφαρμόστηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (ΕΤΣ).

Στην παράθεση των αποτελεσμάτων οι μέσοι των επεμβάσεων που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Στους πίνακες των διπαραγοντικών πειραμάτων, αναφέρονται οι τιμές του F για τις κύριες επιδράσεις και την αλληλεπίδρασή τους. Το σύμβολο (*) δίπλα από κάθε τιμή του F , δηλώνει ότι οι συγκεκριμένες τιμές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ήταν σημαντικές. Ο αριθμός των επαναλήψεων που χρησιμοποιήθηκαν ανά επέμβαση αναγράφεται στο τέλος κάθε πίνακα αποτελεσμάτων.

Οι μέθοδοι απολύμανσης εκφύτων για την αρχική εγκατάσταση αυτών, εκτιμήθηκαν ως προς το ποσοστό εκφύτων που επέζησαν μετά την απολύμανση, καθώς

και το ποσοστό των εκφύτων που δεν μολύνθηκαν. Η βλάστηση των σπόρων καταγράφηκε με την εμφάνιση του ριζιδίου μήκους τουλάχιστον 1 mm σύμφωνα με τον International Seed Testing Association (1999) και οι μετρήσεις λαμβάνονταν ανά 2 ημέρες. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων, τόσο κατά το στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιεργειών όσο και κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών, έγινε 40 ημέρες μετά την εγκατάσταση της καλλιέργειας. Υπολογίσθηκαν το ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν ως προς την έκπτυξη βλαστών (προηγήθηκε γωνιακή μετατροπή των ποσοστών πριν τη στατιστική ανάλυση), ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκε ανά έκφυτο, το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν, ο μέσος αριθμός κόμβων και φύλλων και εκτιμήθηκε ο σχηματισμός κάλλου. Υπολογίσθηκε, επίσης, το δυναμικό πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας ως το γινόμενο του ποσοστού βλαστογένεσης, του μέσου αριθμού βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε και του μέσου μήκους των σχηματισθέντων βλαστών, διαιρεμένο με 0,6 (θεωρώντας ότι 0,6 cm είναι το ελάχιστο αποδεκτό μήκος ενός εκφύτου κατά την υποκαλλιέργεια).

Η ριζοβολία των μικροβλαστών εκτιμήθηκε 40 ημέρες μετά την εγκατάστασή τους στα υποστρώματα ριζοβολίας. Υπολογίσθηκαν το ποσοστό των μικροβλαστών που σχημάτισαν ρίζες (προηγήθηκε γωνιακή μετατροπή των ποσοστών πριν τη στατιστική ανάλυση), ο αριθμός και το μέσο μήκος των ριζών που σχηματίστηκαν.

Η επιτυχία του *ex vitro* εγκλιματισμού των φυταρίων, καταγράφηκε 30 ημέρες μετά τη μεταφύτευση των φυταρίων σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη 1:1 v/v ως το ποσοστό (%) επιβίωσης αυτών.

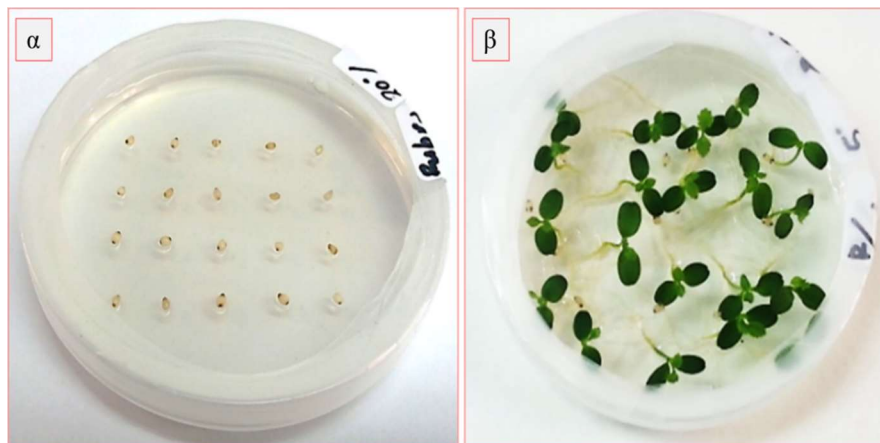
3. ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ *Arbutus unedo* var. *rubra*

3.1 *In vitro* πολλαπλασιασμός από κόμβους σποροφύτων

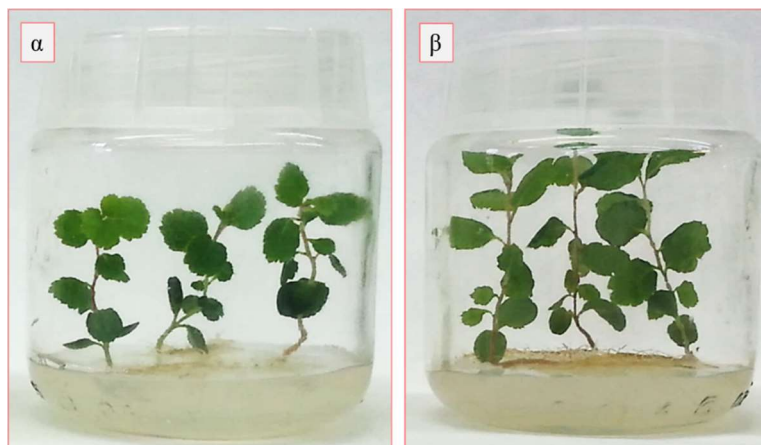
3.1.1 Υλικά και μέθοδοι

3.1.1.1 Φυτικό υλικό

Σπόροι του *A. unedo* var. *rubra* που είχαν συλλεχθεί από αυτοφυές φυτό στη Βαρυμπόμπη του Ν. Αττικής καθώς και σπορόφυτα ανεπτυγμένα *in vitro* αποτέλεσαν το υλικό της αρχικής καλλιέργειας *in vitro*. Τα σπορόφυτα, οι κόμβοι των οποίων χρησιμοποιήθηκαν για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της ποικιλίας, *rubra*, προέρχονταν από σπόρους που είχαν βλαστήσει *in vitro* σε τρυβλία Petri με στερεό (8 g l^{-1} agar) θρεπτικό υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) υποδιπλασιασμένης δύναμης, κυρίως στους $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ για ένα μήνα περίπου, και στη συνέχεια είχαν μεταφερθεί για περαιτέρω ανάπτυξη σε γυάλινα βάζα όγκου 100 ml που περιείχε θρεπτικό υπόστρωμα MS ή WPM, 30 g l^{-1} σακχαρόζη και 1 mg l^{-1} IBA (Εικ. 6, 7).



Εικ. 6. Σπόροι *A. unedo* var. *rubra* σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS, στους $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 μέρες (α) και 30 ημέρες μετά την εγκατάστασή τους (β).

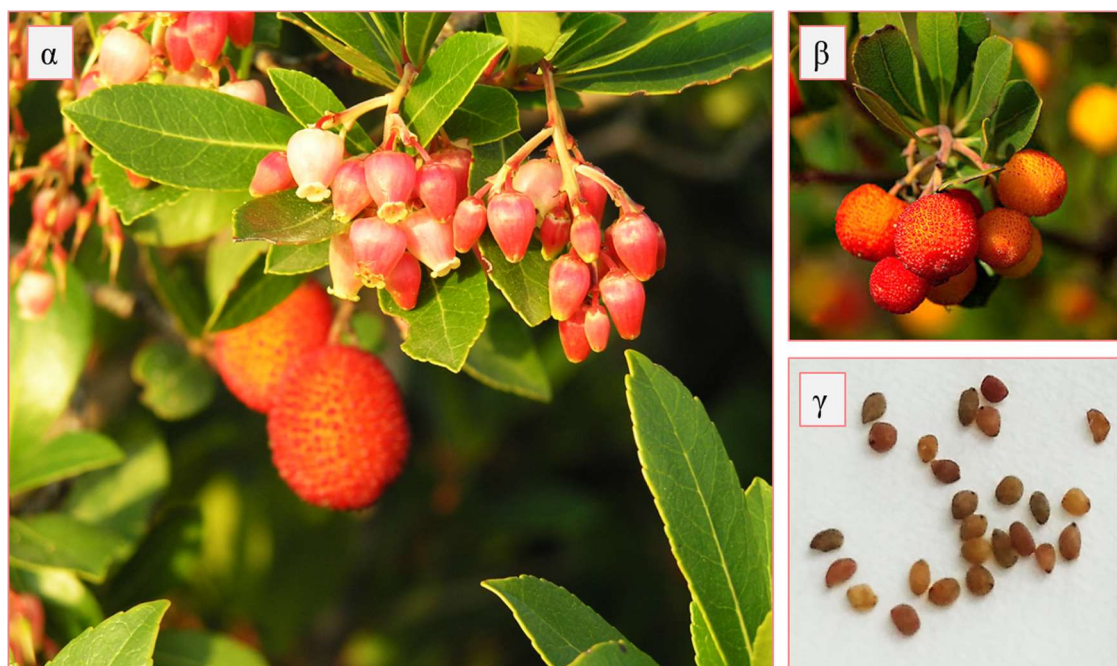


Εικ. 7. Σπορόφυτα *A. unedo* var. *rubra* σε MS (α) και WPM (β) με 1 mg l^{-1} IBA, που αποτέλεσαν το αρχικό υλικό για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του φυτού.

3.1.1.2 Συλλογή, καθαρισμός, αποθήκευση και βλάστηση σπόρων

Ωριμοί καρποί του *A. unedo* var. *rubra* συλλέχθηκαν τον Δεκέμβριο του 2014 από αυτοφυές φυτό, στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης, έχοντας πορτοκαλί - κόκκινο χρώμα. Κατά το στάδιο αυτό γίνεται και η συλλογή των καρπών είτε για εδώδιμη είτε για οποιαδήποτε άλλη χρήση.

Οι σπόροι, μετά τη συλλογή τους, διαχωρίστηκαν και απομονώθηκαν από το μεσοκάρπιο των καρπών με το χέρι, μέσα σε πλαστικό δοχείο που περιείχε νερό βρύσης. Οι καρποί πιέζονταν και συνθλίβονταν ώστε να αποκαλυφθούν οι σπόροι. Στη συνέχεια ακολούθησε καλό ξέπλυμα και στέγνωμα των σπόρων ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του μεσοκαρπίου για αποφυγή ανάπτυξης δευτερογενών προσβολών από μύκητες κατά τη διάρκεια διατήρησης και αποθήκευσής τους. Οι επιπλέοντες σπόροι που αποτελούσαν ποσοστό περίπου 40% του συνόλου απορρίπτονταν. Οι σπόροι που επιλέχθηκαν αφέθηκαν σε διηθητικό χαρτί, στον πάγκο του εργαστηρίου, για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσουν. Οι στεγνοί σπόροι τοποθετήθηκαν σε τρυβλία ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί και αποθηκεύτηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών, 25 °C, έως την εγκατάστασή τους (Εικ. 8). Η βλάστηση των σπόρων σε πλαστικά τρυβλία petri έγινε σε συνθήκες και με τεχνικές που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.5.1.



Εικ. 8. Άνθη και καρποί από αυτοφυές φυτό *A. unedo* var. *rubra* στη Βαρυμπόμπη (α), καρποί στο στάδιο συλλογής τους (β) και καθαρισμένοι σπόροι (γ).

3.1.1.3 Υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειας

Για την αρχική εγκατάσταση καλλιέργειας *in vitro* του *A. unedo* var. *rubra* από ιστούς σποροφύτων, η επιλογή του είδους και των συγκεντρώσεων των φυτορρυθμιστικών ουσιών στηρίχθηκε σε υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την *in vitro* εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας άλλων ειδών του γένους *Arbutus*. Κατά την εγκατάσταση, λοιπόν, εξετάστηκε η επίδραση των κυτοκινινών ZEA και TDZ σε συγκέντρωση 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ και 0,2 ή 2,0 mg l⁻¹, αντίστοιχα, σε υπόστρωμα MS ή WPM. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια θρεπτικά υποστρώματα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες.

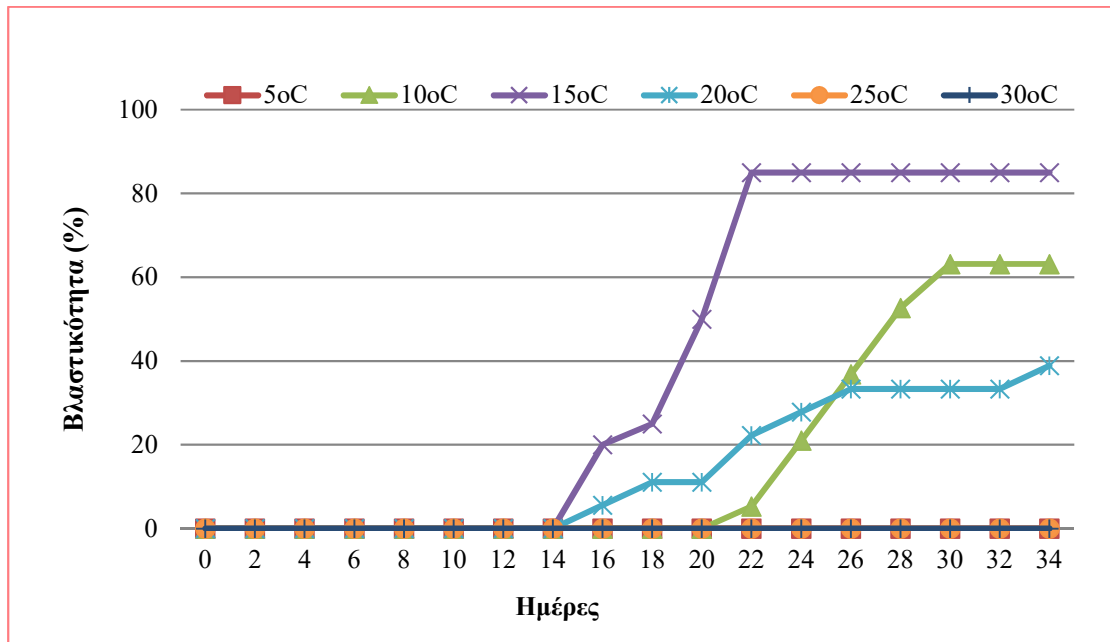
Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών, κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια, μελετήθηκαν ξανά τα θρεπτικά υποστρώματα MS ή WPM με ZEA σε συγκέντρωση 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹, καθώς κατά την αρχική εγκατάσταση παρατηρήθηκε η υπεροχή των υποστρωμάτων αυτών. Δεδομένης της αδυναμίας των υποστρωμάτων που δοκιμάστηκαν κατά τις προηγούμενες *in vitro* καλλιέργειες να συμβάλουν στην παραγωγή βλαστών ικανοποιητικού μήκους, εξετάστηκε η επίδραση αυξίνης NAA σε συγκέντρωση 0,1 mg l⁻¹ σε συνδυασμό με 2,5 mg l⁻¹ ZEA. Κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια, με βάση τα αποτελέσματα που είχαν συλλεχθεί κατά την προηγούμενη υποκαλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκαν τα υποστρώματα που εμφάνισαν τα θετικότερα αποτελέσματα και εξετάστηκε επιπλέον χαμηλότερη συγκέντρωση ζεατίνης (0,5 mg l⁻¹ ZEA), λόγω του υψηλού κόστους αυτής. Τέλος, με στόχο την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της προηγούμενης καλλιέργειας ακολούθησε τέταρτη υποκαλλιέργεια στα ίδια υποστρώματα.

3.1.2 Αποτελέσματα

3.1.2.1 Βλαστικότητα σπόρων *in vitro* - Εγκατάσταση μητρικής καλλιέργειας

Σπόροι του *A. unedo* var. *rubra* βλάστησαν σε υψηλό ποσοστό (85%) σε σύντομο χρονικό διάστημα (22 ημέρες) στους 15 °C. Στις θερμοκρασίες 10 και 20 °C οι σπόροι εμφάνισαν χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας (63,2% και 38,9%, αντίστοιχα). Η βλαστικότητα ήταν μηδενική στους 25 και 30 °C, ενώ στους 5 °C η βλάστηση των σπόρων καθυστέρησε καθώς παρατηρήθηκε έκπτυξη ριζιδίου 61 ημέρες από την εγκατάσταση των σπόρων στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Τα σπορόφυτα αναπτύχθηκαν περαιτέρω και μετά την εμφάνιση ριζιδίου όταν μεταφέρθηκαν στους 15 °C. Η βλάστηση των σπόρων ολοκληρώθηκε πιο γρήγορα

στους 15 °C (22 ημέρες), ενώ στους 10 και 20 °C ολοκληρώθηκε 8-13 ημέρες αργότερα. (Πίν. 2, Σχ. 1)



Σχ. 1. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. unedo* var. *rubra* στους 5, 10, 15, 20, 25 και 30 °C. $n=20$.

Πίνακας 2. Ποσοστό βλάστησης και χρόνος βλάστησης του 50% της μέγιστης βλαστικότητας (T_{50}) σπόρων του *A.unedo* var. *rubra*, όπως διαμορφώθηκαν από τις διάφορες θερμοκρασίες.

Θερμοκρασία (°C)	Βλαστικότητα (%)	T_{50} (ημέρες)
5	00,00	-
10	63,20	26
15	85,00	20
20	38,90	22
25	00,00	-
30	00,00	-

2.1.2.2 Αρχική καλλιέργεια *in vitro*

Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα WPM που περιείχε 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ ZEA χωρίς διαφορά από τον μάρτυρα, ή το υπόστρωμα με 0,2 mg l⁻¹ TDZ. Σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 2,5 mg l⁻¹ ZEA σημειώθηκε ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών (Εικ. 9, Πίν. 3). Το μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν ήταν μεγαλύτερο σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM με 5,0 mg l⁻¹ ZEA, χωρίς διαφορά από εκείνο με 2,5 mg l⁻¹ ZEA. TDZ σε συγκέντρωση 0,2 ή 2,0 mg l⁻¹ έδωσε βλαστούς μικρότερου μήκους, παρόμοιου με εκείνων του μάρτυρα. Ο μεγαλύτερος αριθμός κόμβων και φύλλων παρατηρήθηκε στις επεμβάσεις με 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ ZEA σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM (Εικ. 10, Πίν. 3). Γενικότερα, υποστρώματα που περιείχαν ZEA, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, έδωσαν θετικότερα αποτελέσματα και ως εκ τούτου το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερο (2,8-2,0 και 2,2-2,4, σε MS και WPM αντίστοιχα) (Εικ. 9,10, Πίν. 3).

Πίνακας 3. Επίδραση των κυτοκινινών TDZ και ZEA σε συγκέντρωση 0,2 ή 2,0 mg l⁻¹ και 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹, αντίστοιχα, στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβων από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα *A. unedo* var. *rubra*, σε υπόστρωμα MS ή WPM

Υπόστρωμα (mg l ⁻¹)		Ποσοστό Βλαστ/σης (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων	Μέσος Αριθμός Φύλλων	Δυν. πολ/μού
MS	Hf ¹	53 c	1,4 de	0,5 cd	4,6 b	5,6 b	0,6
	0,2 TDZ	88 b	1,9 bcd	0,6 c	4,3 b	5,3 b	1,7
	2,0 TDZ	63 c	1,7 cde	0,2 e	2,3 c	3,3 c	0,4
	2,5 ZEA	88 b	3,1 a	0,6 c	5,0 b	6,0 b	2,8
	5,0 ZEA	88 b	2,3 b	0,6 bc	5,4 b	6,4 b	2,0
WPM	Hf ¹	100 a	1,4 e	0,5 cd	2,8 c	3,8 c	1,2
	0,2 TDZ	98 ab	1,5 de	0,4 de	3,0 c	4,0 c	1,0
	2,0 TDZ	90 b	1,7 cde	0,3 e	2,7 c	3,7 c	0,8
	2,5 ZEA	100 a	1,9 bc	0,7 ab	6,5 a	7,5 a	2,2
	5,0 ZEA	100 a	1,8 cd	0,8 a	7,2 a	8,2 a	2,4

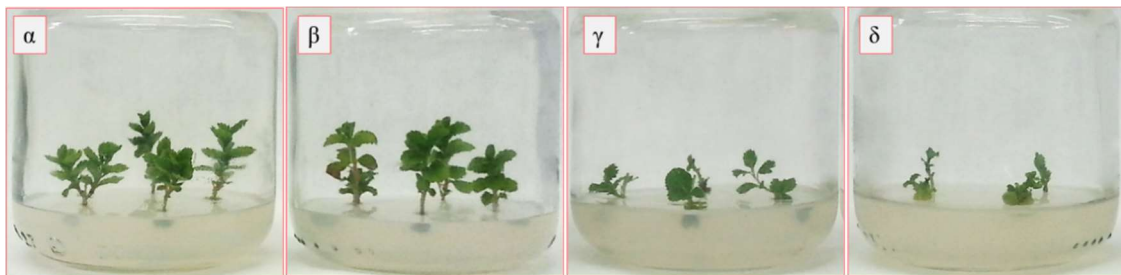
Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 32-44$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6

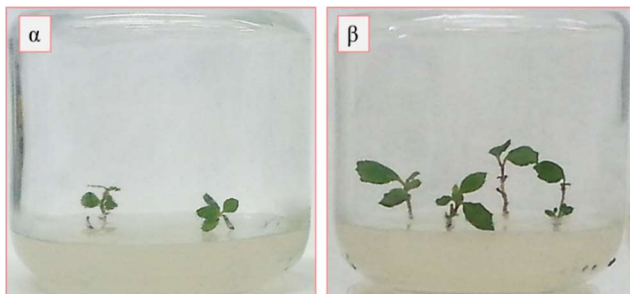
¹Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (Hormone free).



Εικ. 9. Καλλιέργεια κόμβων σποροφύτων *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEA (α και β, αντίστοιχα) και με 0,2 και 2,0 mg l⁻¹ TDZ (γ και δ, αντίστοιχα).



Εικ. 10. Καλλιέργεια κόμβων σποροφύτων *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα WPM εμπλουτισμένο με 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEA (α και β, αντίστοιχα) και με 0,2 και 2,0 mg l⁻¹ TDZ (γ και δ, αντίστοιχα).



Εικ. 11. Καλλιέργεια κόμβων σποροφύτων *A. unedo* var. *rubra* σε MS ή WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (α και β, αντίστοιχα).

3.1.2.3 Πολλαπλασιασμός καλλιεργειών *in vitro*

3.1.2.3.1 Πρώτη υποκαλλιέργεια

Η διπαραγοντική ανάλυση του πειράματος έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της συγκέντρωσης της ZEA και του τύπου θρεπτικού υποστρώματος όσον αφορά στον αριθμό των εκπυσσόμενων βλαστών. Σε ότι αφορά, όμως, στο μήκος των παραγόμενων βλαστών και στον αριθμό κόμβων και φύλλων ανά βλαστό υπήρξε επίδραση τόσο του θρεπτικού υποστρώματος όσο και της συγκέντρωσης της ZEA (Πίν. 4). Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης σημειώθηκε σε υπόστρωμα WPM με 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ ZEA (100%) χωρίς διαφορά από τις αντίστοιχες επεμβάσεις σε υπόστρωμα MS (Εικ. 12,13, Πίν. 4). Σε υπόστρωμα MS χωρίς προσθήκη ZEA (μάρτυρας) παρατηρήθηκε βλαστογένεση σε πολύ χαμηλό ποσοστό. Ο μεγαλύτερος

αριθμός βλαστών σημειώθηκε σε έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 5,0 mg l⁻¹ ZEA, ενώ υψηλότερου μήκους βλαστοί σχηματίστηκαν σε υπόστρωμα MS με 2,5 mg l⁻¹ ZEA (Εικ. 12, Πίν. 4). Ο μεγαλύτερος αριθμός κόμβων και φύλλων ανά βλαστό παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα MS ή WPM που περιείχε 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ ZEA, καθώς και σε υπόστρωμα MS χωρίς προσθήκη φυτορρυθμιστικής ουσίας. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν αρκετά υψηλότερο σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, σχεδόν διπλάσιο και στις δύο συγκεντρώσεις της ZEA, από εκείνο που παρατηρήθηκε σε WPM (Εικ. 12,13,14, Πίν. 4).

Πίνακας 4. Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος και της συγκέντρωσης της ζεατίνης (2,5 και 5,0 mg l⁻¹) στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβων από μικροβλαστούς του *A. unedo* var. *rubra* που παρήχθησαν κατά την αρχική εγκατάσταση της καλλιέργειας

Υπόστρωμα (mg l ⁻¹)		Ποσοστό Βλαστ/σης (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων	Μέσος Αριθμός Φύλλων	Δυν. πολ/μού
MS	Hf ¹	34 c	1,0 d	0,6 abc	4,7 a	5,7 a	0,3
	2,5 ZEA	98 ab	3,6 b	0,8 a	5,6 a	6,6 a	4,7
	5,0 ZEA	93 ab	4,2 a	0,7 b	5,3 a	6,3 a	4,6
WPM	Hf ¹	90 b	1,0 d	0,3 d	3,0 b	4,0 b	0,5
	2,5 ZEA	100 a	2,7 c	0,6 b	5,4 a	6,4 a	2,7
	5,0 ZEA	100 a	2,5 c	0,5 c	5,1 a	6,1 a	2,1
$F_{\text{Συγκέντρωση ζεατίνης}}$			-	*	*	*	
$F_{\text{Τύπος υποστρώματος}}$			-	*	*	*	
$F_{\text{Συγκ. ζεατίνης X Τύπος υποστρ.}}$			*	NS	NS	NS	

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 22-64$.

*: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, NS: μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6

¹Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (Hormone free).



Εικ.12. Βλαστογένεση εκφύτων κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEA (α, β και γ, αντίστοιχα).



Εικ. 13. Βλαστογένεση εκφύτων κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEA (α, β και γ, αντίστοιχα).

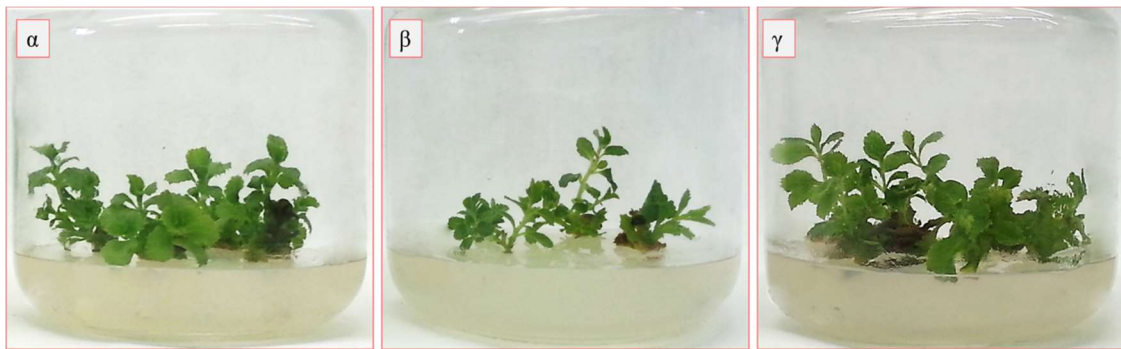
3.1.2.3.2 Δεύτερη υποκαλλιέργεια

Η αλληλεπίδραση των επεμβάσεων και του τύπου του θρεπτικού υποστρώματος τόσο στον αριθμό των εκπτυσσόμενων βλαστών όσο και στον αριθμό των κόμβων και φύλλων που σχηματίστηκαν ανά βλαστό ήταν σημαντική, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε στο μέσο μήκος των βλαστών (Πίν. 5). Το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς επηρεάστηκε από τον τύπο του θρεπτικού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε και ήταν 100% στα υποστρώματα WPM, ανεξαρτήτως επέμβασης, χωρίς διαφορά από την επέμβαση με 5,0 mg l⁻¹ ZEA σε υπόστρωμα MS. Έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εκτός από εκείνα που τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (μάρτυρας), σχημάτισαν τον υψηλότερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε. Το μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν ήταν μεγαλύτερο σε υπόστρωμα MS με 2,5 mg l⁻¹ ZEA και 0,1 mg l⁻¹ NAA. Ο υψηλότερος αριθμός κόμβων και φύλλων ανά βλαστό παρατηρήθηκε σε επέμβαση με 2,5 mg l⁻¹ ZEA και σε αυτή με 2,5 mg l⁻¹ ZEA και 0,1 mg l⁻¹ NAA, ανεξάρτητα από τον τύπο θρεπτικού υποστρώματος. Σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, ανεξαρτήτως επέμβασης, παρατηρήθηκε το υψηλότερο δυναμικό

πολλαπλασιασμού, σχεδόν τριπλάσιο από τις αντίστοιχες επεμβάσεις σε υπόστρωμα WPM (Εικ. 14, 15, 16, Πίν. 5) .



Εικ. 14. Βλαστογένεση εκφύτων κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα MS ή WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (α και β, αντίστοιχα).



Εικ. 15. Βλαστογένεση εκφύτων κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα MS με 2,5, 5,0 mg l⁻¹ ZEA και με 2,5 mg l⁻¹ ZEA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA (α, β και γ, αντίστοιχα).



Εικ. 16. Βλαστογένεση εκφύτων κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα MS με 2,5, 5,0 mg l⁻¹ ZEA και με 2,5 mg l⁻¹ ZEA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA (α, β και γ, αντίστοιχα).

Πίνακας 5. Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος και των επεμβάσεων (mg l^{-1}) στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβων από μικροβλαστούς του *A. unedo* var. *rubra* που παρήχθησαν κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια

Υπόστρωμα (mg l^{-1})		Ποσοστό Βλαστ/σης (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων	Μέσος Αριθμός Φύλλων	Δυν. πολ/μού
MS	Hf ¹	38 c	1,0 cd	0,6 cde	4,5 abcd	5,5 abcd	0,4
	2,5 ZEA	92 b	2,8 a	0,8 b	5,9 a	6,9 a	3,4
	5,0 ZEA	100 a	2,8 a	0,7 c	5,2 b	6,2 b	3,3
	ZEA/NAA 2,5/0,1	88 b	3,1 a	1,0 a	6,3 a	7,3 a	4,6
WPM	Hf ¹	100 a	1,0 d	0,3 e	2,8 d	3,8 d	0,5
	2,5 ZEA	100 a	1,7 bc	0,6 d	5,7 ab	6,7 ab	1,7
	5,0 ZEA	100 a	2,0 b	0,4 e	3,7 c	4,7 c	1,3
	ZEA/NAA 2,5/0,1	100 a	1,6 c	0,6 cd	6,0 a	7,0 a	1,6
$F_{\text{Επέμβαση}}$			-	*	-	-	
$F_{\text{Τύπος υποστρώματος}}$			-	*	-	-	
$F_{\text{επέμβαση X Τύπος υποστρ.}}$			*	NS	*	*	

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 8-95$.

*: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, NS: μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6

¹Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (Hormone free).

3.1.2.3.3 Τρίτη υποκαλλιέργεια

Η διαπαραγοντική ανάλυση του πειράματος ανέδειξε τη σημαντικότητα της επέμβασης όσον αφορά στον αριθμό των παραγόμενων βλαστών ανά έκφυτο, ενώ σημειώθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων όσον αφορά στο μήκος βλαστού, αριθμό κόμβων και αριθμό φύλλων ανά βλαστό (Πίν. 6). Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης σημειώθηκε σε υπόστρωμα MS ή WPM που περιείχε $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA χωρίς διαφορά για τις υπόλοιπες επεμβάσεις σε WPM, ή επέμβαση με $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA σε υπόστρωμα MS (Πίν. 5). Περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο σχηματίστηκαν σε υπόστρωμα MS ή WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA καθώς επίσης και σε υπόστρωμα MS με $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA. Το μεγαλύτερο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε MS ή WPM με $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA, χωρίς διαφορά από εκείνα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με $2,5/0,1$ ZEA/NAA mg l^{-1} . Ο υψηλότερος αριθμός κόμβων και φύλλων ανά βλαστό παρατηρήθηκε σε

επέμβαση με 0,5 mg l⁻¹ ZEA, ανεξάρτητα από τον τύπο του θρεπτικού υποστρώματος. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν αρκετά υψηλότερο σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εκτός του μάρτυρα, χωρίς όμως διαφορά από την επέμβαση με 0,5 mg l⁻¹ ZEA σε υπόστρωμα WPM (Εικ. 17, 18, 19, Πίν. 6).

Πίνακας 6. Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος και των επεμβάσεων (mg l⁻¹) στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβων από μικροβλαστούς του *A. unedo* var. *rubra* που παρήχθησαν κατά την δεύτερη υποκαλλιέργεια

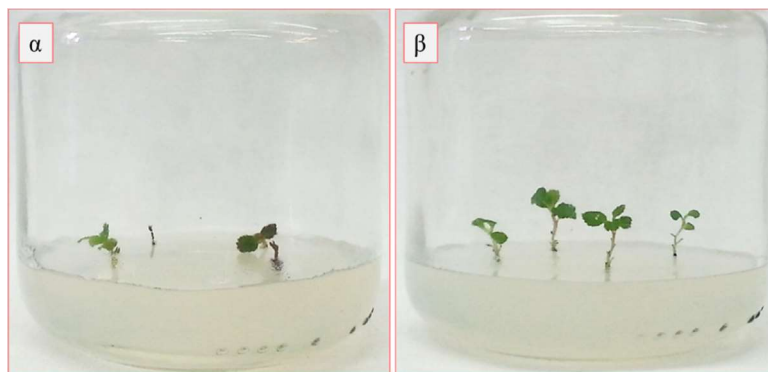
Υπόστρωμα (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων	Μέσος Αριθμός Φύλλων	Δυν. πολ/μού	
MS Hf ¹	50 c	1,0 ef	0,3 cd	2,3 cd	3,3 cd	0,3	
	0,5 ZEA	96 ab	2,5 ab	0,9 a	5,6 a	3,6	
	2,5 ZEA	100 a	2,8 a	0,7 b	4,3 b	3,3	
	ZEA/NAA 2,5/0,1	95 b	2,3 bc	0,9 a	5,7 a	6,7 a	3,3
WPM Hf ¹	100 ab	1,0 f	0,4 d	2,6 d	3,6 d	0,7	
	0,5 ZEA	100 ab	2,1 cd	0,9 a	6,3 a	7,3 a	3,2
	2,5 ZEA	100 a	2,6 ab	0,6 c	4,2 b	5,2 b	2,6
	ZEA/NAA 2,5/0,1	98 ab	2,0 de	0,5 cd	3,9 bc	4,9 bc	1,6
$F_{\text{Επέμβαση}}$		*	-	-	-		
$F_{\text{Τύπος υποστρώματος}}$		NS	-	-	-		
$F_{\text{επέμβαση Χ Τύπος υποστρ.}}$		NS	*	*	*		

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 4-80$.

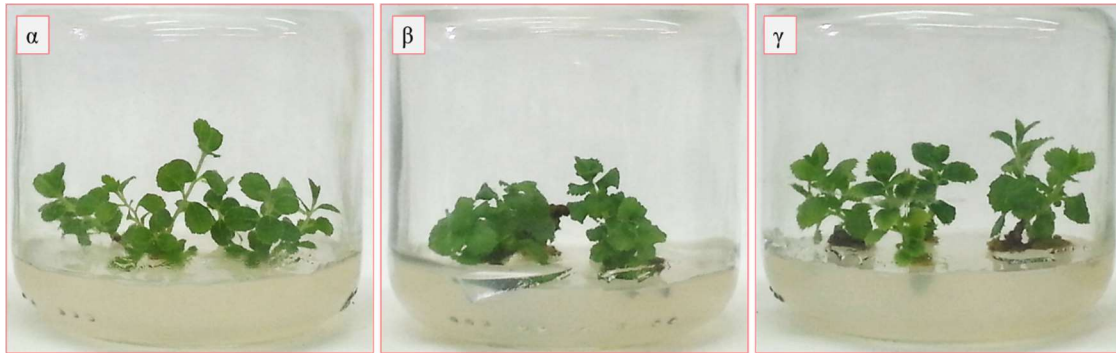
*: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, NS: μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6

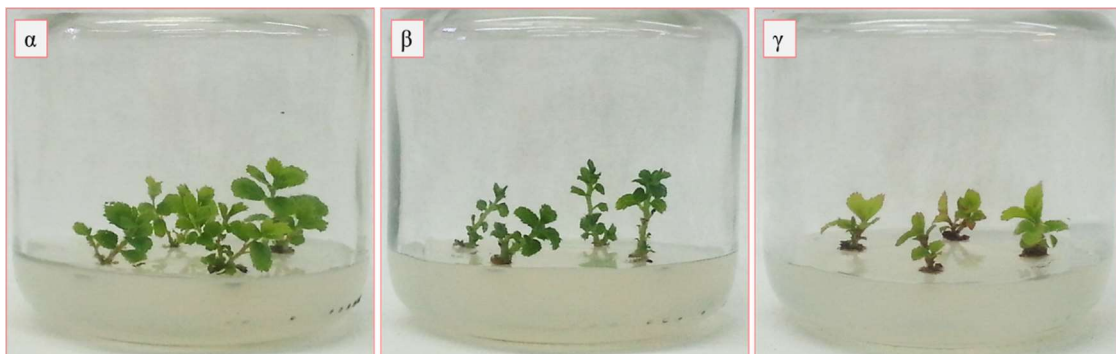
¹Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (Hormone free).



Εικ. 17. Βλαστογένεση εκφύτων κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα MS ή WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (α και β, αντίστοιχα).



Εικ. 18. Βλαστογένεση εκφύτων κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα MS με 0,5, 2,5 mg l⁻¹ ZEA και με 2,5 mg l⁻¹ ZEA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA (α, β και γ, αντίστοιχα).



Εικ. 19. Βλαστογένεση εκφύτων κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα WPM με 0,5, 2,5 mg l⁻¹ ZEA και με 2,5 mg l⁻¹ ZEA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA (α, β και γ, αντίστοιχα).

3.1.2.3.4 Τέταρτη υποκαλλιέργεια

Η διπαραγοντική ανάλυση του πειράματος ανέδειξε τη σημαντικότητα της επέμβασης σχεδόν σε όλα τα εκτιμώμενα χαρακτηριστικά (μήκος βλαστού, αριθμός κόμβων και φύλλων/ βλαστό), ενώ δεν σημειώθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων όσον αφορά στον αριθμό των παραγόμενων βλαστών ανά έκφυτο (Πίν. 7). Το ποσοστό βλαστογένεσης σε όλες της επεμβάσεις, ανεξάρτητα από το είδος του θρεπτικού υποστρώματος, ήταν πολύ υψηλό (94-100%). Σε υπόστρωμα MS με 2,5 mg l⁻¹ ZEA σχηματίστηκαν οι περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο, χωρίς διαφορά για την επέμβαση με 0,5 mg l⁻¹ ZEA. Το μεγαλύτερο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε MS ή WPM με 0,5 mg l⁻¹ ZEA, καθώς και σε αυτά που καλλιεργήθηκαν σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA. Ο υψηλότερος αριθμός κόμβων και φύλλων ανά βλαστό παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα WPM με 0,5 mg l⁻¹ ZEA, χωρίς διαφορά για την επέμβαση με 2,5 mg l⁻¹ ZEA ή επέμβαση με 0,5 mg l⁻¹ ZEA σε υπόστρωμα MS. Στα ανωτέρω θρεπτικά

υποστρώματα παρατηρήθηκε και το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (Εικ. 20, 21, Πίν. 7).

Πίνακας 7. Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος και των φυτορρυθμιστιών ουσιών στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβων από μικροβλαστούς του *A. unedo* var. *rubra* που παρήχθησαν κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια

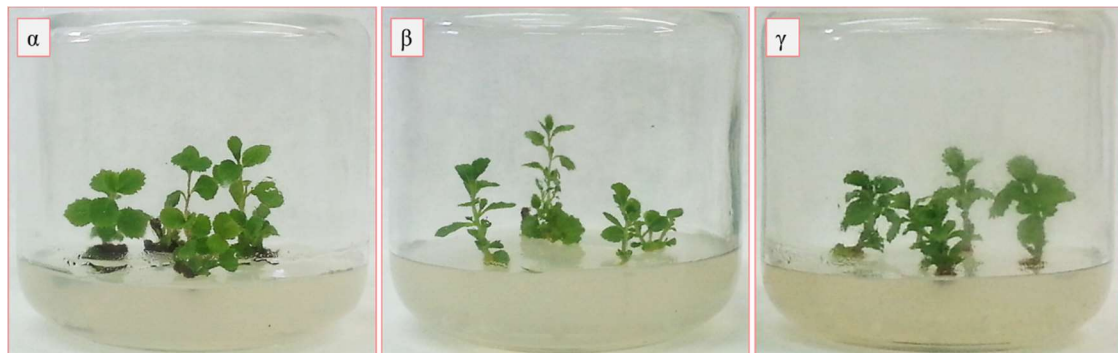
Υπόστρωμα (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων	Μέσος Αριθμός Φύλλων	Δυν. πολ/μού	
MS	0,5 ZEA	98 a	2,5 ab	0,9 a	5,3 ab	6,3 ab	3,7
	2,5 ZEA	97 a	3,0 a	0,7 b	4,5 c	5,5 c	3,4
	ZEA/NAA 2,5/0,1	94 a	2,2 b	0,7 b	4,6 bc	5,6 bc	2,4
WPM	Hf ¹	100 a	1,0 c	0,4 c	2,4 d	3,4 d	0,7
	0,5 ZEA	100 a	2,4 b	0,9 a	5,5 a	6,5 a	3,6
	2,5 ZEA	100 a	2,3 b	0,9 a	5,0 abc	6,0 abc	3,5
	ZEA/NAA 2,5/0,1	100 a	2,4 b	0,6 b	4,3 c	5,3 c	2,4
$F_{\text{Επέμβαση}}$		NS	*	*	*		
$F_{\text{Τύπος υποστρώματος}}$		NS	NS	NS	NS		
$F_{\text{επέμβαση X Τύπος υποστρ.}}$		NS	NS	NS	NS		

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 24-95$.

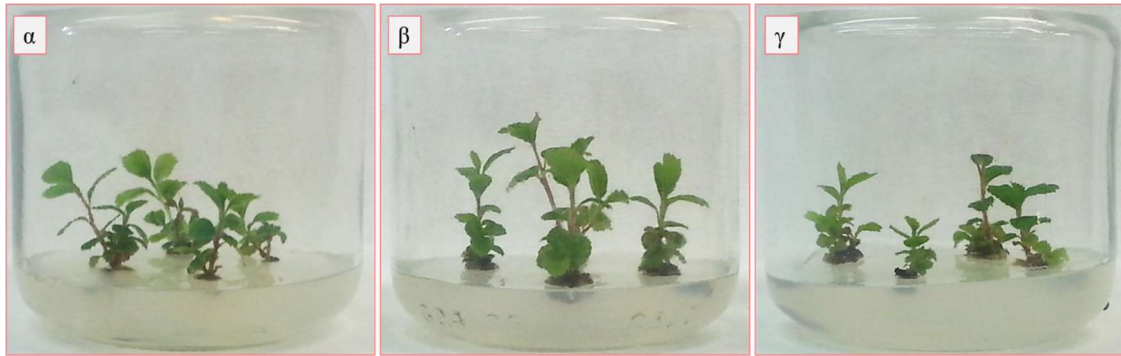
*: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, NS: μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6

¹Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (Hormone free).



Εικ. 20. Βλαστογένεση εκφύτων κατά την τέταρτη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα MS με 0,5, 2,5 mg l⁻¹ ZEA και με 2,5 mg l⁻¹ ZEA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA (α, β και γ, αντίστοιχα).



Εικ. 21. Βλαστογένεση εκφύτων κατά την τέταρτη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα WPM με 0,5, 2,5 mg l⁻¹ ZEA και με 2,5 mg l⁻¹ ZEA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA (α, β και γ, αντίστοιχα).

3.1.2.3.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των τεσσάρων υποκαλλιεργειών

Στο σύνολο των υποκαλλιεργειών σημειώθηκε υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης (92-100%) σε όλα τα μελετώμενα υποστρώματα. Περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο σχηματίστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 5,0 mg l⁻¹ ZEA. Το μεγαλύτερο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 0,5 mg l⁻¹ ZEA, χωρίς διαφορά από εκείνα που καλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα με 2,5 mg l⁻¹ ZEA σε συνδυασμό με NAA σε συγκέντρωση 0,1 mg l⁻¹. Ο υψηλότερος αριθμός κόμβων ανά βλαστό παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA. Η ZEA σε συγκέντρωση 0,5 mg l⁻¹ επέφερε το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού, χωρίς όμως μεγάλη διαφορά από την επέμβαση με χαμηλότερη συγκέντρωση (0,5 mg l⁻¹ ZEA) (Πίν. 8).

Πίνακας 8. Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος (MS ή WPM) και των επεμβάσεων (mg l⁻¹) στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβων κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών.

Υπόστρωμα (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων	Μέσος Αριθμός Φύλλων	Δυν. πολ/μού	
MS	0,5 ZEA	97	2,5 c	0,9 a	5,5 ab	6,5 ab	3,6
	2,5 ZEA	97	2,8 b	0,7 b	4,9 cde	5,9 cde	3,2
	5,0 ZEA	97	3,5 a	0,7 bc	5,2 abc	6,2 abc	4,0
	2,5/0,1 ZEA/NAA	92	2,4 c	0,8 a	5,4 ab	6,4 ab	2,9
WPM	0,5 ZEA	100	2,4 c	0,7 bc	5,0 bcd	6,0 bcd	2,8
	2,5 ZEA	100	1,9 d	0,7 c	5,5 a	6,5 a	2,2
	5,0 ZEA	100	2,3 c	0,4 e	4,5 e	5,5 e	1,5
	2,5/0,1 ZEA/NAA	99	2,0 d	0,6 d	4,7 de	5,7 de	2,0

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 90-165$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6. Μ.Ο υποκαλλιεργειών.

3.1.2.4 Ριζοβολία μικροβλαστών

3.1.2.4.1 Πρώτο πείραμα ριζοβολίας

Μικροβλαστοί 1-2 cm, που είχαν εκπτυχθεί κατά την τρίτη υποκαλλίεργεια, τοποθετήθηκαν στα υποστρώματα ριζοβολίας όπου και παρέμειναν για 40 ημέρες σε θάλαμο ανάπτυξης σταθερών συνθηκών. Με στόχο να βρεθεί το ιδανικό υπόστρωμα ριζοβολίας και με βάση βιβλιογραφικές αναφορές για άλλα είδη του γένους *Arbutus* και της οικογένειας Ericaceae, αρχικά χρησιμοποιήθηκε ορμόνη IBA σε συγκέντρωση 1 ή 2 mg l⁻¹ και ελέγχθηκε η δυνατότητα ριζοβολίας σε θρεπτικό υπόστρωμα MS ή WPM.

Η διπαραγοντική ανάλυση του πειράματος ανέδειξε τη σημαντικότητα του είδους του θρεπτικού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε κατά το στάδιο της ριζοβολίας όσον αφορά στον αριθμό των παραγόμενων ριζών, ενώ σε ότι αφορά το μήκος ριζών υπήρξε επίδραση τόσο του είδους του θρεπτικού υποστρώματος όσο και της συγκέντρωσης του IBA. Το ποσοστό ριζοβολίας του *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα WPM με 1 ή 2 mg l⁻¹ IBA ήταν πολύ υψηλό 88 και 93% αντίστοιχα, ενώ σε υπόστρωμα MS με 1 ή 2 mg l⁻¹ IBA ήταν μόλις 33 και 44% αντίστοιχα. Ως προς τον αριθμό των ριζών που σχηματίστηκαν ανά μικροβλαστό δεν υπήρξαν διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων IBA, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των

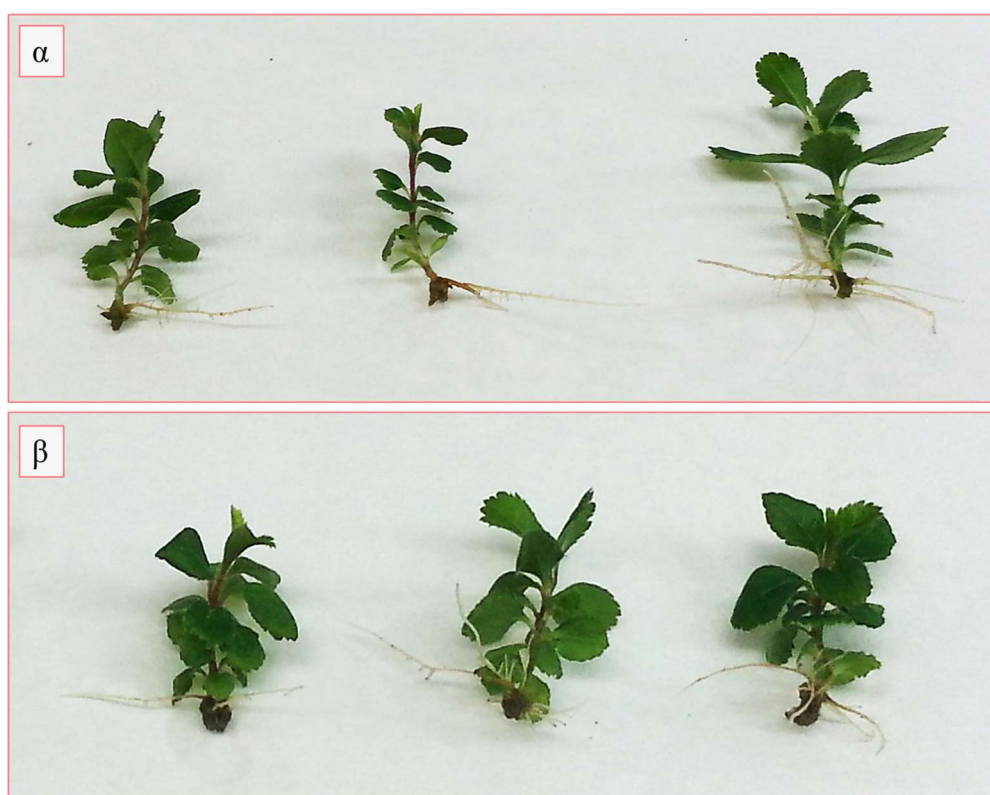
δύο θρεπτικών υποστρωμάτων με το WPM να υπερέχει του MS. Οι ρίζες ήταν μακρύτερες σε υπόστρωμα WPM με 2 mg l⁻¹ IBA (Εικ. 23, 23, Πίν. 8).

Πίνακας 9. Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος (MS ή WPM) και της συγκέντρωσης του IBA (mg l⁻¹) στο ποσοστό ριζοβολίας, στον αριθμό και μήκος ριζών που σχηματίστηκαν ανά ριζοβολημένο μικροβλαστό

Υπόστρωμα (mg l ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος Αριθμός Ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)	
MS	1 IBA	33 b	2,8 b	0,9 c
	2 IBA	44 b	3,6 b	1,0 c
WPM	1 IBA	88 a	5,5 a	1,3 b
	2 IBA	93 a	5,6 a	1,8 a
$F_{\text{Συγκέντρωση}}$		NS	*	
$F_{\text{Τύπος υποστρώματος}}$		*	*	
$F_{\text{Συγκέντρωση X Τύπος υποστρ.}}$		NS	NS	

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 80$.

*: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, NS: μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$.



Εικ. 22. Ριζοβολία μικροβλαστών *A. unedo* var. *rubra* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 1 ή 2 mg l⁻¹ IBA (α και β, αντίστοιχα).



Εικ. 23. Ριζοβολία μικροβλαστών *A. unedo* var. *rubra* σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM με 1 ή 2 mg l⁻¹ IBA (α και β, αντίστοιχα).

3.1.2.4.2 Δεύτερο πείραμα ριζοβολίας

Βιβλιογραφικές πηγές (Mostafa *et al.*, 2010, Parafotiou *et al.*, 2013) αναφέρουν ότι καλύτερη ριζοβολία μικροβλαστών ξυλωδών φυτών μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας θρεπτικό υπόστρωμα υποδιπλασιασμένης δύναμης, καθώς μειώνεται η συγκέντρωση των αλάτων του θρεπτικού υποστρώματος. Έτσι, σε επόμενη ριζοβολία μικροβλαστοί του *Arbutus unedo* var. *rubra* τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS ή WPM υποδιπλασιασμένης δύναμης με 1 mg l⁻¹ IBA.

Μικροβλαστοί που καλλιεργήθηκαν σε ½ WPM με 1 mg l⁻¹ IBA ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με εκείνους που τοποθετήθηκαν σε ½ MS με ίδια συγκέντρωση IBA. Στο ίδιο υπόστρωμα σχηματίστηκαν και περισσότερες ρίζες ανά μικροβλαστό μεγαλύτερου μήκους (Εικ. 24; Πίν. 9).

Πίνακας 10. Ριζοβολία μικροβλαστών που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS ή WPM υποδιπλασιασμένης δύναμης με 1 mg l⁻¹ IBA

Υπόστρωμα (mg l ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος Αριθμός Ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
½ MS + 1 IBA	44 b	3,3 b	1,1 b
½ WPM + 1 IBA	94 a	5,6 a	2,0 a

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 60$.

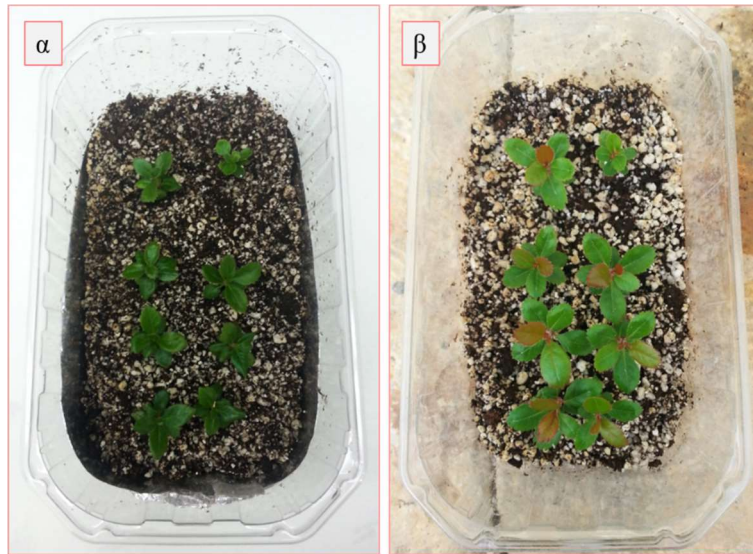


Εικ. 24. Ριζοβολία μικροβλαστών *A. unedo* var. *rubra* σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS με 1 mg l⁻¹ IBA (α) ή ½ WPM με 1 mg l⁻¹ IBA (β).

3.1.2.5 Εγκλιματισμός φυταρίων

Φυτάρια του *A. unedo* var. *rubra* που ριζοβόλησαν *in vitro*, μετά την απομάκρυνση του υποστρώματος από το ριζικό τους σύστημα, φυτεύονταν στα δοχεία καλλιέργειας σε μίγμα τύρφη-περλίτης. Μετά την παρέλευση 1 εβδομάδας των δοχείων καλλιέργειας σε θάλαμο σταθερών συνθηκών (25 °C, 16 h φωτοπερίοδος) αφαιρούνταν η πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος και τα δοχεία μεταφέρονταν στην

υδρονέφωση του θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου από τον Νοέμβριο έως τον Φεβρουάριο, έως την εκτίμηση του εγκλιματισμού ένα μήνα αργότερα. Τα ριζοβολημένα φυτά εγκαταστάθηκαν με απόλυτη επιτυχία (100%) σε *ex vitro* συνθήκες σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1, v/v) (Εικ. 25). Μετά το τέλος του εγκλιματισμού ακολούθησε μεταφύτευση, για περαιτέρω ανάπτυξη, σε γλαστράκια διαμέτρου 10 cm (Εικ. 26).



Εικ. 25. Φυτάρια *A. unedo* var. *rubra*, στα δοχεία εγκλιματισμού, σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1, v/v) 1 εβδομάδα μετά την έναρξη του σταδίου εγκλιματισμού (α) και κατά το τέλος του σταδίου εγκλιματισμού (β).



Εικ. 26. Εγκλιματισμένα φυτάρια *A. unedo* var. *rubra* ηλικίας περίπου 40 ημερών (α) και 2,5 μηνών (β) από την μεταφύτευσή τους σε ατομικά γλαστράκια σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1, v/v).



Εικ. 27. Εγκλιματισμένα φυτάρια *A. unedo* var. *rubra* ηλικίας 3,5 μηνών σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1, v/v).

3.2 *In vitro* πολλαπλασιασμός από ενήλικα φυτά

3.2.1 Υλικά και μέθοδοι

3.2.1.1 Φυτικό υλικό

Για την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών *A. unedo* var. *rubra*, έκφυτα κόμβων βλαστών από ενήλικο αυτοφυές φυτό (Εικ. 4), καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM αφού προηγήθηκε απολύμανση όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.4.1 και σε συνθήκες και με τεχνικές που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.5.2.1. Κατά την αρχική εγκατάσταση χρησιμοποιήθηκαν 5 τύποι εκφύτων, που ανάλογα με τη θέση τους στο μητρικό βλαστό αριθμήθηκαν σε έκφυτα 1, 2, 3, 4 και 5, ξεκινώντας την αρίθμηση από την κορυφή των βλαστών, από την οποία αφαιρούνταν το κορυφαίο μερίστωμα.

3.2.1.2 Υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειας

Με βάση βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τον πολλαπλασιασμό του γένους *Arbutus* και της οικογένειας Ericaceae, κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών από ενήλικο αυτοφυές φυτό *A. unedo* var. *rubra* εξετάστηκε η επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό βλαστό στη βλαστογένεση του είδους σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA.

Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών μελετήθηκε το ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα με την ίδια συγκέντρωση ZEA που είχε χρησιμοποιηθεί και κατά την αρχική εγκατάσταση και επιπλέον υπόστρωμα με διπλάσια συγκέντρωση αυτής (5,0 mg l⁻¹ ZEA). Με βάση τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν από την πρώτη υποκαλλιέργεια και με στόχο την παραγωγή βλαστών ικανοποιητικού μήκους, ακολούθησε επόμενη υποκαλλιέργεια κατά την οποία εξετάστηκε η επίδραση αυξίνης NAA σε συγκέντρωση 0,1 mg l⁻¹ σε συνδυασμό με 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ ZEA. Με στόχο την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της δεύτερης υποκαλλιέργειας ακολούθησε επόμενη υποκαλλιέργεια στα ίδια ακριβώς υποστρώματα. Κατά την τελευταία υποκαλλιέργεια εξετάστηκε η επίδραση της ζεατίνης σε χαμηλότερη συγκέντρωση από εκείνη που είχε χρησιμοποιηθεί έως τότε (0,5 mg l⁻¹) και σε αρκετά πιο υψηλή (10,0 mg l⁻¹).

Στο στάδιο της ριζοβολίας, λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα της ριζοβολίας μικροβλαστών του *A. unedo* var. *rubra* που είχαν προέλθει από νεανικούς ιστούς *in vitro* ανεπτυγμένων σπορόφυτων, χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα WPM υποδιπλασιασμένης δύναμης (½ WPM) που περιείχε 1 mg l⁻¹ IBA.

3.2.2 Αποτελέσματα

3.2.2.1 Αρχική καλλιέργεια *in vitro*

Το ποσοστό αντίδρασης για το σχηματισμό βλαστών κυμάνθηκε από 54 έως 67% (Πίν. 10). Περισσότεροι βλαστοί σχηματίστηκαν στα έκφυτα (1), χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά από τα έκφυτα των θέσεων (2), (3) και (4). Αντίθετα, το μήκος των μικροβλαστών ήταν μεγαλύτερο στα έκφυτα της θέσης (5), αλλά και σε εκείνα της θέσης (4) αποτελέσματα που εξηγούν το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού που παρουσίασαν τα έκφυτα της θέσης (4 και 5). Τα ίδια έκφυτα σημείωσαν και τον υψηλότερο αριθμό κόμβων και φύλλων ανά βλαστό (Εικ. 28, Πίν. 10).

Ανεξαρτήτως της θέσης του εκφύτου στο μητρικό βλαστό, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 63% και τα έκφυτα σχημάτισαν κατά μέσο όρο 1,4 βλαστούς μήκους 1 cm (Πίν. 10).

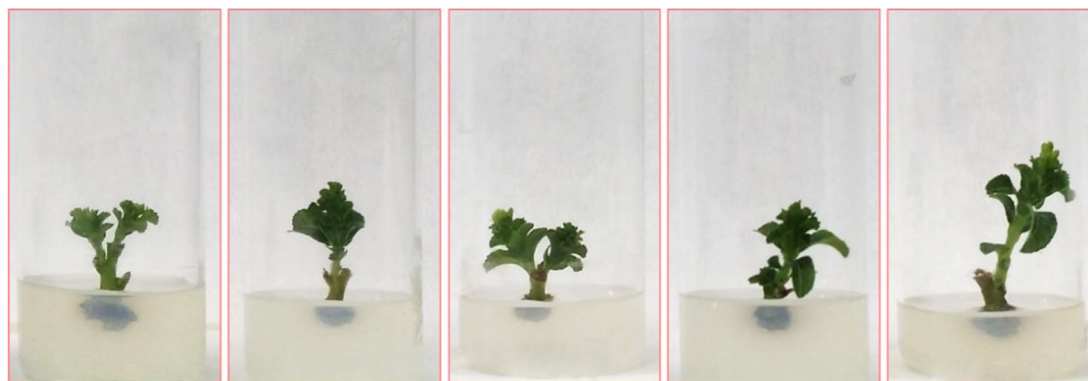
Πίνακας 11. Επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό βλαστό στη βλαστογένεση *unedo* var. *rubra*. Καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA.

Θέση εκφύτου	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων	Μέσος Αριθμός Φύλλων	Δυν. πολ/μ
1	67 a	1,8 a	0,5 c	5,3 c	6,3 c	1,0
2	65 a	1,3 ab	0,9 b	9,5 b	10,5 b	1,3
3	67 a	1,4 ab	0,9 bc	9,9 b	10,9 b	1,4
4	63 a	1,3 ab	1,2 ab	11,5 ab	12,5 ab	1,6
5	54 b	1,1 b	1,6 a	13,8 a	14,8 a	1,6
Συνολικά ¹	63	1,4	1,0	9,8	10,8	1,5

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 24$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών : μήκος βλαστών/0,6

¹αποτελέσματα ανεξαρτήτως θέσης εκφύτου.



Εικ. 28. Βλαστογένεση σε έκφυτα θέσης (1), (2), (3), (4) και (5) (από αριστερά προς τα δεξιά) *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA.

3.2.2.2 Πολλαπλασιασμός καλλιέργειών *in vitro*

3.2.2.2.1 Πρώτη υποκαλλιέργεια

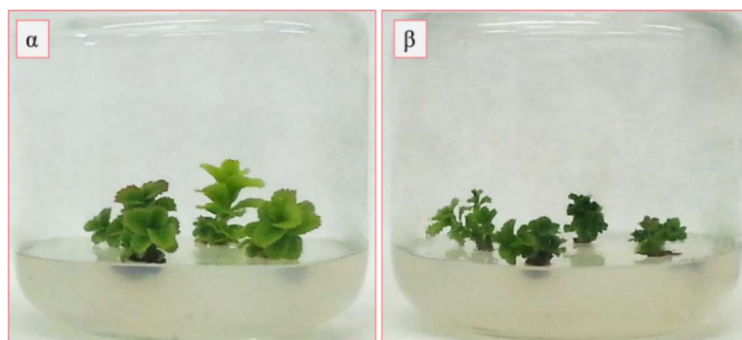
Όλα τα έκφυτα που μεταφυτεύθηκαν από το υπόστρωμα αρχικής καλλιέργειας σε υπόστρωμα WPM με 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ ZEA αντέδρασαν σε ποσοστό 100% (Πίν. 11). Ο αριθμός βλαστών που σχηματίστηκαν ήταν υψηλότερος στο υπόστρωμα με 5,0 mg l⁻¹ ZEA (3,5 βλαστοί/ έκφυτο), αλλά το μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών ήταν πολύ μικρό και στα δύο υποστρώματα. Ο υψηλότερος αριθμός κόμβων και φύλλων παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με τη μικρότερη συγκέντρωση ZEA (2,5 mg l⁻¹), χωρίς όμως μεγάλη διαφορά από το υπόστρωμα με 5,0 mg l⁻¹ ZEA (Εικ. 29, Πίν.11.). Ως εκ τούτου το δυναμικό πολλαπλασιασμού της υποκαλλιέργειας ήταν παρόμοιο και για τα δύο υποστρώματα (Πίν. 11).

Πίνακας 12. Επίδραση της συγκέντρωσης της ζεαΐνης (2,5 ή 5,0 mg l⁻¹) στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβων από μικροβλαστούς του *A. unedo* var. *rubra* που παρήχθησαν κατά την αρχική εγκατάσταση. Καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM

Υπόστρωμα (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων	Μέσος Αριθμός Φύλλων	Δυν. πολ/μού
2,5 ZEA	100 a	2,6 b	0,6 a	7,2 a	8,2 a	2,6
5,0 ZEA	100 a	3,5 a	0,5 b	6,2 b	7,2 b	2,9

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 50-54$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6



Εικ. 29. Βλαστογένεση εκφύτων κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε WPM με 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEA (α και β, αντίστοιχα).

3.2.2.2.3 Δεύτερη υποκαλλιέργεια

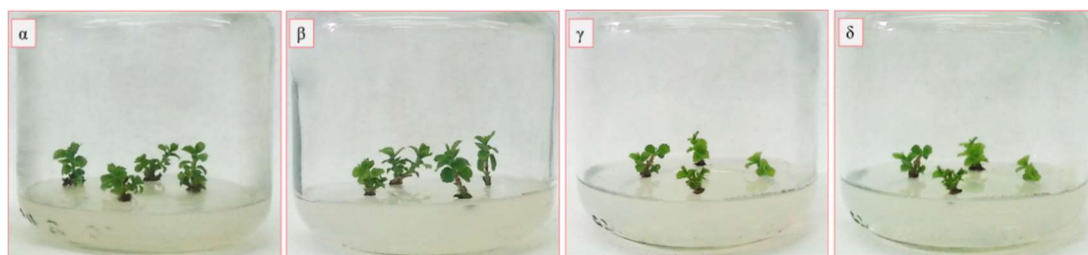
Το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς ήταν 100% και για τα τέσσερα υποστρώματα (Πίν. 12). Έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 5,0 mg l⁻¹ ZEA σχημάτισαν τον υψηλότερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, χωρίς όμως διαφορά από εκείνα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 5,0 mg l⁻¹ ZEA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA (Εικ. 30, Πίν. 12,). Το μεγαλύτερο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 2,5 mg l⁻¹ ZEA, είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA. Στα ίδια υποστρώματα παρατηρήθηκε και ο υψηλότερος αριθμός κόμβων και φύλλων ανά βλαστό (Εικ. 30, Πίν. 12). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερο στο υπόστρωμα με 2,5 mg l⁻¹ ZEA, χωρίς όμως μεγάλη διαφορά από τα υπόλοιπα υποστρώματα (Πίν. 12).

Πίνακας 13. Επίδραση του υποστρώματος στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβων από μικροβλαστούς του *A. unedo* var. *rubra* που παρήχθησαν κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια. Καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM.

Υπόστρωμα (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων	Μέσος Αριθμός Φύλλων	Δυν. πολ/μού
2,5 ZEA	100 a	2,0 bc	0,6 a	5,3 a	6,3 a	2,0
2,5/0,1 ZEA/NAA	100 a	1,7 c	0,6 a	5,7 a	6,7 a	1,7
5,0 ZEA	100 a	2,9 a	0,4 b	3,1 b	4,1 b	1,9
5,0/0,1 ZEA/NAA	100 a	2,4 ab	0,4 b	3,2 b	4,2 b	1,6

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 24-32$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6



Εικ. 30. Βλαστογένεση εκφύτων κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA και $2,5/0,1 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA/NAA (α και β, αντίστοιχα) και με $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA και $5,0/0,1 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA/NAA (γ και δ, αντίστοιχα).

3.2.2.2.3 Τρίτη υποκαλλιέργεια

Το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς ήταν 100% για όλες τις μεταχειρίσεις και αυτή τη φορά (Πίν. 13). Παρόλο που το υπόστρωμα με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA έδωσε περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο που αντέδρασε, το υψηλότερο μήκος αυτών παρατηρήθηκε σε έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με την ίδια συγκέντρωση ZEA σε συνδυασμό, όμως, με $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ NAA (Εικ. 31, Πίν. 13). Στο ίδιο υπόστρωμα, δηλ. WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA και $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ NAA, παρατηρήθηκε και ο υψηλότερος αριθμός κόμβων και φύλλων ανά βλαστό (Εικ. 31, Πίν. 13). Υπόστρωμα με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA εμφάνισε το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού, χωρίς όμως μεγάλη διαφορά από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις (Πίν. 13).

Πίνακας 14. Επίδραση του υποστρώματος στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβων από μικροβλαστούς του *A. unedo* var. *rubra* που παρήχθησαν κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια. Καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM

Υπόστρωμα (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων	Μέσος Αριθμός Φύλλων	Δυν. πολ/μού
2,5 ZEA	100 a	3,2 a	0,5 b	3,7 b	4,7 b	2,7
2,5/0,1 ZEA/NAA	100 a	1,7 c	0,7 a	5,7 a	6,7 a	2,0
5,0 ZEA	100 a	2,6 b	0,5 b	4,0 b	5,0 b	2,2
5,0/0,1 ZEA/NAA	100 a	2,1 bc	0,6 b	4,4 b	5,4 b	2,1

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 20-32$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6



Εικ. 31. Βλαστογένεση εκφύτων κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA και 2,5/0,1 mg l⁻¹ ZEA/NAA (α και β, αντίστοιχα) και με 5,0 mg l⁻¹ ZEA και 5,0/0,1 mg l⁻¹ ZEA/NAA (γ και δ, αντίστοιχα).

3.2.2.2.4 Τέταρτη υποκαλλιέργεια

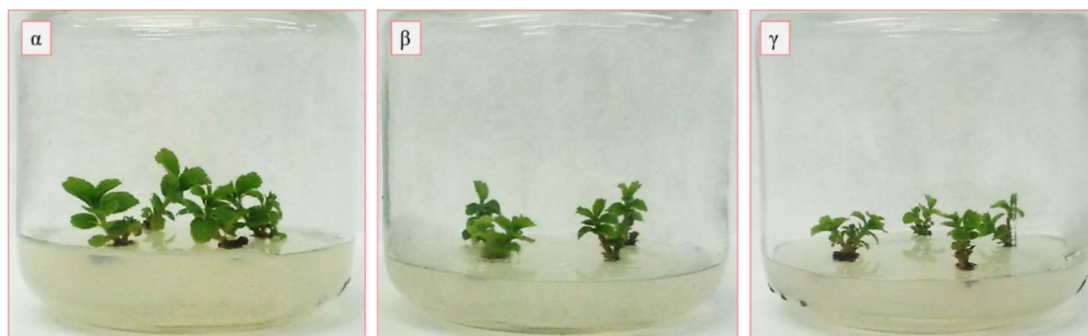
Το ποσοστό βλαστογένεσης σε όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν, ανεξάρτητα από την συγκέντρωση της ZEA, ήταν πολύ υψηλό (93-100%), με ικανοποιητική παραγωγή βλαστών, καθώς σχηματίστηκαν 2,1-2,5 βλαστοί άνα έκφυτο (Εικ. 32, Πίν. 14). Το μεγαλύτερο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 0,5 ή 2,5 mg l⁻¹ ZEA. Στα ίδια υποστρώματα παρατηρήθηκε και ο υψηλότερος αριθμός κόμβων και φύλλων ανά βλαστό (Εικ. 32, Πίν. 14). Υπόστρωμα με 0,5 mg l⁻¹ ZEA εμφάνισε το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού, χωρίς όμως μεγάλη διαφορά από την επέμβαση με 2,5 mg l⁻¹ ZEA (Πίν. 14).

Πίνακας 15. Επίδραση της συγκέντρωσης της ζεατίνης (0,5, 2,5 ή 10,0 mg l⁻¹) στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβων από μικροβλαστούς του *A. unedo* var. *rubra* που παρήχθησαν κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια. Καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM

Υπόστρωμα (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων	Μέσος Αριθμός Φύλλων	Δυν. πολ/μού
0,5 ZEA	100 a	2,4 a	0,7 a	5,1 a	6,1 a	2,8
2,5 ZEA	100 a	2,1 a	0,6 a	4,9 a	5,9 a	2,1
10,0 ZEA	93 a	2,5 a	0,4 b	2,7 b	3,7 b	1,6

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 28$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6



Εικ. 32. Βλαστογένεση εκφύτων κατά την τέταρτη υποκαλλιέργεια *A. unedo* var. *rubra* σε WPM με 0,5, 2,5 και 10,0 mg l⁻¹ ZEA (α, β και γ, αντίστοιχα).

3.2.2.5 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των τεσσάρων υποκαλλιεργειών

Στο σύνολο των υποκαλλιεργειών σημειώθηκε υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης (93-100%) σε όλα τα μελετώμενα υποστρώματα. Περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο σχηματίστηκαν σε υπόστρωμα με 5,0 mg l⁻¹ ZEA. Το μεγαλύτερο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε 0,5 mg l⁻¹ ZEA, χωρίς διαφορά από εκείνα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 2,5/0,1 mg l⁻¹ ZEA/NAA. Ο υψηλότερος αριθμός κόμβων ανά βλαστό παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα με 2,5/0,1 mg l⁻¹ ZEA/NAA, όπως και σε εκείνα που περιείχαν ZEA σε συγκέντρωση 0,5 ή 2,5 mg l⁻¹.

Η ZEA σε χαμηλή συγκέντρωση (0,5 mg l⁻¹) επέφερε το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού, χωρίς όμως μεγάλη διαφορά από την επέμβαση με 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ ZEA.

Πίνακας 16. Επίδραση της ZEA σε συγκέντρωση 0,5, 2,5, 5,0 και 10,0 mg l⁻¹ καθώς και των συνδυασμών 2,5/0,1 mg l⁻¹ ZEA/NAA και 5,0/0,1 mg l⁻¹ ZEA/NAA στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβων, κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών σε υπόστρωμα WPM.

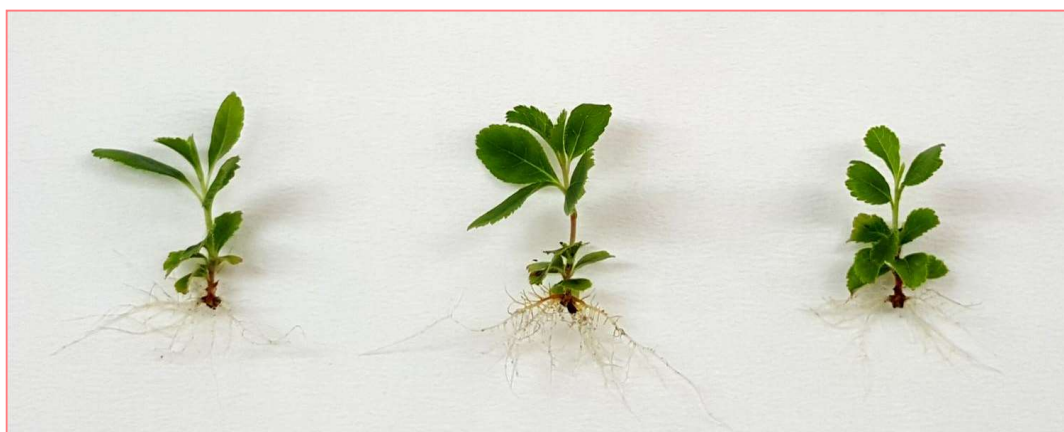
Υπόστρωμα (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων	Μέσος Αριθμός Φύλλων	Δυν. πολ/μού
0,5 ZEA	100	2,4 b	0,7 a	5,1 ab	6,1 ab	2,8
2,5 ZEA	100	2,5 b	0,6 b	5,6 a	6,6 a	2,5
5,0 ZEA	100	3,1 a	0,5 c	4,9 b	5,9 b	2,6
10,0 ZEA	93	2,5 b	0,4 d	2,7 d	3,7 d	1,6
2,5/0,1 ZEA/NAA	100	1,7 c	0,7 a	5,7 a	6,7 a	2,0
5,0/0,1 ZEA/NAA	100	2,3 b	0,5 c	3,8 c	4,8 c	1,9

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 30-145$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6. Μ.Ο υποκαλλιεργειών.

3.2.2.3 Ριζοβολία μικροβλαστών

Η ριζοβολία του *A. unedo* var. *rubra* από νεανικούς βλαστούς ενήλικου αυτοφυούς φυτού ήταν 100% επιτυχής σε υπόστρωμα ½ WPM με 1 mg l⁻¹ IBA, δίνοντας ικανοποιητικό αριθμό ριζών (4,3 ρίζες ανά μικροβλαστό) μήκους 2,1 cm (Εικ. 33).



Εικ. 33. Ριζοβολία μικροβλαστών *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα ½ WPM με 1 mg l⁻¹ IBA.

3.2.2.4 Εγκλιματισμός φυταρίων

Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί του *A. unedo* var. *rubra* με καλά αναπτυγμένο ριζικό σύστημα, που προέκυψαν από καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν *in vitro* από ενήλικο αυτοφύες φυτό, τοποθετήθηκαν σε διάφανα πλαστικά δοχεία όγκου 2 l για εγκλιματισμό (οχτώ φυτάρια ανά δοχείο) σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη 1:1 v/v. Μετά από παρέλευση 1 εβδομάδας των δοχείων καλλιέργειας σε θάλαμο σταθερών συνθηκών αφαιρέθηκε η πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος και τα δοχεία μεταφέρθηκαν στην υδρονέφωση του θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου τον Απρίλιο. Τα ριζοβολημένα φυτάρια εγκαταστάθηκαν με απόλυτη επιτυχία (100%) σε *ex vitro* συνθήκες και μετά το τέλος του εγκλιματισμού μεταφύτευθηκαν σε γλαστράκια διαμέτρου 10 cm για να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους (Εικ. 34).



Εικ. 34. Φυτάρια *A. unedo* var. *rubra*, σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη (1:1, v/v) 1 εβδομάδα μετά την έναρξη του σταδίου εγκλιματισμού (α) και κατά το τέλος του εγκλιματισμού (β).

3.3 Συζήτηση – Συμπεράσματα

3.3.1 *In vitro* πολλαπλασιασμός από ιστούς σποροφύτων

Στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δεν βρέθηκαν αναφορές σχετικά με οποιαδήποτε μέθοδο πολλαπλασιασμού του *A. unedo* var. *rubra*, όπως συμβαίνει με άλλα είδη του γένους. Η παρούσα μελέτη αφορά τον μικροπολλαπλασιασμό του φυτού και οι πρώτες προσπάθειες εγκατάστασης καλλιεργειών έγιναν με τη χρήση εκφύτων προερχόμενα από σπορόφυτα που είχαν βλαστήσει *in vitro*. Νεανικοί ιστοί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως αρχικό υλικό για τον μικροπολλαπλασιασμό αρκετών ειδών, ανάμεσα σε αυτά και τα τρία πιο δημοφιλή είδη του γένους, *A. unedo*, *A. andrachne* και το φυσικό τους υβρίδιο *A. x andrachnoides* που συναντώνται στην Ελλάδα (Mostafa *et al.*, 2010, Papafotiou *et al.*, 2013).

Με στόχο τη λήψη σποροφύτων μελετήθηκε και η βλαστικότητα του σπόρου του *A. unedo* var. *rubra*. Η βλάστηση των σπόρων επηρεάστηκε από τη θερμοκρασία και βλάστησαν σε υψηλό ποσοστό (85 %) στους 15 °C. Επίσης, αρκετά υψηλό ποσοστό βλαστικότητας παρατηρήθηκε και στους 10 °C. Άνοδος της θερμοκρασίας πέραν των 15 °C οδήγησε σε πτώση της βλαστικότητας. Στους 20 °C οι σπόροι βλάστησαν σε χαμηλό ποσοστό, ενώ στους 25 και 30 °C η βλάστηση ήταν μηδενική. Στους 5 °C η βλάστηση των σπόρων καθυστέρησε καθώς παρατηρήθηκε έκπτυξη ριζιδίου 61 ημέρες από την εγκατάσταση των σπόρων στο υπόστρωμα καλλιέργειας και τα σπορόφυτα δεν αναπτύχθηκαν περαιτέρω έως την μεταφορά τους στους 15 °C. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχαν παρατηρήσει οι Bertsoouklis and Papafotiou (2013) και οι Olmez *et al.* (2007) κατά την στρωμάτωση των σπόρων των *A. unedo* και *A. andrachne*.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, διαπιστώθηκε ότι οι σπόροι του *A. unedo* var. *rubra* βλαστάνουν σε υψηλό ποσοστό και σε σύντομο χρονικό διάστημα (22 ημέρες) στους 15 °C χωρίς να έχει προηγηθεί οποιαδήποτε μεταχείριση. Τα ευρήματά μας συμφωνούν με των Bertsoouklis and Papafotiou (2013), όπου σε έρευνα τους σχετικά με τη βλάστηση των σπόρων του *A. unedo*, *A. andrachne* και του φυσικού τους υβριδίου διαπίστωσαν ως βέλτιστη θερμοκρασία βλάστησης τους 15 °C χωρίς επίσης κάποια προμεταχείριση, αντίθετα από αναφορές στη βιβλιογραφία περί ύπαρξης ληθάργου στους σπόρους των ειδών αυτών (Karam and Al-Salem, 2001, Tilki, 2004, Hammami *et al.*, 2005, Olmez *et al.*, 2007, Demirsoy *et al.*, 2010, Ertekin and Kirdar, 2010, Mostafa *et al.*, 2010). Σπόροι και των τριών ειδών του γένους βλάστησαν σε υψηλό ποσοστό στους 15 °C, στους 20 °C η βλαστικότητα μειώθηκε αρκετά ενώ στους 25 °C ήταν σχεδόν μηδενική. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν

για ακόμα μία φορά πως η βλάστηση των σπόρων εξαρτάται από την κατάλληλη θερμοκρασία και πως η αδυναμία βλάστησής τους σε μη ευνοϊκές συνθήκες και θερμοκρασίες δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως ένδειξη ληθάργου, κάτι που είχαν επισημάνει και προηγούμενοι μελετητές (Thompson and Ooi, 2010, Bertsoouklis and Parafotiou, 2013).

Κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών από ιστούς σποροφύτων, με βάση βιβλιογραφικές αναφορές για άλλα είδη, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα της ZEA σε σύγκριση με εκείνης του TDZ, καθώς, γνωρίζοντας το υψηλό κόστος της ζεατίνης, αναζητούσαμε μία πιο οικονομική λύση. Ταυτόχρονα, εξετάσαμε την αποτελεσματικότητα του θρεπτικού υποστρώματος WPM σε σχέση με το MS.

Ο τύπος του θρεπτικού υποστρώματος φάνηκε να επηρεάζει την ανταπόκριση του *A. unedo* var. *rubra*, καθώς θρεπτικό υπόστρωμα WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες επέφερε διπλάσιο ποσοστό βλαστογένεσης από το αντίστοιχο υπόστρωμα MS. Οι Parafotiou *et al.* (2013) κάνουν λόγο για επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος στην αρχική εγκατάσταση του *A. andrachne* από ιστούς σποροφύτων, καθώς το 1/3 των εκφύτων που τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS δεν έδωσε βλαστούς, ενώ στα δύο άλλα είδη (*A. unedo* και *A. x andrachnoides*) δεν παρατήρησαν καμία διαφορά.

Η προσθήκη ZEA σε συγκέντρωση 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ και του TDZ σε συγκέντρωση 0,2 mg l⁻¹ επέφερε υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης, ενώ η αύξηση της συγκέντρωσης του TDZ σε 2,0 mg l⁻¹ οδήγησε σε μείωση της βλαστογένεσης. Ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών ανά έκφυτο, το μήκος των βλαστών και ο αριθμός των κόμβων ανά βλαστό που εκπύχθηκε ήταν υψηλότερος στα υποστρώματα που περιείχαν ZEA, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης. Ως εκ τούτου το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν αρκετά υψηλότερο για τα υποστρώματα που περιείχαν ZEA.

Τα αποτελέσματα της μελέτης, όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της ZEA, συμφωνούν με αναφορές σχετικά με την εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών άλλων ειδών του γένους *Arbutus* από ιστούς σποροφύτων. Οι Parafotiou *et al.* (2013) διαπίστωσαν ότι η παρουσία της ZEA στο θρεπτικό υπόστρωμα αύξησε το δυναμικό πολλαπλασιασμού των *A. unedo*, *A. andrachne* και του φυσικού τους υβριδίου, ενώ θετικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της ZEA είχαν επισημάνει και οι Mostafa *et al.* (2010). Επίσης, τα αποτελέσματα της έρευνας συμφωνούν και με βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό διαφόρων ειδών της οικογένειας Ericaceae, όπου η χρήση φυσικών κυτοκινινών, ZEA και 2iP, έχει αποδειχθεί πιο

αποτελεσματική σε σχέση με τις συνθετικές, όπως το TDZ (Ostrolucka *et al.*, 2002, George *et al.*, 2008).

Το TDZ κρίνεται ακατάλληλο για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας καθώς προκάλεσε το σχηματισμό παραμορφωμένων, μικρού μήκους βλαστών, τη δημιουργία κάλου και κατ' επέκταση επηρέασε αρνητικά το δυναμικό πολλαπλασιασμού. Αρνητικές επιδράσεις του TDZ, όπως σχηματισμός κάλου, υπερενυδάτωση και μικροί παραμορφωμένοι βλαστοί έχουν παρατηρηθεί κατά τον μικροπολλαπλασιασμό αρκετών ειδών συμπεριλαμβανομένων και πολλών ειδών της οικογένειας Ericaceae (Debnath, 2005, Gomez *et al.*, 2010, Guo *et al.*, 2011). Παρόλα αυτά, οι Mostafa *et al.* (2010) και El-Sayed El-Mahrouk *et al.* (2010) αναφέρουν παραγωγή βλαστών μήκους τουλάχιστον 1 cm χωρίς να είναι παραμορφωμένοι σε καλλιέργεια *A. andrachne* και *A. unedo*, αντίστοιχα.

Το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών είναι μείζονος σημασίας για τη δημιουργία ενός πρωτόκολλου *in vitro* πολλαπλασιασμού. Στόχος του σταδίου αυτού ήταν η παραγωγή περισσότερων και μεγαλύτερου μήκους βλαστών ανά έκφυτο. Μετά την αρχική επιτυχή εγκατάσταση σε υπόστρωμα MS ή WPM που περιείχε ZEA και βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τον μικροπολλαπλασιασμό των τριών συγγενών ειδών του γένους *Arbutus* (*A. unedo*, *A. andrachne* και *A. x andrachnoides*) ακολούθησαν υποκαλλιέργειες κατά τις οποίες διερευνήθηκε, και στο στάδιο αυτό, η επίδραση του είδους του θρεπτικού υποστρώματος (WPM και MS). Η ZEA χρησιμοποιήθηκε μόνη της σε συγκεντρώσεις 0,5, 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ ή σε συνδυασμό με NAA σε συγκέντρωση 0,1 mg l⁻¹.

Γενικά, στο σύνολο των υποκαλλιεργειών σημειώθηκε υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης σε όλα τα υποστρώματα. Σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 5,0 mg l⁻¹ ZEA σχηματίστηκαν περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο που τοποθετήθηκε. Το μέσο μήκος των παραγόμενων βλαστών ήταν παρόμοιο σε όλα τα υποστρώματα και παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα όπως και στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης. Ούτε η μείωση της συγκέντρωσης της ZEA αλλά ούτε και η προσθήκη NAA στο υπόστρωμα δεν βοήθησε στην επιμήκυνση των παραγόμενων βλαστών. Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα MS με 5,0 mg l⁻¹ ZEA, χωρίς μεγάλη διαφορά από εκείνο που περιείχε ZEA σε συγκέντρωση 0,5 mg l⁻¹. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με εκείνα των Παπαφωτίου *et al.* (2013) καθώς κατέγραψαν μεγαλύτερη παραγωγή βλαστών σε υπόστρωμα MS απ' ότι WPM. Η αποτελεσματικότητα της ZEA

δεν επηρεάστηκε από τη συγκέντρωση και ήταν εξίσου ικανοποιητική και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπως και στην παρούσα μελέτη.

Το στάδιο της ριζοβολίας και του εγκλιματισμού είναι εξαιρετικά σημαντικό για την επιτυχία μίας μεθόδου μικροπολλαπλασιασμού. Χωρίς την δημιουργία ενός καλά ανεπτυγμένου ριζικού συστήματος ο εγκλιματισμός των ριζοβολημένων φυταρίων είναι αρκετά δύσκολος και κατ' επέκταση μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά ο αριθμός του πολλαπλασιαστικού υλικού (Gomes *et al.*, 2010). Στην παρούσα μελέτη η ποικιλία *A. unedo* var. *rubra* ριζοβόλησε χωρίς δυσκολία. Στο σύνολο των πειραμάτων ριζοβολίας βλαστών που προήλθαν από την καλλιέργεια κόμβων σποροφύτων, το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα WPM υποδιπλασιασμένης δύναμης με 1 mg l⁻¹ IBA, ενώ το ποσοστό μειώθηκε κατά το ήμισυ (44%) όταν χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα υποδιπλασιασμένης δύναμης MS με την ίδια συγκέντρωση αυξίνης. Τα ευρήματα της μελέτης συμφωνούν με τα χαμηλά ποσοστά (20-40%) που αναφέρουν οι Mostafa *et al.* (2010) για τη ριζοβολία μικροβλαστών *A. andrachne* από σπορόφυτα σε ½ MS με 1-3 mg l⁻¹ IBA. Γενικότερα, σε υπόστρωμα MS είτε πλήρες είτε υποδιπλασιασμένης δύναμης παρατηρήθηκε χαμηλότερο ποσοστό ριζοβολίας με φυτάρια χωρίς καλά ανεπτυγμένο ριζικό σύστημα. Αντίστοιχα αποτελέσματα, όσον αφορά την αποτελεσματικότητα των δύο θρεπτικών υποστρωμάτων, είχαν διαπιστώσει και οι Parafotiu *et al.* (2013) για την ριζοβολία μικροβλαστών από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα του *A. unedo*, *A. andrachne* και *A. x andrachnoides*, καθώς υπόστρωμα WPM με 1 ή 2 mg l⁻¹ IBA ήταν πιο αποτελεσματικό από το MS δίνοντας ποσοστό ριζοβολίας 82-97 %. Υπάρχουν αναφορές που κρίνουν απαραίτητη την παρουσία IBA ή οποιασδήποτε αυξίνης στο υπόστρωμα για την *in vitro* ριζοβολία ειδών του γένους *Arbutus*, καθώς η απουσία IBA ή χαμηλές συγκεντρώσεις αυτής (0,2-0,5) επηρέασαν αρνητικά τη ριζοβολία (Μπερτσουκλής, 2012). Έτσι, στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε η παρουσία IBA στο υπόστρωμα σε συγκέντρωση 1 ή 2 mg l⁻¹. Η αύξηση της συγκέντρωσης του IBA από 1 σε 2 mg l⁻¹ δεν οδήγησε σε υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας και παρέμεινε στα ίδια επίπεδα και για τα δύο θρεπτικά υποστρώματα (MS και WPM).

Η αποτελεσματικότητα μιας μεθόδου μικροπολλαπλασιασμού μπορεί να εκτιμηθεί από τον αριθμό των φυτών που είναι δυνατόν να επιζήσουν σε συνθήκες αγρού, μετά από το στάδιο του εγκλιματισμού και της σκληραγώγησης (Ziv, 1986). Ο *ex vitro* εγκλιματισμός των ριζοβολημένων φυταρίων ήταν απόλυτα επιτυχής (100%). Τα εγκλιματισμένα φυτά είχαν φυσιολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και ήταν

πανομοιότυπα του μητρικού φυτού. Τα αποτελέσματά μας συμπίπτουν με αναφορές άλλων μελετητών για υψηλά ποσοστά εγκλιματισμού ειδών του γένους *Arbutus* (Mostafa *et al.*, 2010, Papafotiou *et al.*, 2013) καθώς και άλλων ειδών της οικογένειας Ericaceae (Pereira, 2006).

3.3.2 *In vitro* πολλαπλασιασμός από ενήλικο αυτοφυές φυτό

Με βάση βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τον πολλαπλασιασμό του γένους *Arbutus* και της οικογένειας Ericaceae, κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιιεργειών από ενήλικο αυτοφυές φυτό *A. unedo* var. *rubra* εξετάστηκε η επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό βλαστό στη βλαστογένεση του είδους σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA.

Το ποσοστό αντίδρασης για το σχηματισμό βλαστών κυμάνθηκε από 54 έως 67%. Οι Μπερτσουκλής και Παπαφωτίου (2016) κατά την εγκατάσταση *in vitro* καλλιιεργειών από αυτοφυή βλάστηση του *A. unedo* είχαν σημειώσει υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης σε όλα τα έκφυτα ανεξαρτήτως της θέσης τους στο μητρικό βλαστό, αγγίζοντας και το 100%. Περισσότεροι βλαστοί σχηματίστηκαν στα έκφυτα (1), χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά από τα έκφυτα των θέσεων (2), (3) και (4), ενώ αντίθετα το μήκος των μικροβλαστών ήταν μεγαλύτερο στα έκφυτα της θέσης (5), αλλά και σε εκείνα της θέσης (4) αποτελέσματα που εξηγούν το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού που παρουσίασαν τα έκφυτα των θέσεων αυτών (4 και 5). Επίσης, παρατηρήθηκε διαφορά στο μήκος των παραγόμενων βλαστών σε σχέση με την προέλευση του κόμβου που αυξανόταν καθώς απομακρύνονταν από την κορυφή του βλαστού. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχε παρατηρήσει και ο Μπερτσουκλής (2012) σε έρευνα σχετικά με τον πολλαπλασιασμό των *A. andrachne* και *A. x andrachnoides* από έκφυτα ενήλικου αυτοφυούς φυτού. Τέλος, το μήκος των παραγόμενων βλαστών και κατ' επέκταση και το δυναμικό πολλαπλασιασμού παρέμεινε σε χαμηλότερα επίπεδα από εκείνα που είχαν παρατηρήσει οι Μπερτσουκλής και Παπαφωτίου (2016) για το *A. unedo*, που ήταν κατά μέσο όρο διπλάσιο από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα WPM με ZEA σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων 0,5, 2,5, 5,0 και 10,0 mg l⁻¹, ενώ ελέγχθηκε και η συνδυασμένη επίδραση 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ ZEA με NAA σε συγκέντρωση 0,1 mg l⁻¹. Στο σύνολο των υποκαλλιιεργειών η βλαστογένεση ανήλθε σε πολύ υψηλό ποσοστό (93-100%). Ο Μπερτσουκλής (2012) διαπίστωσε ότι το υψηλότερο ποσοστό αντίδρασης και σχηματισμού βλαστών σημειώθηκε σε υπόστρωμα με ZEA σε σύγκριση με άλλες κυτοκίνινες, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, υπερéχοντας όμως η συγκέντρωση των 2,5 mg l⁻¹ και στα 3 είδη του γένους (*A. unedo*, *A. andrachne* και *A. x andrachnoides*). Υπό την παρουσία 5,0 mg l⁻¹ ZEA στο

υπόστρωμα ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών ήταν πιο υψηλός, ενώ διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη αυξίνης μείωσε λίγο τον αριθμό των βλαστών. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχαν παρατηρήσει και οι Bertsoouklis and Parafotiou (2009), όπου η ZEA στην ίδια συγκέντρωση επέφερε τον μεγαλύτερο αριθμό βλαστών κατά τον μικροπολλαπλασιασμό του *A. andrachne*, χωρίς σημαντική διαφορά βέβαια από χαμηλότερες συγκεντρώσεις αυτής. Μεγαλύτερου μήκους βλαστοί παρατηρήθηκαν σε υπόστρωμα με 0,5 mg l⁻¹ ZEA ή σε υπόστρωμα με 2,5/0,1 mg l⁻¹ ZEA/NAA. Παρόλα αυτά, όμως, η προσθήκη NAA στο υπόστρωμα δεν επηρέασε το μήκος των βλαστών το οποίο παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με εκείνα των Gomes *et al.* (2010) καθώς το NAA, μόνο του ή σε συνδυασμό με BA, δεν κατάφερε να βελτιώσει το δυναμικό πολλαπλασιασμού κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιέργειών *in vitro* του *A. unedo* από ενήλικα φυτά. Επίσης, υποστρώματα με NAA σε ποικίλες συγκεντρώσεις (0,2, 0,75 και 1,25 mg l⁻¹) είχαν σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό κάλου χωρίς οι βλαστοί του *A. andrachne* να επιμηκύνονται (Μπερτσουκλής, 2012). Η ZEA σε χαμηλή συγκέντρωση (0,5 mg l⁻¹) επέφερε και το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού, αποτέλεσμα που προκύπτει τόσο από το μεγαλύτερο μήκος των παραγόμενων βλαστών όσο και από το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης. Γενικά, η αποτελεσματικότητα της ZEA σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,5 ή 2,5 mg l⁻¹) είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες σχετικά με τον μικροπολλαπλασιασμό άλλων ειδών του γένους *Arbutus* (Bertsoouklis and Parafotiou, 2009, 2011, Μπερτσουκλής, 2012). Οι παραπάνω μελετητές παρατήρησαν ότι το μεγαλύτερο μήκος βλαστών του *A. andrachne* σχηματίστηκε σε υπόστρωμα με 0,5 mg l⁻¹ ZEA, ενώ τα *A. unedo* και *A. x andrachnoides* σχημάτισαν βλαστούς μεγαλύτερου μήκους σε υπόστρωμα με ZEA σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹.

Μικροβλαστοί της ποικιλίας *A. unedo* var. *rubra* από αυτοφυές φυτό ριζοβόλησαν με απόλυτη επιτυχία (100%) σε υπόστρωμα ½ WPM με 1 mg l⁻¹ IBA, καθώς κατά την ριζοβολία μικροβλαστών από νεανικούς ιστούς σποροφύτων ήταν εκείνο το υπόστρωμα που επέφερε τα θετικότερα αποτελέσματα. Αρκετά υψηλό ποσοστό ριζοβολίας παρατήρησε και ο Μπερτσουκλής (2012) κατά τη ριζοβολία μικροβλαστών που προήλθαν από καλλιέργειες ενήλικων φυτών και των τριών ειδών *Arbutus* σε υπόστρωμα WPM με 1 mg l⁻¹ IBA. Ο ίδιος μελετητής διαπίστωσε ότι η ριζοβολία μικροβλαστών του *A. andrachne* δεν στάθηκε δυνατή σε υπόστρωμα WPM υποδιπλασιασμένης δύναμης χωρίς IBA, ενώ όταν προστέθηκε στο υπόστρωμα IBA

σε συγκέντρωση 1 mg l^{-1} το ποσοστό ριζοβολίας ανήλθε στο 60% αλλά και πάλι ήταν χαμηλότερο από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Ο *ex vitro* εγκλιματισμός των ριζοβολημένων φυταρίων ήταν απόλυτα επιτυχής (100%). Τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης συμπίπτουν με αναφορές άλλων μελετητών για υψηλά ποσοστά εγκλιματισμού ειδών του γένους *Arbutus* όταν χρησιμοποίησαν ως μητρικό υλικό ενήλικα αυτοφυή φυτά (Bertsouklis and Papafotiou, 2009,2011, Gomes and Canhoto, 2009, Gomes *et al.*, 2010).

3.4 Γενικό Συμπέρασμα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δεν βρέθηκαν αναφορές σχετικά με οποιαδήποτε μέθοδο πολλαπλασιασμού του *A. unedo* var. *rubra*, όπως συμβαίνει με άλλα είδη του γένους. Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μία πλήρης μέθοδος για τον μικροπολλαπλασιασμό του φυτού χρησιμοποιώντας ως έκφυτα αρχικής εγκατάστασης καλλιεργειών κόμβους είτε από σπορόφυτα ανεπτυγμένα *in vitro* είτε από ενήλικο αυτοφυές φυτό.

Ένα ολοκληρωμένο πρωτόκολλο *in vitro* πολλαπλασιασμού του *A. unedo* var. *rubra* από σπορόφυτα, μπορεί να περιλαμβάνει βλάστηση των σπόρων στους 15°C, μεταφορά για περαιτέρω ανάπτυξη σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM με 1 mg l⁻¹ IBA και αρχική καλλιέργεια εκφύτων κόμβων βλαστών στο ανωτέρω θρεπτικό υπόστρωμα με 2,5 mg l⁻¹ ZEA. Δεδομένου ότι, η αποτελεσματικότητα της ZEA δεν επηρεάστηκε από την συγκέντρωση και ήταν εξίσου ικανοποιητική και σε χαμηλές συγκεντρώσεις και αναζητώντας μία πιο οικονομική μέθοδο, εξαιτίας του υψηλού κόστους αυτής, για τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών προτείνεται η χρήση της ZEA σε συγκέντρωση 0,5 mg l⁻¹ είτε σε θρεπτικό υπόστρωμα MS είτε σε WPM.

Σε ότι αφορά τον μικροπολλαπλασιασμό της ποικιλίας από ενήλικο αυτοφυές φυτό, το Μάιο μπορεί να γίνει αρχική καλλιέργεια εκφύτων κόμβων βλαστού από αυτοφυή βλάστηση σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA και υποκαλλιέργεια των βλαστών στο ίδιο υπόστρωμα με χαμηλότερη συγκέντρωση αυτής (0,5 mg l⁻¹).

Η ριζοβολία των παραγόμενων μικροβλαστών, ανεξάρτητα από την προέλευση των εκφύτων (*in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα ή ενήλικο αυτοφυές φυτό), μπορεί να γίνει σε ½ WPM με 1 mg l⁻¹ IBA και ο *ex vitro* εγκλιματισμός των φυταρίων σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v).

Η παρούσα μελέτη αποτελεί το εφαλτήριο για την διεξαγωγή περαιτέρω έρευνας, ώστε να αυξηθεί η αποδοτικότητα του πρωτοκόλλου κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των βλαστών, διευκολύνοντας την εισαγωγή του ιδιαίτερου αυτού φυτού στην Αρχιτεκτονική τοπίου ως καλλωπιστικό, καθώς θα μπορούσε να σχηματίσει πολύ εντυπωσιακές συνθέσεις σε συνδυασμό με τα άλλα είδη του γένους, τόσο στο αστικό όσο και στο περιαστικό τοπίο, αλλά και στην επιχειρηματική Ανθοκομία για την παραγωγή δρεπτόν κλάδων.

4. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Arbutus*

4.1 Εισαγωγή

4.1.1 Τα κυρίαρχα είδη του γένους *Arbutus*

Το γένος *Arbutus* περιλαμβάνει αειθαλείς θάμνους ή μικρά δένδρα με ελκυστικό φλοιό και χαρακτηρίζεται από τους σφαιρικούς αδενώδης καρπούς που φέρουν επιφανειακά πολυάριθμα φυμάτια (Κοράκης, 2015, Stevens, 1971, Diggs and Breckon, 1981, Sorensen, 1994). Περιλαμβάνονται περίπου 12 είδη αυτοφυή στη βόρεια και κεντρική Αμερική, τη νότια Ευρώπη και τη δυτική Ασία. Στην Ελλάδα απαντούν κυρίως τα είδη *A. unedo* L. (κουμαριά) και *A. andrachne* (γλιστροκουμαριά). Σε περιοχές που τα δύο είδη συνυπάρχουν εμφανίζονται υβρίδια με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά *A. x andrachnoides* Link. (Κοράκης, 2015). Στη χώρα μας απαντά και η ποικιλία του είδους, *A. unedo* var. *rubra* Aiton., η οποία παρατηρείται κυρίως στην Ιρλανδία όπου και εντοπίστηκε για πρώτη φορά, ενώ είναι αρκετά δύσκολο να εντοπιστεί σε άλλες περιοχές (Harrison, 2009).

Το *A. unedo* L. ("strawberry tree", κουμαριά) φύεται σε χώρες της Μεσογείου (εκτός από την Αίγυπτο και τη Λιβύη), στη Μικρά Ασία και την δυτική Ευρώπη από την Γαλλία έως και την Ιρλανδία (Lim, 2012). Το *A. andrachne* L. ("Greek strawberry tree", "Eastern strawberry tree", "Cyprus strawberry tree", γλιστροκουμαριά) φύεται στη νοτιανατολική Ευρώπη (Αλβανία, Ελλάδα, συμπεριλαμβανομένης και της Κρήτης, σε αμιγείς πρεμνοφυείς συστάδες), Μέση Ανατολή (Τουρκία, Λίβανο, Ισραήλ), Κριμέα και σπάνια στη νότια Αγγλία. Το *A. x andrachnoides* Link. είναι φυσικό υβρίδιο των *A. unedo*, και *A. andrachne* (Callan, 1941) και απαντά όπου υπάρχουν και τα δύο γονικά φυτά.

Τα φυτά είναι θάμνοι ή παίρνουν τη μορφή μικρών δέντρων και το ύψος τους φθάνει το 1,5-3 m. Έχουν ξηρό φλοιό, λείο ή ρικνό, σταχτύ ή ερυθρωπό αποφλοιωμένο άλλοτε με μεγάλη ή μικρή ένταση σε επιμήκεις λωρίδες ή μικρά λέπια. Τα φύλλα είναι απλά, εναλάσσοντα. Η άνω επιφάνεια τους έχει βαθυπράσινο χρώμα και είναι γυαλιστερή, ενώ η κάτω επιφάνεια έχει πιο ανοιχτό χρώμα και το μεσαίο νεύρο εξέχει. Ο μίσχος στο *A. unedo* είναι κοντός, μικρότερος από 1 cm ενώ στα *A. andrachne* και *A. x andrachnoides* υπερβαίνει το 1 cm. Τα φύλλα είναι οξέως πριονωτά στην κοινή κουμαριά, στην άγρια φέρουν κάποιες οδοντώσεις, ενώ στο υβρίδιο υπάρχει μεγάλη παραλλακτικότητα στην περιφέρεια του φυλλώματος. Η κοινή κουμαριά έχει συνήθως

πιο πυκνή και ισχυρή βλάστηση. Τα άνθη είναι σταμνόμορφα, λευκά ή ελαφρώς ρόδινα αν πρόκειται για την ποικιλία και φέρονται επάκρια σε βραχείς, σύνθετους, βότρες. Ο καρπός των φυτών έχει έντονο πορτοκαλί-κόκκινο χρώμα, είναι ράγα και στο *A. unedo* θυμίζει φράουλα από όπου και προέκυψε η ονομασία του “strawberry tree” (Hillier, 1993). Ο καρπός του *A. andrachne* έχει μικρότερο μέγεθος, ενώ το *A. x andrachnoides* σχηματίζει καρπούς με μέγεθος ενδιάμεσο των γονέων. Το *A. unedo*, όπως και η ποικιλία *A. unedo* var. *rubra*, είναι φυτό ιδιαίτερα εντυπωσιακό και ελκυστικό από τον Οκτώβριο έως τον Ιανουάριο όταν φέρει πολυάριθμους βότρες με άνθη και καρπούς ταυτόχρονα. Το *A. andrachne* ανθοφορεί την άνοιξη, μετά το πέρας της καρποφορίας, και έχει λείο κανελί-ερυθρωπό φλοιό (όπως και το *A. x andrachnoides*). Κατά το τέλος της άνοιξης-αρχές του καλοκαιριού απολεπίζεται σε φύλλα ή σε επιμήκεις λωρίδες αποκαλύπτοντας το πρασινωπό εσωτερικό του. Είναι φυτά με ελάχιστες απαιτήσεις, ευδοκιμούν σε καλώς στραγγιζόμενα, ελαφρώς όξινα εδάφη, αλλά είναι τα μόνα από εκείνα της οικογένειας Ericaceae που μπορούν να καλλιεργηθούν και σε ασβεστώδη εδάφη (Synge, 1981, Roberts, 1993, The Miller Manual of Trees and Shrubs, 2007, Abidi *et al.*, 2016a).



Εικ. 35. Μητρικό άτομο *A. unedo* L., καρποί και άνθη (α), Μητρικό άτομο *A. unedo* var. *rubra* σε περίοδο ανθοφορίας, ρόδινα άνθη και καρποί (β), Μητρικό άτομο *A. andrachne* L., άνθη και φύλλα (γ), Μητρικό άτομο *A. x andrachnoides*, καρποί και φύλλα (δ).

4.1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Οι τάξεις ενώσεων που παραδοσιακά συνδέθηκαν με τη χημεία των φυσικών προϊόντων, από άποψη δομής, είναι: α) υδατάνθρακες, α-αμινοξέα, πρωτεΐνες, λίπη, νουκλεϊκά οξέα κ.λ.π, που ορίζονται ως προϊόντα πρωτογενούς μεταβολισμού και είναι θεμελιώδη λειτουργικά συστατικά όλων των οργανισμών και β) φαινολικές ουσίες (ανθοκυάνες, φλαβονοειδή), τερπένια, στεροειδή, αλκαλοειδή και πολλά ετεροκυκλικά παράγωγα, που ορίζονται ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού και χαρακτηρίζουν το είδος που τα παράγει, χωρίς να συμμετέχουν στη βασική οργανική του λειτουργία. Ενώ ο ρόλος των πρωτογενών μεταβολιτών είναι πλήρως εξακριβωμένος και όμοιος για όλους τους οργανισμούς, δεν συμβαίνει πάντα το ίδιο με όλους τους δευτερογενείς μεταβολίτες. Η παλαιότερη υπόθεση βέβαια, ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι άχρηστα παράγωγα ή προϊόντα ενός λανθασμένου μεταβολισμού, δεν ισχύει πλέον (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, παρόλο που δεν είναι απαραίτητοι για τη ζωή των οργανισμών, εμπλέκονται στην άμυνα ενάντια σε φυτοφάγους οργανισμούς και παθογόνα, στον έλεγχο της βλάστησης των σπόρων, στη ρύθμιση της συμβίωσης και στη χημική αναστολή των ανταγωνιστικών φυτικών ειδών. Ως εκ τούτου, είναι αναπόσπαστο κομμάτι της αλληλεπίδρασης των φυτικών οργανισμών και της προσαρμογής τους στο περιβάλλον τους (Makkar *et al.*, 2007).

Σήμερα, τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού αναφέρονται με τον όρο φυσικά προϊόντα. Η ανάπτυξη νέων εξειδικευμένων τεχνικών απομόνωσης και καθορισμού όπως π.χ. διάφοροι τύποι χρωματογραφίας, η τελειοποίηση των φυσικών μεθόδων που εφαρμόζονται για την πιστοποίηση της δομής αλλά και η δυνατότητα σύνθεσης των περισσοτέρων από τις δομές που απομονώνονται συνέβαλαν στην τεράστια ανάπτυξη του τομέα των φυσικών προϊόντων τα τελευταία τριάντα χρόνια, με αποτελέσματα πραγματικά εντυπωσιακά. Το μεγαλύτερο μέρος των φυσικών προϊόντων, που έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί, προέρχονται από το φυτικό βασίλειο και κυρίως από τα ανώτερα φυτά (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009).

4.1.3 Φαινολικές ενώσεις

Ο όρος φυσικές φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό κυρίως φυτικών ουσιών, που έχουν στο μόριο τους ένα τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο, υποκατεστημένο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Το όνομά τους το οφείλουν στο

απλούστερο μόριο της σειράς, τη φαινόλη. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαινολικών ενώσεων που απαντούν στα φυτά είναι (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009):

- α) **απλές μονοκυκλικές φαινόλες και φαινολικά οξέα**
- β) **φαινυλοπροπανοειδή**
- γ) **φαινολικές κινόνες**
- δ) **φλαβονοειδή**, ενώσεις που περιέχουν στο μόριο τους το σκελετό της **φλαβόνης** ή του **χλωριούχου φλαβυλίου** και αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα των φυσικών φαινολικών ενώσεων. Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε επιμέρους ομάδες όπως τις ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβονόνες, διϋδροφλαβονόλες, χαλκόνες, φλαβονόλες, φλαβάνες, προανθοκυανιδίνες και τα ισοφλαβονοειδή.
- ε) **πολυμερείς φαινολικές ενώσεις**, όπως οι **λιγνίνες**, οι **μελανίνες** και οι **ταννίνες**.

Φαινολικές μονάδες εμφανίζονται μερικές φορές και σε μόρια τερπενίων, στεροειδών και αλκαλοειδών.

4.1.4 Ο ρόλος των φαινολικών ενώσεων στην πρόληψη ασθενειών και ο τρόπος δράσης τους

Τα τελευταία χρόνια πολλές κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των αντιοξειδωτικών της διατροφής στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών, όπως οι καρδιακές παθήσεις, διάφοροι τύποι καρκίνων, νευρολογικές παθήσεις και ασθένειες του πεπτικού συστήματος. Τα αντιοξειδωτικά της διατροφής μπορούν να χωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες. Η πρώτη αφορά της βιταμίνες και τα μεταλλικά στοιχεία που εμφανίζουν αντιοξειδωτικές δράσεις, ενώ η δεύτερη τις φυτοχημικές ουσίες. Οι σημαντικότερες φυτοχημικές ουσίες με αντιοξειδωτική δράση που έχουν μελετηθεί είναι τα φαινολικά συστατικά.

Ο βασικός μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών θεωρείται η δέσμευση των ελεύθερων ριζών, οι οποίες προωθούν τον εκφυλισμό των κυττάρων, επιταχύνοντας τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς έναρξης των διαφόρων ασθενειών. Οι ελεύθερες ρίζες και οι δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται εντός του κυττάρου είτε ως αποτέλεσμα επίδρασης εξωτερικών περιβαλλοντικών παραγόντων, είτε ως αποτέλεσμα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που οδηγούν στην παραγωγή τους είναι η έκθεση του κυττάρου σε υπεριώδη ακτινοβολία, σε χημικές ουσίες όπως ο καπνός, στρεσογόνοι παράγοντες κ.ά.

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών εντός του κυττάρου ελέγχεται από έναν αντιοξειδωτικό κυτταρικό μηχανισμό, ο οποίος επιτυγχάνει ισορροπία ανάμεσα στις οξειδωτικές και τις αντιοξειδωτικές ουσίες του κυττάρου. Η μετατόπιση της φυσιολογικής αυτής προοξειδωτικής-αντιοξειδωτικής ισορροπίας προς την οξειδωτική πλευρά ονομάζεται οξειδωτικό στρες, το οποίο ευθύνεται για την εκκίνηση της παθοφυσιολογικής διαδικασίας πολλών ασθενειών. Η παραγωγή ελεύθερων ριζών εξισορροπείται από τον οργανισμό μέσω ενός αμυντικού αντιοξειδωτικού συστήματος, το οποίο ενισχύεται με την πρόσληψη αντιοξειδωτικών συστατικών μέσω της διατροφής.

Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να προσδίδουν το υδρογόνο του υδροξυλίου τους, τις καθιστά ισχυρούς παράγοντες δέσμευσης των ελεύθερων ριζών σε κυτταρικό επίπεδο και περιορισμού του οξειδωτικού στρες. Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης τους στην κατεύθυνση πρόληψης των ασθενειών εντοπίζονται τόσο στην αποτροπή της οξειδωτικής διαδικασίας του κυττάρου, μέσω της ενίσχυσης του αμυντικού αντιοξειδωτικού συστήματος, όσο και στην άμεση δράση τους επί των γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή φλεγμονωδών, καρκινογόνων και τοξικών για τα κύτταρα ουσιών (Κουτελιδάκης, 2015).

4.1.5 Χημική και διατροφική σύσταση των *A. unedo* και *A. andrachne*

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με την χημική σύσταση των καρπών και των φύλλων του *A. unedo* οι οποίες κάνουν λόγο για την παρουσία διάφορων φαινολικών ενώσεων, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, οι ταννίνες και οι ανθοκυανίνες, στις οποίες και οφείλονται οι φαρμακολογικές του ιδιότητες (Guendouze- Boucheffa *et al.*, 2015, El Haouari and Mekhfi, 2017). Οι καρποί της κουμαριάς έχουν αποδειχθεί, από διάφορες αναλύσεις και μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, ως μία πολύ καλή πηγή θρεπτικών στοιχείων και βιταμινών με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς είναι πλούσιοι σε ασβέστιο και βιταμίνες C και E (Pallauf *et al.*, 2008). Επίσης, είναι πλούσιοι σε μακρο- και ιχνοστοιχεία και συγκεκριμένα σε K, Ca, P και Mg, καθώς βρέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε καρπούς που συλλέχθηκαν στη περιοχή της Τουρκίας (Özcan and Hacisefrogullari, 2007). Σε μεθανολικά εκχυλίσματα των καρπών έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές φαινολικές ενώσεις όπως η αρβουτίνη και άλλα παραγωγά του γαλλικού οξέος (Pawlowska *et al.*, 2006, Pavlovic *et al.*, 2009). Στην κόκκινη χρωστική των καρπών του φυτού έχουν βρεθεί κυρίως τρεις ανθοκυανίνες: η κυανιδίνη-3-αραβινοσίδη, η κυανιδίνη-3-γαλακτοσίδη και η δελφινιδίνη-3-γαλακτοσίδη (Pallauf *et al.*, 2008, Lim,

2012). Οι ανθοκυανίνες είναι η πιο διαδεδομένη ομάδα των φλαβονοειδών και είναι υπεύθυνες κατά κύριο λόγο για το κόκκινο, πορτοκαλί, κυανό και ιώδες χρώμα στα άνθη, στους καρπούς και στα φύλλα των φυτών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα κούμαρα είναι πολύ καλή πηγή βιταμινών, από τις οποίες οι βιταμίνη Ε και C έχουν ανιχνευθεί σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις σε σχετικές αναλύσεις (Miguel *et al.*, 2014, Guendouze- Bouchefa *et al.*, 2015). Επίσης, σε διάφορες μελέτες έχουν προσδιοριστεί τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά διάφορα φαινολικά οξέα όπως το γαλλικό οξύ, το βανιλλικό οξύ, το *p*-υδροξυβενζοϊκό και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ (Pallauf *et al.*, 2008, Lim, 2012, Miguel *et al.*, 2014). Από τα οργανικά οξέα, το φουμαρικό, λακτικό, κιτρικό, φελλικό και το μαλλικό οξύ έχουν επίσης προσδιοριστεί σε καρπούς κουμαριάς (Pallauf *et al.*, 2008). Η φρουκτόζη, η γλυκόζη και η σουκρόζη είναι τα κύρια σάκχαρα που έχουν βρεθεί σε καρπούς του *A. unedo* από διαφορετικές περιοχές, όπως η Ισπανία, η Πορτογαλία, η Τουρκία κ.ά. (Miguel *et al.*, 2014). Οι Alarcão -E-Silva *et al.* (2001) παρατήρησαν ότι τα ποσοστά των σακχάρων στα κούμαρα εξαρτώνται από το στάδιο ωριμότητας τους. Περισσότερα σάκχαρα περιέχονται σε πλήρως ώριμους καρπούς. Η φρουκτόζη και η γλυκόζη από τα σάκχαρα, το φουμαρικό και το μαλλικό οξύ από τα οργανικά οξέα και το γαλλικό οξύ από τα φαινολικά οξέα είναι οι κύριες ενώσεις που συμβάλλουν στην γεύση των καρπών (Lim, 2012). Οι ταννίνες είναι εκείνες που δίνουν την χαρακτηριστική πικρή και στυφή γεύση των κούμαρων (Pallauf *et al.*, 2008).

Τα φύλλα του *A. unedo* L. είναι, επίσης, μία πολύ καλή πηγή αντιοξειδωτικών συστατικών, στα οποία και οφείλονται οι φαρμακευτικές ιδιότητες του φυτού. Σε εκχυλίσματα φύλλων του *A. unedo* L. που συλλέχθηκαν στο Montenegro παρατηρήθηκε η παρουσία αρβουτίνης μαζί με άλλα παράγωγα της υδροκινόνης (Ρανλιονίτς *et al.*, 2011). Η κερκετίνη, ισοκερκετίνη, υπεροσίδη και το χλωρογενικό οξύ είναι μερικές από τις φαινολικές ενώσεις που έχουν προσδιοριστεί τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά σε εκχυλίσματα φύλλων κουμαριάς στην Κροατία (Males *et al.*, 2006, Males *et al.*, 2013). Σε εκχυλίσματα φύλλων *A. unedo* L. στην βορειανατολική Πορτογαλία βρέθηκαν διάφορες φλαβανόλες (κατεχίνες, διμερείς προκυανιδίνες), φλαβονόλες (κερκετίνη, καμφερόλη, γλυκοσίδες της μυρικετίνης) και υδρολυόμενες ταννίνες (γαλλο- και ελλαγιταννίνες). Οι ενώσεις αυτές έχουν εντοπιστεί και σε εκχυλίσματα καρπών, όμως ο αριθμός των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν ήταν υψηλότερος στα εκχυλίσματα των φύλλων σε σύγκριση με εκείνου των καρπών (Mendes *et al.*, 2011). Τα φύλλα του *A. unedo* είναι πλούσια σε βιταμίνη Ε, η

συγκέντρωση της οποίας έχει φανεί να εξαρτάται από την εποχή συλλογής τους (Kivcak and Mert, 2001).

Η κατεχίνη και η επικατεχίνη είναι μονομερή που συνιστούν τις προανθοκυανιδίνες, γνωστές και ως συμπυκνωμένες ταννίνες. Σε εκχυλίσματα βλαστών *A. unedo* L. από την Αλγερία, οι ερευνητές διαπίστωσαν την παρουσία κατεχίνης και αφζελεχίνης (Dib *et al.*, 2008). Οι ίδιοι ερευνητές, σε άλλη μελέτη τους σχετικά με την χημική σύσταση των ριζών της κουμαριάς, παρατήρησαν ως κύριες ενώσεις την κατεχίνη και την επικατεχίνη (Dib *et al.*, 2010).

Οι καρποί του *A. andrachne* αποτελούν, επίσης, μία πολύ καλή πηγή μακρο- και ιχνοστοιχείων και συγκεκριμένα Κ, Ca και Mg, καθώς βρέθηκαν σε αφθονία σε καρπούς που συλλέχθηκαν στη περιοχή της Τουρκίας. Από τα οργανικά οξέα, το μαλλικό οξύ έχει εντοπιστεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε αναλύσεις καρπών, και ακολουθούν το ασκορβικό και το κιτρικό οξύ. Η φρουκτόζη είναι το κύριο σάκχαρο των καρπών του *A. andrachne* μαζί με την γλυκόζη και τη σακχαρόζη που έχουν ανιχνευθεί σε αρκετά χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Ενώ μέχρι σήμερα δεν έχουν προσδιορισθεί ποιοτικά οι διάφορες φαινολικές ενώσεις των καρπών του *A. andrachne*, ωστόσο έχουν προσδιορισθεί ποσοστικά και έχουν βρεθεί πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών συστατικών, στις οποίες αποδίδεται και η αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτού (Serçe *et al.*, 2010). Επίσης, στις ρίζες του φυτού έχουν βρεθεί οι υψηλότερες συγκεντρώσεις πολυφαινολών, όπως τα φλαβονοειδή, οι ανθοκυανίνες και οι ταννίνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δράση των φυτών. Σε εκχυλίσματα φύλλων και καρπών του *A. andrachne* έχει παρατηρηθεί χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (Abidi *et al.*, 2016a, b)

Γενικά, οι μικροί καρποί και οι καρποί τύπου berries έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά και κατ' επέταση και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με άλλους καρπούς (Moyer *et al.*, 2002, Serçe *et al.*, 2010).

4.1.6 Φαρμακευτικές ιδιότητες των *A. unedo* και *A. andrachne*

Σε αρκετά είδη της οικογένειας Ericaceae έχουν αναγνωρισθεί φαρμακευτικές ιδιότητες και γι' αυτό έχουν συμπεριληφθεί σε εκείνα τα φυτά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε φυτικά σκευάσματα. Οι θεραπευτικές ιδιότητες των ειδών της οικογένειας οφείλονται κυρίως στις πολυάριθμες φαινολικές ενώσεις που απαντώνται σε αυτά, όπως αυτές που αναλύσαμε στην παράγραφο (4.1.5) (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015). Στις μέρες μας, το ενδιαφέρον για τη χρήση των φαρμακευτικών φυτών έχει

αυξηθεί καθώς η πρόσβαση σε αυτά αλλά και η κατανάλωση τους είναι πολύ πιο εύκολη από τα συμβατικά φάρμακα (El Haouari and Mekhfi, 2017).

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει πλήθος αναφορών σχετικά με τις φαρμακολογικές ιδιότητες τόσο του *A. unedo* όσο και του *A. andrachne*. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στους καρπούς των φυτών αυτών, καθώς πρόκειται για καρπούς υψηλής διατροφικής αξίας με θρεπτικά συστατικά που βοηθούν στην πρόληψη και τη θεραπεία διάφορων ασθενειών.

Η κουμαριά χρησιμοποιείται ευρέως για την θεραπεία πολλών ασθενειών. Αναλυτικά, οι καρποί του *A. unedo* παρουσιάζουν αντισηπτικές, διουρητικές και καθαρτικές ιδιότητες (Fiorentino *et al.*, 2007, Oliviera *et al.*, 2009, Mendes *et al.*, 2011). Επίσης, βοηθούν σημαντικά στη θεραπεία γαστρεντερικών και δερματολογικών παθήσεων (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015). Τα φύλλα του φυτού χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική για τις στυπτικές, αντισηπτικές του ουροποιητικού συστήματος, αντιδιαρροϊκές, διουρητικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδης ιδιότητές τους και πιο πρόσφατα για την πρόληψη και τη θεραπεία της υπέρτασης και του διαβήτη (Fiorentino *et al.*, 2007, Marrioto *et al.*, 2008, Oliviera *et al.*, 2009, Mendes *et al.*, 2011, Malheiro *et al.*, 2012, Ziani *et al.*, 2015, Moualek *et al.*, 2016, El Haouari and Mekhfi, 2017). Εκχυλίσματα φύλλων του φυτού βρίσκουν άμεση εφαρμογή σε υποτροπιάζουσες δερματικές παθήσεις, όπως εκζέματα και μυκητιάσεις (Guendouze-Bouchefa *et al.*, 2015). Οι El Haouari and Mekhfi (2017) έχουν διαπιστώσει την ευεργετική επίδραση κατά της συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων, η οποία συνδέεται με διάφορες ασθένειες όπως ο διαβήτης, η λευχαιμία, ο καρκίνος του στομάχου και του νεφρού αλλά και πολλές καρδιαγγειακές ασθένειες. Οι ίδιοι μελετητές κάνουν λόγο και για τις αντιθρομβωτικές ιδιότητες του φυτού, οι οποίες οφείλονται κυρίως στην ομάδα των φλαβονοειδών. Οι Guendouze-Bouchefa *et al.* (2015) αναφέρουν τις ταννίνες ως τις κύριες φαιολικές ενώσεις για τη θεραπεία της υπέρτασης όπως άλλωστε και Mekhfi *et al.* (2006).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες αναφορές σχετικά με τη χημική σύσταση του *A. andrachne* (Sakar 1991, Serçe *et al.*, 2010) και τις βιολογικές του ιδιότητες (Kamalak *et al.*, 2010). Πρόσφατα οι Abidi *et al.* (2016a) μελέτησαν για πρώτη φορά την επίδραση εκχυλισμάτων και των τριών μερών του φυτού (καρπών, φύλλων και ριζών) στην λειτουργία της καρδιάς, υπολογίζοντας την πίεση της αριστερής κοιλίας, τη ροή της στεφανιαίας αρτηρίας και τους παλμούς της καρδιάς, καθώς συνδέονται άμεσα με τη σωστή λειτουργία της. Εκχυλίσματα, λοιπόν, του *A. andrachne* μπορούν

να παρέχουν εξαιρετικά αποτελέσματα στη πρόληψη και τη θεραπεία παθήσεων του μυοκαρδίου. Επιπλέον, από τα τρία διαφορετικά μέρη του φυτού, τα εκχυλίσματα ριζών ήταν εκείνα που έδειξαν ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο αποτελεσματικά για τη θεραπεία της υπέρτασης. Τέλος, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρατηρήθηκε, επίσης, στα εκχυλίσματα ριζών, αναστέλλοντας σχεδόν ολοκληρωτικά την παραγωγή των ελεύθερων ριζών.

Όσον αφορά τη χημική σύσταση αλλά και τις φαρμακευτικές ιδιότητες των άλλων δύο μελετώμενων ειδών, του υβριδίου *A. x andrachnoides* και της ποικιλίας *A. unedo* var. *rubra*, δεν υπάρχουν σχετικές αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία. Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε για πρώτη φορά η περιεκτικότητα των ειδών αυτών σε ολικά φαινολικά.

4.1.7 Συντήρηση του φυτικού υλικού

Τις περισσότερες φορές, δεν είναι δυνατή η επεξεργασία του φυτικού υλικού αμέσως μετά τη συλλογή του. Έτσι, ακολουθείται μία διαδικασία η οποία έχει στόχο να προλάβει πιθανές αλλοιώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών κατά την διάρκεια της μεταφοράς και της αποθήκευσης. Τα κύτταρα των ζωντανών φυτών περιέχουν όχι μόνο ένζυμα και ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους αλλά και φραγμούς διαφόρων τύπων, οι οποίοι αποτρέπουν την επαφή μεταξύ τους. Μετά τον θάνατο του φυτού οι φραγμοί καταστρέφονται, με αποτέλεσμα τα ενυπάρχοντα ένζυμα να προάγουν διάφορες χημικές αντιδράσεις μεταξύ των κυτταρικών συστατικών, όπως οξειδώσεις ή υδρολύσεις. Σκοπός της συντήρησης είναι ο περιορισμός των διεργασιών αυτών στον μικρότερο δυνατό βαθμό (Samuelsson, 2004). Η κατεργασία του φυτικού υλικού εξαρτάται κυρίως από την κατηγορία των χημικών ενώσεων που πρόκειται να απομονωθούν ή να μελετηθούν και από το είδος και το μέρος του υπό μελέτη φυτού (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009).

4.1.7.1 Ξήρανση - Λυοφιλίωση (Freeze-drying)

Η συνηθέστερη μέθοδος συντήρησης φυτικών υλικών είναι η ξήρανση ή αφυδάτωση. Οι ενζυμικές διεργασίες λαμβάνουν χώρα σε υδατικό περιβάλλον, οπότε η ταχεία απομάκρυνση του νερού από το κύτταρο προλαμβάνει κατά μεγάλο μέρος την αποικοδόμηση των κυτταρικών συστατικών, ενώ επιπλέον ελαττώνονται οι κίνδυνοι εξωτερικών επιθέσεων, όπως μύκητες. Το ζωντανό φυτικό υλικό έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό. Τα φύλλα περιέχουν νερό σε ποσοστό 60-90%, οπότε για την

αναστολή των ενζυμικών διεργασιών το υδατικό περιεχόμενο πρέπει να ελαττωθεί στο 10% (Samuelsson, 2004).

Για την ξήρανση του φυτικού υλικού εφαρμόζονται αρκετές τεχνικές, ανάλογα με την ευαισθησία των διαφόρων ουσιών, οι περισσότερες από τις οποίες βασίζονται στην αρχή διαβιβάσεως θερμού και ξηρού αέρα (Samuelsson, 2004). Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε μία εναλλακτική μέθοδος ξήρανσης φυτικού υλικού, η τεχνική της λυοφιλίωσης (Freeze-drying). Η λυοφιλίωση (ξήρανση υπό ψύξη) είναι μία μέθοδος κατά την οποία το φυτικό υλικό ψύχεται σε χαμηλή θερμοκρασία και στη συνέχεια μεταβαίνει από την στερεή στην αέρια φάση απευθείας, με εξάχνωση, χωρίς να περάσει από το στάδιο της υγρής φάσης (Oetjen and Haseley, 2004). Η διαδικασία έχει ως εξής: κατεψυγμένο φυτικό υλικό τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή υπό κενό, η επιφάνεια της οποίας διατηρείται σε θερμοκρασία -60 έως -80 °C. Οι υδρατμοί από το κατεψυγμένο φυτικό υλικό μεταφέρονται γρήγορα στην ψυχρή επιφάνεια. Η ενέργεια εξατμίσεως προέρχεται κυρίως από το υπό ξήρανση υλικό, το οποίο παραμένει σε κατάσταση ψύξεως παρά το γεγονός ότι η συσκευή βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου ή υψηλότερη. Το προϊόν φτάνει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μόνο όταν έχει απαλλαγεί τελείως από το νερό (Κατσιώτης και Χατζοπούλου, 2015).

Η τεχνική της λυοφιλίωσης πλεονεκτεί έναντι των μεθόδων ξήρανσης με θερμό αέρα διότι η ξήρανση σε χαμηλές θερμοκρασίες μειώνει την πιθανότητα υποβάθμισης των θερμοευαίσθητων προϊόντων, η περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος σε υγρασία μπορεί να ελεγχθεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, το ξηρό προϊόν μπορεί να έχει μία ελκυστική φυσική μορφή και τέλος έχοντας μεγάλη ειδική επιφάνεια μπορεί γρήγορα να ανασυσταθεί. Παρόλα αυτά, η μέθοδος απαιτεί σχετικά πολύπλοκο εξοπλισμό και το κόστος λειτουργίας και διαχείρισης είναι αρκετά υψηλό (Oetjen and Haseley, 2004).

4.1.8 Τεχνικές εκχύλισης για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων

Η εκχύλιση είναι μία από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές διαχωρισμού των φαινολικών ενώσεων. Βασίζεται στη ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων που πρακτικά δεν αναμειγνύονται ή αναμειγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Οι πιο διαδεδομένες τεχνικές εκχύλισης είναι η εκχύλιση στερεών με υγρό (Extraction), η εκχύλιση υγρού ή στερεού σώματος διαλυμένου σε υγρό, από άλλο υγρό (Liquid-Liquid Extraction, LLE), καθώς και η εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction,

SPE) για το διαχωρισμό ουσιών από υγρά δείγματα (Ταραντίλης και Παππάς, 2015). Οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης με διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών από φυσικές πηγές. Πρόκειται για απλές και σχετικά φθηνές τεχνικές που, όμως, απαιτούν αρκετό χρόνο για την ολοκλήρωση της εκχύλισης, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε αποικοδόμηση των δραστικών συστατικών. Η υπερβολική χρήση τοξικών διαλυτών θεωρείται εξαιρετικά επιβαρυντική για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον (Kyriakopoulou *et al.*, 2013).

Τα τελευταία χρόνια, σύγχρονες, εναλλακτικές, “πράσινες” τεχνικές έχουν καταφέρει να αντικαταστήσουν τις συμβατικές μεθόδους, επιταχύνοντας την διαδικασία της εκχύλισης, μειώνοντας την χρήση διαλυτών και την πιθανότητα υποβάθμισης του εκχυλίσματος. Μία από τις τεχνικές αυτές είναι και η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound-assisted Extraction, UAE) που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη για την παραλαβή των φαινολικών συστατικών (Rostagno and Prado, 2013). Η ίδια τεχνική ακολουθήθηκε και από τους Boulanouar *et al.* (2013).

4.1.8.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound-assisted Extraction) – υπέρηχοι και δράση αυτών κατά την εκχύλιση

Η χρήση των υπερήχων θεωρείται μία καινοτόμος και πολλά υποσχόμενη τεχνική του 21^{ου} αιώνα με πληθώρα εφαρμογών στους τομείς της φαρμακευτικής, της χημείας, της διατροφής αλλά και της κοσμετολογίας.

Υπέρηχος ονομάζεται το ακουστικό κύμα που χρειάζεται ένα ελαστικό μέσο για να διαδοθεί με συχνότητα μεγαλύτερη από αυτή που μπορεί να ακούσει ο άνθρωπος. Οι ακουστικές συχνότητες στους ανθρώπους κυμαίνονται από 16 Hz έως 20 kHz, ενώ οι συχνότητες των υπερήχων κυμαίνονται από 20 kHz έως 10 MHz (Rostagno and Prado, 2013).

Ο μηχανισμός δράσης των υπερήχων στην εκχύλιση βασίζεται στο φαινόμενο της ταλάντωσης που προκαλεί η πηγή των υπερήχων στα γειτονικά μόρια του υλικού με τα οποία έρχεται σε επαφή. Λόγω της ταλάντωσης παρατηρείται μεταβολή της πίεσης του υλικού, που συνήθως είναι υγρός διαλύτης, με αποτέλεσμα την δημιουργία και κατάρρευση φυσαλίδων. Η αναταραχή που ακολουθεί την κατάρρευση των φυσαλίδων δημιουργεί διάβρωση στα υλικά που βρίσκονται μέσα στο διαλύτη. Όταν το στερεό είναι φυτικός ιστός η διάβρωση βοηθά τόσο στην διείσδυση του διαλύτη και

επομένως την καλύτερη εκχύλιση όσο και στην αποικοδόμηση των πολυμερών που περιέχει με αποτέλεσμα η εκχύλιση να πραγματοποιείται πιο εύκολα.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση των υπερήχων κατά τη διάρκεια της εκχύλισης είναι η συχνότητά τους, οι ιδιότητες του μέσου μετάδοσης των υπερήχων (δηλ. του υγρού διαλύτη), η θερμοκρασία του υγρού, η περιεκτικότητά του σε αέρα κ.ά. (Ταραντίλης και Παππάς, 2015).

Κατά την εκχύλιση οι υπέρηχοι παράγονται από ειδικό εξοπλισμό που ονομάζεται λουτρό υπερήχων το οποίο είναι εύκολο στο χειρισμό του και με χαμηλό κόστος λειτουργίας. Το λουτρό υπερήχων αποτελείται από έναν κάδο από ανοξείδωτο ατσάλι, στη βάση του οποίου βρίσκονται οι πηγές υπερήχων. Ο κάδος γεμίζεται με νερό που χρησιμοποιείται ως μέσο διάδοσης των υπερήχων προς το φυτικό υλικό που θέλουμε να εκχυλίσουμε. Το φυτικό υλικό τοποθετείται σε γυάλινη φιάλη με διαλύτη που θα μεταδώσει τους υπερήχους στους ιστούς (Rostagno and Prado, 2013).

4.1.8.2 Διαλύτες εκχύλισης φαινολικών συστατικών

Διαλύτες, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, η προπανόλη, αλλά και ο συνδυασμός αυτών έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων από φυτικά εκχυλίσματα, σε διαφορετικές αναλογίες με νερό (Garcia-Salas *et al.*, 2010). Ανατρέχοντας στη διεθνή βιβλιογραφία και σε έρευνες σχετικά με τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου των ειδών του γένους *Arbutus* με χρήση διάφορων διαλυτών εκχύλισης των δειγμάτων, διαπιστώνεται πως τα μεθανολικά εκχυλίσματα είναι εκείνα που έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετές από αυτές και έχουν δώσει τα θετικότερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τους υπόλοιπους οργανικούς διαλύτες (Pallauf *et al.*, 2008, Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2014, Guendouze-Boucheffa *et al.*, 2015, Abidi *et al.*, 2016a, Isbilir *et al.*, 2016).

4.1.9 Μέθοδος Folin-Ciocalteu για τον ποσοτικό προσδιορισμό ολικών φαινολικών συστατικών

Πληθώρα φασματοφωτομετρικών μεθόδων έχουν αναπτυχθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων από φυτικούς οργανισμούς. Βασιζόμενες σε διαφορετικές αρχές, μπορούν να προσδιορίσουν ποσοτικά το σύνολο των φαινολικών συστατικών, μία συγκεκριμένη φαινολική ένωση ή μία ολόκληρη κατηγορία αυτών, όπως τα φαινολικά οξέα (Shahidi and Naczki, 2004). Στην παρούσα μελέτη για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών χρησιμοποιήθηκε η φωτομετρική μέθοδος των

Folin-Ciocalteu (Folin and Ciocalteu, 1927) η οποία βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύεται το σύνολο των υδροξυ-φαινυλομάδων ενός δείγματος χωρίς το διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών (Waterman and Mole, 1994). Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων, που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ($H_3PMo_{12}O_{40}$) και φωσφοβολφραϊμικά ($H_3PW_{12}O_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Σε αλκαλικό περιβάλλον, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των οξέων προς μείγμα οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}), πιθανώς $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$, με χαρακτηριστικό κυανό χρώμα. Πιστεύεται ότι το μολυβδαίνιο ανάγεται πιο εύκολα σε σύμπλοκο και ότι μία αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου λαμβάνει χώρα (Huang *et al.*, 2005):



Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 725 nm και είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ουσίες εκφράζονται σε ισοδύναμα οξέος, συνήθως γαλλικού ή καφεϊκού οξέος.

Η μέθοδος αυτή τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της αυξημένης ευαισθησίας της και της επαναληψιμότητάς της, αλλά και λόγω του ότι επηρεάζεται λιγότερο από ουσίες παρεμπόδισης, οι οποίες μεταβάλλουν το αποτέλεσμα (Makkar *et al.*, 2007).

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Φυτικό υλικό – Συλλογή και αποθήκευση

Κατά την παρούσα μελέτη έγινε φωτομετρικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών των τριών κυρίαρχων ειδών *Arbutus* που απαντώνται στην Ελληνική χλωρίδα (*A. unedo*, *A. andrachne* και του φυσικού τους υβριδίου *A. x andrachnoides*), καθώς και της ποικιλίας *A. unedo* var. *rubra*.

Ως πειραματικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν φύλλα από φυτά που εντοπίστηκαν στην περιοχή της Βαρυμπόμπης του Ν. Αττικής, ηλικίας περίπου 20-25 ετών, υγιή χωρίς εμφανή συμπτώματα εχθρών και ασθενειών και αντιπροσωπευτικά των υπό μελέτη ειδών. Από κάθε φυτό συλλέχθηκαν φύλλα από ολόκληρη την κόμη του, τυχαία, και τοποθετήθηκαν σε φορητό ψυγείο μέσα σε χάρτινες σακούλες. Μετά τη συλλογή τους τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γ.Π.Α, όπου και αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο βαθιάς κατάψυξης στους -80 °C έως την λυοφιλίωσή τους.

Δείγματα φύλλων συλλέχθηκαν το Μάιο από την κορυφή των βλαστών (νέα βλάστηση) και από χαμηλότερα στο βλαστό (παλαιά βλάστηση). Επίσης συλλέχθηκαν κατά το στάδιο της ανθοφορίας δείγματα φύλλων ακριβώς κάτω από την ταξιανθία, δηλαδή Απρίλιο από το *A. andrachne* και Δεκέμβριο από τα άλλα taxa.

4.2.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Επαρκής ποσότητα φυτικού υλικού λυοφιλιώθηκε σε συσκευή, όπου μετά την παρέλευση 48 h παρελήφθη το ξηρό δείγμα όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 4.1.6.1. Μετά την ξήρανση τα δείγματα λειοτριβήθηκαν σε εμπορικό μπλέντερ, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία petri κλεισμένα με parafilm και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη οικιακού ψυγείου έως τη χρήση τους.

4.2.3 Παραλαβή των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με υπερήχους (USE)

Σε κωνική φιάλη μεταφέρθηκε ποσότητα 1,0 g αποξηραμένου φυτικού υλικού (υπό μορφή σκόνης) και προστέθηκαν 10 ml συστήματος MeOH:νερού (70:30 v/v). Η φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων συχνότητας 35 KHz (Sonorex Bandelin Super PK255) για 10 min και σε θερμοκρασία 20°C. Η θερμοκρασία ελέγχονταν ώστε να μην ξεπερνάει τους 30°C για να αποφευχθεί η διάσπαση ή οξείδωση των υδατοδιαλυτών συστατικών που εκχυλίζονται. Τα υπερκείμενα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα παραλήφθηκαν με πιπέτα Pasteur και η διαδικασία εκχύλισης

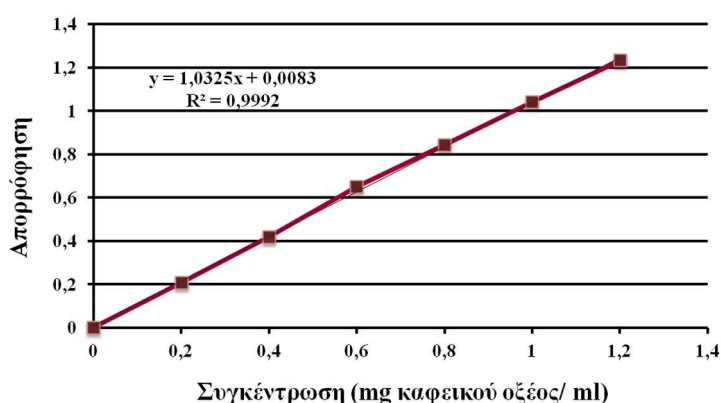
επαναλήφθηκε δύο ακόμη φορές για κάθε δείγμα. Στο τελικό εκχύλισμα που προέκυψε, από την ανάμειξη των τριών εκχυλίσεων, έγινε διήθηση με τη βοήθεια σύριγγας και φίλτρου PTFE 0,45 μm σε βιδωτά φιαλίδια όπου και αποθηκεύτηκε μέχρι την ανάλυσή του.

4.2.4 Μέτρηση ολικών φαινολικών συστατικών

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Folin-Ciocalteu όπως περιγράφεται από τους Waterman and Mole (1994). Εν συντομία, σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml μεταφέρθηκαν 3 ml απιονισμένο νερό, 50 μl από το εξεταζόμενο δείγμα και 250 μl από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Έγινε καλή ανάδευση και μετά το πέρας 3 min προστέθηκαν ακόμη 750 μl άνυδρου Na₂CO₃ (20 g Na₂CO₃/ 100 ml νερό) και συμπληρώθηκε με νερό μέχρι τα 10 ml. Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h και αμέσως μετά μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Bausch and Lomb Spectronic 70) στα 725 nm χρησιμοποιώντας ένα αντιδραστήριο μάρτυρα, στο οποίο είχαν προστεθεί 50 μl καθαρής μεθανόλης αντί δείγματος.

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση το καφεϊκό οξύ (Sigma Co.) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg ισοδύναμων καφεϊκού οξέος/ g ξηρού φυτικού δείγματος. Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα καφεϊκού οξέος (1,2 mg/ml) και ακολούθως με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις (Σχ. 1). Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η πειραματική πορεία όπως περιγράφεται.

Συγκέντρωση καφεϊκού οξέος (mg/ml)	Απορρόφηση σε φωτόμετρο στα 725 nm
1,2	1,232
1,0	1,041
0,8	0,843
0,6	0,651
0,4	0,419
0,2	0,209
0,0	0,000



Σχ. 1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς κατά Folin-Ciocalteu για τα ολικά φαινολικά συστατικά με τη χρήση καφεϊκού οξέος ως πρότυπη ένωση.

4.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

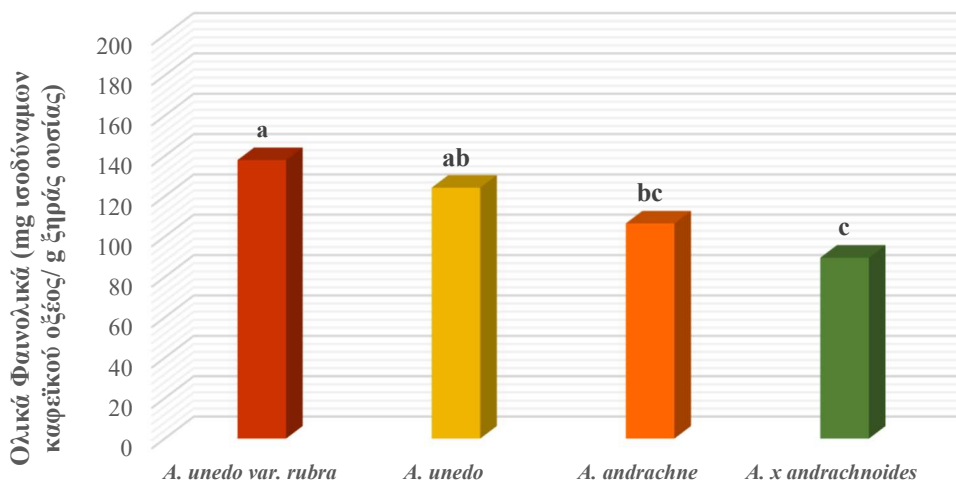
Η διπαραγοντική ανάλυση του πειράματος ανέδειξε τη σημαντικότητα του είδους στην περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά των φύλλων των τεσσάρων taxa. Το *A. unedo* var. *rubra* παράγει ολικά φαινολικά σε υψηλότερα επίπεδα το Μάιο κατά το στάδιο της βλαστικής ανάπτυξης και ακολουθεί το *A. unedo* L. σε παρόμοια επίπεδα. Τα *A. andrachne* και *A. x andrachnoides* έδωσαν τη χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών ανεξάρτητα από το στάδιο συλλογής των δειγμάτων (Πίν. 17, Σχ. 2). Ανεξάρτητα από το στάδιο συλλογής, και τα τέσσερα taxa είναι πλούσια σε ολικά φαινολικά συστατικά καθώς παράγουν σημαντικές ποσότητες αυτών (Σχ. 2).

Πίνακας 17. Επίδραση του είδους και του σταδίου συλλογής των δειγμάτων στην περιεκτικότητα των τεσσάρων taxa σε ολικά φαινολικά συστατικά.

Είδος	Στάδιο συλλογής	Ολικά Φαινολικά (mg ισοδύναμων καφεϊκού οξέος/ g ξηράς ουσίας)
<i>A. unedo</i> var. <i>rubra</i>	Ανθοφορία	130,0 abc
	Βλαστική ανάπτυξη	142,0 a
<i>A. unedo</i>	Ανθοφορία	121,4 abcd
	Βλαστική ανάπτυξη	125,7 ac
<i>A. andrachne</i>	Ανθοφορία	93,3 bcd
	Βλαστική ανάπτυξη	113,2 abcd
<i>A. x andrachnoides</i>	Ανθοφορία	81,8 d
	Βλαστική ανάπτυξη	93,4 bd
$F_{\text{Είδος}}$		*
$F_{\text{Στάδιο συλλογής}}$		NS
$F_{\text{Είδος x Στάδιο συλλογής}}$		NS

Σύγκριση των μέσων κατά στήλες με Student's *t*-test, $P \leq 0,05$, $n = 3-6$.

*: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, NS: μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$.

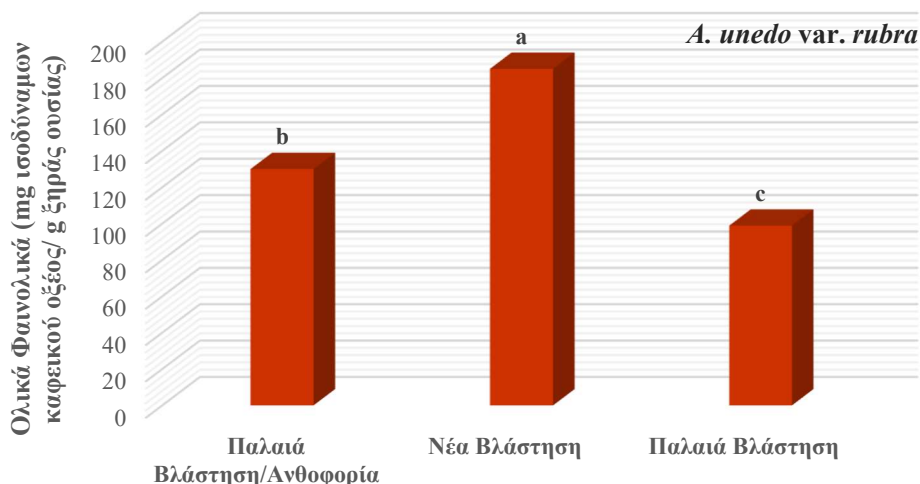


Σχ. 2. Περιεκτικότητα των φύλλων των διαφόρων taxa σε ολικά φαινολικά ανεξάρτητα από το στάδιο ανάπτυξης των φυτών κατά τη συλλογή των δειγμάτων.

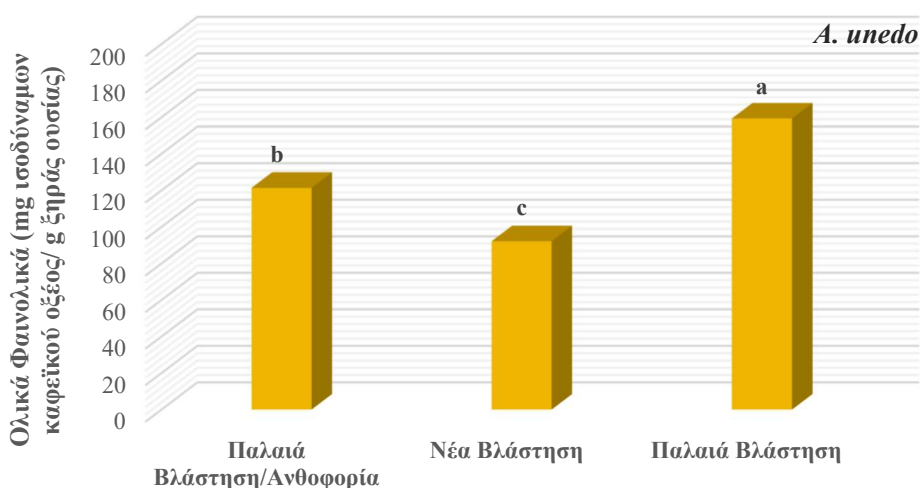
Στα *A. unedo* και *A. x andrachnoides* παρατηρήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών σε φύλλα παλαιάς βλάστησης σε σχέση με τα φύλλα νέας βλάστησης, ενώ στο *A. andrachne* δεν υπήρξε σημαντική διαφορά (Σχ. 4,5,6 – παράρτημα III). Αντίθετα η ποικιλία *A. unedo var. rubra* είχε υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά σε φύλλα νέας βλάστησης και μάλιστα σε σχεδόν διπλάσια ποσότητα από αυτή της παλαιάς βλάστησης (Σχ. 3 – παράρτημα III). Κατά την ανθοφορία οι τιμές των φαινολικών ήταν ενδιάμεσες αυτών σε νέα και παλαιά βλάστηση στα *A. unedo* και *A. unedo var. rubra* (Σχ. 3,4), ενώ στα *A. andrachne* και *A. x andrachnoides* ήταν οι χαμηλότερες που μετρήθηκαν (Σχ. 5,6 – παράρτημα III).

Οι Nenadis *et al.* (2015) σε έρευνα σχετικά με την περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά φύλλων του *A. unedo* αναφέρουν υψηλότερες συγκεντρώσεις το φθινόπωρο και το χειμώνα και αρκετά χαμηλότερες την άνοιξη, κάτι που ισχύει όπως αποδεικνύει η παρούσα εργασία αν ληφθεί (αναγκαστικά) παλαιά βλάστηση το χειμώνα και νέα βλάστηση την άνοιξη. Διαφορετικά, η παλιά βλάστηση της άνοιξης έχει υψηλότερα φαινολικά σε σχέση με αυτή του χειμώνα, αντιθέτως απ' ότι έχουν διατυπώσει οι Nenadis *et al.*, (2015) οι οποίοι δεν διαχώρισαν τη βλάστηση. Τα αποτελέσματα της μελέτης θα μπορούσαν να αποδοθούν στις χαμηλές θερμοκρασίες που επικρατούν τις εποχές αυτές και στην προσπάθεια των φυτών να ανταπεξέλθουν στην καταπόνηση λόγω των χαμηλών αυτών θερμοκρασιών. Τα φυτά συνθέτουν τις φαινολικές ενώσεις τόσο κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής τους ανάπτυξης όσο και κατά τη διάρκεια που βρίσκονται υπό στρες (Hannah *et al.*, 2006, Ferdinando *et al.*, 2012). Η συσσώρευση

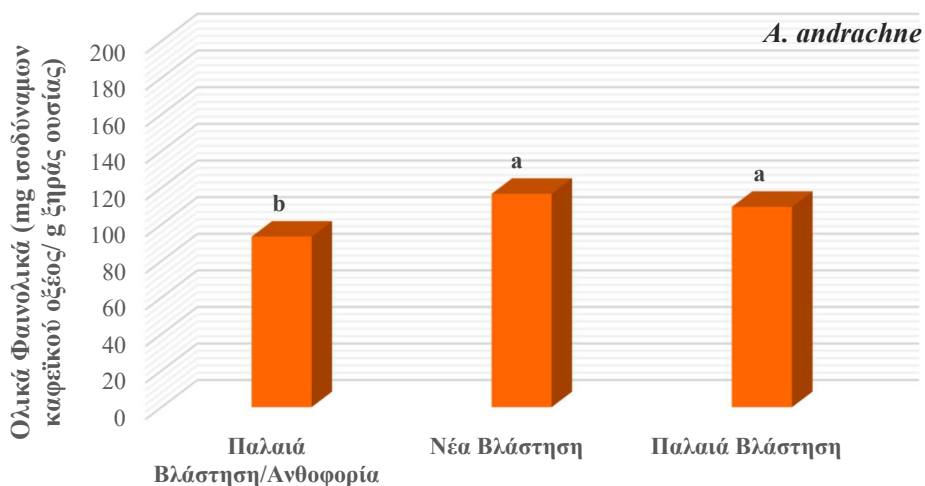
τους συνδέεται με την άμυνα, τον ανταγωνισμό, την επικοινωνία και γενικότερα την αλληλεπίδραση των φυτών με τους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες του περιβάλλοντος. Σε συνθήκες βιοτικής καταπόνησης (προσβολές, τραυματισμοί από παθογόνα) ή και αβιοτικής αντίστοιχα (υπεριώδης ακτινοβολία, έντονος φωτισμός, χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες) επάγεται η σύνθεση της PAL και συντίθενται στα φυτά περισσότερες φαινολικές ενώσεις (Solecka and Kacperska, 2003).



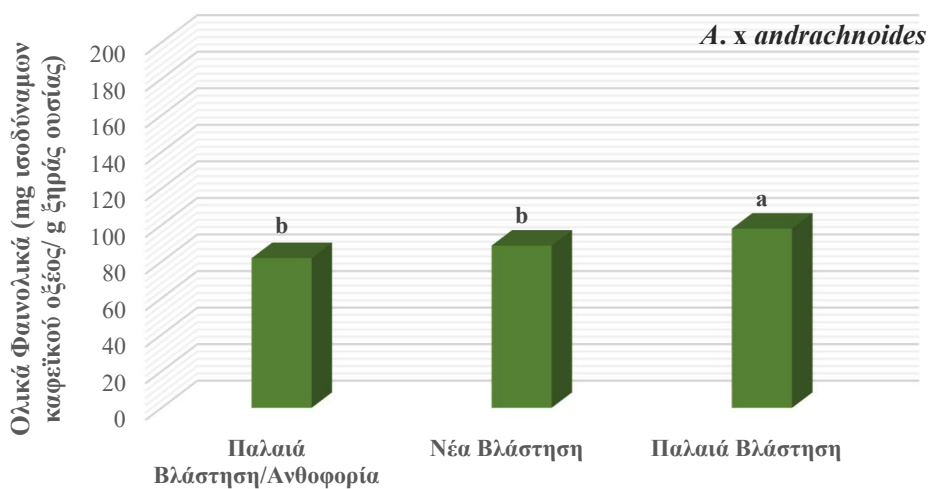
Σχ. 3. Περιεκτικότητα του *A. unedo var. rubra* σε ολικά φαινολικά σε δείγματα φύλλων που συλλέχθηκαν το Μάϊο από την κορυφή των βλαστών (νέα βλάστηση) και από χαμηλότερα στο βλαστό (παλαιά βλάστηση) καθώς και κατά το στάδιο της ανθοφορίας.



Σχ. 4. Περιεκτικότητα του *A. unedo* σε ολικά φαινολικά σε δείγματα φύλλων που συλλέχθηκαν το Μάϊο από την κορυφή των βλαστών (νέα βλάστηση) και από χαμηλότερα στο βλαστό (παλαιά βλάστηση) καθώς και κατά το στάδιο της ανθοφορίας.



Σχ. 5. Περιεκτικότητα του *A. andrachne* σε ολικά φαινολικά σε δείγματα φύλλων που συλλέχθηκαν το Μάϊο από την κορυφή των βλαστών (νέα βλάστηση) και από χαμηλότερα στο βλαστό (παλαιά βλάστηση) καθώς και κατά το στάδιο της ανθοφορίας.



Σχ. 6. Περιεκτικότητα του *A. x andrachnoides* σε ολικά φαινολικά σε δείγματα φύλλων που συλλέχθηκαν το Μάϊο από την κορυφή των βλαστών (νέα βλάστηση) και από χαμηλότερα στο βλαστό (παλαιά βλάστηση) καθώς και κατά το στάδιο της ανθοφορίας.

4.4 Γενικό Συμπέρασμα

Γενικά, παρατηρήθηκε διακύμανση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών μεταξύ των τεσσάρων taxa τα οποία παράγουν σημαντικές ποσότητες φαινολικών ουσιών, καθώς και διακύμανση αναλόγως της ηλικίας της βλάστησης. Το *A. unedo* var. *rubra* παράγει ολικά φαινολικά σε επίπεδα του *A. unedo*, ενώ στα άτομα που ελέγχθηκαν διαφέρουν οι συγκεντρώσεις των φαινολικών στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του φυτού που μελετήθηκαν. Η μέθοδος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη μελέτη των διαφορετικών ειδών και ποικιλιών και θα είχε ενδιαφέρον αν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και στη μελέτη εντός του κάθε είδους, για την απομόνωση κι επιλογή ατόμων με υψηλότερη παραγωγή ολικών φαινολικών συστατικών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abidi, E., Habid, J., Yassine, A., Chahine, N., Mahjoub, T., Elkak, A. (2016a). Effects of methanol extracts from roots, leaves, and fruits of the Lebanese strawberry tree (*Arbutus andrachne*) on cardiac function together with their antioxidant activity. *Pharm. Biol.* 54(6): 1035-1041.
- Abidi, E., Habid, J., Mahjoub, T., Belhadj, F., Garrab, M., Elkak, A. (2016b). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of extracts obtained from the roots bark of *Arbutus andrachne* L. a Lebanese tree. *Int. J. Phytomed.* 8(1): 104-112.
- Alarcão-E-Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G., Leitão, M. C. A. (2001). The *Arbutus* Berry: Studies on its Color and Chemical Characteristics at Two Mature Stages. *J. Food Compos. Anal.* 14(1): 27-35.
- Aljabari, Z., Alzeer, J. and Arafeh, R. (2014). Catechin detection in callus and *in vitro* cultures of the eastern strawberry tree, *Arbutus andrachne* L., an endangered medicinal tree in Palestine. *Global J. Res. Med. Plants Indigen. Med.* 3(5): 196-205.
- Almeida, R., Goncalves, S. and Romano, A. (2005). *In vitro* micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boissier and Reuter) Handel-Mazzetti. *Biodiversity and Conservation* 14: 1059-1069.
- Al-Salem, M.M. and Karam, N.S. (2001). Auxin, wounding and propagation medium affect rooting response of stem cuttings of *Arbutus andrachne*. *Hortscience* 36(5): 976 – 978.
- Anderson, W.C. (1984). A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 343–347.
- Αραμπατζής, Θ. (1998). Θάμνοι και Δέντρα στην Ελλάδα. Τόμος Ι. Έκδοση: Οικολογική Κίνηση Δράμας-ΤΕΙ Καβάλας.
- Αριανούτσου, Μ. (1996). Ο ρόλος της φωτιάς στη διαμόρφωση των Μεσογειακών τοπίων. Πρακτικά 7ου Επιστημονικού Συνεδρίου Ελληνικής Βοτανικής Εταιρείας, Αλεξανδρούπολη, 1-4 Οκτωβρίου 1998, σελ. 164-168.
- Banko, T.J and Stefani, M.A. (1989). *In vitro* propagation of *Oxydendrum arboretum* from mature trees. *HortScience* 24(4): 683-685.
- Bartels, A. (2011). Φυτά της Μεσογείου. Οδηγός αναγνώρισης με 556 έγχρωμες φωτογραφίες. Εκδόσεις Μαλλιάρης-Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
- Bertsouklis, K.F., and Papafotiou, M. (2009). *In vitro* propagation of *Arbutus andrachne* L. *Acta Hort.* 813: 477-480.
- Bertsouklis, K.F., and Papafotiou, M. (2011). Effect of various cytokines on micropropagation of *Arbutus x andrachnoides* Link. *Acta Hort.* 923: 213-218.
- Bertsouklis, K.F. and Papafotiou, M. (2017). Comparative study on the effectiveness of cytokinin type and season on *in vitro* culture establishment of *Arbutus* species. *Acta Hort.* 1189: 435-438.
- Blomquist, C. L., Yakabe, L. E., Soriano, M. C. and Negrete, M. A. (2012). First Report of Leaf Spot Caused by *Phytophthora* taxon Pgchlamydo on Evergreen Nursery Stock in California. *Plant dis.* 96(11): 1691.

- Bertsouklis, K.F., and Papafotiou, M. (2013). Seed Germination of *Arbutus unedo*, *A. andrachne* and Their Natural Hybrid *A. andrachnoides* in Relation to Temperature and Period of Storage. *Hortscience* 48(3): 347-351.
- Bohn, K., and A. Viljoen. (2011). The edible city: Envisioning the continuous productive urban landscape (CPUL). *Field Journal* 4(1): 149–161.
- Botelho, G., Gomes, F., Ferreira, F. M. and Caldeira, I. (2015). Influence of Maturation Degree of *Arbutus (Arbutus unedo L.)* Fruits in Spirit Composition and Quality. *International Journal of Biological, Food, Veterinary and Agricultural Engineering* 9(6): 478-483.
- Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C., Miguel, M.G. (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind. Crops Prod.* 46: 85-96.
- Callan, H.G. (1941). The cytology of *Gaultheria wisleyensis* (Marchant) Rehder, a new mode of species formation. *Annals of Botany* 5: 579–585.
- Canadell, J., Lloret, F. and Lopez-Soria L. (1991). Resprouting vigour of two Mediterranean shrub species after experimental fire treatments. *Vegetatio* 95: 119-126.
- Canadell, J. and López-Soria, L. (1998). Lignotuber reserves support regrowth following clipping of two Mediterranean shrubs. *Functional Ecology*, 12: 31-38.
- Cavuşoglu, A., Sulusogly, M., Erkal, S. (2015). Biotechnological approaches in strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) breeding. *Ekin J. Crop Breed. and Gen.* 1(1): 36-41.
- Chávez, F.Z. and Moya, E.G. (1997). Seedlings and sprouts in the regeneration of oaks in the Sierra de Pachuca, Hidalgo. *Agrociencia* 31(3): 323-329.
- Cronquist, A. (1981). An intergrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Debnath, S.C. (2005). Micropropagation of Lingonberry: Influence of Genotype, Explant, Orientation and Overcoming TDZ-induced Inhibition of Shoot Elongation Using Zeatin. *Hortscience* 40(1): 185-188.
- Demirsoy, L., Demirsoy, H., Celikel, G., Macit, I., Ersoy, B. (2010). Seed treatment with GA₃ or stratification enhances emergence of some strawberry tree genotypes – Short communication. *Hort. Sci. (Prague)*, 37: 34-37.
- DeFossard, R.A., Myint, A and Lee, E.C.M. (1974). A broad system spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum*) pith tissue callus. *Physiol. Plant.* 30: 125-130.
- Dib, M.A., Allali, H., Tabti, B., Bendiabdellah, A. and Djabou, N. (2008). A new proanthocyanidins from *Arbutus unedo L.* stems. *Asian J. Chem.* 20: 3926-3934.
- Dib, M.A., Djabou, N., Allali, H. and Tabti, B. (2010). Identification of phenolic compounds and antimicrobial activity of roots of *Arbutus unedo L.* *Asian J. Chem.* 22: 4045-4053.

- Dimopoulos, P., Raus, Th., Bergmeier, E., Constantinidis, Th., Iatrou, G., Kokkini, S., Strid, A., Tzanoudakis, D. (2016). Vascular plants of Greece: An annotated checklist. Supplement. Willdenowia 46(3): 301-347.
- Diggs, G.M. and Breckon, G.J. (1981). Generic circumscription in the Arbutaeae (Ericaceae). 5–88 in, G. M. Diggs Jr. Systematic studies in the Arbutaeae (Ericaceae, Vaccinioideae) including a revision of the genus Comarostaphylis. The University of Wisconsin-Madison, Ph.D. Dissertation.
- El Haouari, M. and Mekhfi, H. (2017). Anti-platelet aggregation effects of extracts from *Arbutus unedo* leaves. Plant Science Today 4(2): 68-74.
- El-Sayed El-Mahrouk M., Dewir, Y.H and Omar, A.M.K. (2010). In vitro propagation of adult strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) through adventitious shoots and somatic embryogenesis. Prop. Ornam. Plants 10: 93-98.
- Ertekin, M. and Kirdar, E. (2010). Breaking seed dormancy of strawberry tree (*Arbutus unedo*). Int. J. Agric. Biol. 12(1): 57 – 60.
- Ferdinando, M., Brunetti, C., Fini, A., Tattini, M. (2012). In: P. Ahamd, M.N.V. Prasad (eds.), Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stress, Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability, Springer, New York, pp. 159-180.
- Fiorentino, A., Castaldi, S., d'Abrosca, B., Natale, A., Carfora, A., Messere, A., Monaco, P. (2007). Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. Biochem. Syst. Ecol. 35: 809-811.
- Folin, O. and Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and tryptophane determinations proteins. J. Biol. Chem. 73: 627-650.
- Φοίτος, Δ., Κωνσταντινίδης, Θ. Και Καμάρη Γ. (2009). Βιβλίο Ερυθρών Δεδομένων των Σπάνιων και Απειλούμενων Φυτών της Ελλάδας. Τόμος Πρώτος, Α-Δ. Ελληνική Βοτανική Εταιρεία.
- Gajdošova, A., Ostrolucka, M.G., Libiakova, G., Ondruškova, E. and Šimala, D. (2006). Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture in vitro. Journal of fruit and ornamental plant research 14: 103-119.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. and Fernandez-Gutierrez, A. (2010). Review: Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. Molecules 15(12): 8813-8826.
- George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. (eds) (2008). Plant Propagation by tissue culture, 3rd Edition. Springer.
- Gomes, F. and Canhoto J.M. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. In Vitro Cell. Dev. Biol. 45: 72–82.
- Gomes, F.M. (2011). Strategies for the improvement of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree): *in vitro* propagation, mycorrhization and diversity analysis. Departamento de Ciências da Vida Universidade de Coimbra.
- Gomes, F., Simões, M., Lopes, M. L. and Canhoto, J. M. (2010). Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). N. Biotechnol. 27(6): 882-892.

- Guendouze-Bouchefa, N., Madani, K., Chibane, M., Boulekbache-Makhlouf, L., Hauchard, D., Kiendrebeogo, M., Stévinny, C., Okusa, P.N., Duez, P. (20015). Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three Ericaceae from Algeria. *Ind. Crops Prod.* 70: 459-466.
- Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Miguel, M.G.C. and Antunes, M.D.C. (2013). The effect of temperature and films covers on the storage ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. *Sci. Hort.* 159: 96-102.
- Hammami, I., Jellali, M., Ksontini, M. and Rejeb, M.N. (2005). Propagation of the strawberry tree through seed (*Arbutus unedo*). *Int. J. Agric. Biol.* 7(3): 457-459.
- Hannah, M.A., Wiese, D., Freund, S., Fiehn, O., Heyer, A.G. and Hinch, D.K. (2006). Natural Genetic Variation of Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142(1): 98-112.
- Hansen, E. M., Reeser, P., Sutton, W. and Brasier, C. M. (2015). Redesignation of *Phytophthora* taxon Pgchlamydo as *Phytophthora chlamydospora* sp. nov. *North American Fungi* 10(2): 1-14.
- Harrison, M. (2009). Flowering shrubs and small trees for the south, 1st ed. Pineapple Press, Inc. pp 22.
- Hartman, H.T., Rester, D., Davies, F.T.Jr. and Geneve, R.L. (1997). Plant propagation: principles and practices, 6th edn. Prentice Hall Int, Upper Saddle.
- Herrera, C.M. (1987). Vertebrate-dispersed plants of the Iberian Peninsula: a study of fruit characteristics. *Ecol. Monogr.* 57(4): 305-331.
- Hickey, M. and King, C. (1998). Common Families of Flowering Plants, 61. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Hileman, L.C., Vasey, M.C. and Parker, V.T. (2001). Phyllogeny and Biogeography of the Arbutoidae (Ericaceae): Implications for the Madrean-Tethyan Hypothesis. *Syst. Bot.* 26(1): 131-143.
- Hillier, H. (1993). The Hillier manual of trees and shrubs. David and Charles, London.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, RL. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 53(6): 1841-1856.
- Isbilir, S. S., Orak, H. H., Yagar, H., Ekinci, N. (2012). Determination of antioxidant activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) flowers and fruits at different ripening stages. *Acta Sci. Pol.* 11(3): 223-237.
- Isutsa, D.K., Pritts, M.P. and Mudge, K.W. (1994). Rapid propagation of blueberry plants using ex-vitro rooting and controlled acclimatization of micropropagules. *HortScience* 29: 1124-1126.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Atalay, A.I. and Kaplan, M. (2010). Determination of Potential Nutritive Value of Young, Old and Senescent Leaves of *Arbutus andrachne* Tree. *J. Appl. Anim. Res.* 37: 257-260.
- Karam, N.S. and Al-Salem, M.M. (2001). Breaking dormancy in *Arbutus andrachne* L. seeds by stratification and gibberellic acid. *Seed Sci. Technol.* 29(1): 51-56.
- Kivçak, B., Mert, T., Demirci, B. and Baser, K.H.C. Composition of the essential oil of *Arbutus unedo*. *Chem. Nat. Compd.* 37: 445-446.

- Kubitzki, K. (2004). The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering plants. Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Kyriakopoulou, K., Papadaki, S. and Krokida, M. (2015). Life cycle analysis of β -carotene extraction techniques. J. Food Eng. 167: 51-58.
- Καββάδας, Σ. Δ. (1956). Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν. Αθήνα, τόμ. Β., σελ. 532-533.
- Καϊλίδης, Δ.Σ. (1996). Εχθροί των καλλωπιστικών δένδρων και θάμνων. Εκδόσεις Χριστοδουλίδη. Θεσσαλονίκη.
- Καραμπουρνιώτης, Γ. και Λιακόπουλος, Γ. (2009). Οικοφυσιολογία Μεσογειακών Φυτικών Ειδών. Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Κατσιώτης, Σ. και Χατζοπούλου, Π. (2015). Αρωματικά Φαρμακευτικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια. Παραγωγή, Επεξεργασία, Μεταποίηση, Αξιοποίηση, Διεθνείς Αγορές, Αρωματοθεραπεία, Αρωματοποιία. Εκδόσεις Κυριακίδης Μονοπρόσωπη ΙΚΕ, Θεσσαλονίκη.
- Κοράκης, Γ. (2015). Δασική Βοτανική. Αυτοφυή δένδρα και θάμνοι της Ελλάδας. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Αθήνα.
- Κουτελιδάκης, Α. (2015). Λειτουργικά τρόφιμα. Ο ρόλος τους στην προαγωγή της υγείας. Εκδόσεις ΖΗΤΗ, Αθήνα.
- Liddell, H. G. and Scott, R. (2007). Επιτομή του μεγάλου λεξικού της Ελληνικής Γλώσσας. Εκδόσεις Πελεκάνος.
- Lim, T. K. (2012). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Volume 2, Fruits. Springer, Netherlands pp. 444-451.
- Linaldeddu, B.T., Scanu, B., and Franceschini, A. (2010). First Report of *Diplodia scrobiculata* Causing Canker and Branch Dieback on Strawberry Tree (*Arbutus unedo*) in Italy. Plant Dis. 94(7): 919.
- Lloyd, G.B. and McCown, B.H. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. Proc. Int. Plant Propagators Soc. 30: 421-427.
- Λιμνιάτης, Π., Παπαφωτίου, Μ. και Χρονόπουλος, Ι. (2001). Μελέτη του πολλαπλασιασμού του *Arbutus unedo* L. *in vitro*. Πρακτικά 19ου Συνεδρίου ΕΕΕΟ, 9: 453-456.
- Mackay, W.A. (1996). Micropropagation of Texas madrone, *Arbutus xalapensis*. Hortscience 31(6): 1028-1029.
- Makkar, H. P. S., Siddhuraju, P. and Becker, K. (2007). Plant Secondary Metabolites. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Males, Z., Plazibat, M., Vundać, V. B. and Zuntar, I. (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree- *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). Acta. Pharm. 56: 245-250.
- Males, Z., Sarić, D. and Bojić, M. (2010). Quantitative determination of flavonoids and chlorogenic acid in the leaves of *Arbutus unedo* L. using thin layer chromatography. J. Anal. Methods Chem. Volume 2013, 1-4.

- Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., Pereira, J.A. (2012). *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Ind. Crops Prod.* 37: 473-478.
- Mao, A.A., Wetten, A., Fay, M.F. and Caligari, P.D.S. (2000). *In vitro* propagation of *Litsea cuebeba* (Lours.) Pers., a multipurpose tree. *Plant Cell Reports* 19: 263-267.
- Mariotto, S., Esposito, E., Paola, R. D., Ciampa, A., Mazzon, E., Prati, A. C., Darra, E., Vincenzi, S., Cucinotta, G., Caminiti, R. (2008). Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacol. Res.* 57: 110-124.
- Martins, J.F., Correia, S.I. and Canhoto, J.M. (2016). Somatic Embryogenesis Induction and Plant Regeneration in Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.). In: Germana, M., Lambardi, M. (eds.) *In vitro* Embryogenesis in Higher Plant. *Methods in Molecular Biology*, vol 1359. Humana Press, New York, NY.
- Masten Milek, T. and Simala, M. (2008). List of the scale insects (Hemiptera: Coccoidea) of Croatia. In: Branco, M., Franco, J.C., Hodgson, C.J. (Eds) *Proceedings of the XI International Symposium on Scale Insect Studies*, Oeiras, Portugal, 24-27 September 2007. ISA Press, Lisbon, Portugal, 105-119.
- McCown, B.H. and Lloyd, D.G. (1981). Woody Plant medium (WPM) - a revised mineral formulation for micro-culture of woody plant species. *Hortscienc* 16: 453.
- Mekhifi, H., El-Haouari, M., Bnouham, M., Aziz, M., Ziyat, A., Legssyer, A. (2006). Effects of extracts and tannins from *Arbutus unedo* leaves on rat platelet aggregation. *Phytother. Res.* 20: 135-139.
- Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P. and Carvalho, P. (2011) Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food Chem. Toxicol.* 49: 2285–2291.
- Mereti, M., Grigoriadou, K. and Nanos, G.D. (2002). Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Sci. Hortic.* 93: 143-148.
- Mesléard, F. and Lepart, J. (1989). Continuous basal sprouting from a lignotuber: *Arbutus unedo* L. and *Erica arborea* L., as woody Mediterranean examples. *Oecologia* 80: 127-131.
- Metaxas, D.J., Syros, T.D., Yupsanis, T., Economou, A.E. (2004). Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. *Plant Growth Regul.* 44: 257-266.
- Metaxas, D., Syros, T., Economou, A. (2008). Factors affecting vegetative propagation of *Arbutus unedo* L. by stem cuttings. *Propag. Ornam. Plants* 8: 190-197.
- Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C. and Antunes, M.D. (2014). *Arbutus unedo* L.: Chemical and Biological Properties. *Molecules* 19: 15799-15823.
- Mitchell, A. (1992). *Collins Field Guide. Trees of Britain and Northern Europe*, Collins, London.
- Mohan Jain, S. and Haggman, H. (2007). *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer Dordrecht, pp. 445-455.

- Morini, S. and Fiaschi, G. (2000). In vitro propagation of strawberry tree. *Agricoltura Mediterranea* 130(3/4): 240-246.
- Mostafa, S.E., Karam, N.S., Shibli, R.A. and Alali, F.Q. (2010). Micropropagation and production of arbutin in oriental strawberry tree (*Arbutus andrachne* L.). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 103: 111-121.
- Moualek, I., Aiche, G. I., Guechaoui, N. M., Lahcene, S., Houali, K. (2016). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6(11): 937-944.
- Mount, D. (2015). Off the beaten path: Hidden Treasures of the Arboretum. The Pink-Flowered Strawberry Tree. *Washington Park Arboretum Bulletin*.
- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E, Frei, B. and Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*. *J. Agri. Food Chem.* 50: 519-525.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Μπερτσουκλής, Κ.Φ. (2012). Διερεύνηση Μεθόδων *In Vitro* Πολλαπλασιασμού, της Οικοφυσιολογίας του Σπόρου και των Φυλογενετικών Σχέσεων των Ειδών *Arbutus* της Ελλάδας. Διδακτορική διατριβή, Αθήνα.
- Μπερτσουκλής, Κ.Φ. και Παπαφωτίου, Μ. (2016). Επίδραση των κυτοκινινών στον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *Arbutus unedo* L. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 27ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 28 Σεπτ. – 1 Οκτ. 2015, Βόλος, τόμος 17(β), 260-265.
- Naveh, Z. (1975). The evolutionary significance of fire in the Mediterranean region. *Vegetatio*, 29: 199-208.
- Nenadis, N., Llorens, L., Koufogianni, A., Diaz, L., Font, J., Gonzalez, J., Verdaguer, D. (2015). Interactive effects of UV radiation and reduced precipitation on the seasonal leaf phenolic content/ composition and the antioxidant activity of naturally growing *Arbutus unedo* plants. *J. Photochem. Photobiol.* 156: 435-444.
- Oetjen, G.W. and Haseley, P. (2007). *Freeze-Drying*, 2nd ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim .
- Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira, J. A., Baptista, P. (2009). Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food Chem. Toxicol.* 47: 1507-1511.
- Oliviera, M. F. and Franco, J. (2015). Analysis of potentialities for the consumption of fresh strawberry tree fruits: preliminary results. *Know your Food*. Volume null: 241-248.
- Olmez, Z., Temel, F., Gokturk, A. and Yahyaoglu, Z. (2007). Effect of cold stratification treatments on germination of drought tolerant shrubs seeds. *J. Environ. Biol.* 28(2 Suppl): 447 – 453.
- Ostrolucká, M.G., Gajdošová, A. and Libiaková, G. (2002). Influence of zeatin on microclonal propagation of *Vaccinium corymbosum* L. *Propag. Ornam. Plants* 2: 14–18.

- Overview of Forest Pests, (2008). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Forestry Department, Forest Health & Biosecurity Working Papers. Cyprus.
- Özcan, M. M. and Haciseferogullari, H. (2007). The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *J. Food Eng.* 78: 1022-1028.
- Paine, T.D. and Lieutier, F. (2016). *Insects and diseases of Mediterranean Forest Systems*. Springer International Publishing Switzerland, pp. 33.
- Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J.C., del Castillo, M. D., Cano, M.P., de Pascual-Teresa, S. (2008). Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *J. Food Compos. Anal.* 21: 273-281.
- Papafotiou, M., Bertsouklis, K F. and Trigka, M. (2013). Micropropagation of *Arbutus unedo*, *A. andrachne*, and their natural hybrid *A. x andrachnoides*, from seedling explants. *J. Hort. Sci. Biotech.* 88(6): 768-775.
- Paula, S., Naulin, P. I., Arce, C., Galaz, C., Pausas, J. G. (2016). Lignotubers in Mediterranean basin plants. *Plant Ecol.* 2017: 661-676.
- Pavlović, D. R., Lakusić, B., Doslov-Kokorus, Z. and Kovačević, N. (2009). Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species. *Pharmazie* 64: 656-659.
- Pavlović, D. R., Branković, S., Kovacević, N., Kitić, D., Veljković, S. (2011). Comparative Study of Spasmolytic Properties Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Arbutus unedo* from Montenegro and Greece. *Phyther. Res.* 25: 749-754.
- Pawlowska, A. M., De Leo, M. and Braca, A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 54: 10234-10238.
- Pereira, M.J. (2006). Conservation of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae) by micropropagation using seedling nodal explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 42: 65–68.
- Polizzi, G. and Catara, V. (2001). First Report of Leaf Spot Caused by *Cylindrocladium pauciramosum* on *Acacia retinodes*, *Arbutus unedo*, *Feijoa sellowiana*, and *Dodonaea viscosa* in Southern Italy. *Plant Dis.* 85(7): 803.
- Porter, C.L. (1967). *Taxonomy of Flowering Plants*. 2nd Edition. W. H. Freeman and Company, San Francisco and London.
- Preston, R.J. and Braham, R.R. (2002). *North American Trees*, 5th ed. Blackwell State Press, pp. 1(1): 219.
- Ποντίκης, Κ. (2006). Πολλαπλασιασμός Καρποφόρων Δένδρων και Θάμνων. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα.
- Ratnaparkhe, M.B. (2007). Blueberry. In: Kole C. (ed.), *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Springer-Verlag Berlin.
- Reader's Digest Encyclopedia of Garden Plants and Flowers (1988). Ed by the Reader's Digest Association, London, pp.54.

- Roberts, W.G. (1993). New and Outstanding Plants. Compined Proceedings Intenstional Plant Propagators' Society, 43: 228-239.
- Rodrigues A.P., Sergio P.M., Teixeira M.R., Pais M.S. (2001). *In vitro* break of dormancy of axillary buds from woody species (*Persea indica* and *Arbutus unedo*) by sectioning with a laser beam. Plant Science 161(1): 173-178.
- Rostagno, M.A and Prado, J.M. (2013). Natural Product Extraction. Principles and Applications. The Royal Society of Chemistry, UK.
- Ruiz-Rodríguez, B.M., Sanchez-Moreno, C., De Anco, B., Sanchez-Mata, M. de C., Fernandez-Ruiz, V., Camara, M., Tardio. J. (2014). Wild *Arbutus unedo* L. and *Rubus ulmifolius* Schott fruits are underutilized sources of valuable bioactive compounds with antioxidant capacity. Fruits 69(6): 435-448.
- Ραγκούση-Ιγνατιάδου, Β. (2009). Χημεία φυσικών προϊόντων. Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα.
- Sakar, M.K., Berkman, M.Z., Cals, I. and Ruedú, P. (1991). Constituents of *Arbutus andrachne*. Fitoterapia 62: 176-177.
- Samuelsson, G. (2004). Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy, 5th ed. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm.
- Sánchez-Mata, M. de C. and Tardío, J. (2016). Mediterranean Wild Edible Plants. Ethnobotany and Food Composition Tables. Springer-Verlag New York.
- Şeker, M., Akçal, A., Sakaldaş, M., & Gündoğdu, M. A. (2010). Effects of different periods and auxins concentrations on rooting ability of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) cuttings. U.Ü. Ziraat Fak. Dergisi 24(1): 99-108.
- Serçe, S., Özgen, M., Torun, A. A. and Ercişli, S. (2010). Chemical composition, antioxidant activities and total phenolic content of *Arbutus andrachne* L. (Fam. Ericaceae) (the Greek strawberry tree) fruits from Turkey. J. Food Compos. Anal. 23: 619-623.
- Shahidi, F. and Naczki, M. (2004). Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrate and antioxidants by mean of Folin-Cioaltea reagent. Methods of Enzymol. 299: 152-178.
- Solecka, D. and Kacperska, A. (2003). Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. Physiol. Plant. 119(2): 253-262.
- Sorensen, P.D. (1995). *Arbutus* Linnaeus. Pp. 194–221 In Ericaceae Part II: the superior-ovaryed genera, *Flora Neotropica*, Mongraph 66, ed. J. L. Luteyn. New York: New York Botanical Garden.
- Soufleros, E.H., Mygdalia, S. A. and Natskoulis, P. (2005). Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate “koumaro” by aromatic and mineral composition. J. Food Compos. Anal. 18: 699-716.
- Stevens, P.E. (1971). A classification of the Ericaceae: subfamilies and tribes. Bot. J. Linn. Soc. 64: 1-53.

- Sulusoglu, M. (2012). Development of a Rooted Cutting Propagation Method for Selected *Arbutus unedo* L. Types and Seasonal Variation in Rooting Capacity. *J. Agric. Sci.* 4(11): 216-225.
- Synge, P.M, (1981). *Dictionary of Gardening*. Vol 1, 163-164. Oxford University Press.
- The European Garden Flora (1997). Volume V, Cambridge University Press, pp.485-486.
- The Miller Manual of Trees and Shrubs (2007). Ed by David and Charles Limited. Cincinnati. pp. 26.
- Thompson, K. and Ooi, M.K.J. (2010). To germinate or not to germinate: more than just a question of dormancy. *Seed Sci. Res.* 20: 209 – 211.
- Tilki, F. (2004). Improvement in seed germination of *Arbutus unedo* L. *Pak. J. Biol. Sci.* 7(10): 1640-1642.
- Tixier, P. and Bon, H. (2006). Urban horticulture, In van Veenhuizen, R. (ed) *Cities farming for the future: urban agriculture, for green and productive cities*, International Institute of Rural Reconstruction and ETC Urban Agriculture, Silang, the Philippines.
- Trapero, A., Romero, M.A., Varo, R., and Sánchez, M.E. (2003). First Report of *Pestalotiopsis maculans* Causing Necrotic Leaf Spots in Nursery Plants of *Arbutus unedo* and *Ceratonia siliqua* in Spain. *Plant Dis.* 87(10): 1263.
- Tsahouridou. P.C. and Thanassouloupoulos, C.C. (2000). First Report of *Hendersonula toruloidea* as a Foliar Pathogen of Strawberry-tree (*Arbutus unedo*) in Europe. *Plant Dis.* 84(4): 487.
- Ταραντίλης, Π. και Παππάς, Χρ. (2015). Τεχνικές Εκχύλισης και Απόσταξης. Extraction and Distillation Technique. Εργαστηρακές σημειώσεις. Γ.Π.Α., Αθήνα.
- Τζανακάκης, Μ. Ε. και Κατσλογιαννος, Β. Ι. (2003). Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Εκδόσεις ΑγροΤύπος, Αθήνα.
- Waterman, P.G. and Mole, S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Zeunert, J. (2012). *Eating the Landscape: Aesthetic Foodscape Design and its Role in Australian Landscape Architecture*, JOLA.
- Ziani, B. E. C., Calhelha, R.C., Barreira, J.C.M., Barros, L., Hazzit, M., Ferreira, I. C.F.R. (2015). Bioactive properties of medicinal plants from the Algerian flora: Selecting the species with the highest potential in view of application purposes. *Ind. Crops Prod.* 77: 582-589.
- Ziv, M. (1986). *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: Withers AW, Alderson PG (Eds) *Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications*. Butterworth, London pp 187-196.
- Zomlefer, W.B. (1994). *Guide to Flowering Plant Families*. The University of North Carolina Press, ChapelHill and London.
- Χαριζάνης, Π. (1996). Μέλισσα και Μελισσοκομική τεχνική. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. σελ. 108-109.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

1. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Ericaceae/Arbutus>
2. <http://apps.inforest.gr/entoma.php>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Διαγραμματική απεικόνιση της αρχικής καλλιέργειας, του σταδίου πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών και της ριζοβολίας του *A. unedo* var. *rubra*, από νεανικούς ιστούς σποροφύτων ανεπτυγμένα *in vitro*.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Διαγραμματική απεικόνιση της αρχικής καλλιέργειας, του σταδίου πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών και της ριζοβολίας του *A. unedo* var. *rubra*, από ενήλικο αυτοφύες φυτό.

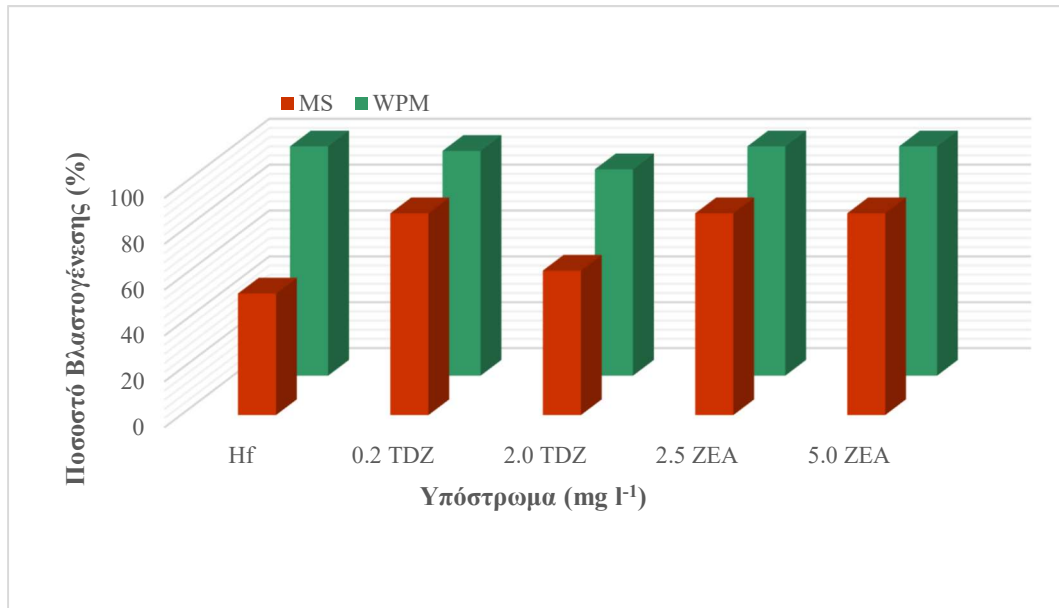
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Διαγραμματική απεικόνιση της περιεκτικότητας των φύλλων των τεσσάρων taxa σε ολικά φαινολικά συστατικά κατά τα στάδια συλλογής.

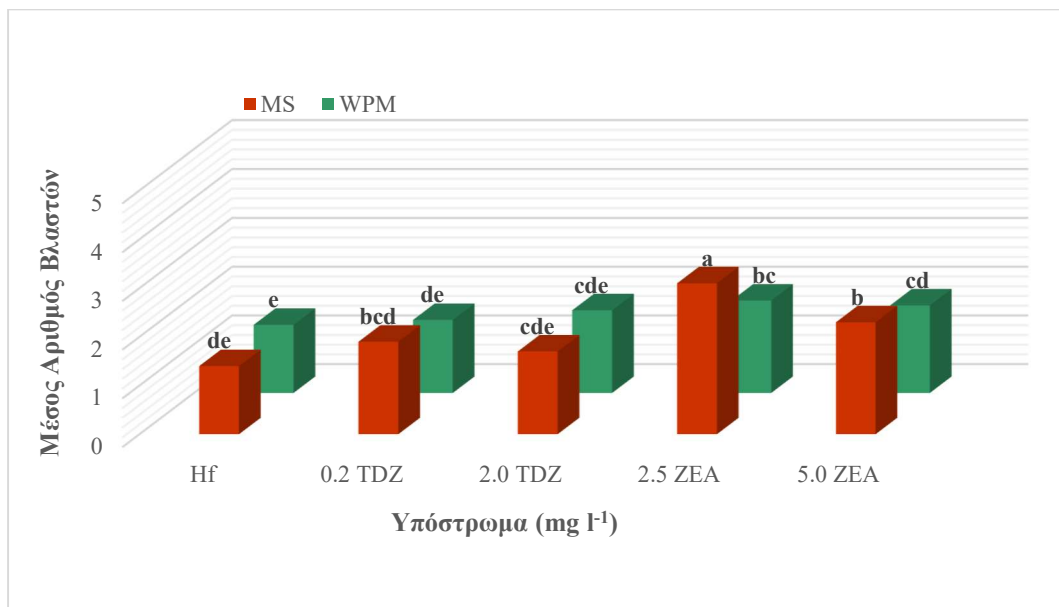
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη.

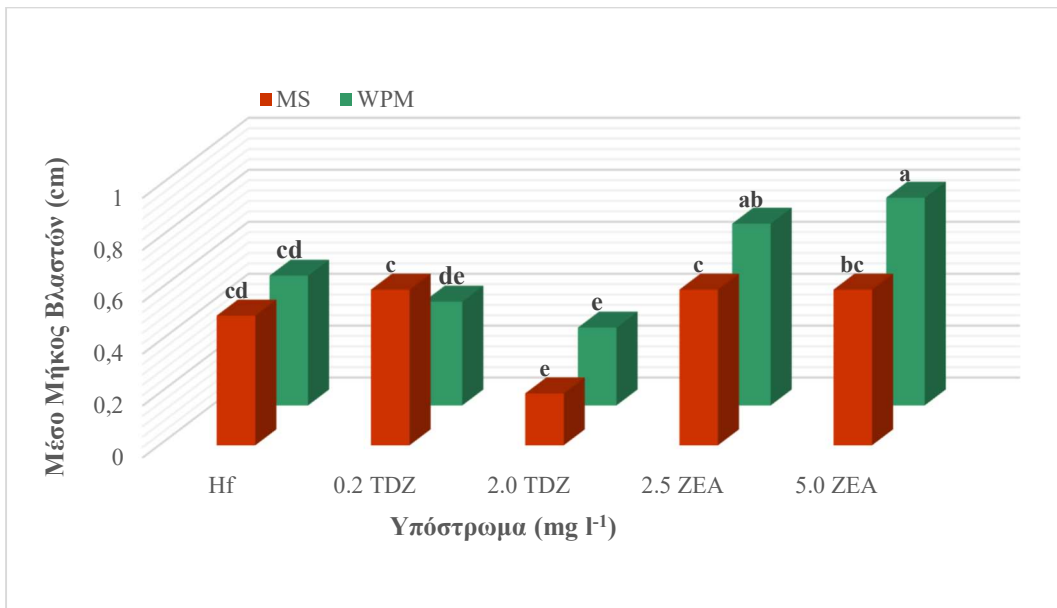
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



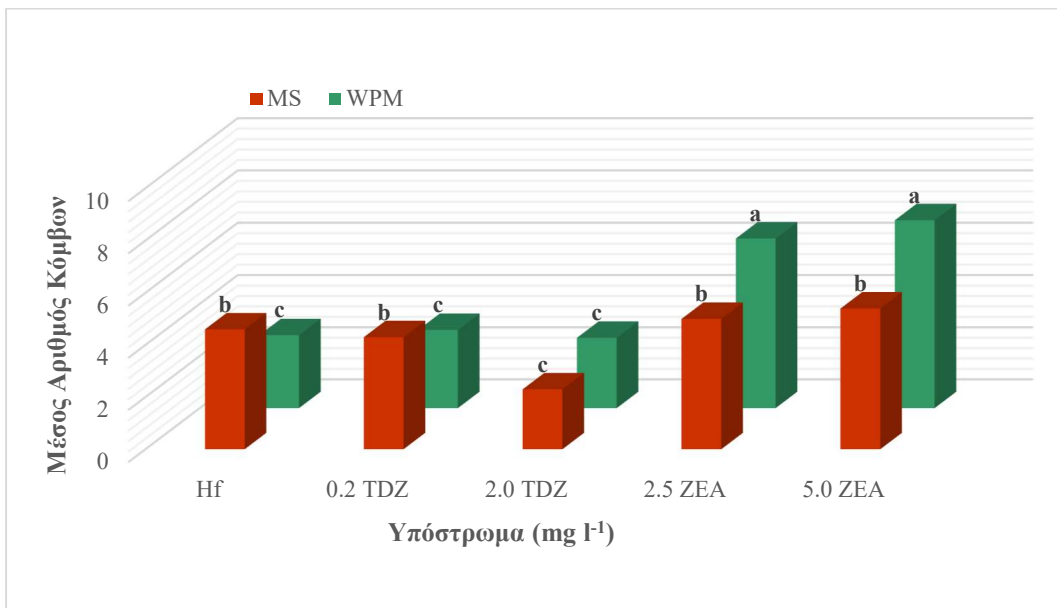
Σχ. 1. Επίδραση του υποστρώματος και της κυτοκινίνης στη βλαστογένεση (%) εκφύτων κόμβων του *A. unedo* var. *rubra* κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από νεανικούς ιστούς σποροφύτων. Σύγκριση μέσω Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=32-44$.



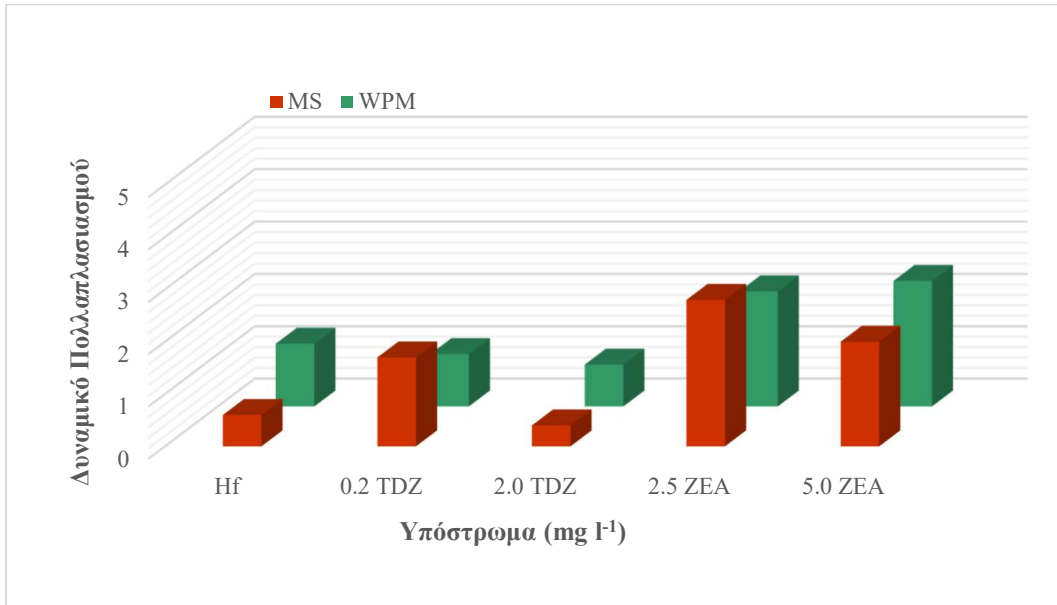
Σχ. 2. Επίδραση του υποστρώματος και της κυτοκινίνης στον αριθμό των παραγόμενων βλαστών από έκφυτα νεανικών ιστών σποροφύτων του *A. unedo* var. *rubra* κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας. Σύγκριση μέσω Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=32-44$.



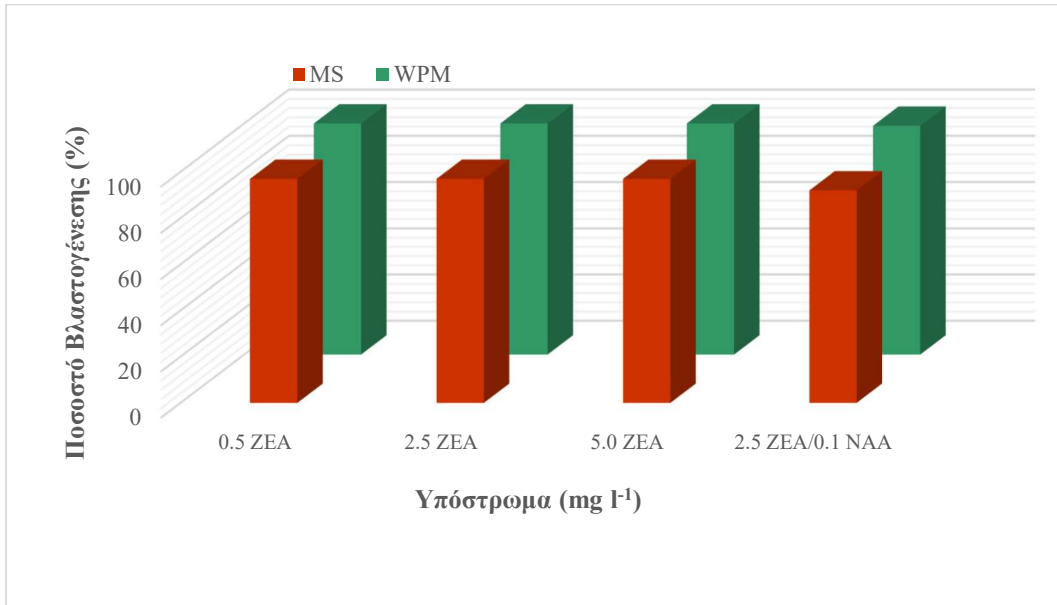
Σχ. 3. Επίδραση του υποστρώματος και της κυτοκινίνης στο μέσο μήκος των παραραγόμενων βλαστών από έκφυτα νεανικών ιστών σποροφύτων του *A. unedo* var. *rubra* κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=32-44$.



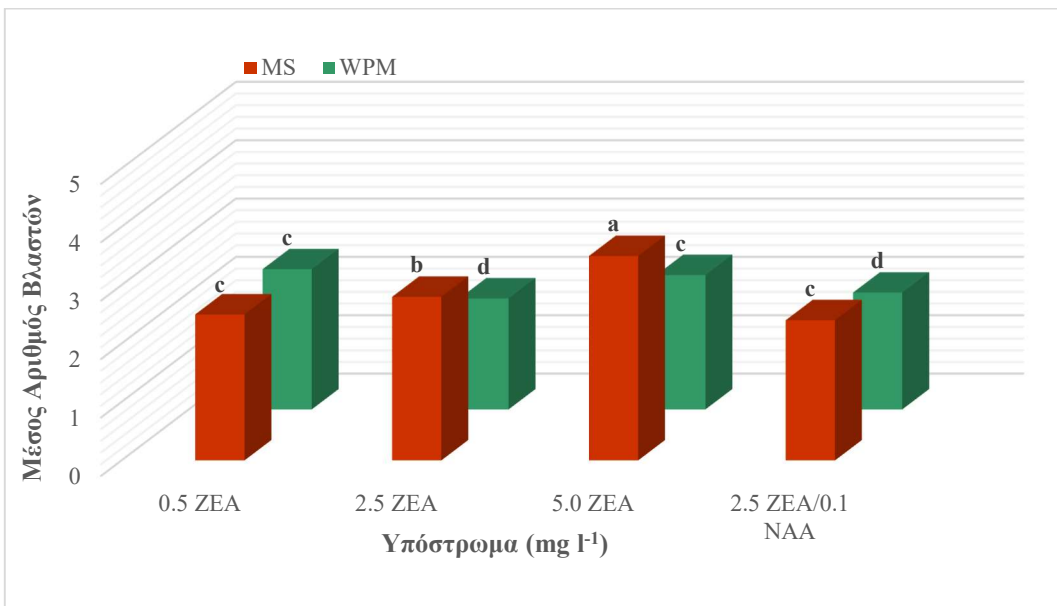
Σχ. 4. Επίδραση του υποστρώματος και της κυτοκινίνης στον αριθμό των κόμβων από έκφυτα νεανικών ιστών σποροφύτων του *A. unedo* var. *rubra* κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=32-44$.



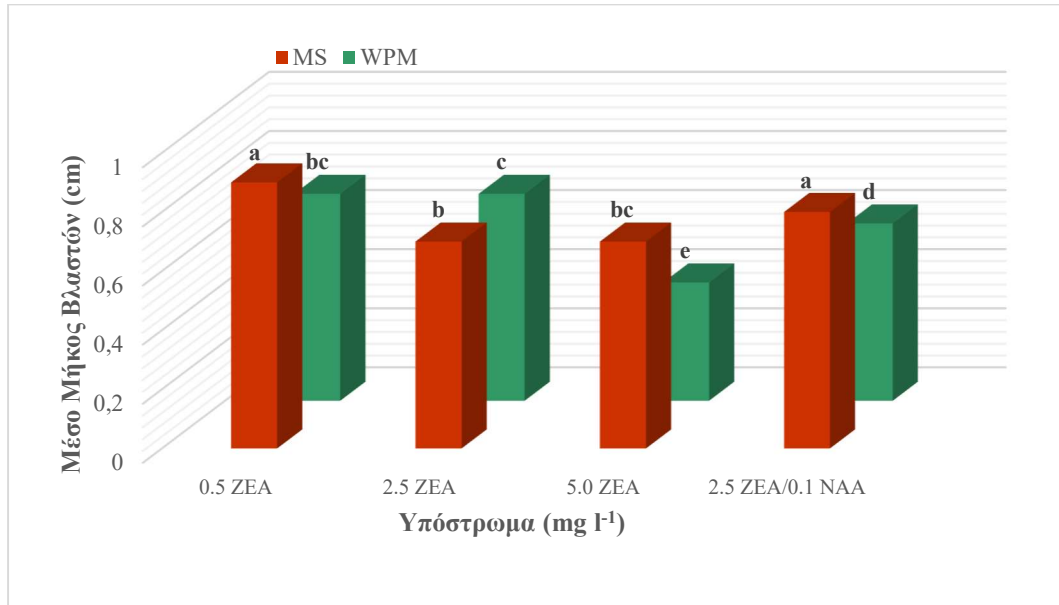
Σχ. 5. Επίδραση του υποστρώματος και της κυτοκινίνης στο δυναμικό πολλαπλασιασμού κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του *A. unedo* var. *rubra* από νεανικούς ιστούς σποροφύτων. Δυναμικό πολλαπλασιασμού=Βλαστογένεση (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6. Σύγκριση μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=32-44$.



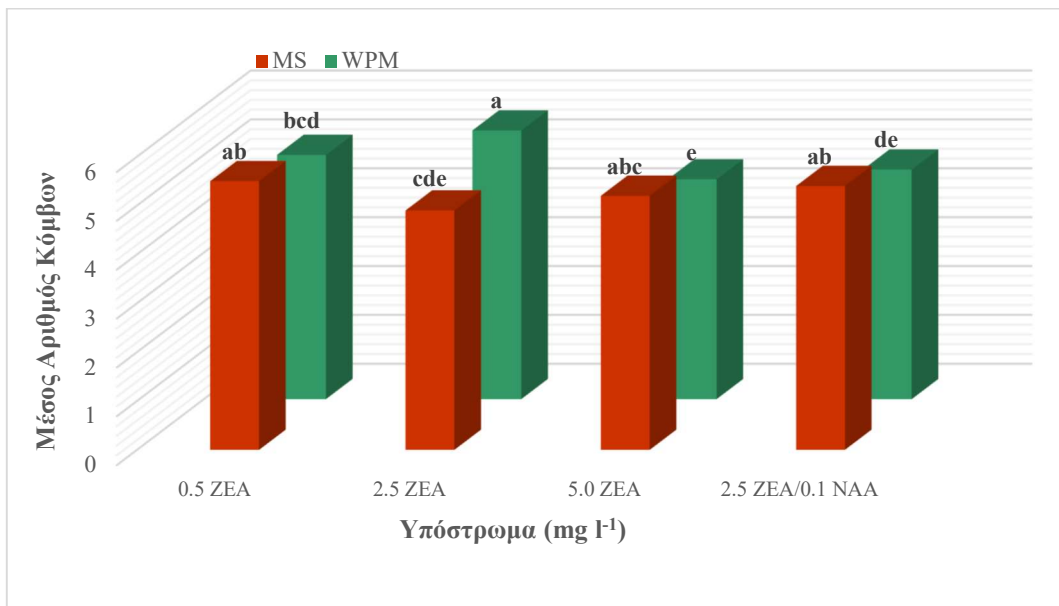
Σχ. 6. Επίδραση του υποστρώματος και της συγκέντρωσης της ZEA, μόνη ή σε συνδυασμό με NAA, στη βλαστογένεση (%) εκφύτων κόμβων του *A. unedo* var. *rubra* κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών. Σύγκριση μέσω Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=90-165$. Μ.Ο υποκαλλιεργειών.



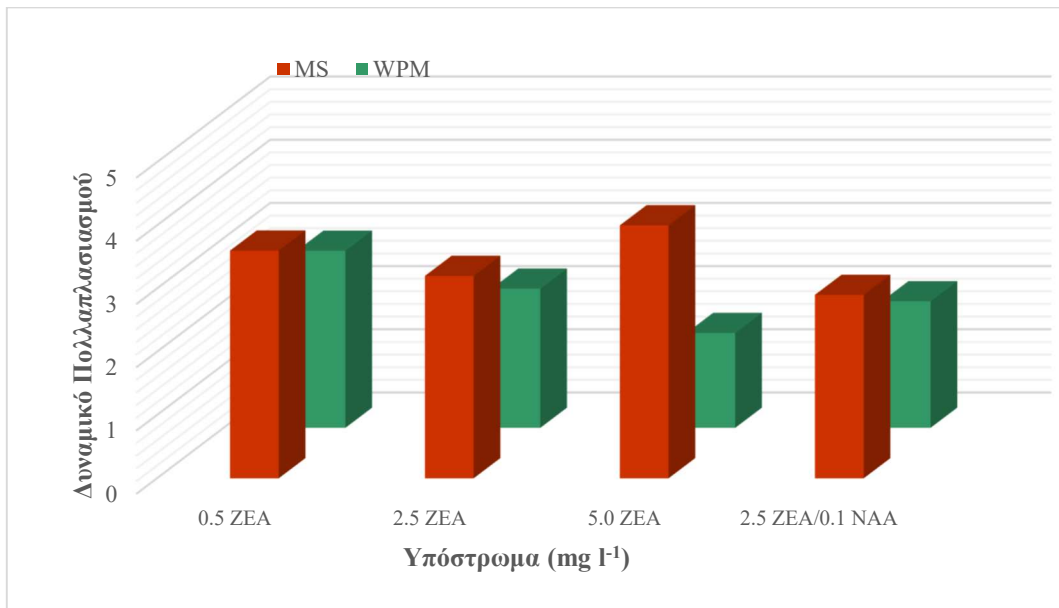
Σχ. 7. Επίδραση του υποστρώματος και της συγκέντρωσης της ZEA, μόνη ή σε συνδυασμό με NAA, στον αριθμό των παραγόμενων βλαστών κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών του *A. unedo* var. *rubra*. Σύγκριση μέσω Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=90-165$. Μ.Ο υποκαλλιεργειών.



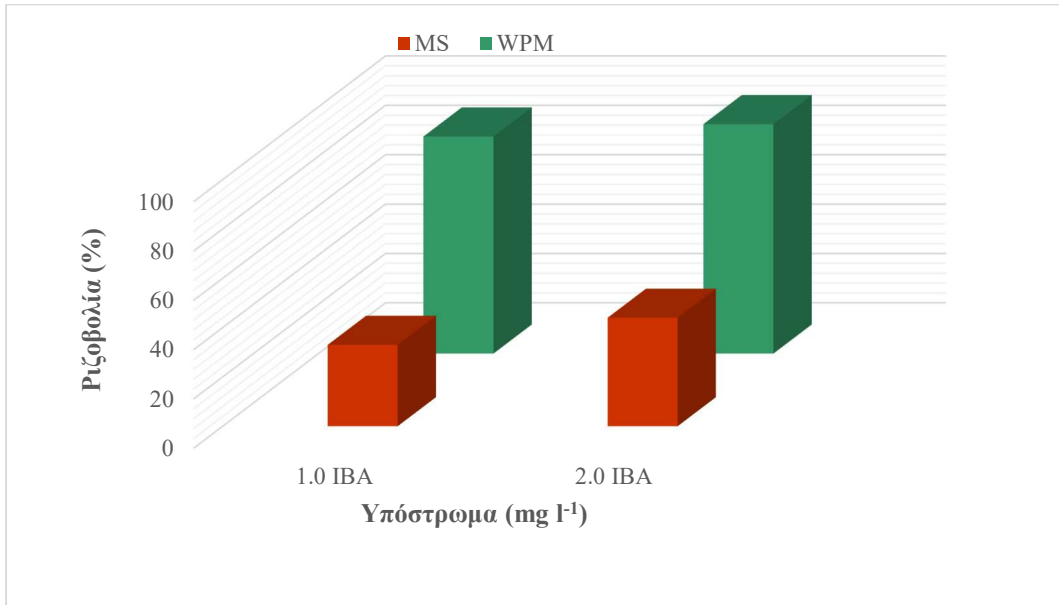
Σχ. 8. Επίδραση του υποστρώματος και της συγκέντρωσης της ZEA, μόνη ή σε συνδυασμό με NAA, στο μέσο μήκος των παραραγόμενων βλαστών κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών του *A. unedo* var. *rubra*. Σύγκριση μέσω Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=90-165$. Μ.Ο υποκαλλιεργειών.



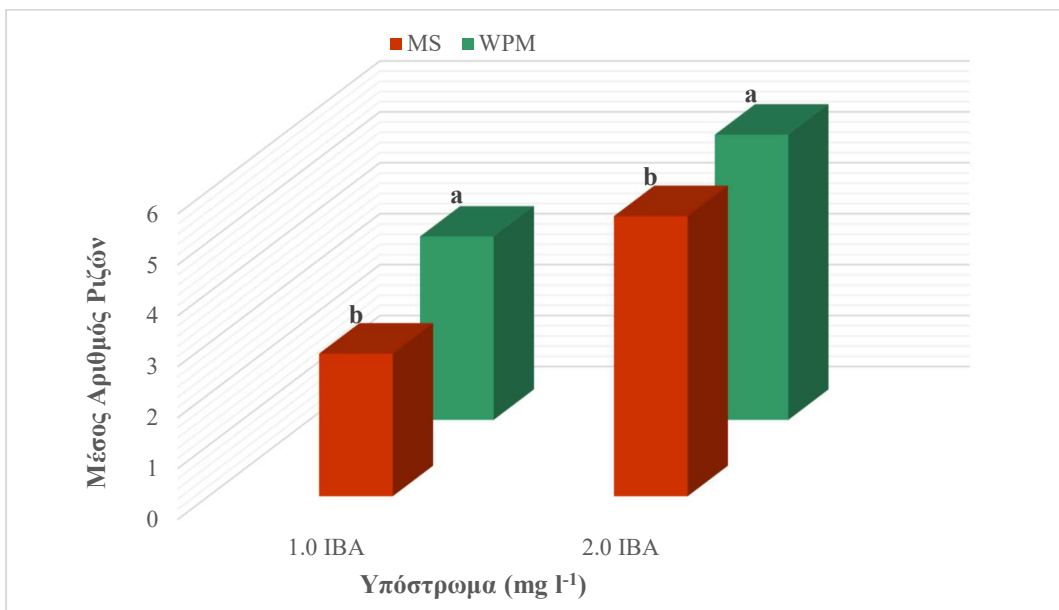
Σχ. 9. Επίδραση του υποστρώματος και της συγκέντρωσης της ZEA, μόνη ή σε συνδυασμό με NAA, στον αριθμό των κόμβων κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών του *A. unedo* var. *rubra*. Σύγκριση μέσω Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=90-165$. Μ.Ο υποκαλλιεργειών.



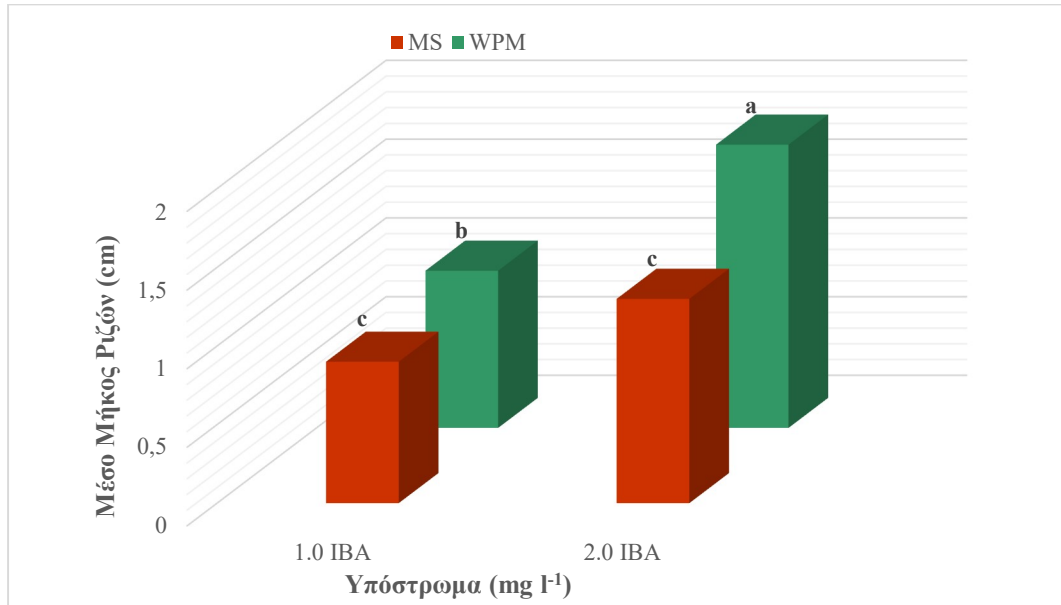
Σχ. 10. Επίδραση του υποστρώματος και της συγκέντρωσης της ZEA, μόνη ή σε συνδυασμό με NAA, στο δυναμικό πολλαπλασιασμού κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών του *A. unedo* var. *rubra*. Δυναμικό πολλαπλασιασμού= Ποσοστό βλαστογένεσης (%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο μήκος βλαστών/0,6. . Σύγκριση μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=90-165$. Μ.Ο υποκαλλιεργειών.



Σχ. 11. Επίδραση του υποστρώματος και της συγκέντρωσης του IBA στη ριζοβολία μικροβλαστών *A. unedo* var. *rubra*. Σύγκριση μέσω Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=30-40$.

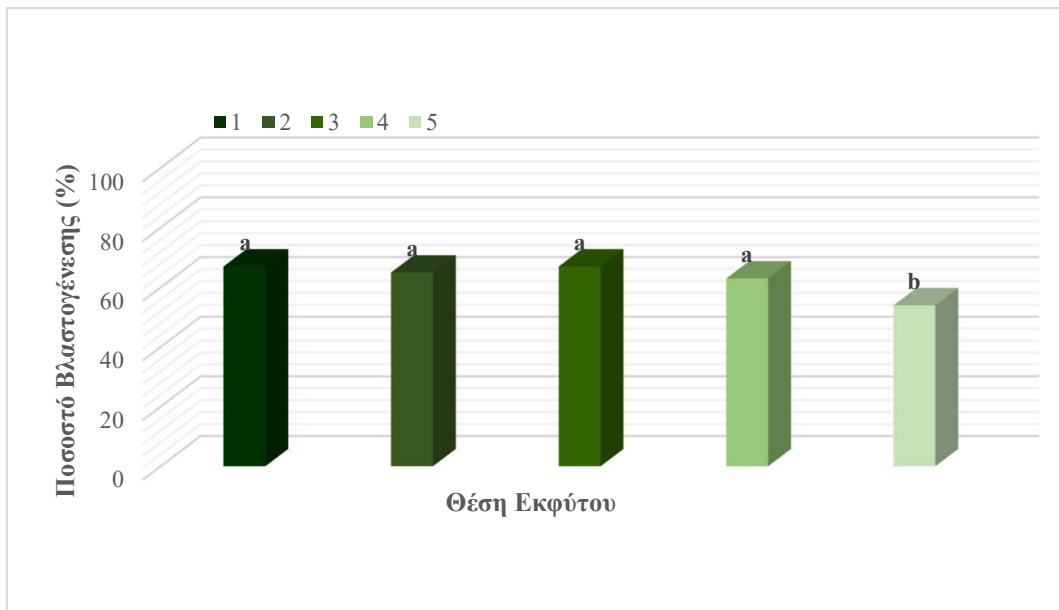


Σχ. 12. Επίδραση του υποστρώματος και της συγκέντρωσης του IBA στον αριθμό των παραγόμενων ριζών σε μικροβλαστούς του *A. unedo* var. *rubra*. Σύγκριση μέσω Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=30-40$.

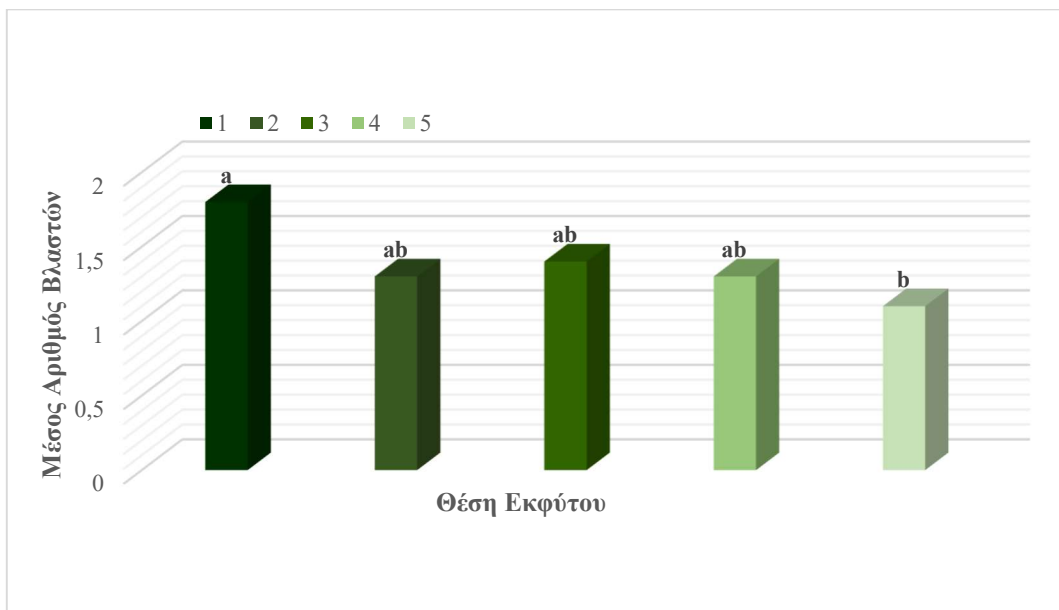


Σχ. 13. Επίδραση του υποστρώματος και της συγκέντρωσης του IBA στο μέσο μήκος των παραγόμενων ριζών σε μικροβλαστούς του *A. unedo* var. *rubra*. Σύγκριση μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=30-40$.

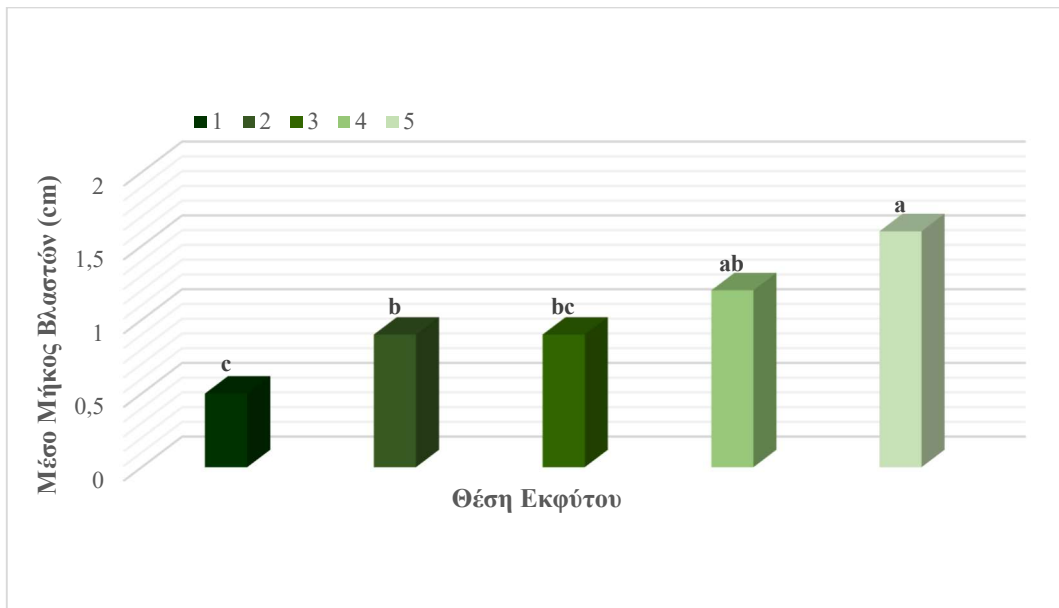
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ



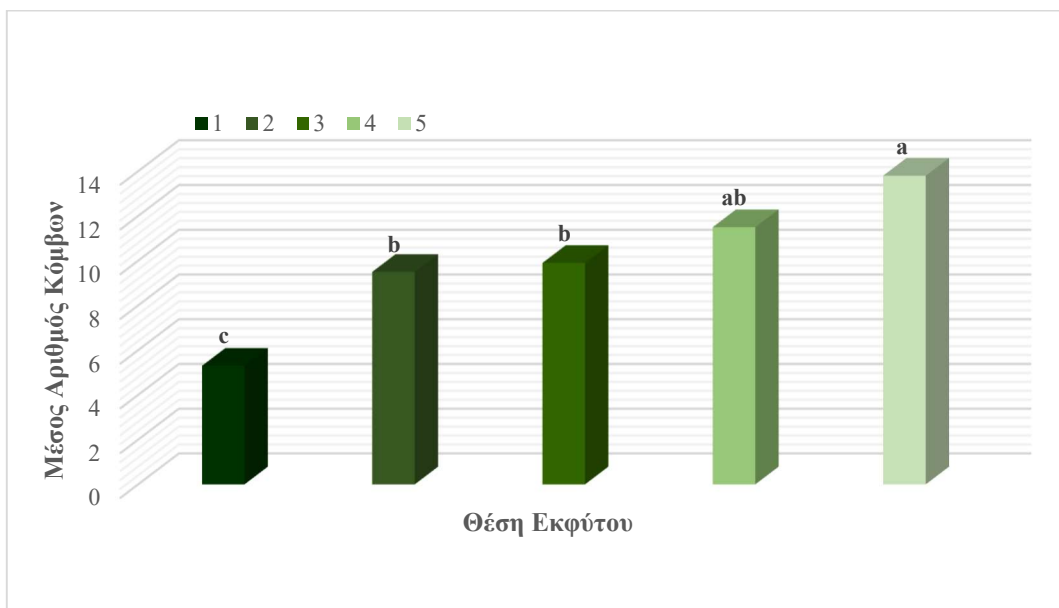
Σχ. 14. Επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό βλαστό στη βλαστογένεση (%) εκφύτων κόμβου του *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από ενήλικο αυτοφυές φυτό. Σύγκριση των μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=24$.



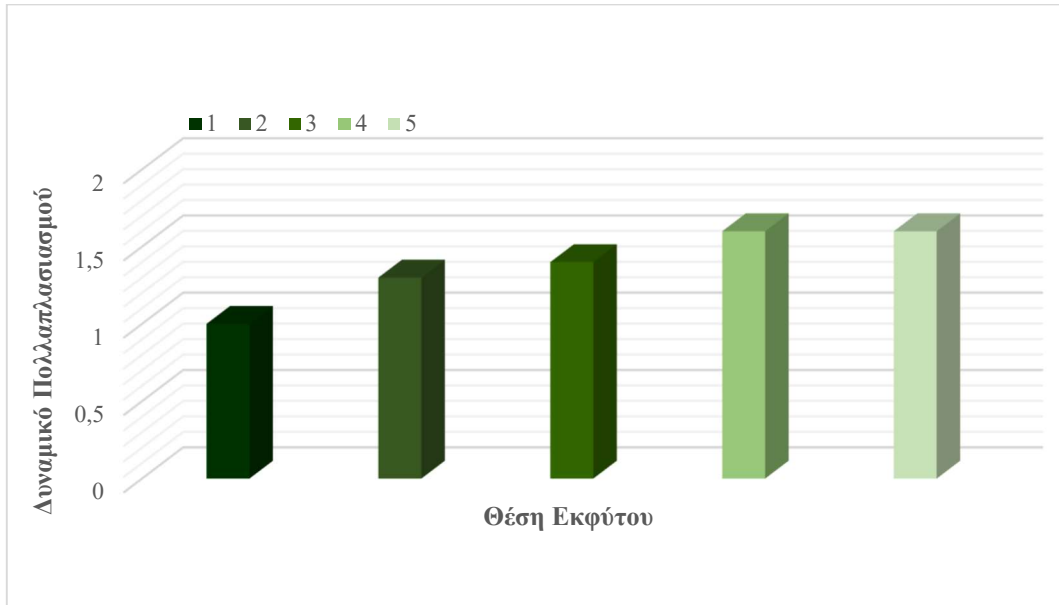
Σχ. 15. Επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό βλαστό στον αριθμό των παραγόμενων βλαστών *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από ενήλικο αυτοφυές φυτό. Σύγκριση των μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=24$.



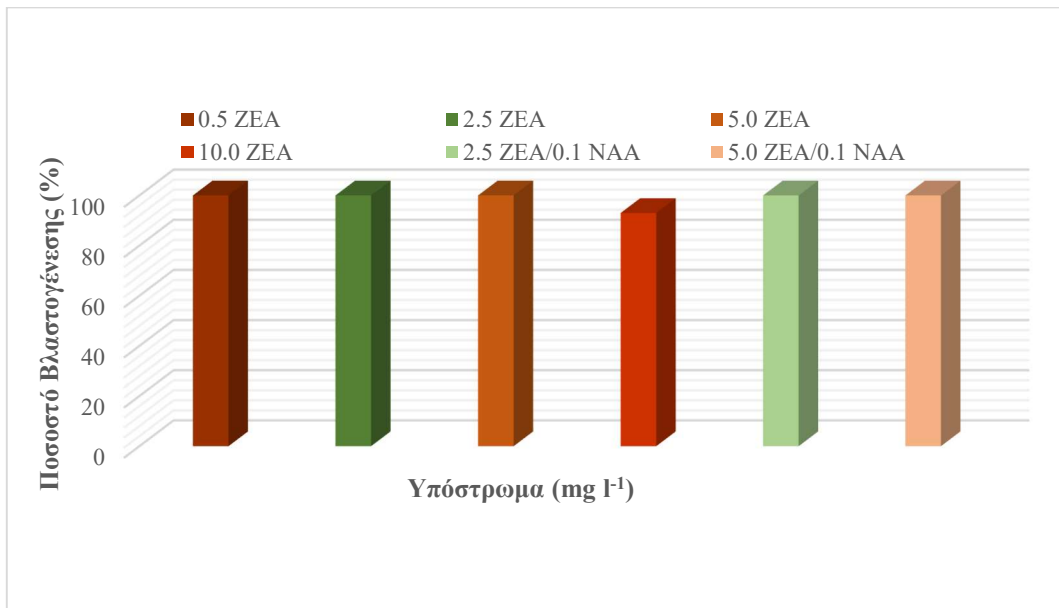
Σχ. 16. Επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό βλαστό στο μέσο μήκος των παραγόμενων βλαστών *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από ενήλικο αυτοφυές φυτό. Σύγκριση των μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=24$.



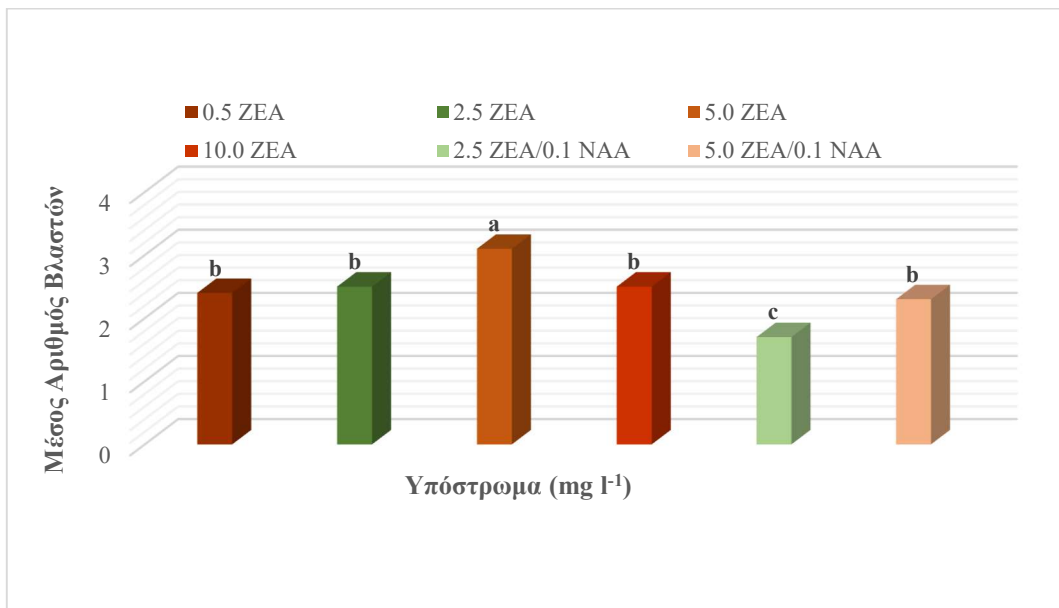
Σχ. 17. Επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό βλαστό στον αριθμό κόμβων *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEA κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από ενήλικο αυτοφυές φυτό. Σύγκριση των μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=24$.



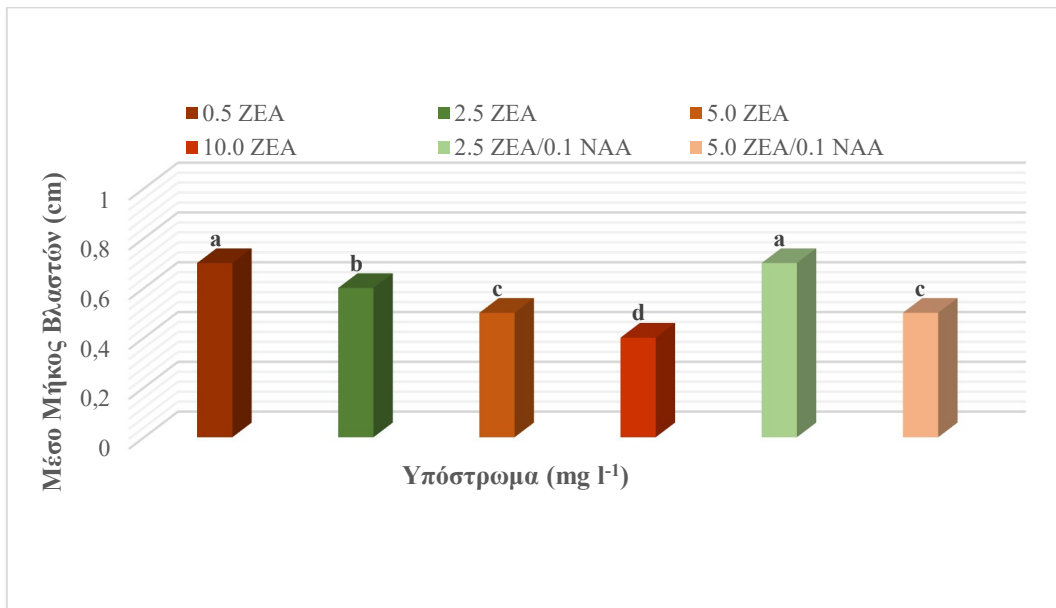
Σχ. 18. Επίδραση της θέσης του εκφύτου στο δυναμικό πολλαπλασιασμού του *A. unedo* var. *rubra* σε υπόστρωμα WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από ενήλικο αυτοφυές φυτό. Σύγκριση των μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=24$.



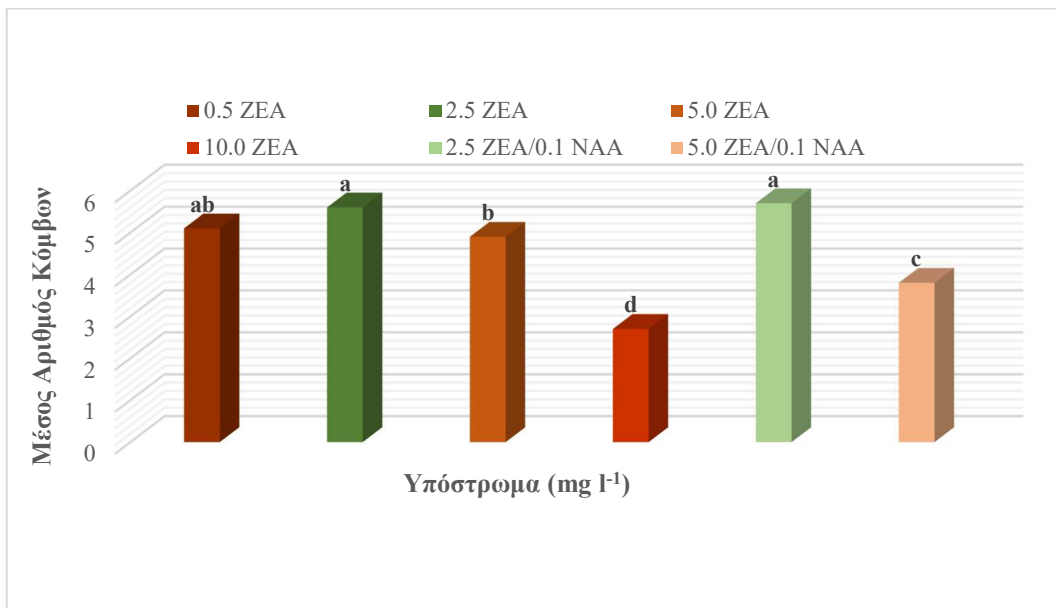
Σχ. 19. Επίδραση του υποστρώματος στη βλαστογένεση (%) εκφύτων κόμβων του *A. unedo* var. *rubra* κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών. Σύγκριση των μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=30-145$. Μ.Ο υποκαλλιεργειών.



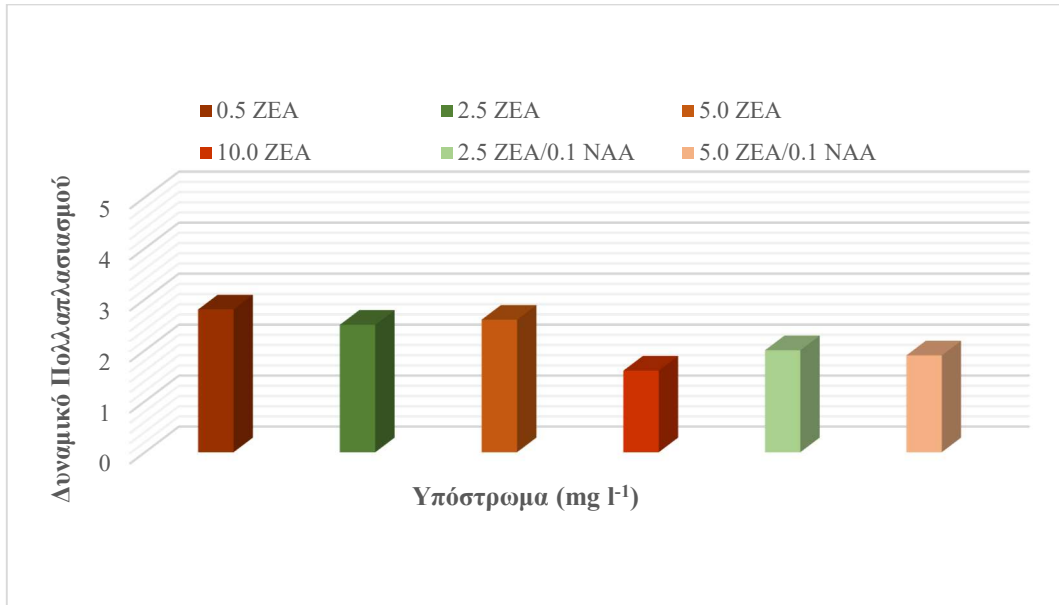
Σχ. 20. Επίδραση του υποστρώματος στον αριθμό των παραγόμενων βλαστών κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών. Σύγκριση των μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=30-145$. Μ.Ο υποκαλλιεργειών.



Σχ. 21. Επίδραση του υποστρώματος στο μήκος των παραγόμενων βλαστών του *A. unedo* var. *rubra* κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών. Σύγκριση των μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=30-145$. Μ.Ο υποκαλλιεργειών.

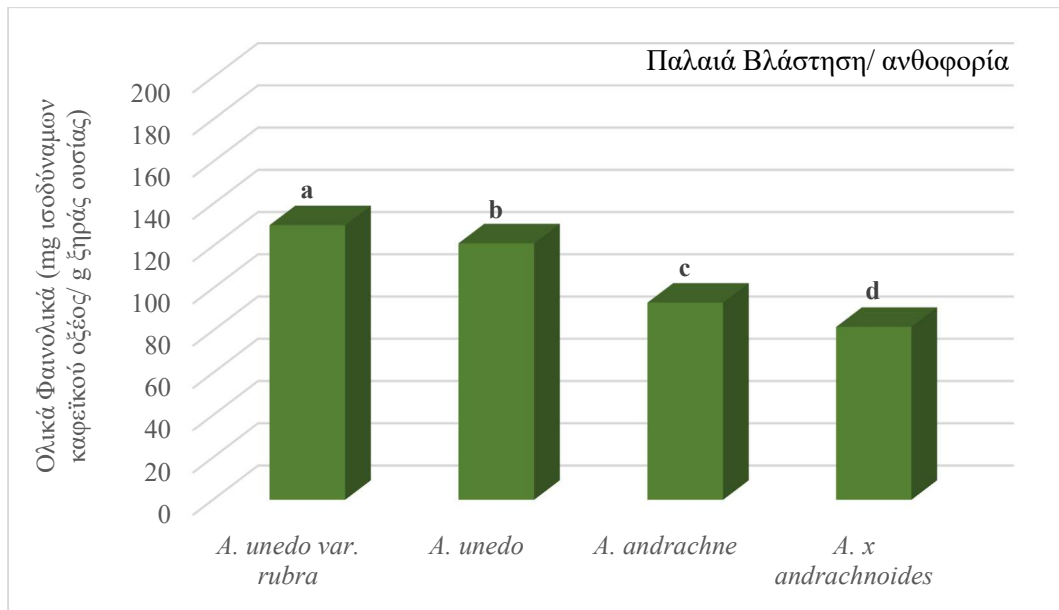


Σχ. 22. Επίδραση του υποστρώματος στον αριθμό των κόμβων κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών. Σύγκριση των μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=30-145$. Μ.Ο υποκαλλιεργειών.

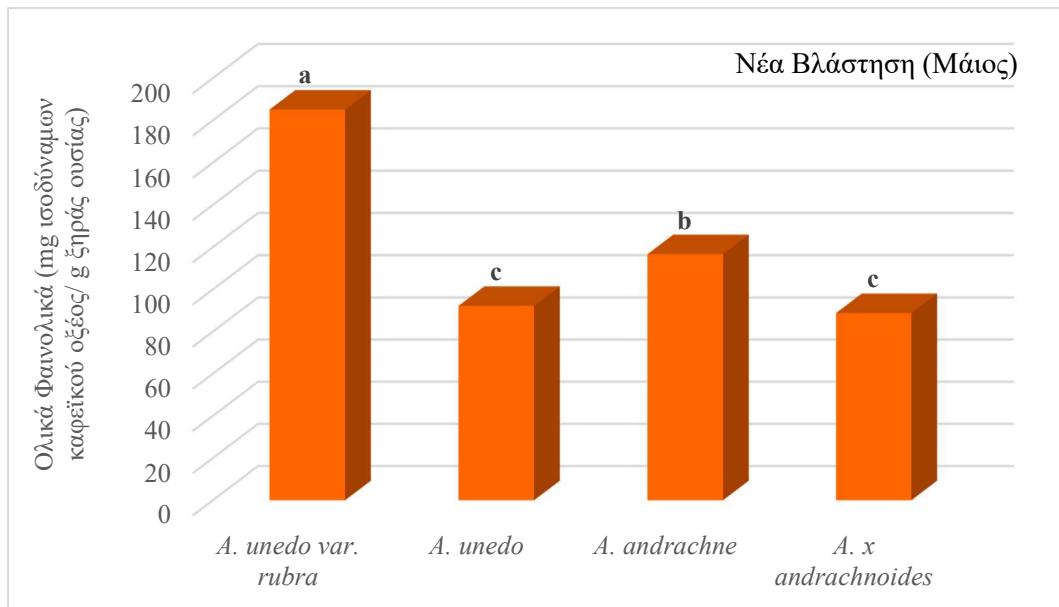


Σχ. 23. Επίδραση του υποστρώματος στο δυναμικό πολλαπλασιασμού του *A. unedo* var. *rubra* κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών. Σύγκριση των μέσων με Student's *t*-test σε $P \leq 0,05$, $n=30-145$. Μ.Ο υποκαλλιεργειών.

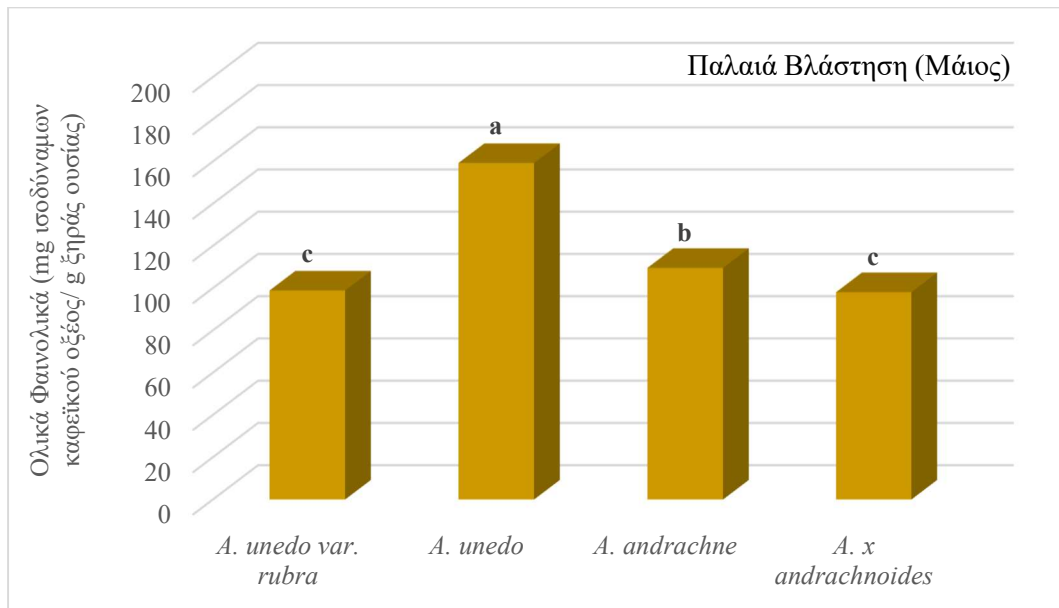
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ



Σχ. 24. Περιεκτικότητα των διάφορων taxa σε ολικά φαινολικά σε δείγματα φύλλων που συλλέχθηκαν κατά το στάδιο της ανθοφορίας, δηλ. Απρίλιο από *A. andrachne* και Δεκέμβριο από τα άλλα taxa.



Σχ. 25. Περιεκτικότητα των διάφορων taxa σε ολικά φαινολικά σε δείγματα φύλλων που συλλέχθηκαν τον Μάιο από την κορυφή των βλαστών (νέα βλάστηση).



Σχ. 26. Περιεκτικότητα του *A. andrachne* σε ολικά φαινολικά σε δείγματα φύλλων που συλλέχθηκαν κατά το στάδιο της ανθοφορίας, από την κορυφή των βλαστών (νέα βλάστηση) και από χαμηλότερα στο βλαστό (παλαιά βλάστηση).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Επιστημονικές Δημοσιεύσεις

Από την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη έχουν δημοσιευτεί οι εξής εργασίες σε πρακτικά διεθνών ή εθνικών συνεδρίων με σύστημα κριτών:

1. **Papagianni, A., Parafotiou, M. and Bertsouklis, K.F.** (2016). *In vitro* propagation of *Arbutus unedo* var. *rubra* starting from seedlings and adult parental plants. 6th International Conference on Landscape and Urban Horticulture, 20-25 June 2016, Athens, Greece, *Acta Hort.*, in press.
2. **Παπαγιάννη, Α., Παπαφωτίου, Μ. και Μπερτσουκλής, Κ.Φ.** (2016). Διερεύνηση του μικροπολλαπλασιασμού του *Arbutus unedo* var. *rubra*. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 27^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 28 Σεπτ. – 1 Οκτ. 2015, Βόλος, τόμος 17(β), 266-269.
3. **Παπαγιάννη, Α., Παπαφωτίου, Μ. και Μπερτσουκλής, Κ.Φ.** (2017). *In vitro* πολλαπλασιασμός του *Arbutus unedo* var. *rubra*. 28^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 16-20 Οκτ. 2017, Θεσσαλονίκη, Υποβλήθηκε προς κρίση.
4. **Παπαγιάννη, Α., Παπαφωτίου, Μ. και Μπερτσουκλής, Κ.Φ.** (2017). Εποχική διακύμανση της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά των ειδών *Arbutus* της Ελλάδας. 28^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 16-20 Οκτ. 2017, Θεσσαλονίκη, Υποβλήθηκε προς κρίση.

In vitro propagation of *Arbutus unedo* var. *rubra* starting from seedlings and adult parental plants

A. Papagianni, M. Papafotiou and K.F. Bertsoyklis

Laboratory of Floriculture and Landscape Architecture, Department of Crop Science, School of Agriculture, Engineering and Environmental Sciences, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 118 55 Athens, Greece. E mail: mpapaf@aua.gr

Abstract

Shooting of nodal explants excised from two-month old *A. unedo* var. *rubra* seedlings was promoted by Woody Plant Medium supplemented with Mullin vitamins (WPM) (100% shooting) compared to Murashige and Skoog (MS) medium (53% shooting), as well as by zeatin (ZEA) at 2.5 or 5.0 mg L⁻¹ (88% shooting on MS medium and 100% on WPM). Thidiazuron (TDZ) at 0.2 mg L⁻¹ induced shooting at similar percentages to ZEA, while at 2 mg L⁻¹ inhibited shooting (63% on MS medium, 90% on WPM). More shoots per explant (2-3), as well as longer shoots (0.6 - 0.8 cm) with more nodes (5.0 - 7.2) were produced on media supplemented with ZEA. Nodal explants excised in early May from young shoots of a wild adult plant and cultured on WPM with 2.5 mg L⁻¹ ZEA sprouted at lower percentage (63%) and formed less shoots per explant (1.4) compared to seedling-originated explants. At the shoot multiplication stage MS medium and WPM were supplemented with 0.5, 2.5 and 10.0 mg L⁻¹ ZEA alone or in combination with 0.1 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA). In all treatments, almost all the explants produced shoots, while the number of shoots per explant remained at the level of the establishment stage (max 3) and the mean shoot length was less than 1 cm. Microshoot rooting occurred at higher percentages on full- or half-strength WPM (88-94%) compared to full- or half-strength MS medium (32-44%), under 1 or 2 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA). All plantlets (100%) were successfully acclimatized ex vitro on a mix of peat: perlite 1:1 (v/v).

Keywords: acclimatization, cytokinins, ericaceae, explant origin, pink strawberry tree

INTRODUCTION

Arbutus unedo var. *rubra* Aiton (f. Ericaceae, syn. var. *Croomei*) is a pink-flowered form of *A. unedo* L., a basic evergreen shrub of macchia vegetation. Pink flowers are borne in pendent terminal panicles, 8 cm long, from October to December, simultaneously with the orange-red strawberry-like fruits (Roy, 1988). The white-flowered *Arbutus unedo* (strawberry tree) is widely used as an ornamental plant and in reforestations at the Mediterranean region (Konstantinidis et al., 2006). Similarly the pink-flowered form could be of high value in the landscape.

There is a number of reports on white-flowered *A. unedo* propagation, either by seed (Bertsoyklis and Papafotiou, 2013), or by micropropagation using explants excised from either adult plants (Gomes and Canhoto, 2009; El-Sayed El-Mahrouk et al., 2010) or seedlings (Papafotiou et al., 2013), but there is no report found in the literature on propagation of the pink-flowered form. Therefore, the aim of this work was to develop an efficient protocol for in vitro propagation of *A. unedo* var. *rubra*, as a first step to facilitate its use as an ornamental plant in urban and suburban landscapes, as well as a forestry plant.

MATERIALS AND METHODS

To establish in vitro cultures from seedlings, single-node explants were excised from two-months old *Arbutus unedo* var. *rubra* seedlings, which were grown in vitro on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) or Woody Plant Medium with Mullin vitamins (WPM) (Lloyd and McCown, 1980), supplemented with 1.0 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA). The explants were cultured on hormone-free (hf) WPM or MS medium in

correspondence with the medium that mother plant seedlings were grown, or on media supplemented either with 2.5 and 5.0 mg L⁻¹ zeatin (ZEA) or with 0.2 and 2.0 mg L⁻¹ thidiazuron (TDZ). To establish in vitro cultures from an adult plant, single-node explants were excised from young shoots in early May. They were washed under running tap water, dipped in 90% ethanol for 10 sec and surface-sterilized in 30% (v/v) commercial bleach containing 0.1% Tween-20 for 10 min. The explants were then rinsed four times for 3 min each with sterile distilled water and cultured on WPM supplemented with 2.5 mg L⁻¹ ZEA. Plant material (seeds and shoots) was collected from a wild, adult plant located on the southeast side of Mount Parnitha, Varympompi, Attiki, Greece. At shoot multiplication stage WPM and MS medium with 0.5, 2.5 or 10.0 mg L⁻¹ ZEA, as well as 2.5 mg L⁻¹ ZEA combined with 0.1 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA) were tested. At the rooting stage micro-shoots 2.0 cm long were transferred on either WPM or MS medium, full or half-strength, supplemented with 1.0 or 2.0 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA). All media were solidified with 8 g L⁻¹ agar and their pH was adjusted to 5.7 – 5.8 before agar addition and autoclaving (121 °C for 20 min). Cultures were maintained at 25±2 °C with a 16-h photoperiod at 37.5 μmol m⁻² s⁻¹ provided by cool-white fluorescent lamps.

Data were collected after 40 d of culture. The replication number (n) is given on data tables. The significance of the results was tested by one- or two-way ANOVA and the means were compared by Student's t at p≤0.05. Plantlets with well-developed roots (longer than 1 cm) were transferred on 1:1 (v/v) peat: perlite medium in containers covered with transparent plastic wrap and placed in a growth chamber for one week at 23±2 °C under a 16-h photoperiod at 37.5 μmol m⁻² s⁻¹ white light before being transferred to a heated glasshouse for ex vitro establishment.

RESULTS AND DISCUSSION

WPM induced double shooting response to explants derived from seedlings compared to MS medium (Table 1). TDZ at 0.2 mg L⁻¹ and ZEA at 2.5 or 5.0 mg L⁻¹ induced shooting at high percentages, while the increase of TDZ concentration at 2.0 mg L⁻¹ decreased shooting. Shoot number, shoot length and shoots node number were highest on ZEA-media, independently of ZEA concentration, and thus multiplication index was highest at those media (Table 1).

Table 1. Effect of nutrient medium and cytokinin type and concentration on shoot production from nodal explants excised from seedlings at the establishment stage.

Medium	cytokinin (mg L ⁻¹)	Shooting (%)	Shoot number per explant	Shoot length (cm)	Node number per shoot	Multiplication index
MS/	hf [§]	53	1.4 de	0.5 cd	4.6 b	0.6
MS/	0.2 TDZ	88	1.9 bcd	0.6 c	4.3 b	1.7
MS/	2.0 TDZ	63	1.7 cde	0.2 e	2.3 c	0.4
MS/	2.5 ZEA	88	3.1 a	0.6 c	5.0 b	2.8
MS/	5.0 ZEA	88	2.3 b	0.6 bc	5.4 b	2.0
WPM/	hf [§]	100	1.4 e	0.5 cd	2.8 c	1.2
WPM/	0.2 TDZ	98	1.5 de	0.4 de	3.0 c	1.0
WPM/	2.0 TDZ	90	1.7 cde	0.3 e	2.7 c	0.8
WPM/	2.5 ZEA	100	1.9 bc	0.7 ab	6.5 a	2.2
WPM/	5.0 ZEA	100	1.8 cd	0.8 a	7.2 a	2.4

Mean separation in columns by Student's t-test, p≤0.05, n=32-44.

Multiplication Index = shooting (%) X mean shoot number per explant X mean shoot length/0.6.

[§]Hormone free.

These results are in agreement with reports on other *Arbutus* species established from seedlings; Papafotiou et al. (2013) found that ZEA increased shoot proliferation in accordance to previous studies (George et al., 2008; Mostafa et al., 2010) referring that

natural cytokinins are more effective than synthetic ones for the micropropagation of Ericaceous species.

When explants were excised from adult plants, WPM medium supplemented with 2.5 mg L⁻¹ ZEA resulted to a lower explant sprouting (63%) and less shoots per explant (1.4) (data not shown) compared to seedling originated explants (Table 1).

Table 2. Effect of nutrient medium and plant growth regulators (PGRs) on shoot production at the multiplication stage of seedlings-derived cultures.

Medium	PGRs (mg L ⁻¹)	Shooting (%)	Shoot number per explant	Shoot length (cm)	Node number per shoot	Multiplication index
MS	0.5 ZEA	97	2.5 b	0.9 a	5.5 ab	3.6
MS	2.5 ZEA	96	2.8 a	0.7 bc	4.9 cd	3.1
MS	2.5/0.1 ZEA/NAA	92	2.4 b	0.8 ab	5.4 abc	2.9
WPM	0.5 ZEA	100	2.4 b	0.7 c	5.0 bcd	2.8
WPM	2.5 ZEA	100	1.9 c	0.7 c	5.6 a	2.2
WPM	2.5/0.1 ZEA/NAA	99	2.0 c	0.6 d	4.7 d	2.0
F _{PGRs}			*	-	-	
F _{medium}			*	-	-	
F _{interaction}			NS	*	*	

Mean separation in columns by Student's t-test, p≤ 0.05, n=100-200.

*:Significant at p≤0.05, NS: not significant at p≤0.05.

Multiplication Index = shooting (%) x mean shoot number per explant x mean shoot length/0.6.

Pooled data of three subcultures.

Table 3. Effect of plant growth regulators (PGRs) on shoot production at the multiplication stage of adult-plant derived cultures on WPM.

PGRs (mg L ⁻¹)	Shooting (%)	Shoot number per explant	Shoot length (cm)	Node number per shoot	Multiplication index
0.5 ZEA	100	2.4 a	0.7 a	5.2 a	2.8
2.5 ZEA	100	2.5 a	0.6 b	5.6 a	2.5
10.0 ZEA	93	2.5 a	0.4 c	2.7 b	1.6
2.5/0.1 ZEA/NAA	100	1.7 b	0.7 a	5.7 a	2.0

Mean separation in columns by Student's t-test, p≤0.05, n=60-140.

Multiplication Index = shooting (%) X mean shoot number per explant X mean shoot length/0.6.

Pooled data of three subcultures.

Table 4. Rooting of microshoots cultured on full- or half-strength WPM or MS medium supplemented with 1 or 2 mg L⁻¹ IBA.

Medium	Rooting (%)	Root number	Root length (cm)
MS + 1 IBA	33	2.9 b	0.9 c
MS + 2 IBA	44	3.6 b	1.0 c
½ MS + 1 IBA	44	3.3 b	1.1 bc
WPM + 1 IBA	88	5.5 a	1.3 b
WPM + 2 IBA	93	5.6 a	1.8 a
½ WPM + 1 IBA	94	5.6 a	2.0 a

Mean separation in columns by Student's t-test, p≤0.05, n=64-80.

At the shoot multiplication stage, shooting was very high in all treatments, while slightly more shoots per explant were produced on MS medium supplemented with 2.5 mg l⁻¹ ZEA (Table 2). Shoot length was small (Table 2), as at the establishment stage. Similar responses were obtained with adult-plant derived explants (Table 3). Neither the increase of ZEA concentration nor the addition of NAA to the medium induced higher shoot proliferation. The effectiveness of ZEA at rather low concentrations (0.5 or 2.5 mg

L⁻¹) is in agreement with previous studies on other *Arbutus* species (Bertsouklis and Papafotiu, 2009, 2011).

Microshoots from seedlings-derived cultures rooted at high percentages on full- or half-strength WPM with 1 or 2 mg L⁻¹ IBA (Table 4). The rate of rooting on full- or half-strength MS medium was low, as observed by Mostafa et al. (2010) and Papafotiu et al. (2013) for *A. unedo*, *A. andrachne* and *A. x andrachnoides*. Half-strength WPM with 1 mg L⁻¹ IBA was also highly efficient (100%, data not shown) for rooting of microshoots produced from adult-plant derived cultures. Ex vitro acclimatization of plantlets was 100% successful on peat: perlite (1:1, v/v), as also found for other *Arbutus* species (Papafotiu et al., 2013).

CONCLUSIONS

WPM supplemented with 2.5 mg L⁻¹ ZEA was effective for in-vitro cultures establishment from either young seedlings or an adult plant. ZEA at 0.5 mg L⁻¹ was appropriate for the shoot multiplication stage, and half-strength WPM with 1 mg L⁻¹ IBA for microshoot rooting. A mix of peat: perlite (1:1, v/v) led to successful ex vitro acclimatization.

Literature cited

Bertsouklis, K.F., and Papafotiu, M. (2009). In vitro propagation of *Arbutus andrachne* L. Acta Hort. 813, 477-480 <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.813.63>.

Bertsouklis, K.F., and Papafotiu, M. (2011). Effect of various cytokines on micropropagation of *Arbutus x andrachnoides* Link. Acta Hort. 923, 213-218 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.923.32>.

Bertsouklis, K.F., and Papafotiu, M. (2013). Seed germination of *Arbutus unedo*, *A. andrachne* and their natural hybrid *A. andrachnoides* in relation to temperature and period of storage. HortScience 48 (3), 347-351.

George, E.F., Hall, M.A., and De Klerk, G.-J., eds. (2008). Plant propagation by tissue culture, 3rd edn. vol. 1. The Background. (Springer, Dordrecht, The Netherlands), pp.215.

El-Sayed El-Mahrouk M., Dewir Y.H., and Omar, A.M.K. (2010). In vitro propagation of adult strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) through adventitious shoots and somatic embryogenesis. Propag. Orn. Plants 10 (2), 93-98.

Gomes, F., and Canhoto, J.M. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. In Vitro Cell. Dev. B. 45 (1), 72-82 <http://dx.doi.org/1007/s11627-008-9164-8>.

Konstantinidis, P., Tsiourlis, G., and Xofis, P. (2006). Effect of fire season, aspect and pre-fire plant size on the growth of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree) resprouts. Forest Ecol. Manag., 225 (1-3), 359-367 <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.01.011>.

Lloyd, G.B. and McCown, B.H. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. Proc. Int. Plant Propagators Soc. 30, 421-427.

Mostafa, S.E., Karam, N.S., Shilbi, R.A., and Alali, F.Q. (2010). Micropropagation and production of arbutin in oriental strawberry tree (*Arbutus andrachne* L.). Plant Cell Tiss. Org. 103 (1), 111-121 <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9760-2>.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

Papafotiu, M., Bertsouklis, K.F., and Trigka, M. (2013). Micropropagation of *Arbutus unedo*, *A. andrachne*, and their natural hybrid *A. x andrachnoides*, from seedling explants. J. Hort. Sci. Biotech. 88 (6), 768-775 <http://dx.doi.org/10.1080/14620316.2013.11513037>.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ *IN VITRO* ΤΟΥ *Arbutus unedo* var. *rubra*

Α. Παπαγιάννη, Μ. Παπαφωτίου και Κ.Φ. Μπερτσουκλής
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών και Περιβάλλοντος, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίδραση των φυτορρυθμιστικών ουσιών ζεατίνη (ZEA) και θειντιαζουρόν (TDZ) στην *in vitro* βλαστογένεση εκφύτων κόμβων από νεαρά σπορόφυτα του *A. unedo* var. *rubra*. Κόμβοι από σπορόφυτα ανεπτυγμένα *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS ή WPM που περιείχε 1 mg l^{-1} IBA, καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS ή WPM, αντίστοιχα με το υπόστρωμα προέλευσης, χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (μάρτυρας) ή με TDZ σε συγκέντρωση $0,2$ ή $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ ή με ZEA σε συγκέντρωση $2,5$ ή $5,0 \text{ mg l}^{-1}$. Το ποσοστό βλαστογένεσης και στα δύο υποστρώματα που περιείχαν ZEA ήταν πολύ υψηλό (90-100%), με ικανοποιητική παραγωγή βλαστών, καθώς σχηματίστηκαν 3,4-3,5 και 2,2-2,4 βλαστοί ανά έκφυτο σε υπόστρωμα MS ή WPM, αντίστοιχα. Στα υποστρώματα χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία και σε αυτά που περιείχαν TDZ ο αριθμός των παραχθέντων βλαστών ήταν χαμηλός.

Λέξεις κλειδιά: *In vitro* βλαστογένεση, ποικιλία κουμαριάς, σπορόφυτα, zeatin, thidiazuron

Εισαγωγή

Το *Arbutus unedo* var. *rubra* (κοιν. ροζ κουμαριά), οικ. Ericaceae, (pink strawberry tree) είναι ποικιλία του *A. unedo* L. (Synge, 1956), ενός από τα κυρίαρχα είδη της μακίας βλάστησης. Το είδος απαντάται σε μεγάλους πληθυσμούς σε όλη την Ελλάδα, σε υψόμετρο από 400 έως 900 περίπου μέτρα, όπως και σε ορεινούς όγκους της Αττικής. Είναι αειθαλής θάμνος ύψους 2 - 3 m ή σπανιότερα μικρό δέντρο. Η μορφολογική διαφορά της ποικιλίας σε σχέση με το *A. unedo* L. είναι ότι φέρει ρόδινα αντί για λευκά άνθη. Τα άνθη, όπως και στο είδος, σχηματίζονται ταυτόχρονα με τους πορτοκαλί-κόκκινους καρπούς, από τον Οκτώβριο έως και τον Ιανουάριο, ιδιαιτερότητα που του προσδίδει μεγάλη καλλωπιστική αξία.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε ο *in vitro* πολλαπλασιασμός του *A. unedo* var. *rubra* με σκοπό την αξιοποίησή του σε διαμορφώσεις τοπίου και την κηποτεχνία. Δεν υπάρχει καμία βιβλιογραφική αναφορά σχετικά με οποιαδήποτε μέθοδο πολλαπλασιασμού του φυτού. Το συγγενές *A. unedo* πολλαπλασιάζεται με σπόρο (Bertsouklis & Papafotiou, 2013), ενώ υπάρχουν αναφορές για μικροπολλαπλασιασμό του είτε από ενήλικα μητρικά φυτά (Mereti κ.ά., 2002, Gomes & Canhoto, 2009, El-Sayed El-Mahrouk κ.ά., 2010) ή από σπορόφυτα (Papafotiou κ.ά., 2013).

Υλικά και Μέθοδοι

Καρποί του *A. unedo* var. *rubra* συλλέχθηκαν από αυτοφυές φυτό στην Βαρυμύοπη (Ν. Αττικής) το Δεκέμβριο του 2014. Στη συνέχεια έγινε διαχωρισμός και επιλογή των σπόρων, οι οποίοι απολυμάνθηκαν με 20 % υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (4,6%, w/v υποχλωριώδες νάτριο), για 10 min. Έγιναν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri με στερεό (8 g l^{-1} agar) θρεπτικό υπόστρωμα MS (Murashige and

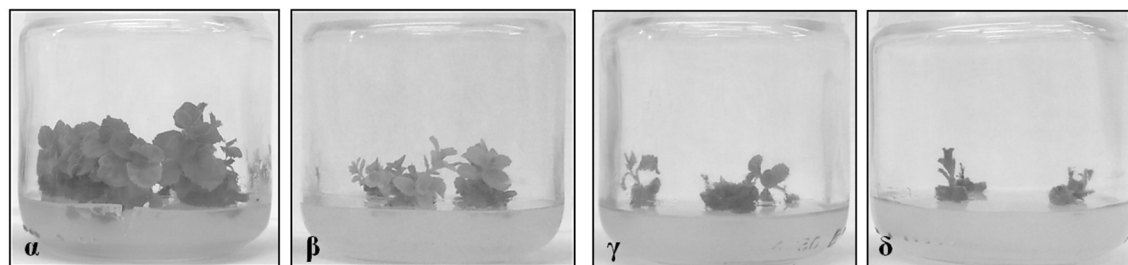
Skoog, 1962) μισής δύναμης σε θερμοκρασία 15 °C, για διάστημα 40 ημερών. Τα *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν σε γυάλινα βάζα (Magenta-B caps) με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS ή με θρεπτικό υπόστρωμα αλάτων WPM (McCown and Lloyd, 1981), με βιταμίνες Mullin (μυοϊνοσιτόλη 100 mg l⁻¹, θειαμίνη 1 mg l⁻¹, νικοτινικό οξύ 0,5 mg l⁻¹, πυριδοξίνη 0,5 mg l⁻¹), 30 g l⁻¹ σακχαρόζη και 1 mg l⁻¹ ινδολυλ-3-βουτυρικό οξύ (IBA), για περαιτέρω ανάπτυξη. Κόμβοι από τα σπορόφυτα καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS ή WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (μάρτυρας) ή με TDZ σε συγκέντρωση 0,2 ή 2,0 mg l⁻¹ ή με ZEA σε συγκέντρωση 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹.

Η ανάπτυξη όλων των καλλιεργειών έγινε σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε θερμοκρασία 25 °C και 16 h φωτοπερίοδο, υπό 37,5 μmol m⁻² s⁻¹ φωτισμό λαμπτήρων φθορίου. Το pH των υποστρωμάτων ρυθμίστηκε στο 5,7 πριν από την αποστείρωσή τους στους 121 °C για 20 min. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε 40 ημέρες μετά την εγκατάσταση της καλλιέργειας και αφορούσε στο ποσοστό εκφύτων που έδωσε βλαστούς, στον αριθμό βλαστών ανά έκφυτο, στο μήκος των βλαστών, στον αριθμό των κόμβων καθώς και στο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Ως δυναμικό πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας ορίστηκε το γινόμενο του ποσοστού βλαστογένεσης, του μέσου αριθμού βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε και του μέσου μήκους των βλαστών, διαιρεμένο με 0,6 που ήταν το μήκος εκφύτου.

Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς και η σύγκριση των μέσων όρων των επεμβάσεων έγινε με το Student's *t* test, σε *P* = 0,05.

Αποτελέσματα και Συζήτηση

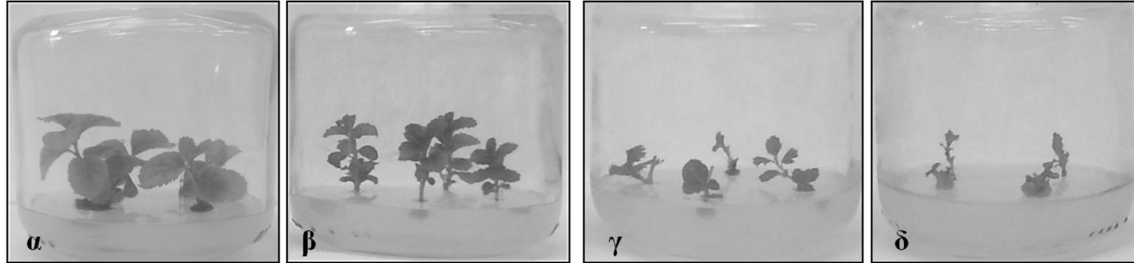
Το ποσοστό βλαστογένεσης και στα δύο υποστρώματα που περιείχαν ZEA ήταν πολύ υψηλό (90-100%), με ικανοποιητική παραγωγή βλαστών, καθώς σχηματίστηκαν 3,4-3,5 και 2,4-2,2 βλαστοί ανά έκφυτο σε υπόστρωμα MS ή WPM, αντίστοιχα (Σχ. 1, Εικ. 1, 2). Στα υποστρώματα χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία και σε αυτά που περιείχαν TDZ ο αριθμός των παραχθέντων βλαστών ήταν χαμηλός (Σχ. 1). Το μήκος των βλαστών που εκπύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM ήταν σχεδόν διπλάσιο και στις δύο συγκεντρώσεις της ZEA, από αυτό των βλαστών στις δύο συγκεντρώσεις TDZ, που έδωσε ίδιο μήκος βλαστών με το μάρτυρα (0,4 cm) (Σχ. 1, Εικ. 2). Αντίστοιχα αποτελέσματα της ZEA, όσον αφορά τη βλαστογένεση, έχουν παρατηρηθεί και σε έρευνα σχετικά με το μικροπολλαπλασιασμό του *A. unedo* από έκφυτα νεανικών ιστών (Parafotiou κ.ά., 2013), όπως και με άλλα είδη *Arbutus* με έκφυτα προερχόμενα από ενήλικα φυτά (Bertsouklis & Parafotiou, 2009, 2011).



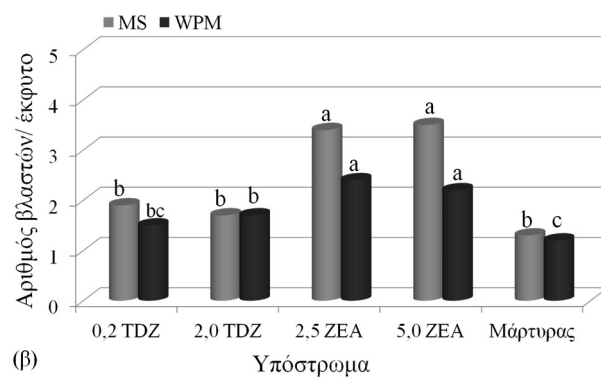
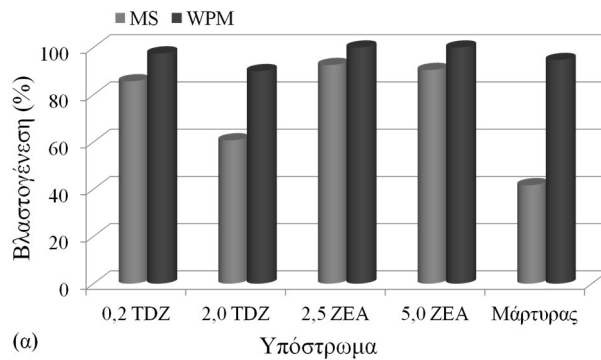
Εικ. 1. Καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEA (α και β, αντίστοιχα) και 0,2 και 2,0 mg l⁻¹ TDZ (γ και δ, αντίστοιχα).

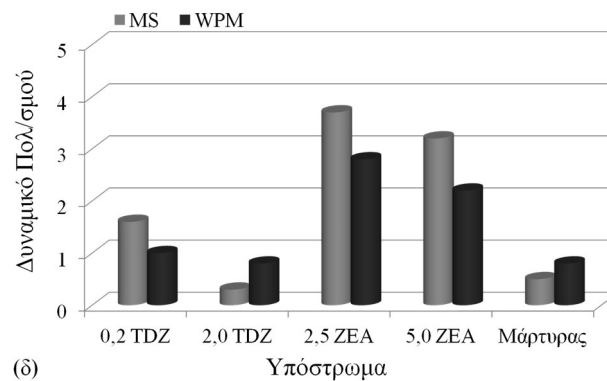
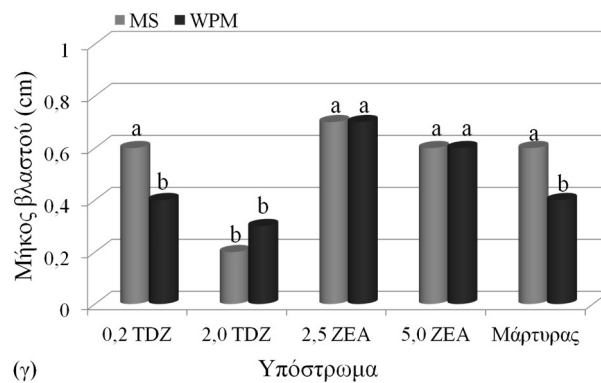
Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερο στα υποστρώματα που περιείχαν ZEA, τόσο σε MS όσο και σε WPM (3,7-3,2 και 2,8-2,2, αντίστοιχα), το οποίο μπορεί να οφείλεται, εν μέρει, στο υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης αλλά και

στο μεγαλύτερο αριθμό εκπτυχθέντων βλαστών ανά έκφυτο (Σχ. 1). Τα αποτελέσματα της έρευνας συμφωνούν με βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό διαφόρων ειδών της οικογένειας Ericaceae, όπου η χρήση φυσικών κυτοκινινών, ZEA και 2iP, έχει αποδειχθεί πιο αποτελεσματική σε σχέση με τις συνθετικές, όπως το TDZ (George κ.ά., 2008).



Εικ. 2. Καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM με 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEA (α και β, αντίστοιχα) και 0,2 και 2,0 mg l⁻¹ TDZ (γ και δ, αντίστοιχα).





Σχ. 1. Επίδραση του υποστρώματος και της κυτοκινίνης: α) στη βλαστογένεση (%), β) στον αριθμό των βλαστών, γ) στο μήκος των βλαστών και δ) στο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Σύγκριση των μέσων με Student's *t* test, σε $P = 0,05$, $n = 40-100$.

Συμπεράσματα

Επομένως, για την *in vitro* καλλιέργεια του *Arbutus unedo* var. *rubra*, μπορεί με επιτυχία να χρησιμοποιηθούν έκφυτα από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα σε θρεπτικό υπόστρωμα MS ή WPM με 1 mg l^{-1} IBA, τα οποία στη συνέχεια να καλλιεργηθούν σε υπόστρωμα MS ή WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEA για βλαστογένεση.

Βιβλιογραφία

- Bertsouklis, K.F. and Papafotiou, M. 2009. *In vitro* propagation of *Arbutus andrachne* L. Acta Hort. 813: 477-480.
- Bertsouklis, K.F. and Papafotiou, M. 2011. Effect of various cytokinins on micropropagation of *Arbutus x andrachnoides* Link. Acta Hort. 923: 213-218.
- George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G-J. 2008. Plant propagation by tissue culture, 3rd Edition. Springer.
- El-Sayed El-Mahrouk M., Dewir Y.H and Omar A.M.K. 2010. In vitro propagation of adult strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) through adventitious shoots and somatic embryogenesis. Prop. Ornam. Plants 10: 93-98.
- Gomes, F. and Canhoto, J. 2009. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. In Vitro Cell. Dev. Biol. 45: 72-82.
- McCown, B.H. and Lloyd, D.G. 1981. Woody Plant medium (WPM) - a revised mineral formulation for micro-culture of woody plant species. Hortscienc. 16: 453.
- Mereti, M., Grigoriadou, K. and Nanos, G.D. 2002. Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. Sci. Hortic. 93: 143-148.

Mullin, R.H., Smith, S.H., Frazier N.W., Schlegel, D.E. and McCall, S.R. 1974. Meristem culture frees strawberries of mild yellow edge, pallidosis and mottle diseases. *Phytopathology* 64: 1425-1429.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Papafotiou, M., Bertsouklis, K F. and Trigka, M. 2013. Micropropagation of *Arbutus unedo*, *A. andrachne*, and their natural hybrid *A. × andrachnoides*, from seedling explants. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 88(6): 768-775.

Synge, P. 1956. *Dictionary of Gardening*, Oxford University Press. Oxford. p. 163.