

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου

«Διερεύνηση Μεθόδων *In Vitro* Πολλαπλασιασμού,
της Οικοφυσιολογίας του Σπόρου και των
Φυλογενετικών Σχέσεων των Ειδών *Arbutus* της
Ελλάδας»

Διδακτορική Διατριβή
Κωνσταντίνου Φ. Μπερτσουκλή
Γεωπόνου MSc.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Περίληψη	1
Abstract	3
Συνοτομογραφίες	5
Σκοπός	6
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1 Μεσογειακή βλάστηση-Το γένος <i>Arbutus</i>	7
1.1 Μεσογειακή βλάστηση	7
1.2 Το γένος <i>Arbutus</i>	11
1.2.1 Βοτανική ταξινόμηση	11
1.2.2 Χρήσεις	24
1.2.3 Απειλές από αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες	28
1.2.3.1 Αβιοτικοί παράγοντες	29
1.2.3.2 Αναβλάστηση μετά από πυρκαγιές	29
1.2.3.3 Βιοτικοί παράγοντες	33
1.2.3.3.1 Έντομα	33
1.2.3.3.2 Μύκητες-Βακτήρια	34
2 Η Ιστοκαλλιέργεια στο γένος <i>Arbutus</i>, την οικ. <i>Ericaceae</i> και σε άλλα ξυλώδη φυτά	35
3 Υλικά και μέθοδοι <i>in vitro</i> καλλιέργειών	42
3.1 Φυτικό υλικό	42
3.2 Υποστρώματα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	42
3.2.1 Υλικά	42
3.2.2 Μέθοδος παρασκευής υποστρωμάτων	43
3.2.3 Παρασκευή διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών και βιταμινών	45
3.3 Μέθοδοι απολύμανσης, αποστείρωσης και εγκατάστασης φυτικού υλικού	47
3.3.1 Απολύμανση-εγκατάσταση εκφύτων	47
3.3.2 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών	48
3.4 Έκφυτα-χειρισμοί εκφύτων	49
3.4.1 Έκφυτα εγκατάστασης αρχικών καλλιεργειών	49
3.4.2 Έκφυτα καλλιεργειών πολλαπλασιασμού	50
3.5 Ριζοβολία μικροβλαστών	50
3.6 Εγκλιματισμός φυταρίων	51
3.7 Συνθήκες καλλιέργειας	51
3.7.1 Συνθήκες <i>ex vitro</i> καλλιέργειας	51
3.7.2 Συνθήκες <i>in vitro</i> καλλιέργειας	52
3.7.3 Δοχεία <i>in vitro</i> καλλιέργειας και υλικά κάλυψης αυτών	52
3.8 Πειραματικά σχέδια-στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	53
3.8.1 Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο εγκατάστασης των καλλιεργειών	54

3.8.2	Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών	54
3.8.3	Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο της ριζοβολίας και του εγκλιματισμού των φυταρίων	55
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	56
4	Εγκατάσταση καλλιεργειών <i>in vitro</i> από ενήλικα φυτά	56
4.1	Εισαγωγή	56
4.2	Υλικά και Μέθοδοι	57
4.2.1	Φυτικό υλικό	57
4.2.2	Εγκατάσταση καλλιεργειών <i>in vitro</i> -Απολύμανση εκφύτων	57
4.2.3	Πειραματικό Σχέδιο-Στατιστική Ανάλυση	60
4.3	Αποτελέσματα	60
4.3.1	Αρχική εγκατάσταση <i>A. andrachne</i>	60
4.3.1.1	Αρχικά πειράματα για εγκατάσταση <i>A. andrachne</i>	60
4.3.1.2	Επίδραση της εποχής και της θέσης του εκφύτου στην εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών <i>A. andrachne</i>	71
4.3.1.3	Επίδραση κυτοκινινών στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών <i>A. andrachne</i>	77
4.3.1.3.1	Επίδραση τύπου κυτοκινίνης και εποχής στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών <i>A. andrachne</i>	77
4.3.1.3.2	Επίδραση της θέσης του εκφύτου στην αντίδραση κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών <i>A. andrachne</i> σε διάφορες κυτοκινίνες	81
4.3.2	Αρχική εγκατάσταση <i>A. x andrachnoides</i>	86
4.3.2.1	Επίδραση κυτοκινινών στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών <i>A. x andrachnoides</i>	86
4.3.2.1.1	Επίδραση τύπου κυτοκινίνης και εποχής στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών <i>A. x andrachnoides</i>	86
4.3.2.1.2	Επίδραση της θέσης του εκφύτου στην αντίδραση κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών <i>A. x andrachnoides</i> σε διάφορες κυτοκινίνες	91
4.3.2.2	Επίδραση αυξίνης στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών <i>A. x andrachnoides</i>	95
4.3.3	Αρχική εγκατάσταση <i>A. unedo</i>	96
4.3.3.1	Επίδραση κυτοκινινών στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών <i>A. unedo</i>	96
4.3.3.1.1	Επίδραση τύπου κυτοκινίνης και εποχής στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών <i>A. unedo</i>	96
4.3.3.1.2	Επίδραση της θέσης του εκφύτου στην αντίδραση κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών <i>A. unedo</i> σε διάφορες	101

	κυτοκινίνες	
4.3.2.2	Επίδραση αυξίνης στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών <i>A. unedo</i>	105
4.3.4	Συγκριτική παράθεση των τριών ειδών στις αρχικές καλλιεργείες	105
4.3.5	Χειμερινή αρχική καλλιεργεία	113
4.3.6	Συγκριτική εξέταση ποσοστού επιβίωσης και βλαστογένεσης	113
4.4	Συζήτηση-Συμπεράσματα	116
5	Πολλαπλασιασμός καλλιεργειών <i>in vitro</i>	124
5.1	Εισαγωγή	124
5.1.1	Πολλαπλασιασμός <i>in vitro</i> στο γένος <i>Arbutus</i> και την οικογένεια Ericaceae	124
5.1.2	Πολλαπλασιασμός καλλιεργειών <i>in vitro</i> σε άλλα ξυλώδη είδη	126
5.2	Υλικά και Μέθοδοι	130
5.2.1	Μητρικό υλικό	130
5.2.2	Υποστρώματα-Μέθοδοι και συνθήκες καλλιεργείας	131
5.2.3	Καλλιεργείες πολλαπλασιασμού <i>in vitro</i>	131
5.2.3.1	Καλλιεργείες πολλαπλασιασμού <i>in vitro</i> του <i>A. andrachne</i>	131
5.2.3.2	Καλλιεργείες πολλαπλασιασμού <i>in vitro</i> του <i>A. x andrachnoides</i> και <i>A. unedo</i>	132
5.2.4	Πειραματικό Σχέδιο-Στατιστική Ανάλυση	132
5.3	Αποτελέσματα	133
5.3.1	Πολλαπλασιασμός των καλλιεργειών του <i>A. andrachne</i>	133
5.3.1.1	Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση και επιμήκυνση κατά την 1η μεταφύτευση-υποκαλλιεργεία εκφύτων <i>A. andrachne</i>	133
5.3.1.2	Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στην βλαστογένεση και επιμήκυνση <i>A. andrachne</i> στην 2 ^η -3 ^η υποκαλλιεργεία	138
5.3.1.3	Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών κατά τον πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών <i>A. andrachne</i>	142
5.3.1.4	Επίδραση της συγκέντρωσης του TDZ στο υπόστρωμα προέλευσης στην εν συνεχεία υποκαλλιεργεία και πολλαπλασιασμό καλλιεργειών <i>A. andrachne</i>	150
5.2.3.5	Επίδραση της ZEAT σε διαδοχικές υποκαλλιεργείες <i>A. andrachne</i>	152
5.3.1.6	Συγκριτική αξιολόγηση της επίδρασης του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στον πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών <i>A. andrachne</i> , <i>A. x andrachnoides</i> και <i>A. unedo</i>	155
5.3.1.7	Σύγκριση μεσαίας και τελικής καλλιεργείας σε WPM με ZEAT στα <i>A. andrachne</i> , <i>A. x andrachnoides</i> και <i>A. unedo</i>	160

5.3.1.8	Επίδραση θρεπτικού υποστρώματος, WPM ή MS, στον πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών <i>A. andrachne</i> , <i>A. x andrachnoides</i> και <i>A. unedo</i>	162
5.3.1.9	Συγκριτική αξιολόγηση της επίδραση TDZ σε WPM στον πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών <i>A. andrachne</i> , <i>A. x andrachnoides</i> και <i>A. unedo</i>	166
5.3.1.10	Συγκριτική αξιολόγηση της επίδρασης μη ισχυρής αυξίνης στο WPM, στον πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών <i>A. andrachne</i> , <i>A. x andrachnoides</i> και <i>A. unedo</i>	169
5.4	Συζήτηση-Συμπεράσματα	171
6	Εγκατάσταση και πολλαπλασιασμός από ιστούς σποροφύτων	179
6.1	Εισαγωγή	179
6.2	Υλικά και Μέθοδοι	179
6.2.1	Φυτικό υλικό	179
6.2.2	Εγκατάσταση καλλιεργειών <i>in vitro</i>	181
6.2	Αποτελέσματα	181
6.2.1	Επίδραση του IBA στην βλαστογένεση του <i>A. andrachne</i>	181
6.2.2	Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος και των κυτοκινινών στην βλαστογένεση του <i>A. andrachne</i> , <i>A. x andrachnoides</i> και <i>A. unedo</i>	182
6.4	Συζήτηση-Συμπεράσματα	188
7	Ριζοβολία μικροβλαστών - Εγκλιματισμός <i>ex vitro</i> φυταρίων	190
7.1	Εισαγωγή	190
7.1.1	Ριζοβολία μικροβλαστών ξυλωδών ειδών	190
7.1.2	Εγκλιματισμός ριζοβολημένων μικροβλαστών ξυλωδών ειδών	192
7.2	Υλικά και Μέθοδοι	194
7.2.1	Ριζοβολία μικροβλαστών	194
7.2.2	Εγκλιματισμός φυταρίων	194
7.3	Αποτελέσματα	195
7.3.1	Ριζοβολία μικροβλαστών	195
7.3.1	Εγκλιματισμός φυταρίων	197
7.4	Συζήτηση-Συμπεράσματα	206
8	Οικοφυσιολογία του σπόρου των τριών ειδών <i>Arbutus</i> της Ελλάδας	210
8.1	Εισαγωγή	210
8.2	Υλικά και Μέθοδοι	213
8.2.1	Συλλογή-καθαρισμός, αποθήκευση	213
8.2.2	Καλλιέργεια <i>in vitro</i>	214
8.2.3	Εκτίμηση αποτελεσμάτων-Πειραματικό σχέδιο-Στατιστική επεξεργασία	214
8.3	Αποτελέσματα	215
8.4	Συζήτηση-Συμπεράσματα	227

9	Φυλογενετική Μελέτη	231
9.1	Εισαγωγή	231
9.1.1	Μορφολογικοί χαρακτήρες	232
9.1.2	Μοριακοί δείκτες	233
9.1.2.1	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	235
9.2	Υλικά και Μέθοδοι	240
9.2.1	Φυτικό υλικό	240
9.2.2	Μορφολογική Ανάλυση	241
9.2.3	Γενετική Ανάλυση	244
9.2.3.1	Απομόνωση DNA	244
9.2.3.1.1	Στάδια Απομόνωσης	244
9.2.3.1.2	Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA	245
9.2.3.2	Εκκινητές	245
9.2.3.2	Συνθήκες ενίσχυσης (PCR)	246
9.2.3.3	Ηλεκτροφόρηση	246
9.2.3	Στατιστική ανάλυση των δεδομένων	247
9.3	Αποτελέσματα	249
9.3.1	Μορφολογική Ανάλυση	249
9.3.2	Μοριακή Ανάλυση	256
9.3.2.1	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	256
9.3.2.2	Πολυμορφισμός εκκινητών	258
9.3	Συζήτηση-Συμπεράσματα	272
10	Γενικά Συμπεράσματα και Συζήτηση	279
	Βιβλιογραφία	285
	Παράρτημα	315

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Γεωργικές Επιστήμες, Ανθοκομία, Δασοκομία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ (στα Ελληνικά)

- 7.1.1 Μακκία βλάστηση
- 7.1.2 Μικροπολλαπλασιασμός από ενήλικους και νεανικούς ιστούς
- 7.1.3 Ριζοβολία *in vitro*
- 7.1.4 Ιστοκαλλιέργεια
- 7.1.5 Λήθαργος σπόρων
- 7.1.6 Βλαστικότητα σπόρων
- 7.1.7 Μοριακοί Δείκτες (RAPDs)
- 7.1.8 Μορφολογικοί χαρακτήρες

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ (ξενόγλωσσες)

- 7.2.1 Maquis
- 7.2.2 Micropropagation from adult and young tissues
- 7.2.3 *In vitro* rooting
- 7.2.4 Tissue culture
- 7.2.5 Seed dormancy
- 7.2.6 Seed germination
- 7.2.7 Molecular markers (RAPDs)
- 7.2.8 Morphological characters

Περίληψη

Τα *Arbutus andrachne*, *A. unedo* και το φυσικό τους υβρίδιο *A. x andrachnoides*, είναι τα τρία είδη *Arbutus* που απαντώνται στην Ελληνική Χλωρίδα. Αποτελούν βασικά είδη της Μεσογειακής Μακίας, τα οποία λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως καλλωπιστικά, στη διαμόρφωση του τοπίου αστικών και περιαστικών περιοχών, σε αναδασώσεις λόγω της εύκολης αναβλάστησης μετά από πυρκαγιά και στη φαρμακοβιομηχανία λόγω πολύτιμων ουσιών που περιέχονται στα φύλλα και στους καρπούς τους. Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε ο *in vitro* πολλαπλασιασμός και των τριών ειδών και αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μια πλήρης μέθοδος για το μικροπολλαπλασιασμό των *A. andrachne* και *A. x andrachnoides* ξεκινώντας από ενήλικα φυτά και σπορόφυτα. Έγινε εκτενής διερεύνηση ως προς την αποτελεσματικότητα διαφόρων κυτοκινινών στην παραγωγή βλαστών, καθώς περιοριστικός παράγον ήταν η επιμήκυνση των μικροβλαστών. Η χρήση της ZEAT καθώς και του 2IP επέφερε υψηλή παραγωγή και ικανοποιητική επιμήκυνση των μικροβλαστών και των τριών ειδών. Καλύτερη εποχή για την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών αποδείχθηκε η άνοιξη, με την καλλιέργεια εκφύτων κόμβων βλαστών τρέχουσας βλάστησης σε WPM με βιταμίνες Mullin και 2,5 mg l⁻¹ ZEAT και για τα τρία είδη *Arbutus* που μελετήθηκαν. Για το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών προτείνεται η χρήση 2,5 mg l⁻¹ ZEAT, που εμφάνισε μεγάλη αποτελεσματικότητα σε ότι αφορά στην παραγωγή βλαστών και στα τρία είδη, είτε σε WPM με βιταμίνες Mullin, είτε σε MS. Τα ίδια υποστρώματα ήταν κατάλληλα επίσης για τον μικροπολλαπλασιασμό και των τριών ειδών, με χρήση μητρικού υλικού από νεαρά σπορόφυτα. Η υποκαλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT επαναλήφθηκε για μεγάλο αριθμό κύκλων (περισσότεροι από 14 δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη στο *A. andrachne*) με μεγάλη επιτυχία και για τα τρία είδη. Αντιμετωπίστηκαν επίσης με επιτυχία οι μολύνσεις κατά την αρχική καλλιέργεια, ενός παράγοντα περιοριστικού για την επιτυχή εγκατάσταση σε πολλά ξυλώδη είδη. Η ριζοβολία των μικροβλαστών έγινε σε πολύ υψηλά ποσοστά που άγγιζαν το 100% σε WPM με 1 mg l⁻¹ IBA και για τα τρία είδη, ανεξάρτητα της ενήλικης ή νεανικής προέλευσης των μικροβλαστών. Ο εγκλιματισμός των φυταρίων σε *ex vitro* συνθήκες επίσης έγινε με πολύ υψηλό ποσοστό επιβίωσης καλοσηματισμένων φυτών (90-100%).

Διερευνήθηκαν επίσης για πρώτη φορά και προσδιορίστηκαν οι κριτικές τιμές της θερμοκρασίας για τη βλάστηση σπόρου των τριών ειδών. Η μέγιστη βλαστικότητα

και για τα τρία είδη επιτεύχθηκε στους 15 °C και κυμάνθηκε από 87-99%. Οι 10 °C είναι κοντά στο κατώτατο όριο για βλάστηση των σπόρων και των τριών ειδών. Τα ανώτερα όρια θερμοκρασίας για βλάστηση των σπόρων *A. andrachne* και *A. unedo* κυμάνθηκαν από 20-25 °C, ενώ για το *A. x andrachnoides* ήταν 15-20 °C. Οι σπόροι, βλάστησαν εξ ίσου καλά σε φως ή σκοτάδι. Η βλαστικότητα των σπόρων που αποθηκεύτηκαν ξηροί στους 25 °C διατηρήθηκε και για τα τρία είδη σε υψηλά επίπεδα μετά από 11 μήνες αποθήκευση, περιορίζοντας όμως το εύρος της θερμοκρασίας για βλάστηση μεταξύ 10 και 15 °C. Μετά από 27 μήνες αποθήκευσης οι σπόροι δεν βλάστησαν.

Η διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων υπέδειξε για πρώτη φορά κατάλληλους μορφολογικούς (ποσοτικούς και ποιοτικούς) χαρακτήρες και μοριακούς δείκτες RAPDs για τη γενετική μελέτη του γένους που θεμελίωσαν σε γενετικό υπόβαθρο τη φαινοτυπική διαφορά του φυσικού υβριδίου. Τα προηγούμενα αποτελέσματα ενδυναμώνονται από τα αποτελέσματα του *in vitro* πολλαπλασιασμού και της οικοφυσιολογίας του σπόρου. Ενδιαφέρον έχει δε, ότι το μορφογενετικό δυναμικό και η συμπεριφορά του *A. x andrachnoides* στον *in vitro* πολλαπλασιασμό κινήθηκε πλησιέστερα με αυτήν του *A. unedo*, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη ανταπόκριση σε σύγκριση με το *A. andrachne*, παρά τη φαινοτυπική του ομοιότητα με το τελευταίο.

Abstract

Arbutus andrachne, *A. unedo* and their natural hybrid *A. x andrachnoides* are the three *Arbutus* species found in the Greek flora, representative of the Mediterranean maquis. Their particular characteristics could introduce them in the horticultural industry as ornamentals, for use in the urban and suburban landscape, for reforestation due to their ability to re-sprout easily after fire and to the pharmaceutical industry due to various precious substances in their leaves and fruits. The present thesis investigated the *in vitro* propagation of the above species and for the first time has developed a method of micropropagation for *A. andrachne* and *A. x andrachnoides* from mature plants and young seedlings. A thorough investigation of the effectiveness of various cytokinin on shoot production was undertaken, as micro- shoot elongation was a limiting factor. The use of ZEAT as well as 2IP resulted in high production and elongation of micro-shoots in all three species. The best season for the initial establishment of plants proved to be spring, with the cultivation of node explants from the current year's shoots in WPM with Mullin vitamins and 2.5 mg l⁻¹ ZEAT for all three species of *Arbutus* studied. The use of 2.5 mg l⁻¹ ZEAT is proposed for the proliferation stage as it showed to be very effective in shoot production in all three species, either in WPM with Mullin vitamins or in MS. The same substrates were also suitable for the micropropagation of all three species using young seedlings as stock plant material. The subculture in nutrient medium with 2.5 mg l⁻¹ ZEAT could be repeated for a large number of cycles (more than 14 were tested in the current study for *A. andrachne*) with great success for all three species. Contamination, a limiting factor for the establishment of many woody species, was successfully treated during the initial cultivation. The rooting of microshoots reached very high levels that approximated 100% in WPM with 1 mg l⁻¹ IBA for all three species, irrespective of the mature or young origin of the microshoots. The survival rate from the acclimatisation of plantlets to *ex vitro* conditions was very high with well-formed plants (90-100%).

Furthermore for the first time the critical temperatures for seed germination of all three species was investigated and determined. Maximum germination for all three species was achieved at 15 °C and ranged between 87-99%. Temperature of 10 °C is near the lower threshold value for seed germination for all three species. The higher threshold temperature values for seed germination of *A. andrachne* and *A. unedo* ranged between 20-25 °C, whereas for the natural hybrid *A. x andrachnoides*

temperatures ranged between 15-20 °C. Seeds germinated equally well under light and darkness. Seeds of all three species stored dry at 25 °C maintained their germination ability at high levels after eleven months of storage, limiting however the temperature range for germination between 10 and 15 °C. After storing for 27 months the seeds did not germinate.

The investigation of phylogenetic relationships showed for the first time suitable morphological (quantitative and qualitative) characteristics and molecular markers RAPDs for the genetic study of the genus that developed the foundation at a genetic level for the phenotype variation of the natural hybrid. The latter results are strengthened by the seed ecophysiology and the *in vitro* propagation results. It is interesting that the morphogenetic potential and behaviour of *A. x andrachnoides* under *in vitro* propagation progressed nearer to that of *A. unedo*, showing a greater response than *A. andrachne*, despite the phenotypic similarity with the latter.

Συντομογραφίες

AND	Anderson's Rhododendron Medium
BA	6-benzyladenine
BAP	6-benzyl-aminopurine
BTM	Broad leaved Tree Medium
B5	Gamborg's B-5 basal salt mixture
CKX	Cytokinin oxidase/dehydrogenase enzyme
DKW	Driver and Kuniyuki Basal Medium
FS	De Fossard Medium
GA ₃	Gibberillic acid
GD	Gresshoff and Doy Basal Medium
IBA	Indole-3-butyric acid
IAA	Indole-3-acetic acid
NAA	1-Naphtheleneacetic acid
MS	Murashige and Skoog Basal Salt Mixture Medium
QL	Quoirin and Lepoivre Basal Salts Medium
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLPs	Restriction fragment polymorphisms
SH	Schenk and Hildebrandt Basal Salt Mixture
TDZ	Thidiazuron
WPM	McCown's Woody Plant Basal Salt Mixture Medium
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2iP	6-γ-γ-(Dimethylallylamino)-purine

Σκοπός της Έρευνας

Το γένος *Arbutus* είναι ένα από τα βασικά μέλη της ελληνικής χλωρίδας όπου εκπροσωπείται από τρία είδη, το *A. unedo*, το *A. andrachne* και το φυσικό τους υβρίδιο *A. x andrachnoides*. Τα είδη αυτά έχουν ιδιαίτερα καλλωπιστικά χαρακτηριστικά και μεγάλη σημασία για πολλές περιοχές της χώρας μας με ξηροθερμικό κλίμα που απειλούνται από διάβρωση του εδάφους τους από τις επαναλαμβανόμενες πυρκαγιές.

Το πυκνό και στιλπνό τους φύλλωμα, η εντυπωσιακή και πλούσια ανθοφορία και καρποφορία κατά τους χειμερινούς μήνες και ιδιαίτερα ο λείος ερυθρός-κανελί φλοιός του *A. andrachne* και *A. x andrachnoides*, καθιστούν τα φυτά του γένους ιδιαίτερα ενδιαφέροντα για χρήση ως καλλωπιστικών σε αστικές και ξηρές περιαστικές περιοχές (Εικ 3, 4, 5). Η μεγάλη τους ικανότητα για αναβλάστηση μετά από πυρκαγιές και υπερβόσκηση, προσδίδουν επίσης στα φυτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την χρήση τους σε αναδασώσεις σε περιοχές που έχουν θερμό και ξηρό καλοκαίρι, καθώς και για τη συγκράτηση των διαβρωμένων εδαφών και τη δημιουργία αντιπυρικών ζωνών σε δάση αείφυλλων πλατύφυλλων.

Με στόχο λοιπόν την εισαγωγή των ειδών *Arbutus* της Ελλάδας στην ανθοκομική πράξη και την Αρχιτεκτονική Τοπίου, διερευνήθηκε ο μικροπολλαπλασιασμός τους και η οικοφυσιολογία των σπόρων τους, ώστε να προταθούν αποτελεσματικές μέθοδοι πολλαπλασιασμού των ειδών.

Έγινε συγκριτική μελέτη της αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων και φυτορρυθμιστικών ουσιών, καθώς και της ηλικίας του μητρικού υλικού, στον μικροπολλαπλασιασμό των τριών ειδών, ενώ διερευνήθηκε η βλαστικότητα του σπόρου σε σχέση με τις συνθήκες περιβάλλοντος και την πιθανότητα ύπαρξης ληθάργου.

Παράλληλα στόχευσε στην εξεύρεση μιας αποτελεσματικής μεθόδου για την διάκριση και κατάταξη ατόμων του γένους με τη συνδυασμένη χρήση μορφολογικών χαρακτήρων και μοριακών δεικτών (RAPDs), που μπορεί να διευκολύνει σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του μικροπολλαπλασιασμού την προσπάθεια εισαγωγής κατάλληλων γενοτύπων για εμπορική χρήση τόσο ως καλλωπιστικών φυτών, ως φυτών για αναδασώσεις, αλλά και για τις πολύτιμες φαρμακευτικές τους ιδιότητες.



Γενικό μέρος

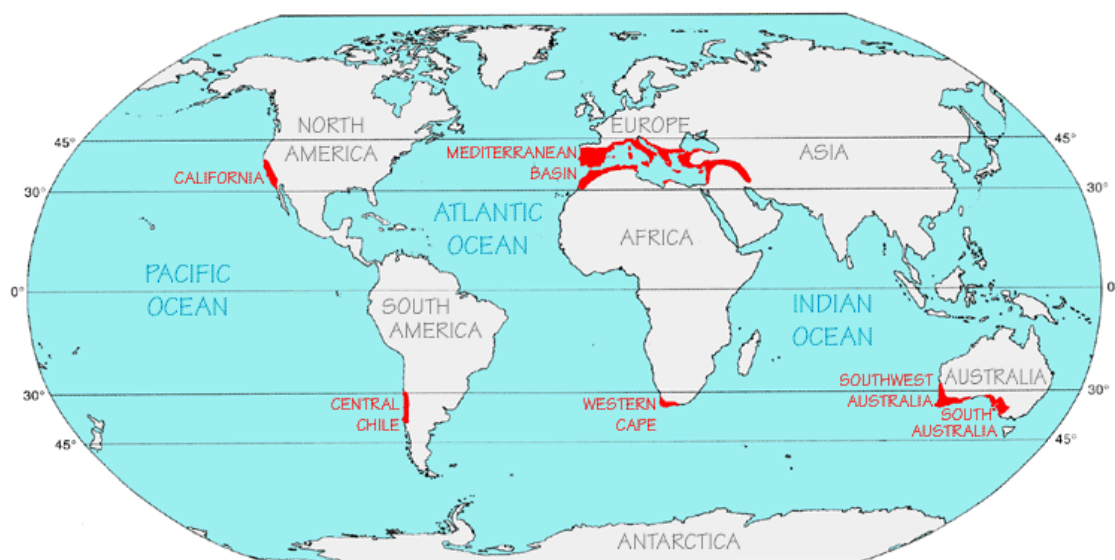
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Μεσογειακή βλάστηση – Το γένος *Arbutus*

1.1 Μεσογειακή βλάστηση

Οι Μεσογειακές θαμνώδεις εκτάσεις είναι σε γενικές γραμμές σχηματισμοί που απαντούν κυρίως σε ξηροθερμικές περιοχές με Μεσογειακό κλίμα, και χαρακτηρίζονται από την επικράτηση ξυλωδών φυτών σε μεγάλη πυκνότητα. Σε παγκόσμιο επίπεδο καλύπτουν μόλις 1-2% της επιφάνειας της γης, αλλά περιλαμβάνουν αξιοσημείωτη ποικιλία φυτικών ειδών που ανακύπτει από την πολυμορφία του ανάγλυφου. Οι εκτάσεις αυτές απαντούν σε πέντε απομακρυσμένες περιοχές του κόσμου: στις ΗΠΑ (Καλιφόρνια), Χιλή, Μεσόγειο, Νότιο Αφρική και ΝΔ Αυστραλία (Walter, 1979, Di Castri, 1981, Barbour and Billings, 1988, Rundel, 2007) (Εικ. 1).



Εικ. 1. Παγκόσμιος χάρτης με τις περιοχές που έχουν μεσογειακό κλίμα (κόκκινο χρώμα) από 30° έως 45° γεωγραφικό πλάτος. Όλες ευρίσκονται στο δυτικό μέρος των ηπείρων.

Πηγή: <http://www.grabovrat.com/mapsViews/mapsViews80.html>

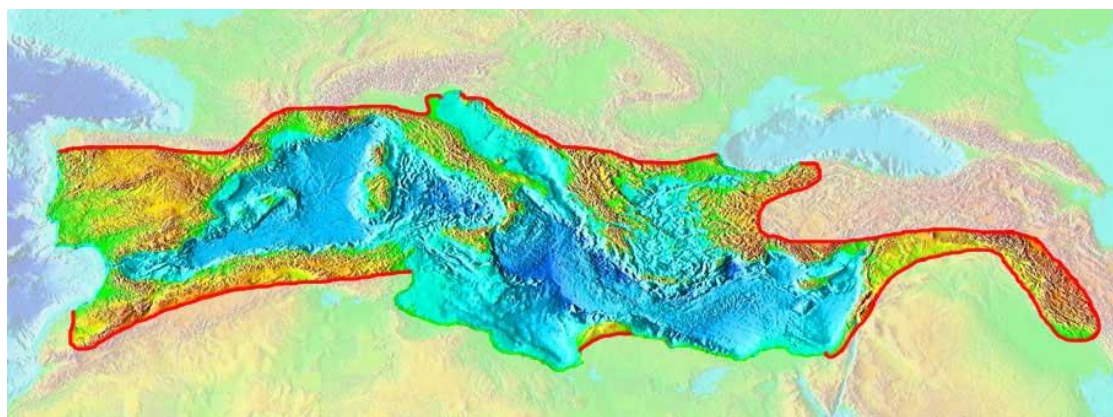
Το κλίμα χαρακτηρίζεται από θερμό και ξηρό καλοκαίρι που εναλλάσσεται με κρύο χειμώνα, εποχή που κυρίως σημειώνονται οι βροχοπτώσεις. Αξιοσημείωτη είναι η βιοποικιλότητα των μεσογειακών οικοσυστημάτων. Αν και καταλαμβάνουν λιγότερο από το 2% της επιφάνειας της γης, φιλοξενούν 45.000 είδη αγγειόσπερμων, αριθμό που αποτελεί το 18% των ειδών που αναφέρονται παγκοσμίως (250.000 είδη) (Rundel, 2007).

Η ζώνη βλάστησης σε αυτές τις περιοχές έχει διάφορα ονόματα από περιοχή σε περιοχή. Στη Μεσόγειο λέγεται «μακκία» (maquis, macchia), στη Χιλή και στην Ισπανία «matorral», στην Καλιφόρνια «chaparral», στην Αυστραλία «mallee» και «renosterved» στη Νότιο Αφρική (Di Castri, 1981). Η μακκία βλάστηση περιλαμβάνει γενικά πυκνά, αειθαλή θαμνώδη φυτά ή χαμηλόσωμα δένδρα, αναπτύσσεται προς τις ακτές και εισχωρεί στην ενδοχώρα ακολουθώντας τις λεκάνες των ποταμών (Dallman, 1998). Η μείωση των ατμοσφαιρικών κατακρημνισμάτων (βροχοπτώσεις) επιφέρει την αύξηση της απόστασης μεταξύ των θάμνων και/ή την παρουσία μεγαλύτερων πληθυσμών φυλλοβόλων-ξηροφύτων. Η φυτοκοινότητα αυτή απαντά με διαφορετικά ονόματα σε κάθε περιοχή ανά τον κόσμο, πρόκειται για τα επονομαζόμενα φρύγανα (Di Castri, 1981).

Η σκληροφυλλία είναι ένας μηχανισμός προσαρμογής, μια φυσική ιδιότητα που συναντάται ευρύτατα σε περιβάλλοντα με χαμηλό δυναμικό θρεπτικών συστατικών, όπως περιοχές με μεσογειακό κλίμα και συνδέεται με λειτουργίες που παρέχουν προστασία κάτω από συνθήκες ξηρασίας (Turner, 1994, Salleo and Nardini, 2000). Η σκληροφυλλία γίνεται εντονότερη σε περιπτώσεις καταπόνησης λόγω έντονης ακτινοβολίας, ξηρασίας ή μικρής γονιμότητας του εδάφους (Poole and Miller, 1975, Specht and Runderl, 1990, Gutschick, 1999).

Η μεγάλη ποσότητα φυλλικής μάζας ανά μονάδα επιφάνειας, η υψηλή πυκνότητα του φυλλικού ιστού ή η μικρή φυλλική επιφάνεια είναι ιδιότητες των αείφυλλων-σκληρόφυλλων ειδών που βελτιώνουν την αντοχή τους στην ξηρασία (Abril and Hanano, 1998, Castro-Diez *et al.*, 1998, Gratani and Bombelli, 1999, Werner *et al.*, 1999).

Η Λεκάνη της Μεσογείου εκτείνεται από 45° Βόρειο γεωγραφικό πλάτος έως 37° 30' Νότια, περιορίζεται σε περιοχές με μεσογειακό κλίμα (Di Castri, 1981), με θερμό-ξηρό καλοκαίρι και ήπιο-υγρό χειμώνα (Εικ. 2).



Εικ. 2. Τα όρια του μεσογειακού κλίματος στην Λεκάνη της Μεσογείου.

Πηγή: <http://www.grabovrat.com/mapsViews/mapsViews82.html>

Η Λεκάνη της Μεσογείου αποτελεί το 60% όλων των περιοχών με μεσογειακό κλίμα παγκοσμίως και μαζί τις Καναρίους Νήσους αποτελούν τα δύο παγκόσμια κέντρα βιοποικιλότητας (“hotspots”, Myers *et al.*, 2000). Περιβάλλει τη Μεσόγειο Θάλασσα και περιλαμβάνει περιοχές από: Ισπανία, Γαλλία, Πορτογαλία, Βαλκανικές χώρες, Ελλάδα, Τουρκία, Συρία, Ιορδανία, Λίβανο, Ισραήλ, Αίγυπτο, Λιβύη, Τυνησία, Αλγερία και Μαρόκο καθώς και περίπου 5.000 νησιά της Μεσογείου Θάλασσας. Η τοποθεσία της Λεκάνης ανάμεσα σε Ευρασία και Αφρική έχει συμβάλει στη μεγάλη πολυμορφία της χλωρίδας της και του περιβάλλοντος γενικότερα. Στη λεκάνη ευρίσκονται βουνά με υψόμετρο έως 4.500 μέτρα, χερσόνησοι και ένα από τα μεγαλύτερα αρχιπελάγη του κόσμου. Σύμφωνα με τον Le Houerou (1981), η χλωρίδα της Μεσογείου περιλαμβάνει 15.000 είδη, και είναι η πλουσιότερη από τις πέντε περιοχές παγκοσμίως με το ίδιο κλίμα. Νεότερη μελέτη προσδιορίζει σε 25.000 τον αριθμό των φυτικών ειδών (Cowling *et al.*, 1996). Η βλάστηση της Μεσογείου δέχεται αδιάκοπη πίεση από την ανθρώπινη δραστηριότητα, τη βόσκηση και την εξάπλωση των πόλεων, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της χλωριδικής διαστρωμάτωσης, την καταστροφή της ή και τον περιορισμό της (Papanastasis, 2004). Οι επαναλαμβανόμενες πυρκαγιές σε συνδυασμό με την ανεξέλεγκτη βόσκηση έχουν οδηγήσει και σε σοβαρή υποβάθμιση των εδαφών και σε ερημοποίηση μεγάλων εκτάσεων (Papanastasis, 1977, Margaris and Koutsidou, 1998). Μετά τον 2^ο παγκόσμιο πόλεμο η επιτάχυνση της υποβάθμισης των εδαφών έχει εκθέσει σε κίνδυνο τη βλάστηση της Μεσογείου (Naveh, 1988). Η Μεσογειακή βλάστηση καλύπτει το 15% των χωρών της Λεκάνης της Μεσογείου (Le Houerou, 1981). Στην Ελλάδα καλύπτει το 40% της έκτασης της χώρας (Arianoutsou,

1998). Η βροχόπτωση κυμαίνεται από 400 mm ή και λιγότερο, έως 3.000 mm ετησίως. Τα σημαντικότερα οικοσυστήματα της Μεσογειακής βλάστησης κατά τον Papanastasis (2004), είναι:

α. Φρυγανικά οικοσυστήματα ("garrigues"): Κυριαρχούν χαμηλόσωμα (<1 m ύψος) θαμνώδη είδη με εποχικό διμορφισμό, συχνά αρωματικά ή με βελονοειδή φύλλα (Margaris, 1981). Ενδεικτικά αναφέρονται τα: *Sarcopoterium spinosum*, L. Spach, *Phlomis fruticosa* L., *Cistus* sp., *Euphorbia acanthothamnus* Heldr & Sart. Ex Boiss., *Corydanthus capitatus* L., *Globularia alypum* L.

β. Θαμνώδη οικοσυστήματα ("maquis", μακκία): Επικρατούν αειθαλή, σκληρόφυτα, πλατύφυλλα είδη, γνωστά ως «matorral» (Tomaselli, 1977). Τα είδη αυτά ανθίστανται στη θερινή ξηρασία με τα δερματώδη φύλλα και τα βυθισμένα στομάτια (Margaris, 1981), όπως τα φυτά του γένους *Arbutus*. Η μακκία βλάστηση είναι πιο πυκνή, με υψηλότερους θάμνους, σε εδάφη κυρίως πυριτικά (Le Houerou, 1992). Κυρίαρχα είδη: *Arbutus* sp., *Erica arborea* L., *Erica manipuliflora* L., *Phillyrea latifolia* L., *Olea oleaster* L., *Quercus coccifera* L., *Pistacia lentiscus* L.

γ. Δασικά οικοσυστήματα: Κυριαρχούν τα κωνοφόρα είδη: *Pinus halapensis* Miller, *P. Brutia* Ten., *Cupressus sempervirens* L. Μπορεί να συμπεριλαμβάνουν ποώδη είδη ή πιο συχνά πυκνή θαμνώδη βλάστηση αποτελούμενη κυρίως από είδη της μακκίας βλάστησης (Papanastasis, 2004). Πρόκειται ουσιαστικά για τα πευκοδάση, τα πιο ευπαθή δασικά οικοσυστήματα της Ν. Ευρώπης.

Η βιοποικιλότητα της Ελλάδας σε επίπεδο φυτικών ειδών, όπως αυτή εκφράζεται από τη σχέση αριθμού ειδών και έκτασης της χώρας, είναι μεταξύ των υψηλότερων της Ευρώπης και της Μεσογείου. Η περιοχή των Βαλκανίων περιλαμβάνει 6.500-7.000 αυτοφυή είδη, 1.500 από τα οποία είναι ενδημικά (Polunin, 1980). Η ελληνική χλωρίδα περιλαμβάνει 6.308 τάξα, ενώ ο αριθμός των ειδών υπολογίζεται ότι είναι 4.900-5.500 (Strib and Tan, 1992). Στην περιοχή της Πάρνηθας αναφέρεται η ύπαρξη 1.096 taxa (Aplada *et al.*, 2007) και του Τατοΐου 434 taxa (Papanikolaou and Sarlis, 1991).

Η Ελλάδα χαρακτηρίζεται επίσης και από τη μεγάλη της βιοποικιλότητα σε επίπεδο γενετικό, τοπίων και φυτοκοινωνιών-οικοσυστημάτων. Η βιοποικιλότητα, παρά τη διάκρισή της σε επίπεδα, πρέπει να αντιμετωπίζεται ως κάτι ενιαίο. Η προστασία κάθε επιπέδου εξαρτάται από την προστασία του προηγούμενου ή επόμενου επιπέδου. Η προστασία και διατήρηση των τοπίων εξαρτάται από την προστασία και διατήρηση της βιοποικιλότητας των οικοσυστημάτων που τα

συνθέτουν. Η σταθερότητα των οικοσυστημάτων εξαρτάται από την προστασία και διατήρηση των ειδών που συμμετέχουν στη δομή τους δηλαδή από την προστασία και διατήρηση της βιοποικιλότητας των ειδών και η προστασία και επιβίωση των ειδών, εξαρτάται από τη διατήρηση και προστασία της γενετικής βιοποικιλότητάς τους, δηλαδή τη διατήρηση των κληρονομικών μεταβολών τους σε όλο το εύρος τους (Dafis *et al.*, 1997).

Η προστασία της βιοποικιλότητας της χώρας μας σε όλα της τα επίπεδα, για την οποία τόσα πολλά λέγονται και τόσα λίγα γίνονται, δεν επιβάλλεται για λόγους καθαρά ρομαντικούς, αλλά από την ανάγκη ορθολογικής και αειφορικής διαχείρισης των φυσικών πόρων, συνεπώς για την επιβίωση του ίδιου του ανθρώπου και του πολιτισμού του.

1.2 Το γένος *Arbutus*

1.2.1 Βοτανική ταξινόμηση

Βοτανική ταξινόμηση

Σύστημα κατάταξης: Cronquist, 1981

<i>Kingdom</i>	<i>Plantae</i> –	Plants
<i>Subkingdom</i>	<i>Tracheobionta</i> –	Αγγειώδη φυτά
<i>Superdivision</i>	<i>Spermatophyta</i> –	Σπερματοφύτα
<i>Διαίρεση</i>	<i>Magnoliophyta</i> –	Αγγειόσπερμα
<i>Κλάση</i>	<i>Magnoliopsida</i> –	Δικότυλα
<i>Υποκλάση</i>	<i>Dilleniidae</i> –	Διλλενίδες
<i>Τάξη</i>	<i>Ericales</i> –	Ερεικώδη, Δίκερα
<i>Οικογένεια</i>	<i>Ericaceae</i> –	(Ερεικίδες, Heath family: οικ. του ρεικιού)
<i>Υποοικογένεια</i>	<i>Arbutoideae</i>	
<i>Γένος</i>	<i>Arbutus</i>	
<i>Είδος</i>	<i>A. andrachne</i>	
	<i>A. x andrachnoides</i>	
	<i>A. unedo</i>	

Η οικ. *Ericaceae* περιλαμβάνει αιθαλή ή μερικές φορές φυλλοβόλα θαμνώδη ή ημιθαμνώδη, μικρόσωμα δένδρα και τυπικά διαχωρίζεται σε τέσσερις υποοικογένειες: *Ericoideae*, *Rhododendroideae*, *Arbutoideae* και *Vaccinioideae*. Ο διαχωρισμός αυτός τελεί υπό αμφισβήτηση από κάποιους συγγραφείς που αναγνωρίζουν μια πρόσθετη μικρή οικογένεια (την *Epigaeoideae*) (Cronquist, 1981). Οι Hickey and King, (1998) εντάσσουν την υποοικογένεια *Arbutoideae* στην *Vaccinioideae*.

Ο αριθμός των γενών που περιλαμβάνει η οικογένεια ποικίλει ανάλογα με το συγγραφέα. Ο Porter (1967), αναφέρει ότι περιλαμβάνονται 90 γένη και περισσότερα από 1.700 είδη, ενώ ο Zomlefer (1994), αυξάνει σε 99 τον αριθμό των γενών και 2.245 τον αριθμό των ειδών της οικογενείας. Κατά τους Hickey and King, (1998), η οικογένεια περιλαμβάνει 103 γένη και 3.350 είδη. Κατά τον Cronquist, (1981) τα γένη ανέρχονται σε 125 με 3.500 είδη. Τα μεγαλύτερα γένη κατά τον συγγραφέα είναι το *Rhododendron* (850) και *Erica* (600) ακολουθούμενα από τα γένη *Vaccinium* (450), *Gaultheria* (150) και *Cavendishia* (150). Τα είδη του γένους *Vaccinium* είναι ευρέως γνωστά στις ΗΠΑ και καλλιεργούνται για τα εδώδιμα φρούτα τους, γνωστά με τις ονομασίες cranberries, bilberries, blueberries και cowberries (Hickey and King, 1998). Στις Η.Π.Α. είναι αρκετά διαδεδομένα καλλωπιστικά φυτά του γένους *Arbutus*, *Calluna*, *Epigaea*, *Erica*, *Kalmia*, *Oxydendrum*, *Pieris* και *Rhododendron*. Το γένος *Erica* είναι ευρέως και ιδιαίτερα διαδεδομένο στη Νότια Αφρική και το *Rhododendron* στην περιοχή των Ιμαλαΐων και της Μαλαισίας.

Η υποοικογένεια *Arbutoideae* με βάση τη μορφολογία των ανθέων και των καρπών, καθώς και ανατομικές και φυτοχημικές παρατηρήσεις (Cox, 1948, Stevens, 1971) αποτελεί μια διακριτή ομάδα της οικ. *Ericaceae*. Περιλαμβάνει σκληροφυτικά είδη προσαρμοσμένα σε συνθήκες ξηρασίας (Hileman *et al.*, 2001). Τα πλέον συνήθη γένη είναι: *Arbutus*, *Arctostaphylos*, *Arctus*, *Comarostaphylis*, *Ornithostaphylos* και *Xylococcus*. Το γένος *Arbutus* χαρακτηρίζεται από τους σφαιρικούς αδενώδεις καρπούς με τα πολυάριθμα φυμάτια που φέρουν επιφανειακά (Small, 1914, Stevens, 1971, Diggs and Breckon, 1981, Sorensen, 1995). Οι Young and Young (1992) μάλιστα, αναφέρουν πως το όνομα «*arbutus*», προέρχεται από την Κέλτικη λέξη «*arboise*», που σημαίνει «τραχύ» φρούτο.

Η οικ. *Ericaceae* αντιπροσωπεύεται στην Ελλάδα από τα γένη *Erica*, *Arbutus*, *Arctostaphylos*, *Vaccinium*, *Calluna* με αντιπροσωπευτικά τα είδη: *Vaccinium myrtillus*, *V. Vitis-idaea*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Erica arborea*, *E. verticillata*,

Rhododendron flavum καθώς και τα *Arbutus andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* (Στεφανάκη, 1999, Μπαμπαλώνας και Κοκκίνη, 2004).

Ο αριθμός των ειδών του γένους *Arbutus* ποικίλει από 12 έως 20, ανάλογα με το συγγραφέα. Για 12 είδη κάνουν λόγο οι, Καββάδας (1956), Mitchell (1992), Hickey and King, (1998), The European Garden Flora, (1997), Hileman *et al.*, (2001). 14 είναι τα είδη σύμφωνα με τους Hickey and King, (1998) και Hogon, (2008), ενώ υπάρχουν αναφορές για 20 είδη (Reader's Digest Encyclopedia of Garden Plants and Flowers, 1988, Αραμπατζής, 1998, Preston, 2002). Στην Μεσόγειο απαντούν τέσσερα είδη του γένους και δύο υβρίδια (Torres *et al.*, 2002): *Arbutus unedo* L., *A. andrachne* L. (κουμαριά και άγρια κουμαριά αντίστοιχα, ανατολική Μεσόγειος), *A. pavarii* Pampanini (Ακτές Λιβύης), *A. canariensis* Veill. (Κανάριοι Νήσοι), *A. x andrachnoides* Link. (*A. unedo* × *A. andrachne*, ανατολική Μεσόγειος) και *A. x androsterilis* Salas, Acebes & Arco (*A. unedo* × *A. canariensis*), στις Καναρίους Νήσους. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους έχουν μελετηθεί αρκετά (Link, 1821, Bonnier, 1934 κ.α.)

Το *A. andrachne* L. ("Greek strawberry tree", "Eastern strawberry tree", "Cyprus strawberry tree", γλυστροκουμαριά) φύεται στη ΝΑ Ευρώπη (Αλβανία, Ελλάδα, Κρήτη σε αμιγείς πρεμνοφυείς συστάδες), Μέση Ανατολή (Τουρκία, Λίβανο, Ισραήλ), Κριμέα και σπάνια στη Ν. Αγγλία.

Το *A. unedo* L. ("strawberry tree", κουμαριά) φύεται σε Β. Αφρική, ΝΑ-ΝΔ Ευρώπη (από Ισπανία έως Τουρκία), Ιρλανδία, Ν. Αγγλία. Επίσης αναφέρεται η ύπαρξή του και στα νησιά της Μακαρονησίας (Villar, 1993). Καλλιεργείται σε αρκετές περιοχές με ήπιο κλίμα (Orwa *et al.*, 2009). Η παρουσία του στην Ιρλανδία και σε περιοχές του Ατλαντικού οφείλεται μάλλον σε εισαγωγή στις περιοχές αυτές κατά την εποχή της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας κατά την οποία ήταν φυτό με ευρεία αναγνώριση και χρήση (Bradshaw, 2004, Chessa and Nieddu, 2009).

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 (Rikli, 1943, Καββάδας, 1959, Tutin *et al.*, 1972, Mitchell, 1982, Polunin, 1987, Reader's Digest Encyclopedia of Garden Plants and Flowers, 1988, Blamey and Wilson, 1993, Roberts, 1993, The European Garden Flora, 1997, Αραμπατζής, 1998, Synge, 1981). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα των Hileman *et al.* (2001), που μελετώντας τη βιογεωγραφία και τις φυλογενετικές σχέσεις της υποοικογένειας *Arbutoideae* διαπίστωσαν μεγαλύτερη γενετική σχέση των μεσογειακών ειδών

Arbutus με άλλα γένη (*Arctostaphylos*, *Arctus*, *Comarostaphylis*, *Ornithostaphylos*, *Xylococcus*) της *Ericaceae* σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη του γένους *Arbutus* της Αμερικανικής Ηπείρου.

Στη χώρα μας απαντούν τα *A. andrachne* L., *A. unedo* L., *A. x andrachnoides* (Εικ. 3, 4, 5, αντίστοιχα). Στη χώρα μας απαντά και το *A. unedo* forma *rubra* Ait με ρόδινα άνθη, το οποίο όμως δεν παρουσιάζει καμιά άλλη μορφολογική διαφορά (Εικ. 6). Ο γενότυπος αυτός δεν εντοπίστηκε στις περιοχές μελέτης. Στην εικόνα 7 και 8 φαίνεται η περιοχή η οποία διερευνήθηκε στα πλαίσια της παρούσης μελέτης για την ύπαρξη ατόμων των ειδών. Το σύνηθες ύψος των φυτών στις περιοχές που έχει εντοπιστεί από προσωπικές παρατηρήσεις είναι 1,5-3 m, ύψος που αναφέρει ότι αποκτούν και ο Καρέτσος στο όρος Οίτη (2002). Κάποιες φορές είναι δυνατόν να φθάσουν μέχρι το ύψος των 6-8 m (Lillis and Fontanella, 1992), ακόμα και 9-12 m (Tutin *et al.*, 1972). Ο κορμός είναι πολυκλαδισμένος, αλλά στην κοινή κουμαριά αυτό είναι πιο έντονο.

Τα φυτά 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, επαλάσσοντα, με στιλπνή επιφάνεια, σκληρά, δερματώδη, επιμήκη έως ελλειψοειδή, οξυκόρυφα ή όχι, με μήκος 5-10 cm. Η άνω επιφάνεια των φύλλων είναι βαθυπράσινη, γυαλιστερή, ενώ η κάτω επιφάνεια έχει ανοιχτότερο χρωματισμό 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. Οι κλαδίσκοι των φυτών καθώς και η νέα βλάστηση μπορεί να φέρουν αδενώδη τριχίδια έχουν ερυθρωπό χρωματισμό στην ηλιαζόμενη πλευρά του φυτού. 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, με μήκος 8-9 mm υποπράσινα-λευκά ή ελαφρώς ρόδινα αν είναι αρκετά εκτεθειμένα στον ήλιο για το μεγαλύτερο μέρος της μέρας και φέρονται επάκρια σε βραχείς, σύνθετους, βότρες. Τα άνθη φέρουν 10 στήμονες έγκλειστους εντός της πεντάχωρης ωοθήκης.

Είναι φυτά αυτογονιμοποιούμενα και η γονιμοποίηση γίνεται με τη διαμεσολάβηση διαφόρων υμενόπτερων (Knuth, 1909, Orwa *et al.*, 2009).



Εικ. 3. Μητρικό άτομο *A. andrachne* (α), σχίσμο του φλοιού (β), άνθη (γ), φύλλα (δ), καρποί (ε) (Βαρυμπόμπη).



Εικ. 4. Μητρικό άτομο *A. unedo* (α), καρποί, άνθη και φύλλα (β), άνθη (γ), φλοιός (δ) (Βαρυμπόμπη).



Εικ. 5. Μητρικό άτομο *A. x andrachnoides* (α), άνθη (β), φύλλα (γ), φλοιός (δ), καρποί (ε) (Βαρυμπόμπη).



Εικ. 6. Άτομο *A. unedo* var. *rubra*.

Πηγή: <http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/315105/>



Εικ. 7. Οι περιοχές μελέτης και συλλογής φυτικού υλικού, Κάλαμος ($38^{\circ}16'3''$ N, $23^{\circ}51'55''$ E) και Βαρυμπόμπη ($38^{\circ}8'19''$ N, $23^{\circ}47'44''$ E), Ν. Αττικής.



α



β

Εικ. 8. Άτομα *Arbutus* μεμονωμένα ή σε συστάδες στην περιοχή της Βαρυμπόμπης (α) και του Κάλαμου (β).

Ο καρπός των φυτών του γένους έχει ζωηρό πορτοκαλί-κόκκινο χρώμα, είναι ράγα, πολύσπερμος, κοκκιώδης επιφανειακώς και στο *A. unedo* θυμίζει φράουλα από όπου και προέκυψε η ονομασία του “strawberry tree” (Hillier, 1993), με διάμετρο περίπου 20 mm. Ο καρπός του *A. andrachne* έχει μικρότερο μέγεθος (περί τα 10 mm), ενώ το *A. x andrachnoides* όταν σχηματίζει καρπούς, αυτοί έχουν μέγεθος

ενδιάμεσο των γονέων (10-15 mm). Τα φρούτα διασπείρονται κυρίως από διάφορα σπονδυλωτά (Herrera, 1987).

Το *A. unedo* είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακό και ελκυστικό κατά την περίοδο Οκτώβριος-Ιανουάριος όταν φέρει πολυάριθμους βότρεις με άνθη και καρπούς ταυτόχρονα. Το *A. andrachne* ανθοφορεί την άνοιξη, μετά το πέρας της καρποφορίας, ενώ και έχει λείο κανελί-ερυθρωπό φλοιό που έλκει από μακριά το βλέμμα (όπως και το *A. x andrachnoides*), ιδιαίτερα όταν κατά το τέλος της άνοιξης-αρχές του καλοκαιριού απολεπίζεται σε φύλλα ή σε επιμήκεις λωρίδες αποκαλύπτοντας το πρασινωπό εσωτερικό του (Εικ. 9). Στη συνέχεια αποκτά λευκό χρωματισμό και αφού πάρει καφέ αποχρώσεις σημαίνει τελικά την είσοδο του χειμώνα με την επαναφορά του κανελί-ερυθρού χρωματισμού. Η ιδιότητα αυτή της απολέπισης του φλοιού του *A. andrachne* και της εξέλιξής της σε διάφορα στάδια, περιγράφεται και εξαιρείται ως ιδιαίτερο καλλωπιστικό στοιχείο του φυτού σε μονογραφία του 19^{ου} αιώνα που αναφέρεται στον βοτανικό κήπο του Τσέλσου (Μ. Βρετανία) (Sims, 1819).



Εικ. 9. Συστάδα *Arbutus andrachne*, αρχές Ιουνίου, εποχή που παρατηρείται με μεγάλη ένταση η απολέπιση στους βλαστούς για να αποκαλυφτεί ο εσωτερικός γκριζοπράσινος φλοιός.

Το *A. unedo* είναι από τα φυτά της ελληνικής χλωρίδας που έγιναν πιο δημοφιλή κατά την προετοιμασία της χώρας μας για τους Ολυμπιακούς αγώνες του 2004 οπότε έγινε ευρέως γνωστό και πλέον παρουσιάζει ζήτηση για χρήση στην Κηποτεχνία (προσωπικές παρατηρήσεις). Είναι φυτά κατάλληλα λόγω της αντοχής τους σε ξηροθερμικές συνθήκες για φύτευση σε αυτοκινητόδρομους, πρανή, σε περιοχές πλησίον της θάλασσας ενώ παράλληλα παρέχουν αντιδιαβρωτική προστασία στο έδαφος (Olmez *et al.*, 2007). Σε πολλές περιοχές της Ελλάδας, όπως στο Ν. Πήλιο (Μουρτιάς, Κατηγιώργης κ.α.) η κουμαριά και η άγρια κουμαριά σχηματίζουν πυκνή βλάστηση μέσου ύψους έως στις παρυφές της ακτογραμμής (προσωπικές παρατηρήσεις). Η κουμαριά λόγω της πυκνής και ισχυρής της βλάστησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό συμπαγών συστάδων. Παράλληλα παρουσιάζει πολλή καλή προσαρμοστικότητα και σε ημισκιερές θέσεις στο φυσικό της περιβάλλον (Gilman & Watson, 1993) όπως διαπιστώθηκε και από προσωπικές μας παρατηρήσεις σε πολλούς φυσικούς βιότοπους όπου απαντά το φυτό (Πιερία, Νάουσα, Πήλιο, Βαρυμπόμπη, Κάλαμος, Σκιάθος κλπ).

Το *A.x andrachnoides* διακρίνεται δύσκολα από το *A. andrachne* λόγω της ομοιότητας σε μεγάλο βαθμό που παρουσιάζουν τα είδη στους μορφολογικούς χαρακτήρες και ως εκ τούτου συχνά τα δύο είδη συγχέονται. Οι Bačić *et al.*, (1992), ερεύνησαν ανατομικά χαρακτηριστικά στο φύλλωμα των δύο ειδών και διαπίστωσαν ότι το φερόμενο ως *A. andrachne* είδος στην περιοχή Badijia (ακτές Αδριατικής, Γιουγκοσλαβία) είναι πιο συγγενές στο *A.x andrachnoides*.

Το μέγιστο υψόμετρο που απαντά το *Arbutus unedo* στην Ευρώπη, βρίσκεται στην Ελλάδα, όπου φύεται σε υψόμετρο έως τα 900 m (Boratynski *et al.*, 1997). Για το *A. andrachne* αναφέρεται αντοχή σε θερμοκρασίες έως -18 °C (Roberts, 1993) και για το *A. unedo* έως -10 °C (Bird, 1989). Τα φυτά του γένους χαρακτηρίζονται από έντονη βλαστική ανάπτυξη την άνοιξη, όπως διαπιστώθηκε από προσωπικές παρατηρήσεις και αναφέρεται για το *A. unedo* (Andrianoutsou-Faraggitaki and Diamantopoulos, 1983, Pereira *et al.*, 1987, Gratani and Crescente 1997). Την ίδια εποχή παρατηρείται και πτώση φύλλων (Andrianoutsou-Faraggitaki and Diamantopoulos, 1983). Είναι φυτά με μικρές ή ελάχιστες απαιτήσεις που ευδοκμούν σε καλώς στραγγιζόμενα, ελαφρώς όξινα εδάφη, αλλά είναι τα μόνα από τα Ericaceae που μπορούν να καλλιεργηθούν και σε ασβεστώδη εδάφη (Synge, 1981, Roberts, 1993, The Miller Manual of Trees and Shrubs, 2007).

Το *A. andrachne* είναι γνωστό ως ανδράχνη του Θεόφραστου, αγριοκουμαριά, ανδράκλα, άνδρακλα, αντρουκλία, ανδρακλίδα, γλυστροκουμαριά, κουκουμάτσι, μπαμπουκλιά (Καββάδας, 1956). Στην Ελλάδα το επίθετο άγριος έχει επικρατήσει εδώ και πολλά χρόνια, για να προσδιορίσει ένα φυτό που παρουσιάζει κάποιους κοινούς χαρακτήρες με καλλιεργούμενα είδη (Dawkins, 1936). Το *A. unedo* (κουμαριά, άρβουτος ο κοινός) είναι γνωστό ως κόμαρος από τον Θεόφραστο και Διοσκουρίδη (Καββάδας, 1956) και συναντάται με την ονομασία καρομηλιά (Σκύρος) και λαγομηλιά (Πελοπόννησος) (Βολιώτης, και Αθανασιάδης, 1990). Η κουμαριά προέρχεται από τη μεταμόρφωση του γιού της Γαίας Τρικόρφου. Σύμφωνα με τον Πausanias έξω από το ναό του Προμάχου Ερμή στην Τανάγρα, ανδρώθηκε ο φτερωτός θεός στη σκιά μιας μεγάλης γλυστροκουμαριάς (I.M.Δ.Ο.Τ.Δ.Π., 2007).

Για τα *A. andrachne* και *A. unedo* αναφέρονται τάσης μείωσης των πληθυσμών τους κατά τόπους στην Ελλάδα (<http://filotis.itia.ntua.gr/species/d/2524/>, <http://filotis.itia.ntua.gr/species/d/2525/>). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν αναφορές (Garzuglia, 2006) ότι στην Ουκρανία το *A. andrachne* συμπεριλαμβάνεται στα ευάλωτα είδη και στην Αλβανία στα απειλούμενα με εξαφάνιση και ότι το *A. unedo* συμπεριλαμβάνεται στα απειλούμενα με εξαφάνιση στην Σλοβενία, σύμφωνα με τους εθνικούς καταλόγους, αν και δεν αναφέρονται στους καταλόγους του IUCN RedList. Το *A. andrachne* περιλαμβάνεται επίσης στα επαπειλούμενα είδη της Γεωργίας (Kacharava *et al.*, 1982) και Ιορδανίας (Karam and Al-Salem, 2001). Οι Celikel *et al.* (2008) αναφέρουν ότι οι πληθυσμοί του *A. unedo* στις κεντρικές, βόρειες και βορειοδυτικές ακτές της Τουρκίας υφίστανται μεγάλη πίεση εξ' αιτίας της μεγάλης ανάπτυξης των τουριστικών υποδομών στις περιοχές αυτές. Οι ίδιοι συγγραφείς επισημαίνουν ότι περαιτέρω πίεση στους πληθυσμούς θα μπορούσε να οδηγήσει ακόμα και σε εξάλειψη του είδους. Το φυσικό υβρίδιο *A. x andrachnoides* περιλαμβάνεται σε κατάλογο με 44 προστατευόμενα είδη της Κροατίας (Šatović, 2002).

Τα φυτά πολλαπλασιάζονται στη φύση με σπόρο. Αναφέρεται ότι το *A. x andrachnoides* μπορεί να εμβολιαστεί με υποκείμενο το *A. unedo* τον Αύγουστο ή τον Ιανουάριο-Φεβρουάριο (side graft) και ότι το *A. andrachnoides* μπορεί να πολλαπλασιαστεί με μοσχεύματα (Macdonald, 1986). Οι Al-Salem & Karam (2001) πολλαπλασίασαν με μοσχεύματα βάσης και κορυφής το *A. andrachne*. Ο Μεταξάς (2004) αναφέρει ότι ο καλύτερος τύπος μοσχεύματος για το *A. unedo* είναι τα

επάκρια και ότι ο γενότυπος έχει σημαντική επίδραση στη ριζοβολία όπως και η εποχή ριζοβολίας.

1.2.2 Χρήσεις

Τα κούμαρα είναι αγαπημένη τροφή για τα πτηνά και οι κίσσες και οι κότσυφες τρελαίνονται να τα τρώνε. Ο Αριστοφάνης αναφέρεται στους «Όρνιθες» (Άπαντα Αριστοφάνους, 1961) στα κοτσύφια τα κουμαροφάγα που:

“Κι όσα μες τους κήπου, στου κισσού τα κλώνια
βρίσκεις τροφές,
και σεις που πάνω στα βουνά τις αγριελιές τσιμπολογάτε,
και σεις κουμαροφάγα, τη φωνή μου ακούστε
Και γοργοπετάχτε – τριοτό-τριοτό-τοτοβρίζ”

Στην Ισπανία το *A. unedo* αποτελεί την κύρια τροφή για τον αίγαγρο (*Capra pyrenaica* Sinhinz) και το ελάφι (*Cervus elaphus* L.) (Martínez, 2008). Όπως διαπιστώθηκε επανειλημμένα από προσωπικές παρατηρήσεις, σε χρονιές που είχε σημειωθεί έντονη χιονόπτωση στην Αττική, οι καρποί τόσο του *A. unedo*, όσο και των άλλων ειδών *Arbutus* εξαφανίζονταν μέσα σε 1-2 μέρες αφού προφανώς αποτελούσαν τη μόνη προσιτή τροφή για τα πτηνά, αλλά και τα θηλαστικά της περιοχής, όταν το χιόνι είχε καλύψει τα πάντα. Αποτελούν επίσης εκλεκτό έδεσμα για το αγριογούρουνο, (σύμφωνα με προφορικές μαρτυρίες κυνηγών που μας είπαν ότι την εποχή της καρποφορίας, στήνουν «παγάνες», παγίδες δηλαδή σε κουμαριές και περιμένουν τα αγριογούρουνα). Είναι εκλεκτή τροφή για τις νυχτερίδες (Izhaki *et al.*, 1995) και τις αρκούδες.

Στην πόλη της Μαδρίτης (Puerta del Sol square) είναι τοποθετημένο το άγαλμα με την αρκούδα (Εικ. 10) που τρώει κούμαρα. Η ίδια παράσταση αποτελεί το επίσημο οικόσημο της πόλης που σύμφωνα με κάποιες απόψεις πήρε το όνομά της (madroño) από το φυτό αυτό (<http://elmadridmedieval.jmcastellanos.com>).



Εικ. 10. Μαδρίτη, η πλατεία με την αρκούδα που τρώγει κούμαρα (Puerta del Sol square). Πηγή: <http://www.pbase.com/bossuytj/image/53468335>

Στο Museo del Prado στη Μαδρίτη, εκτίθεται ένας πίνακας του Ιερώνυμου Μπος, (Ο κήπος των επίγειων απολαύσεων), ένα τρίπτυχο που απεικονίζει τη δημιουργία της γης και την αμαρτία. Δεξιά απεικονίζεται η κόλαση και αριστερά ο παράδεισος (ο κήπος της Εδέμ). Δεσπόζουσα θέση στα φρούτα έχουν τα κούμαρα και ο πίνακας στην Ισπανία είναι γνωστός και ως ο πίνακας με τα κούμαρα (Εικ. 11).



Εικ. 11. The Garden of Earthly Delights, (c. 1480-1505), Hieronymus Bosch. Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/File:The_Garden_of_Earthly_Delights_by_Bosch_High_Resolution.jpg

Τα κούμαρα ήταν πασίγνωστα στην Αρχαία Ελλάδα και συμπεριλαμβάνονταν στη διατροφή των προγόνων μας (Μότσιας, 1982). Σε τοιχογραφίες της Πομπηίας απεικονίζεται το *A. unedo*. Ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος, ο Ρωμαίος επιστήμονας (φυσικός φιλόσοφος) και ιστορικός, περίφημος κυρίως από το έργο του «Φυσική Ιστορία» (*Naturalis Historia*), έδωσε το λατινικό όνομα της κουμαριάς. Το όνομα «unedo» προέρχεται από το λατινικό «unum edo» που σημαίνει «τρώω ένα, μόνο». Το *A. unedo* απεικονίζεται σε 2 οικίες στην Αρχαία Πομπηία (Εικ. 12).



Εικ. 12. Οικίες στην Αρχαία Πομπηία με απεικόνιση του *A. unedo* (Jasbemski *et al.*, 2002).

Οι καρποί του *A. unedo* και του *A. andrachne* είναι πλούσιοι σε βιταμίνη C (Baytop, 1984, Sakar *et al.*, 1991, Alarcoe-E-Silva *et al.*, 2001). Τα κούμαρα είναι αγαπημένο φρούτο στην Μάνη στην Ήπειρο και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας. Στην Β. Ελλάδα οι καρποί της ήμερης κουμαριάς δεν καταναλώνονται μόνο ως νοποί, αλλά χρησιμοποιούνται και για την παρασκευή μαρμελάδας και τσίπουρου. Στην Περία χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για την παρασκευή καλής ποιότητας αποστάγματος για εγχώρια κατανάλωση. Η απόσταξη του κούμαρου χρονολογείται από τα χρόνια του Βυζαντίου, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι είχε ξεκινήσει από ακόμη νωρίτερα (Soufleros *et al.*, 2005). Με το νόμο 2969/2001 (Εφημερίδα της Κυβερνήσεως, 2001) εναρμονίζεται η νομοθεσία με το ευρωπαϊκό δίκαιο και ρυθμίζονται οι υποχρεώσεις των παραγωγών τσίπουρου από φρούτα όπως το κούμαρο, το μούρο τα ζίζιφα και τα κρίνα. Ήδη από το 1989 ο ευρωπαϊκός κανονισμός 1576/89 (Official Journal of EEC, 1989) και ο 1014/90 (Official Journal of EEC, 1990), αναφέρονται στον ορισμό, περιγραφή και παρουσίαση αρκετών

αποσταγμάτων που συμπεριλαμβάνουν και τα κούμαρα. Στην Ευρώπη χρησιμοποιούνται για την παρασκευή (arbouse) κρασιού, κονιάκ και ενός ηδύποτου που λέγεται κουμαρόκρεμα (crème d' arbouse στην Κορσική, fior de corbezzolo στην Σικελία) (Orwa *et al.*, 2009). Στην Πορτογαλία παρασκευάζεται το μπράντυ *aguardente de medronhos (medronheiro)* (Mabberley and Placito, 1993). Είναι γνωστά φρούτα και στην Ευρώπη για την παρασκευή μαρμελάδας, ζελέ φρούτων, (Seidemann, 1995).

Τα φύλλα και ο φλοιός της ήμερης κουμαριάς χρησιμοποιούνται και είναι γνωστά από χρόνια για τις στυπτικές, διουρητικές και αντισηπτικές τους ιδιότητες (Grieve, 1967). Η κουμαριά θεωρείται φαρμακευτικό φυτό, γνωστή για τις αντιδιαβητικές της ιδιότητες, για τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης, για τις ευεργετικές της ιδιότητες στα καρδιαγγειακά νοσήματα, τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και τις αντιμικροβιακές (Ziyyat, *et al.*, 1997, Mekhfi *et al.*, 2004, Diba *et al.*, 2010). Αρωματικά οξέα, флаβονοειδή ιριδοειδή, στερόλες, φενυλ-προπανοειδή, μονο-τερπένια και τρι-τερπένια είναι οι κύριες κατηγορίες ουσιών που έχουν απομονωθεί από την ήμερη κουμαριά (Carcache-Blanco *et al.*, 2006). Από εκχυλίσματα των φύλλων έχουν απομονωθεί σειρά από φαινολικούς γλυκοζίτες (Karikas and Giannitsaros, 1990). Τα τελευταία χρόνια διερευνώνται και οι αντικαρκινικές ιδιότητες του φυτού (Carcache-Blanco *et al.*, 2006, Mariotto *et al.*, 2008). Γενικά το *A. unedo* είναι φυτό που έλκει το ενδιαφέρον της έρευνας στο πεδίο της φαρμακολογίας καθώς αποτελεί σημαντική πηγή φαινολικών συστατικών, της ομάδας του γαλλικού οξέος και των флаβονοειδών που είναι γνωστά για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Rice-Evans *et al.*, 1995). Οι Pawlowska and De Leo (2006), επισημαίνουν με έμφαση ότι η αφθονία του *A. unedo* μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική πηγή χρήσιμων για την υγεία φρούτων. Οι Ruiz-Rodríguez, *et al.*, (2010) εκθειάζουν τη θρεπτική αξία των κούμαρων και ενθαρρύνουν την έρευνα για την επιλογή κατάλληλων γονότυπων και την ένταξη των μικρών αυτών καρπών στα σύγχρονα διατροφικά προγράμματα.

Όσον αφορά στο *A. andrachne*, αφέψημα από τις ρίζες, τα φύλλα και τους καρπούς χρησιμοποιείται για τη θεραπεία παθήσεων του ουροποιητικού συστήματος σε παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος όπως το άσθμα (Al-Khalil, 1995). Πολτοποιημένος ιστός από τις ρίζες και τους καρπούς, ομογενοποιημένα σε λάδι ελιάς, χρησιμοποιείται ως τοπικό παυσίπονο σε εξωτερική εφαρμογή (Said *et al.*, 2002). Οι Sakar *et al.*, (1991), αναφέρονται στις αιμοστατικές και αντισπασμικές

ιδιότητες του *A. andrache*. Από εκχυλίσματα των βλαστών έχουν απομονωθεί τερπενοειδή, φαινολι- καθώς και ιριδο-γλυκοζίτες (Aburjai *et al.*, 1999). Στην Ιορδανία εκχύλισμα από φύλλα του *A. andrachne* χρησιμοποιείται για την λεύκανση του δέρματος (Issa *et al.*, 2008). Τα φυτά έχουν και μελισσοκομική αξία, το παραγόμενο δε μέλι έχει μια διακριτική-πικρή γεύση (Soro and Paxton, 1999, Chessa and Nieddu, 2009).

Το φύλλωμα της ήμερης κουμαριάς χρησιμοποιείται ευρέως στην Ανθοδετική ως φύλλωμα φόντου σε ανθικές συνθέσεις. Δυστυχώς όμως η κοπή των φυλλωμάτων γίνεται ανεξέλεγκτα από τους φυσικούς βιότοπους. Το ξύλο της κουμαριάς είναι βαρύ και σκληρό, χρησιμοποιείται ως ξυλοκάρβουνο και για την κατασκευή μικροαντικειμένων, όπως φλάουτα. Ο φλοιός της περιέχει ταννίνη που χρησιμοποιείται στην επεξεργασία των δερμάτων (Χριστόπουλος, 2006).

1.2.3 Απειλές από αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες

Τα οικοσυστήματα της μεσογειακής βλάστησης καλύπτουν το 40% της Ελλάδας και αναπτύσσονται στην ηπειρωτική χώρα και στις νήσους, σε υψόμετρο συνήθως μέχρι 800 m (Arianoutsou, 2001). Η βλάστηση των μακί, με θάμνους μέχρι 2 m, θεωρείται ότι αποτελεί προστάδιο της δασικής βλάστησης ή υποβάθμιση του δασικού οικοσυστήματος, αποτελούν ωστόσο την άριστη δυνητική βλάστηση σε περιοχές με ξηρότερο κλίμα. Τυπικά είδη των μακί στην Ελλάδα είναι τα: *Ceratonia siliqua*, *Olea europaea* var. *sylvestris*, *Pistacia lentiscus*, *Quercus coccifera*, *Arbutus unedo*, *A. andrachne*, *Erica arborea*, *Laurus nobilis*, *Myrtus communis* κ.α. και οι φυτοκοινότητες που σχηματίζουν χαρακτηρίζονται φυτοκοινωνιολογικά ανάλογα με τα επικρατούντα είδη. Κυριότερες απειλές που αντιμετωπίζουν οι οικότυποι αυτοί είναι (Papanastasis, 2004):

- α) Η αλλαγή χρήσεων γης: η εγκατάλειψη των παραδοσιακών μεθόδων καλλιέργειας και η επέκταση των εντατικών καλλιεργειών.
- β) Η μεγάλη συχνότητα των επεισοδίων φωτιάς και η καύση της φυσικής βλάστησης προκειμένου να μετατραπεί σε βοσκότοπο.
- γ) Η υπερβολική, μη ελεγχόμενη βόσκηση.
- δ) Η εισαγωγή ξένων ειδών.

1.2.3.1 Αβιοτικοί παράγοντες

Τα ενήλικα δένδρα της κουμαριάς είναι αρκετά ανθεκτικά σε χαμηλή θερμοκρασία, αλλά ως νεαρό φυτό καλό είναι να προστατεύεται από το δριμύ ψύχος. Η διαμόρφωση με κορμό την καθιστά πιο ευαίσθητη σε χαμηλές θερμοκρασίες (Μεταξάς, 2004). Ο Καϊλίδης (1990) αναφέρει ότι τον Φεβρουάριο του 1983, παρατήρησε ελαφριά νέκρωση των φύλλων σε πληθυσμούς κουμαριάς στη Β. Ελλάδα, ύστερα από πτώση της θερμοκρασίας στους -10°C .

Το διοξείδιο του Θείου (SO_2) αναφέρεται ότι οδηγεί στη μείωση της φωτοσύνθεσης (Panicucci *et al*, 1998) του *Arbutus unedo* και ότι το όζον (O_3) μειώνει τη στοματική αντίδραση προκαλώντας βλάβες στα φύλλα (Paoletti, 2005).

1.2.3.2 Αναβλάστηση μετά από πυρκαγιές

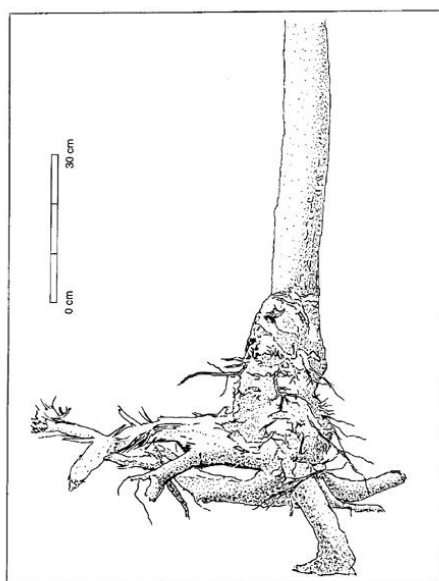
Η φύση, η δομή και η σύνθεση των Μεσογειακών δασών και θαμνώνων σε συνδυασμό με τις μετεωρολογικές συνθήκες, καθιστούν τα οικοσυστήματα αυτά εύφλεκτα (Le Houerou, 1987). Στην Ελλάδα το 90 % της έκτασης που καίγεται κάθε χρόνο αντιστοιχεί σε Μεσογειακά οικοσυστήματα (24 % σε πευκοδάση και 66 % σε φρύγανα και μακί, Αριανούτσου, 1998). Οι φυτοκοινωνίες των Μεσογειακών οικοσυστημάτων ορίζονται ως πυρότοποι (fire type) ή «καταληκτικές καταστάσεις» μετά από φωτιά, με την προϋπόθεση ότι δεν επαναλαμβάνεται επιπρόσθετη δευτερογενής διατάραξη, όπως είναι η πιθανή επανεκδήλωση πυρκαγιάς ή η υποβάθμιση εξ' αιτίας της υπερβόσκησης (Arianoustou and Margaris, 1981, Trabaud *et al.*, 1985). Η ικανότητα ανάκαμψης των Μεσογειακών οικοσυστημάτων μετά από φωτιά (fire resilience) συνδέεται με τους μηχανισμούς και στρατηγικές που έχουν αναπτύξει τα φυτικά είδη που περιλαμβάνουν:

α) *Φύτρωση σπερμάτων (reseeding)*. Είναι ο πλέον εξειδικευμένος μηχανισμός προσαρμογής των φυτών για την αντιμετώπιση της φωτιάς (π.χ. είδη των οικογενειών *Cistaceae*, *Leguminosae*, *Pinaceae* κ.α.) (Arianoustou and Margaris, 1981).

β) *Αναβλάστηση (resprouting)*. Λαμβάνει χώρα από ληθαργικούς οφθαλμούς που έμειναν προστατευμένοι στο έδαφος ή από υπόγειες κονδυλώδεις κατασκευές (π.χ. είδη του γένους *Quercus*, *Juniperus*, και *Arbutus*, *Erica* κ.α.). Τα φυτά του γένους *Arbutus* έχουν μεγάλη ικανότητα για αναβλάστηση (Naveh, 1975, Canadell *et*.

al, 1991, Chávez and Moya, 1997) και πράγματι σε διάστημα 10-15 χρόνων, μαζί με άλλα είδη όπως ρείκια, σχίνα και μυρτιές, έχουν σχηματίσει έναν πυκνό όροφο βλάστησης ύψους μέχρι 1,5–3,0 m στις περιοχές μελέτης (Βαρυμπόμπη και Κάλαμος). Η απουσία σποροφύτων *Arbutus unedo* και *Erica arborea* (σε καμμένες περιοχές, τόσο σε εργαστηριακές συνθήκες όσο και στο φυσικό περιβάλλον) διαπιστώθηκε ότι δεν οφείλεται σε καταστροφή των σπόρων, αλλά στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες που διαμορφώθηκαν μετά την πυρκαγιά (Mesléard and Lepart, 1991). Οι σπόροι είχαν βλαστήσει την άνοιξη όταν οι συνθήκες ήταν ευνοϊκές, και γι' αυτό δεν υπάρχουν σπορόφυτα μετά την πυρκαγιά.

Τα φυτά του γένους έχουν υπόγειες κονδυλώδεις κατασκευές λιγνοκυτταρίνης στη βάση του κορμού (αμυλώδες οίδημα) (Εικ. 13) (Lacey, 1983, James, 1984, Canadell *et. al*, 1991, Lloret and Vilà, 1997, El Omani *et al.*, 2003). Οι σχηματισμοί αυτοί που μοιάζουν με ρόζους (“lignotuber” ή “burl”) εξασφαλίζουν τη ζωνή αναβλάστηση μετά την καταστροφή του υπέργειου μέρους του φυτού από πυρκαγιά ή άλλους παράγοντες (Εικ. 14, 15, 16, 17).



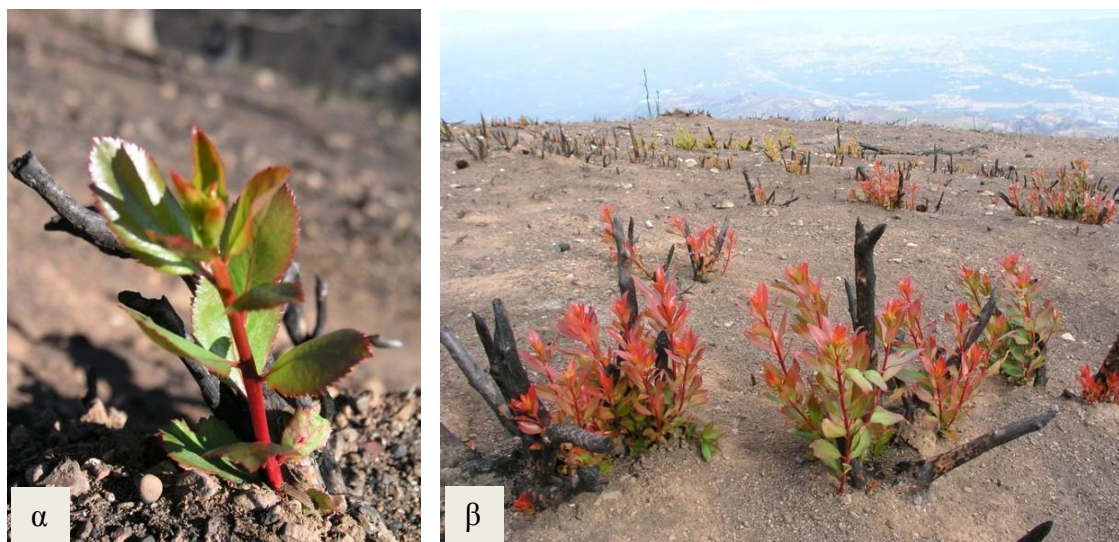
Εικ. 13. Βλαστός, κόνδυλος (lignotuber) και ρίζες *A. unedo* ηλικίας 35 ετών, το υπέργειο μέρος του οποίου δεν έχει καταστραφεί.

Πηγή: Canadell, J. and López-Soria, L., 1998.

Οι διογκωμένες αυτές περιοχές είναι πηγή νέων μεριστωμάτων (Malanson and Trabaud, 1987, Zammit, 1988, Moreno and Oechel, 1994, Canadel and López - Soria, 1998). Αποτελούν επίσης σημαντικά αποθηκευτικά όργανα υδατανθράκων,

σακχάρων και θρεπτικών στοιχείων που κινητοποιούνται μετά την πυρκαγιά και υποστηρίζουν την αρχική αναβλάστηση του φυτού (Canadel and López - Soria, 1998). Η αναβλάστηση με αυτόν τον τρόπο, αποτελεί έναν επιτυχή μηχανισμό ανασύστασης ενός πληθυσμού μετά από πυρκαγιά, γιατί τα αποθεματικά στο ριζικό σύστημα του μητρικού φυτού που διατηρούνται αποθηκευμένα, μπορούν να αποτελέσουν ένα σημαντικό πλεονέκτημα στα αναγεννημένα με αναβλάστηση φυτά σε σχέση με τα σπορόφυτα από φυτά που δεν αναγεννιούνται με αυτόν τον τρόπο (Mooney and Hobbs, 1986).

Όλα τα είδη της οικ. *Ericaceae* μπορούν να αναβλαστήσουν και με σπόρο μετά από πυρκαγιά (Gratani and Amadori, 1991). Οι ίδιοι ερευνητές υπολόγισαν ύψος φυτών 2,00-2,50 m ύστερα από 8 έτη, μετά από ελεγχόμενη πυρκαγιά και αναβλάστηση σε έρευνα που διεξήχθη σε πειραματικό αγρό πλησίον της Ρώμης. Σε έρευνα που έλαβε χώρα στη Χαλκιδική προκειμένου να μελετηθεί η αναβλάστηση σε καμένα δάση με κουμαριές, βρέθηκε ότι η κλάδευση και η απομάκρυνση των καμένων κλαδιών επιταχύνει την αναβλάστηση των φυτών (Spanos *et al.*, 2005). Οι πυρκαγιές όμως που επαναλήφθηκαν ύστερα από τρία χρόνια σε περιοχή της Πεντέλης επηρέασαν περισσότερο την αναγέννηση του *A. andrachne* σε σχέση με το *A. unedo* (Goudelis *et al.*, 2007).



Εικ. 14. Αναβλάστηση *A. unedo* στην Ακράτα (N. Αχαΐας, 2007) 35 και 50 ημέρες μετά (α και β αντίστοιχα). Πηγή: http://kpe-akrat.ach.sch.gr/regeneration_gallery.php



Εικ. 15. Άτομο *Arbutus andrachne*, 10 περίπου έτη μετά την πυρκαγιά (Αθήνα, Βαρυμπόμπη).



Εικ. 16. Πληθυσμοί *Arbutus*, ένα έτος μετά την πυρκαγιά (Καλαμάκι, Πήλιο).



Εικ. 17. Αναβλαστημένο άτομο *A. andrachne* ύστερα από την καταστροφή του υπέργειου τμήματος που προήλθε από διάνοιξη δασικού δρόμου από συνεργεία συντήρησης του εναέριου δικτύου της ΔΕΗ.

Το *A. unedo* χρησιμοποιείται ευρέως στην αναβλάστηση ερημοποιημένων εδαφών στην περιοχή της Μεσογείου, ενώ ενδείκνυται για την αποκατάσταση ορυχείων, εξ' αιτίας της ανθεκτικότητάς του στο αρσενικό (As) (Moreno-Jiménez *et al.*, 2008). Σύμφωνα με τους ερευνητές, η ικανότητα που έχει το φυτό για κατακράτηση του αρσενικού, επιτρέπει τη χρήση του ως φυτού-σταθεροποιητή, παρεμποδίζοντας την ανεξέλεγκτη διάβρωση και την έκπλυση του αρσενικού. Ο Καρέτσος (2002), αναφέρει ότι σε περιοχές του όρους Οίτη, ο συνδυασμός των απότομων κλίσεων με τις μακροχρόνιες συνέπειες της βοσκής, έχει δημιουργήσει εξαιρετικά ξηρά περιβάλλοντα που ευνοούν την κυριαρχία του *A. andrachne*.

1.2.3.3 Βιοτικοί παράγοντες

1.2.3.3.1 Έντομα

Το γένος *Arbutus* αναφέρεται ως ξενιστής του *Lymantria dispar* L. (λεπιδόπτερο) το οποίο προσβάλλει περίπου 250 είδη και παρατηρείται συχνά στην

Κύπρο. Οι προνύμφες μπορεί να προκαλέσουν αποφύλλωση σε μεγάλη έκταση και να καταστήσουν τα δένδρα ευαίσθητα σε δευτερογενείς προσβολές από άλλα έντομα. Κατά περιόδους μπορεί να προκαλέσει έντονα συμπτώματα, ειδικά στα *Quercus infectoria* ssp. *Veneris*, *Quercus alnifolia*, *Pistacia terebinthus* και *Arbutus andrachne* με ταυτόχρονη υποβάθμιση της αισθητικής αξίας των δένδρων (Overview of Forest Pests, 2008). Στην Πάρνηθα από την πληροφόρηση που είχαμε από τις αρμόδιες υπηρεσίες του Δασαρχείου, οι προσβολές του εντόμου *Limandria dispar* L. είναι περιορισμένης έκτασης και προκαλούν μόνο μείωση της ανάπτυξης των δένδρων. Το λεπιδόπτερο *Euproctis chrysorrhoea* ήταν σε επιδημική κατάσταση τα έτη 1991-1994 στην Ικαρία (Καϊλίδης, 1996).

Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι διάφορα είδη (*Aleurotuba jelinekii*, *Dialeurodes setiger*, *Aleurotrachelus rhamnocola*) από την υπεροικογένεια Aleurodoidea (Ημίπτερα-Ομόπτερα), προσβάλλουν τόσο το *A. unedo* όσο και το *A. andrachne* (*Trialeurodes lauri*, *Tetraleurodes neemani*), (Martin *et al.*, 2000). Από την ίδια τάξη εντόμων, αναφέρονται προσβολές από τα *Targiana vitis*, *Ceroplastes rusci*, *Saissetia oleae* (Καϊλίδης, 1996). Το *Coccus hesperidum* (κόκκος των εσπεριδοειδών), πολυφάγο είδος, προσβάλλει και το *A. andrachne*. Οι νεαρές προνύμφες προσβάλλουν συνήθως την άνω επιφάνεια του φύλλου και το βασικό τμήμα του μεσαίου νεύρου (Pirone, 1978).

1.2.3.3.2 Μύκητες-Βακτήρια

Ο μύκητας *Phytophthora ramorum* αναφέρεται ότι προσβάλλει επίσης τα ελληνικά είδη (<http://www.bpi.gr/photos/home/files/Phytophthora%20ramorum.pdf>) προκαλώντας ζημιές στο φλοιό, στο φύλλωμα ή στους νεαρούς κλαδίσκους. Στην Ισπανία υπάρχουν αναφορές για προσβολές από μύκητες του γένους *Phytophthora* (Moralejo *et al.*, 2008). Στην ίδια χώρα νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα του *A. unedo* παρατηρούνται ύστερα από προσβολή από τον μύκητα *Pestalotiopsis maculans* (Trapero *et al.*, 2003). Οι Polizzi & Catara (2001) παρατήρησαν νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα του *A. unedo* στη Β. Ιταλία που προκλήθηκαν από μύκητες του γένους *Cylindrocladium pauciramosum*. Ο Καϊλίδης, (1996), έχει καταγράψει στον ελληνικό χώρο προσβολές στο *A. unedo* από τους μύκητες *Phytophthora microstictum* (σηψιρριζίες και νεκρώσεις στον κορμό που οριακά μπορεί να οδηγήσουν σε

νέκρωση μέρους της κόμης), *Corryneum microstictum* (κηλιδώσεις ακανόνιστης μορφής και μεγέθους στα φύλλα ή καστανόχρωες κηλιδώσεις στη νεαρή βλάστηση), *Griphosphaeria corticola* (στίγματα στα φύλλα και νέκρωση κορυφών, *Septoria unedonis* (κηλίδες στα φύλλα) και *Phyllosticta* spp. (κηλίδες στα φύλλα). Ο ίδιος συγγραφέας αναφέρει ότι το *Bacterium tumefaciens* προκαλεί όγκους στο δένδρο. Στο *A. menziesii* όμως, (Pacific madrone), αναφέρεται η συμβολή διαφόρων μυκητολογικών ασθενειών στην εξάλειψη του πληθυσμού του είδους, καθώς προσβεβλημένα δένδρα από μύκητες που προκαλούν καρκίνο αναβλαστάνουν λιγότερο (Elliot *et al.*, 2002). Αρκετές νεκρωτικές κηλίδες σε πληθυσμούς *A. unedo* της Χαλκιδικής παρουσιάστηκαν την άνοιξη του 1997 και του 1998 (Tsahouridou & Thanassouloroulos, 2000) και διαπιστώθηκε ότι επρόκειτο για την πρώτη προσβολή στην Ευρώπη από τον μύκητα *Nattrassia mangiferae*. Οι Linaldeddu *et al.*, (2010) αναφέρουν για πρώτη φορά, σε πληθυσμούς του *A. unedo* στην Ιταλία, προσβολή από τον μύκητα *Diplodia scrobiculata* που προκαλεί καρκίνο και νέκρωση βραχιόνων. Σε γενικές γραμμές όμως στο φυσικό περιβάλλον δεν υπάρχουν εχθροί ή ασθένειες που να προκαλούν μεγάλη ανησυχία (Orwa *et al.*, 2009), κάτι που έχει διαπιστωθεί και από τις προσωπικές μας παρατηρήσεις στις περιοχές μελέτης.

Μετασυλλεκτικές προσβολές σε καρπούς του *A. unedo* αναφέρονται από τον μύκητα *Penicillium citrinum* Thom και *Verticicladiella abielina* (Peck) Hughes (Xiaodong Zheng, 2004).

2 Η Ιστοκαλλιέργεια στο γένος *Arbutus*, την οικογένεια *Ericaceae* και σε άλλα ξυλώδη είδη φυτών

Η κουμαριά (strawberry tree), περιλαμβάνεται στον κατάλογο των “minor fruits” ως φυτό με οικονομικό ενδιαφέρον και έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών για τις φαρμακευτικές και χημικές του ιδιότητες (βλ 1.2.2) πέραν των δυνατοτήτων της ως φυτού κηποτεχνίας. Η επιλογή των πιο ενδιαφερόντων ατόμων (γενοτύπων) είναι απαραίτητη στα πλαίσια της αξιοποίησής του από οικονομικής πλευράς. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις εναλλακτικές καλλιέργειες στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχει προκαλέσει τη δημιουργία μακροπρόθεσμων προγραμμάτων για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών της κουμαριάς σε χώρες όπως η Πορτογαλία, με βάση τη γενετική παραλλακτικότητα που παρατηρείται σε φυσικούς πληθυσμούς

προερχόμενους από διαφορετικές περιοχές (Torres *et al.*, 2002). Στην Τουρκία γίνονται ανάλογες προσπάθειες (Celikel *et al.*, 2008). Η εκτίμησή μας είναι ότι ο το ενδιαφέρον θα αυξηθεί στο εγγύς μέλλον και στην χώρα μας, όπως έχει συμβεί και με άλλες καλλιέργειες (π.χ. τα μανιτάρια). Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα αυτοφυή είδη έχει καταγραφεί από τους ερευνητές και εκφράζεται με δράσεις όπως ο αγροτουρισμός (Molina *et al.*, 2011). Στη χώρα μας η πρόσφατη οικονομική κρίση κινητοποιεί τους πολίτες και τους επιστήμονες προκαλώντας αυξανόμενο ενδιαφέρον για εναλλακτικές καλλιέργειες και εκτροφές που θα μπορούσαν να εξασφαλίσουν ικανοποιητικό εισόδημα στους καλλιεργητές. Η έντονη αυτή τάση καταγράφεται και από την αυξανόμενη συμμετοχή των πολιτών σε ταχύρυθμα σεμινάρια που διοργανώνονται από φορείς όπως το Ινστιτούτο Γεωπονικών Επιστημών (αδημοσίευτα δεδομένα).

Υπό το πρίσμα μιας τέτοιας προσέγγισης ο πολλαπλασιασμός επιλεγμένων ατόμων είναι μεγάλης σημασίας. Ο εγγενής πολλαπλασιασμός δεν εξασφαλίζει γενετική ομοιομορφία και σταθερότητα και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ενός γονότυπου μπορεί να εξαφανιστούν, προβλήματα που μπορούν να ξεπεραστούν με τις παραδοσιακές τεχνικές αγενούς πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα ή με μικροπολλαπλασιασμό (Hartman *et al.*, 1997).

Συχνά όμως το ποσοστό ριζοβολίας των μοσχευμάτων της κουμαριάς είναι μικρό, ειδικά αν το υλικό που χρησιμοποιείται είναι ώριμα μοσχεύματα (Mereti *et al.*, 2002, Metaxas *et al.*, 2004). Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός βλαστών του γένους *Arbutus* δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Οι βιβλιογραφικές αναφορές αφορούν κυρίως στο *A. unedo* και δευτερευόντως στο *A. xalapensis*. Ο Mackay (1996), αναφέρει ως καταλληλότερο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού για το *A. xalapensis*, υπόστρωμα με άλατα WPM και βιταμίνες MS που περιείχε 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ BA, χωρίς την προσθήκη αυξίνης. Οι Morini and Fiaschi (2000), αξιολόγησαν ως καταλληλότερο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού, υπόστρωμα με μακροστοιχεία QL και μικροστοιχεία MS, με βιταμίνες Mullin, που περιείχε 2,5 mg l⁻¹ BA, 0,2 mg l⁻¹ GA₃ και 0,06 mg l⁻¹ IBA, χωρίς όμως πολύ υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού. Οι Rodrigues *et al.*, (2001) μελέτησαν την επίδραση ενός τεμαχιστή laser CO₂ αντί νυστεριού, σε έκφυτα κόμβου *A. unedo*, χρησιμοποιώντας στερεό υπόστρωμα MS με 30 g l⁻¹ σακχαρόζη και 1 mg l⁻¹ BAP. Ο τεμαχιστής laser ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικός στη διακοπή του ληθάργου των οθαλμών των εκφύτων από Οκτώβριο έως Ιανουάριο. Οι Mohamed El-Sayed El-Mahrouk *et al.* (2010), χρησιμοποίησαν υπόστρωμα MS με διάφορες

συγκεντρώσεις TDZ (0-4) mg l⁻¹ για τον πολλαπλασιασμό *A. unedo* μέσω εμβρυογενικού κάλλου που αναπτύχθηκε στη συνέχεια σε υπόστρωμα MS με BA/NAA. Τα φυτά αναπτύχθηκαν τελικά σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες.

Οι Gomes and Canhoto (2009), για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του *A. unedo* χρησιμοποίησαν επικορμικούς βλαστούς *A. unedo* από διάφορους γονότυπους, αντιμετωπίζοντας έντονα προβλήματα από μολύνσεις στην έρευνά τους. Διαπίστωσαν τη μεγάλη επίδραση του γονότυπου σε σημείο που κάποιοι να μη δίνουν καθόλου επιμηκυσμένους βλαστούς. Οι ερευνητές προτείνουν ως κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, μέσο FS με τα μικροστοιχεία του MS. Στη μελέτη τους τα έκφυτα κορυφής από επικορμικούς (λαίμαργους) βλαστούς έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τα έκφυτα κόμβων. Η ριζοβόληση ήταν αρκετά εύκολη σε όλα τα υποστρώματα που έλεγξαν, ακόμα και χωρίς την προσθήκη αυξίνης που βέβαια αύξησε το σχηματισμό ριζών. Τα ριζοβολημένα φυτά εγκλιματίστηκαν με επιτυχία. Οι βλαστοί από κάποιους γονότυπους δεν ήταν δυνατόν να ριζοβολήσουν. Οι Gomes *et al.*, (2010) μελέτησαν την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων BA στον πολλαπλασιασμό του *A. unedo* και διαπίστωσαν ως καταλληλότερη την συγκέντρωση των 2 mg l⁻¹ που όμως δεν διέφερε από την απόδοση ίδιας συγκέντρωσης ZEAT ή KIN. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού διέφερε μεταξύ των διαφόρων γονότυπων. Η χρήση TDZ ή NAA είχε επιβλαβή αποτελέσματα.

Σύμφωνα επίσης με τον Debnath, (2004), η αύξηση της συγκέντρωσης της ZEAT στα υποστρώματα καλλιέργειας, προκάλεσε αύξηση του αριθμού των βλαστών και του κάλλου, αλλά μείωση του αριθμού των φύλλων, του ύψους και της ευρωστίας των βλαστών (σχηματίστηκαν υπερενυδατωμένοι βλαστοί), ενώ έκφυτα από κορυφαίους κόμβους παρουσίασαν καλύτερη αντίδραση από αυτά κόμβων της βάσης (αυτή η διαφορετική μορφογενετική ικανότητα πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική φυσιολογική κατάσταση των οφθαλμών σε διαφορετικά μέρη του βλαστού όπως αναφέρεται και για άλλα είδη του γένους *Vaccinium*).

Για την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από διαφορετικά είδη, πληθυσμούς και ποικιλίες του γένους *Vaccinium* οι Reed and Abdelnour-Esquivel (1991), χρησιμοποίησαν με επιτυχία ZEAT σε συγκέντρωση 4 mg l⁻¹ και τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα WPM, το οποίο περιείχε διπλάσια συγκέντρωση Ca(NO₃)₂.

Οι El-Morsy and Millet (1996), πολλαπλασίασαν *in vitro* το είδος *Citrus aurantium* χρησιμοποιώντας έκφυτα κόμβων, τα οποία ελήφθησαν από τα μητρικά φυτά σε τρία στάδια βλάστησης. Αρχικά (1^ο στάδιο) πριν τελειώσει η φάση της επιμήκυνσης της αρχικής βλάστησης, στη συνέχεια (2^ο στάδιο) κατά τη διάρκεια της διακοπής της βλάστησης και τέλος (3^ο στάδιο) κατά την έναρξη της νέας βλάστησης. Έπαιρναν έκφυτα από το ανώτερο, από το μέσο και από τη βάση του ακραίου τμήματος της βλάστησης. Έκφυτα κόμβων που συλλέχθηκαν από το 1^ο στάδιο ανάπτυξης από το μέσο και την βάση της βλάστησης αναπτύχθηκαν γρηγορότερα *in vitro* από αυτά που κόπηκαν από την κορυφή της βλάστησης. Η επίδραση της θέσης των εκφύτων δεν ήταν σημαντική στα άλλα δύο στάδια βλάστησης. Έκφυτα κόμβων που κόπηκαν από τη βάση και το μέσο της βλάστησης στα στάδια 2 και 3 παρήγαγαν τον υψηλότερο αριθμό βλαστών ανά φυτό και το μεγαλύτερο μήκος βλαστών. Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η διακλάδωση και η επιμήκυνση των μασχαλιαίων οφθαλμών που αναπτύχθηκαν *in vitro* εξαρτάται σημαντικά από την φάση της βλάστησης και από την θέση των οφθαλμών πάνω στο βλαστό. Έδειξαν επίσης ότι μασχαλιαίοι οφθαλμοί που κόπηκαν από την κορυφή της του βλαστού (οπότε και σχηματίστηκαν στο τέλος της νέας βλάστησης), αναπτύχθηκαν πολύ πιο αργά από τους οφθαλμούς που βρίσκονταν στην μέση και τη βάση του βλαστού που σχηματίστηκαν στη φάση της ταχείας ανάπτυξης αυτού. Επίσης οι γρήγοροι ρυθμοί ανάπτυξης των μητρικών φυτών διατηρήθηκαν και στα παραγόμενα φυτά.

Οι Sahoo and Chand (1998), εγκατέστησαν μια γρήγορη και ιδιαίτερα αποδοτική μέθοδο μικροπολλαπλασιασμού για το είδος *Vitex negundo*. Χρησιμοποίησαν έκφυτα κόμβων ενήλικων φυτών, τα οποία καλλιέργησαν σε BA, KIN ή TDZ, με το BA να είναι το πιο αποτελεσματικό στην εγκατάσταση των καλλιεργειών. Εξέτασαν επίσης την επίδραση που είχε η εποχή κοπής των εκφύτων στην καλλιέργεια και βρήκαν ότι έκφυτα που κόπηκαν την περίοδο Ιουνίου - Αυγούστου αντέδρασαν με υψηλότερα ποσοστά και σχημάτισαν τον υψηλότερο αριθμό βλαστών. Οι Romano *et al.* (2002), ανέπτυξαν μια επιτυχή μέθοδο μικροπολλαπλασιασμού του είδους *Ceratonia siliqua*, χρησιμοποιώντας έκφυτα κόμβων που είχαν έναν τουλάχιστον οφθαλμό.

Οι Koubouris and Vasilakakis (2006), πολλαπλασίασαν επιτυχώς την ποικιλία Bebekou του είδους *Prunus armeniaca* L. με μικροπολλαπλασιασμό εγκαθιστώντας τα έκφυτα σε υπόστρωμα Balla με BA και IAA.

Οι Lall *et al.* (2005), κατά τον μικροπολλαπλασιασμό του είδους *Alnus glutinosa*, διαπίστωσαν το σχηματισμό αδύναμων βλαστών, οι οποίοι είχαν κάλλο στη βάση τους όταν συμπεριλήφθησαν στα υποστρώματα, συγκεντρώσεις 1-5 μM του BA. Υποθέτουν ότι η αντίδραση αυτή οφείλεται στην επίδραση ενδογενούς αυξίνης και προσθέτοντας, στα υποστρώματα τους παρεμποδιστές μεταφοράς αυξίνης NPA και TIBA σε συνδυασμό με BA, διαπίστωσαν σχηματισμό βλαστών με ικανοποιητική διακλάδωση και λιγότερο κάλλο στη βάση τους. Οι βλαστοί ριζοβόλησαν εύκολα μετά την μεταφορά τους σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες.

Οι Gajdosova *et al.* (2006), χρησιμοποίησαν τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα Anderson's rhododendron με ZEAT σε συγκέντρωση 0,5 mg l^{-1} όπου επιτεύχθη βλαστογένεση για διάφορες ποικιλίες του γένους *Vaccinium* (highbush blueberry, lingonberry).

Οι Sedlak and Paprstein (2009), μελετώντας κατάλληλες μεθόδους για την ανάπτυξη της καλλιέργειας διαφόρων ποικιλιών του γένους *Vaccinium*, αναφέρουν ότι θρεπτικό υπόστρωμα WPM με ZEAT μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή χιλιάδων φυτών από μια απλή αρχική εγκατάσταση, σε σύγκριση με παραδοσιακές μεθόδους αγενούς πολλαπλασιασμού (μοσχεύματα).

Για τον πολλαπλασιασμό των ποικιλιών blueberries 'brightwell' και 'choice' (Yan-qi Jiang *et al.*, 2000) χρησιμοποιήθηκε η ZEAT σε διάφορες συγκεντρώσεις η οποία έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε συγκέντρωση 2 mg l^{-1} .

Ο Κάρτσωνας (2008), μελέτησε την επίδραση της φυσιολογίας του εκφύτου, του υποστρώματος και των συνθηκών περιβάλλοντος στην οργανογένεση και τον εγκλιματισμό του ενδημικού της βορειοανατολικής Εύβοιας *Quercus euboica* Par. το οποίο απειλείται με εξαφάνιση. Έκφυτα κόμβων από σπορόφυτα έδωσαν τον υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού από αντίστοιχα ενήλικων φυτών. Ο υψηλότερος ρυθμός πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε σε έκφυτα σποροφύτων ηλικίας ενός έτους σε υπόστρωμα με 1 mg l^{-1} BA. Παρατηρήθηκε επίδραση της εποχής λήψης των εκφύτων στην αντίδρασή τους, καθώς έκφυτα που τοποθετήθηκαν στις αρχές Μαΐου παρουσίασαν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σχέση με αυτά του Ιουλίου και Σεπτεμβρίου. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε άλατα του Woody Plant Medium (WPM), με βιταμίνες Mullin και 1,5 ή 3 % σακχαρόζη. Διάφορες συγκεντρώσεις κυτοκινινών εξετάστηκαν για την επίδραση τους στον πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών και ο υψηλότερος ρυθμός πολλαπλασιασμού επιτεύχθηκε σε υπόστρωμα με 1 mg l^{-1} BA και 0,2 mg l^{-1} IBA. Τα καλύτερα αποτελέσματα

ριζοβολίας επιτεύχθηκαν μετά από καλλιέργεια σε 2 mg l^{-1} IBA για μια εβδομάδα και στη συνέχεια σε υπόστρωμα χωρίς ορμόνες. Η εμφάνιση της βάσης των μικροβλαστών σε πυκνά διαλύματα IBA για διάφορες χρονικές περιόδους και στη συνέχεια καλλιέργεια τους *in vitro* σε WPM ή *ex vitro* σε έδαφος, δεν βελτίωσε την ριζοβολία τους, ενώ η χρήση της μεμβράνης sanitas ως κάλυψη των δοχείων καλλιέργειας είχε ευεργετικά αποτελέσματα στη ριζοβολία. Φυτάρια που τοποθετήθηκαν σε έδαφος από την Εύβοια εγκλιματίστηκαν σε υψηλότερο ποσοστό και είχαν καλύτερη ανάπτυξη συγκριτικά με αυτά που τοποθετήθηκαν σε μίγμα compost-περλίτη.

In vitro πολλαπλασιασμός βλαστών ειδών του γένους *Quercus* έχει επιτευχθεί σε υπόστρωμα WPM (McCown και Lloyd, 1981) ή MS (Murashige και Skoog 1962), με την προσθήκη μιας κυτοκινίνης (Bennett and Davies, 1986, Manzanera and Pardos, 1990, Romano *et al.*, 1992, Vieitez *et al.*, 1993, Puddephat *et al.*, 1997, Purohit *et al.*, 2002, Kartsonas and Papafotiou, 2007). Οι Vieitez *et al.* (1985), αναφέρουν επιτυχή ανάπτυξη βλαστών του *Q. robur* σε υπόστρωμα GD με χαμηλές συγκεντρώσεις της κυτοκινίνης BAP. Η Chalupa (1984), αντίθετα αναφέρει ότι τα υποστρώματα BTM (Chalupa, 1981) και WPM, ήταν πιο αποτελεσματικά για καλλιέργεια ειδών του γένους *Quercus* από το GD (Gresshoff and Doy, 1972).

Οι Manzanera and Pardos (1990) πέτυχαν μικροπολλαπλασιασμό του είδους *Q. suber* χρησιμοποιώντας τρία είδη εκφύτων α. σποροφύτων ηλικίας ενός έτους β. ενήλικων φυτών 30-40 ετών (οι κορμοί τους ψεκάστηκαν τον Σεπτέμβριο με BA, τρεις εβδομάδες μετά τον χειρισμό με το BA εκπύχθηκαν βλαστοί μήκους 3-5 cm οι οποίοι και χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή εκφύτων) και γ) μοσχευμάτων ενήλικων φυτών ηλικίας 75-115 ετών που αποθηκευτήκαν στους $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ για 7 ημέρες, ψεκάστηκαν με διάλυμα από φτέρες και BA και μετά 6 εβδομάδες είχαν βλαστούς μερικών cm που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή εκφύτων. Ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποίησαν μακροστοιχεία έξι θρεπτικών υποστρωμάτων, μικροστοιχεία MS και ασκορβικό οξύ, νικοτινικό οξύ, μωινοζιτόλη, πυριδοξίνη, θειαμίνη, pantothenate, CA και 3% σακχαρόζη. Τα διαφορετικά μακροστοιχείων υποστρώματα δεν είχαν επίδραση στην αντίδραση εκφύτων νεανικής προέλευσης στη φάση της εγκατάστασης των αρχικών καλλιεργειών, είχαν όμως επίδραση στη αντίδραση εκφύτων ενήλικης προέλευσης με το MS να είναι το χειρότερο όλων, χωρίς καθόλου έκπτυξη των οφθαλμών.

Η επίδραση της θέσης των εκφύτων στην ανάπτυξη της καλλιέργειας έχει αναφερθεί για πολλά είδη. Ο Evers (1987), αναφέρει ότι στο *Pseudotsuga menziesii*, (Douglas fir) παρατηρήθηκε υψηλότερη αντίδραση των εκφύτων από χαμηλότερους οφθαλμούς στο βλαστό. Η επίδραση της θέσης του εκφύτου σε έναν μεμονωμένο βλαστό βαλανιδιάς σύμφωνα με τους Volkaert *et al.* (1990), όταν τα έκφυτα κόπηκαν κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης των βλαστών ήταν σημαντική, με έκφυτα από την βάση του βλαστού να αντιδρούν καλύτερα, πιθανόν σαν αποτέλεσμα της βελτιωμένης ανάπτυξης αυτών των κόμβων. Το στάδιο ανάπτυξης των βλαστών επηρεάζει την αντίδραση στην καλλιέργεια (Favre and Juncker, 1987) και παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των φύλλων που σχηματίστηκαν σε βλαστούς βαλανιδιών συνδέεται με τον αριθμό των προσχηματισμένων φύλλων που υπήρχαν στον αρχικό οφθαλμό.

Οι Juncker and Favre (1989), αναφέρουν πως ένα μεγάλο πρόβλημα κατά τον μικροπολλαπλασιασμό δασικών φυτών είναι η μη επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, με κυριότερες αιτίες τις ακόλουθες:

α) η μη αποτελεσματική σταθεροποίηση των συνθηκών καλλιέργειας (χημική σύσταση υποστρωμάτων καλλιέργειας, το σχήμα, ο όγκος και το υλικό κάλυψης των δοχείων καλλιέργειας, η ποιότητα και η ένταση του φωτός, η μεταβολή της θερμοκρασίας εντός αυτών)

β) η φυσιολογική ετερογένεια των εκφύτων που σχετίζεται με τη φαινολογία τους, τους ενδογενείς ρυθμούς αύξησης και την ηλικία των μητρικών φυτών και

γ) τα μη αναγνωρισμένα βακτήρια ή μυκόπλασματα που εμφανίζονται κατά την καλλιέργεια.

Διαφορές στην αντίδραση των εκφύτων παρατηρήθηκαν ακόμη και σε υλικό προερχόμενο από σπορόφυτα. Στις βαλανιδιές όπως και σε άλλα δασικά φυτά οι διαφορές μεταξύ των κλώνων είναι αρκετά μεγάλες για να εξηγούν την αστάθεια στην εγκατάσταση καλλιεργειών υποκαλλιεργειών και ριζοβολίας. Οι διαφορές στην ικανότητα ριζοβολίας εμφανίστηκαν κυρίως στους κλώνους ενήλικης προέλευσης από ότι στους νεανικής, φαίνεται λοιπόν ότι η ικανότητα ριζοβολίας είναι καλύτερος δείκτης νεανικότητας. Οι διαφορές των κλώνων στην αντίδραση τους στην καλλιέργεια, εισάγει την δυνατότητα της καλλιέργειας κλώνων με καλύτερη απόδοση που έχουν υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού.



Υλικά και μέθοδοι *in vitro* καλλιέργειών

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

3.1 Φυτικό υλικό

Ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν, επιλεγμένα, ενήλικα, αυτοφυή φυτά (Εικ. 3, 4, 5), σπόροι από τα επιλεγμένα αυτά φυτά και σπορόφυτα ανεπτυγμένα *in vitro* (βλ. κεφ. 6). Τα μητρικά, αυτοφυή φυτά, ήταν αντιπροσωπευτικά του κάθε είδους και περίπου της ίδιας ανάπτυξης και ηλικίας (ένα συγκεκριμένο άτομο για κάθε είδος το οποίο σημάνθηκε). Στη Βαρυμπόμη (Ν. Αττικής) σημάνθηκε και χρησιμοποιήθηκε ένα άτομο του *A. unedo* και ένα άτομο *A. andrachne* για τα πειράματα *in vitro* καλλιέργειών (Εικ. 7). Στον Κάλαμο (Ν. Αττικής) εντοπίστηκε αρχικά ένα άτομο με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά το οποίο σημάνθηκε και έδωσε το απαραίτητο φυτικό υλικό για τα πειράματα *in vitro* καλλιέργειών (Εικ. 7). Στη συνέχεια εντοπίστηκε και χρησιμοποιήθηκε ως μητρικό φυτό άτομο με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά στην Βαρυμπόμη (Εικ. 5).

3.2 Υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειας

3.2.1 Υλικά

Τα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα στα οποία τοποθετήθηκαν τα έκφυτα περιείχαν τα ακόλουθα συστατικά:

- α) Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog basal mixture της εταιρείας Sigma-Aldrich) σε μορφή σκόνης (Murashige and Skoog, 1962) (Πίν. 1).
- β) Άλατα WPM (Woody Plant Medium basal salt mixture) σε μορφή σκόνης της εταιρείας Sigma-Aldrich (McCown and Lloyd, 1981), (Πίν. 1).
- γ) Σακχαρόζη (του εμπορίου).
- δ) Αυξίνες:
 - Ναφθυλ-οξικό οξύ (NAA, 1-Naphthaleneacetic acid), MB=186, της εταιρείας Sigma-Aldrich.
 - Ινδολυλ-3-βουτυρικό οξύ (IBA), MB= 230,24, της εταιρείας Sigma-Aldrich.

- 2,4-διχλωρο-φαινοξυ-οξικό οξύ, (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), MB= 221,04, της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- ε) Κυτοκινίνες:
- Βενζυλαδενίνη (BA, N⁶-benzyladenine), MB= 225,26, της εταιρείας Fluka.
 - Θειντιαζουρόν (TDZ, thidiazuron), MB= 220,3, της εταιρείας Sigma-Aldrich.
 - Ζεατίνη (ZEAT, trans-zeatin), MB= 219,24, της εταιρείας Sigma-Aldrich.
 - Κινετίνη (KIN, kinetin), MB= 215,21, της εταιρείας Sigma-Aldrich.
 - 2IP (6-(γ,γ-Dimethylallylamino)purine), MB=203,24, της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- στ) Γιβερελλίνες:
- γιβερελλινικό οξύ (GA₃, Gibberellic acid), MB= 346,37 της εταιρείας Sigma Aldrich.
- ζ) Βιταμίνες:
- Μυοινοζιτόλη (myo-inositol), MB= 180,16, της εταιρείας Merck.
 - Θειαμίνη (thiamine hydrochloride), MB= 337,30, της εταιρείας Sigma-Aldrich.
 - Πυριδοξίνη (pyridoxol hydrochloride), MB= 205,64, της εταιρείας Merck.
 - Νικοτινικό οξύ (nicotinic acid), MB= 123,11, της εταιρείας Merck.
- η) Άγαρ (Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά).

3.2.2 Μέθοδος παρασκευής υποστρωμάτων

Σε δοχείο ζέσεως με αποσταγμένο νερό (όγκου λιγότερου του τελικού) προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες αλάτων Woody Plant Medium (WPM) $2,3 \text{ g l}^{-1}$ με βιταμίνες Mullin (Mullin *et al.*, 1974, μυοινοσιτόλη 100 mg l^{-1} , θειαμίνη 1 mg l^{-1} , πυριδοξίνη $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ και νικοτινικό οξύ $0,5 \text{ mg l}^{-1}$) ή πλήρους Murashige and Skoog (MS) $4,4 \text{ g l}^{-1}$, καθώς και σακχαρόζης 3% και των επιθυμητών κάθε φορά φυτορρυθμιστικών ουσιών, από τα stock διαλύματα αυτών και αναδεύονταν σε μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι να διαλυθούν πλήρως. Στη συνέχεια γινόταν ογκομέτρηση και προσθήκη αποσταγμένου νερού, μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολουθούσε ρύθμιση του pH στην τιμή 5,6-5,7 της κλίμακας με τη βοήθεια διαλυμάτων 0,1 ή 1 N NaOH και 0,1 ή 1 N HCl. Ακολούθως προστίθετο άγαρ στην

απαιτούμενη ποσότητα (8 g l^{-1}) και ακολουθούσε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως και ομοιόμορφα το άγαρ.

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

Συστατικά	MS (mg l^{-1})	WPM (mg l^{-1})
NH_4NO_3	1.650	400
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	332,2	96
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	556
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370
KNO_3	1.900	-
K_2SO_4	-	990
KH_2PO_4	170	170
H_3BO_3	6,2	6,2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	-
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,25
Na_2EDTA	37,3	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,69	22,3
KI	0,83	-
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	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

Στο στάδιο της εγκατάστασης των αρχικών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν ως δοχεία καλλιέργειας δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 50 ml, που περιείχαν 10 ml υπόστρωμα έκαστος. Μετά την τοποθέτηση του υποστρώματος οι σωλήνες καλύπτονταν με αλουμινόχαρτο για να αποστειρωθούν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης. Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών και των ριζοβολιών χρησιμοποιήθηκαν ως δοχεία καλλιέργειας γυάλινα δοχεία όγκου 100 ml, τα οποία περιείχαν 25 ml υπόστρωμα το κάθε ένα. Στη συνέχεια τα δοχεία καλύπτονταν με σκληρό πλαστικό καπάκι (Sigma, magenta-B caps) και τοποθετούνταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης. Η καλλιέργεια των σπόρων γινόταν σε πλαστικά τρυβλία διαμέτρου 9 cm, με 20 ml υποστρώματος ανά τρυβλίο. Η

πλήρωση των τρυβλίων με υπόστρωμα, γινόταν στην τράπεζα νηματικής ροής. Είχε προηγηθεί αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος στην χύτρα σε υάλινες φιάλες όγκου 500 ή 1000 ml.

3.2.3 Παρασκευή διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών και βιταμινών

Τα stock διαλύματα των φυτορρυθμιστικών ουσιών περιείχαν την κάθε φυτορρυθμιστική ουσία σε ποσοστό 10 % κ.β. Για τον έλεγχο της επίδρασης του TDZ παρασκευάστηκε επιπλέον stock διάλυμα 1 % κ.β.

1. 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 προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.
2. 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 προστίθεντο 100 ml αποσταγμένου νερού.
3. Παρασκευή “stock” διαλύματος 2.4-D. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml, τοποθετούνταν 10 mg 2.4-D, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.
4. Παρασκευή “stock” διαλύματος BA. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg BA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml θερμού (με βραστό νερό κρυστάλλωνε η ουσία) αποσταγμένου νερού.
5. Παρασκευή “stock” διαλύματος BA. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg BA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προστίθεντο 100 ml θερμού (με βραστό νερό κρυστάλλωνε) αποσταγμένου νερού.
6. 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 προσθέτονταν 100 ml

αποσταγμένου νερού. Για την παρασκευή “stock” διαλύματος 1 %, γινόταν λήψη 1 ml από το “stock” 10 % και στη συνέχεια προστίθετο 9 ml αποσταγμένο νερό.

7. Παρασκευή “stock” διαλύματος ZEAT. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg ZEAT, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.
8. Παρασκευή “stock” διαλύματος KIN. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg KIN, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προστίθεντο 100 ml ζεστού (με βραστό νερό κρυστάλλωνε) αποσταγμένου νερού.
9. Παρασκευή “stock” διαλύματος 2IP. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg 2IP, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προστίθεντο 100 ml ζεστού (με βραστό νερό κρυστάλλωνε) αποσταγμένου νερού.
10. Παρασκευή “stock” διαλύματος GA₃. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml, τοποθετούνταν 10 mg GA₃, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml βραστού αποσταγμένου νερού. Η προσθήκη του GA₃ έγινε στο θάλαμο νηματικής ροής, στο δοχείο με το υπόστρωμα, με σύριγγα και φίλτρο 0.22 μm για αποστείρωση.
11. Παρασκευή “stock” διαλύματος θειαμίνης. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml, τοποθετούνταν 10 mg thiamine hydrochloride, τα οποία διαλύονταν σε 100 ml αποσταγμένου νερού.
12. Παρασκευή “stock” διαλύματος πυριδοξίνης. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml, τοποθετούνταν 10 mg pyridoxine hydrochloride, τα οποία διαλύονταν σε 100 ml αποσταγμένου νερού.
13. Παρασκευή “stock” διαλύματος νικοτινικού οξέος. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml, τοποθετούνταν 10 mg nicotinic acid, τα οποία διαλύονταν σε 100 ml αποσταγμένου νερού.

Όλα τα “stock” διαλύματα των ορμονών αποθηκεύονταν σε οικιακό ψυγείο, στους 4 °C, για 30-40 ημέρες.

3.3 Μέθοδοι απολύμανσης, αποστείρωσης και εγκατάστασης φυτικού υλικού

3.3.1 Απολύμανση-εγκατάσταση εκφύτων

Πριν την τοποθέτηση των εκφύτων από τα ενήλικα αυτοφυή φυτά, στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχε το θρεπτικό υπόστρωμα, γινόταν επιφανειακή απολύμανσή τους. Στα πρώτα στάδια της έρευνας, κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειών του *A. andrachne* υπήρχε οξύ πρόβλημα με τις μολύνσεις, με αποτέλεσμα την απώλεια ολόκληρων σειρών από αρχικά πειράματα εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας. Έγινε λοιπόν προσπάθεια για την εξεύρεση μιας αποτελεσματικής μεθόδου απολύμανσης των εκφύτων, η οποία και θα διασφάλιζε τόσο την αποφυγή των μολύνσεων, αλλά και υψηλό ποσοστό επιβίωσης των εκφύτων από αυτήν. Δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις υδατικού διαλύματος χλωρίνης εμπορίου, και αλκοόλης. Τελικά, για την αποτελεσματική απολύμανση διαπιστώθηκε ότι το επιμελές ξέπλυμα των ιστών σε άφθονο νερό βρύσης είναι μείζονος σημασίας. Για τη λήψη φυτικού υλικού επιλέγονταν γενικά βλαστοί υγιείς μήκους περίπου 10 cm (Εικ. 18 α, β), σε ύψος περίπου 1,5-2,0 m από το έδαφος, από την Ν – ΝΑ πλευρά του φυτού. Οι αποκοπέντες βλαστοί μεταφέρονταν στο εργαστήριο μέσα σε μεγάλα πλαστικά δοχεία με νερό, για την αποφυγή της αφυδάτωσης. Τεμάχια βλαστών του *A. andrachne*, *A. unedo*, και *A. x andrachnoides* αφού αφαιρούνταν τα φύλλα και ξεπλένονταν πού καλά με άφθονο νερό βρύσης για 1 min περίπου, απολυμαίνονταν με διάλυμα αιθ. αλκοόλης 90 % (Ethanol Absolute 99 %, Scharlau) για 10 sec (η αιθυλική αλκοόλη άρχισε να χρησιμοποιείται από το 2004 και μετά). Ακολούθως τοποθετούνταν σε κωνικές φιάλες που περιείχαν διάλυμα 30 % χλωρίνης εμπορίου (4,6 % w/v NaClO) συνολικού όγκου 200 ml αποτελούμενο από αποσταγμένο-αποστειρωμένο νερό και 0,1 % Tween-20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene (20)sorbitan Monolaurate, MERCK) και ανακινούνταν για 10 min.

Ακολουθούσαν 4 τρίλεπτα ξεπλύματα των βλαστών με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό υπό συνεχή ανάδευση. Η κοπή των εκφύτων γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε τράπεζα νηματικής ροής (Laminar flow cabinet), επάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι. Η επιφάνεια πάνω στην οποία γινόταν η κοπή απολυμαίνονταν τακτικά με διάλυμα 80 % καθαρής αιθυλικής αλκοόλης. Τα έκφυτα

τοποθετούνταν στο υπόστρωμα έτσι ώστε η επιφάνεια κοπής να έρχεται σε επαφή με αυτό. Χρησιμοποιούνταν μια κωνική φιάλη για 30 εκφύτα.



Εικ. 18. Νεαροί βλαστοί τρέχουσας βλάστησης *A. andrachne*, (α, β) και *A. x andrachnoides* (γ, δ) πριν την λήψη των εκφύτων.

3.3.2 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών

Οι 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 γίνονταν οι κοπές, φιάλες και δοχεία με νερό για την απολύμανση των εκφύτων, αποστειρώνονταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) επί 20 min, σε θερμοκρασία 121 °C, υπό πίεση 1,1 atm, ή σε χύτρα υγρής αποστείρωσης επί 15 min, σε θερμοκρασία 125 °C, υπό πίεση 1,1 atm. Τα καπάκια των δοχείων ήταν χαλαρά τοποθετημένα κατά την αποστείρωση. Μολυσμένοι σωλήνες και δοχεία καλλιέργειας πριν ανοιχτούν και πλυθούν αποστειρώνονταν για 40 min, σε θερμοκρασία 121 °C και σε πίεση 1,1 atm.

3.4 Έκφυτα – χειρισμοί εκφύτων

3.4.1 Έκφυτα εγκατάστασης αρχικών καλλιεργειών

Μετά τη διαδικασία απολύμανσης των βλαστών μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά καθαριζόταν με αιθανόλη 80 %, και με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, οι βλαστοί τεμαχίζονταν σε έκφυτα κόμβων μήκους περίπου 8–10 mm (με 1–2 οφθαλμούς) από την κορυφή (αφαιρεθέντος του ακραίου μεριστώματος, με 2–5 οφθαλμούς), έως τη βάση των βλαστών. Αφαιρούνταν επίσης τυχόν υπολείμματα φύλλων καθώς και τα δύο ακραία τμήματα του βλαστού που είχαν καταστραφεί από την απολύμανση. Στα έκφυτα κορυφής του *A. andrachne*, κατά τα πρώτα στάδια των πειραμάτων δεν αφαιρείτο το κορυφαίο μερίστωμα. Από το 2004 και μετά, σε όλα τα πειράματα αρχικής εγκατάστασης και για τα τρία είδη, στα έκφυτα κορυφής αφαιρείτο το μερίστωμα, διότι διαπιστώθηκε ότι με αυτόν τον τρόπο περιορίζονταν οι μολύνσεις. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν 5 τύποι εκφύτων, που αριθμήθηκαν ανάλογα με τη θέση τους σε έκφυτα 1, 2, 3, 4, 5, της αρίθμησης αρχόμενης από την κορυφή των εκφύτων. Τα έκφυτα τοποθετούνταν στους δοκιμαστικούς σωλήνες (ένα έκφυτο ανά σωλήνα) που περιείχαν το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα κατακόρυφα σε αυτό και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό. Τέλος οι σωλήνες καλύπτονταν με ημίσκληρο διαφανές πλαστικό ή με μεμβράνη sanitas (πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος με το εμπορικό όνομα sanitas της εταιρείας Σαράντης Α.Ε., η οποία είχε τις εξής ιδιότητες : περατότητα σε διοξείδιο του άνθρακα $55.000 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h, περατότητα σε υδρατμούς 110 g m^{-2} σε 24 h, περατότητα σε οξυγόνο $8,5 \text{ cm}^3$

m⁻² σε 24 h) και τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε θερμοκρασία 25 °C και 16 h φωτοπερίοδο υπό 37,5 μmol m⁻² fluorescent φως. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα τεμάχια βλαστού ενός κόμβου από σπορόφυτα τα οποία είχαν βλαστήσει *in vitro*.

3.4.2 Έκφυτα καλλιέργειών πολλαπλασιασμού

Σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαινόταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 90%, και με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro* τεμαχίζονταν σε έκφυτα κόμβων μήκους 5-6 mm, τα οποία περιλάμβαναν 1-2 οφθαλμούς (αφαιρούνταν επίσης τα φύλλα που είχαν σχηματιστεί). 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. Όλες οι καλλιέργειες τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε θερμοκρασία 25 °C και 16 h φωτοπερίοδο υπό 37,5 μmol m⁻² fluorescent φως. Από τα σπορόφυτα υποκαλλιιεργήθηκαν τεμάχια βλαστού ενός κόμβου.

3.5 Ριζοβολία μικροβλαστών

Βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro* και είχαν μήκος μεγαλύτερο από 1 cm προωθούνταν για να ριζοβολήσουν. Μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαινόταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80% και με αποστειρωμένο νυστέρι, οι βλαστοί αποκόπτονταν από την βάση τους (από το έκφυτο) και αφαιρούνταν τα κατώτερα φύλλα τους. Οι βλαστοί τοποθετούνταν στα δοχεία καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα ριζοβολίας, τέσσερις βλαστοί ανά δοχείο καλλιέργειας, κατακόρυφα, και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό. Όλες οι καλλιέργειες τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε θερμοκρασία 25 °C και 16 h φωτοπερίοδο υπό 37,5 μmol m⁻² fluorescent φως.

3.6 Εγκλιματισμός φυταρίων

Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί των *A. andrachne*, *A. unedo* και *A. x andrachnoides*, που είχαν καλά αναπτυγμένο ριζικό σύστημα (40 ημέρες μετά την εγκατάσταση στα υποστρώματα ριζοβολίας) τοποθετούνταν σε δοχεία για εγκλιματισμό. Τα φυτάρια απομακρύνονταν από το υπόστρωμα και στη συνέχεια γινόταν επιμελές πλύσιμο με νερό βρύσης ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το θρεπτικό στερεό υπόστρωμα από τις ρίζες τους. Φυτάρια καλά ριζοβολημένα, μεταφυτεύτηκαν σε ορθογώνια, διάφανα, πλαστικά δοχεία όγκου 2 l.

Τα δοχεία με τα ριζοβολημένα φυτά καλύπτονταν με πλαστική μεμβράνη sanitas, κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας τους, με σκοπό την μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια εγκατάστασης των φυταρίων. Τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 25 °C, με φωτοπερίοδο 16 h, και σε ένταση φωτισμού 37,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ από λαμπτήρες φθορισμού και 30% υγρασία ή στην υδρονέφωση του θερμαινόμενου θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για 1 εβδομάδα. Ακολούθως παρέμεναν εντός του θερμοκηπίου.

Τα φυτάρια αρδεύονταν δύο φορές την εβδομάδα και λιπαίνονταν ανά δεκαήμερο με 2 g l⁻¹ του υδατοδιαλυτού λιπάσματος (Nutrileaf 60, 20-20-20, Miller Chemical and Fertilizer Corp., Hanover, PA, USA). Στα δοχεία τοποθετούνταν 8 φυτάρια.

3.7 Συνθήκες καλλιέργειας

3.7.1 Συνθήκες *ex vitro* καλλιέργειας

Τα *in vitro* ριζοβολημένα φυτά εγκλιματίζονταν αρχικά στο θάλαμο για διάστημα επτά ημερών και ακολούθως μεταφέρονταν σε γυάλινο θερμαινόμενο θερμοκήπιο στον κήπο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για περαιτέρω ανάπτυξη σε συνθήκες μεγάλης ημέρας (16 h φως) από τον Οκτώβριο έως τον Μάιο. Τους καλοκαιρινούς μήνες το θερμοκήπιο βαφόταν για μείωση της θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία (min-max) δίνεται στο παράρτημα (Πίν. I). Συνθήκες

μεγάλης ημέρας δίνονταν με λαμπτήρες πυρακτώσεως (100 W) με ανακλαστήρες, εν σειρά ανά 1 m, σε ύψος 1,40 m από τον πάγκο καλλιέργειας, οι οποίες λειτουργούσαν από το λυκόφως μέχρι τα μεσάνυχτα.

3.7.2 Συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας

Οι δοκιμαστικοί σωλήνες και τα δοχεία καλλιέργειας με τα έκφυτα και τους μικροβλαστούς αντίστοιχα επωάζονταν σε θάλαμο ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, σε θερμοκρασία 25 ± 2 °C και σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 4.000 lx ($37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού οι οποίοι βρίσκονταν στις πλευρές του θαλάμου (φωτισμός φυταρίων από τα πλάγια). Η επώαση διαρκούσε 40-45 ημέρες, ή 40 ημέρες εάν ήταν βλαστοί προς ριζοβολία.

3.7.3 Δοχεία *in vitro* καλλιέργειας και υλικά κάλυψης αυτών

Στο στάδιο της εγκατάστασης των αρχικών καλλιεργειών *in vitro* χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 50 ml (25 x 100 mm). Ως υλικό κάλυψής τους χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη sanitas. Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών *in vitro* χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα βάζα Sigma όγκου 100 ml με πλαστικό καπάκι (Magenta B-caps, Sigma). Τα ίδια βάζα χρησιμοποιήθηκαν για την περαιτέρω ανάπτυξη των *in vitro* ριζοβολημένων σποροφύτων που προήλθαν από σπόρους που είχαν βλαστήσει σε τρυβλία. Η ριζοβόληση των μικροβλαστών έγινε σε επίσης στα ίδια βάζα που περιγράφηκαν ή σε υάλινα βάζα 180 ml με μεταλλικό καπάκι. Ανεπτυγμένα, ριζοβολημένα φυτά μεταφυτεύθηκαν για περαιτέρω ανάπτυξη σε πλαστικά φυτοδοχεία όγκου 2.000 ml.

Τα φυτοδοχεία περιείχαν υπόστρωμα που αποτελείτο από 1 κομπόστα : 1 περλίτη (v/v) ή 1 τύρφη : 1 περλίτη (v/v) (Κομπόστα: Max, Ericaceous Compost, Klanmann-Deilmann, GmbH, Geeste, Germany, pH 4,5 -5,5 λίπασμα N-P-K: 14-16-18 σε ποσότητα $1,5 \text{ kg/m}^3$, Τύρφη: φυσική ξανθιά, διορθωμένο pH: 5.5, Klanmann-Deilmann, GmbH, Geeste, Germany, Περλίτης: Perlofor). Τα φυτά λιπαίνονταν κάθε

10 ημέρες με σύνθετο πλήρες υδατοδιαλυτό λίπασμα Nutrileaf 60 (20-20-20) (Miller Chemical and Fertilizer Corp., Hanover, PA, USA), σε αναλογία 2 g l⁻¹. Τα δοχεία καλυφθήκαν με πλαστική μεμβράνη sanitas, κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας, με σκοπό την μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυταρίων. Για εγκλιματισμό σε *ex vitro* συνθήκες τα φυτάρια που προήλθαν από σπορόφυτα ανεπτυγμένα *in vitro* μεταφυτεύθηκαν σε τέσσερα υποστρώματα, ήτοι τύρφη (pH 5,5), τύρφη-περλίτης (1:1 v/v), κόμποστ, κόμποστ-περλίτης (1:1 v/v), σε πλαστικά δοχεία, όγκου 2 l, στην υδρονέφωση του θερμαινόμενου θερμοκηπίου του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου.

3.8 Πειραματικά σχέδια – στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων έγινε με το πρόγραμμα Jump 8.0 (SAS Institute Inc). Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (Analysis of Variance). Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Students σε επίπεδο σημαντικότητας $P=0,05$ ή $P=0,01$. Ανάλογα με την κάθε επιμέρους πειραματική διαδικασία και τους παράγοντες που εξετάστηκαν σε αυτή, σχεδιάστηκαν, μονοπαραγοντικά και διπαραγοντικά πειράματα και εφαρμόστηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο.

Στην παράθεση των αποτελεσμάτων οι μέσοι που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Ο αριθμός των επαναλήψεων που χρησιμοποιήθηκαν ανά επέμβαση αναγράφεται σε κάθε πίνακα αποτελεσμάτων.

Στο στάδιο της εγκατάστασης των αρχικών καλλιεργειών, καθώς και στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών, ως επανάληψη θεωρήθηκε το κάθε έκφυτο κόμβου που τοποθετήθηκε. Στο στάδιο των ριζοβολιών ως επανάληψη θεωρήθηκε ο κάθε μικροβλαστός, ενώ στο στάδιο του εγκλιματισμού το κάθε ριζοβολημένο φυτάριο που προωθήθηκε προς εγκλιματισμό.

3.8.1 Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο εγκατάστασης των καλλιεργειών

Οι μέθοδοι απολύμανσης εκφύτων για την αρχική εγκατάσταση αυτών, εκτιμήθηκαν ως προς το ποσοστό εκφύτων που επέζησαν μετά την κάθε απολύμανση, καθώς και το ποσοστό των εκφύτων που δεν μολύνθηκαν στην κάθε μέθοδο.

Η αρχική εγκατάσταση εκφύτων *in vitro* εκτιμήθηκε μετά 43 ημέρες από την εμφύτευση των εκφύτων στα υποστρώματα. Υπολογίσθηκαν το ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν ως προς την έκπτυξη βλαστών, ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκε ανά έκφυτο που αντέδρασε, το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν και εκτιμήθηκε ο σχηματισμός κάλλου. Υπολογίσθηκε επίσης η δυναμικότητα πολλαπλασιασμού (στην επικείμενη υποκαλλιέργεια) ως το γινόμενο του ποσοστού αντίδρασης επί του μέσου αριθμού βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε (Γιν. Α) και επί του μέσου μήκους των σχηματισθέντων βλαστών (Γιν. Β), ενώ χρησιμοποιήθηκε και το πηλίκιο Γιν. Β/0,6 σαν μια εκτίμηση του μέσου αριθμού ληφθέντων εκφύτων (θεωρώντας ότι 0,6 cm είναι το μέσο ελάχιστα αποδεκτό μήκος ενός εκφύτου κατά την υποκαλλιέργεια).

3.8.2 Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών

Η αντίδραση των εκφύτων στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών εκτιμήθηκε μετά 43 ημέρες από την εμφύτευση των εκφύτων στα υποστρώματα. Υπολογίσθηκαν το ποσοστό αντίδρασης, ως προς την έκπτυξη βλαστών από τα έκφυτα, ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε, το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν, ο αριθμός φύλλων και το ποσοστό κάλλου. Για την καλύτερη εκτίμηση της αντίδρασης των εκφύτων στις καλλιέργειες υπολογίσθηκαν ακόμα και η δυναμικότητα πολλαπλασιασμού (στην επικείμενη υποκαλλιέργεια), ως τα γινόμενα Α (ποσοστού αντίδρασης των εκφύτων επί τον αριθμό βλαστών που παρήχθησαν ανά έκφυτο που αντέδρασε) και Β (Α επί το μήκος των παραγομένων βλαστών), ενώ χρησιμοποιήθηκε και το πηλίκιο Γιν. Β/0,6 σαν μια εκτίμηση του μέσου αριθμού ληφθέντων εκφύτων (θεωρώντας ότι 0.6 cm είναι το μέσο ελάχιστα αποδεκτό μήκος ενός εκφύτου κατά την υποκαλλιέργεια).

3.8.3 Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο της ριζοβολίας και του εγκλιματισμού των φυταρίων

Η ριζοβολία των μικροβλαστών εκτιμήθηκε 40 ημέρες μετά από την εμφύτευση τους στα υποστρώματα ριζοβολίας. Υπολογίσθηκαν το ποσοστό των μικροβλαστών που σχημάτισαν ρίζες, ο αριθμός και το μέσο μήκος των ριζών που σχηματίστηκαν και εκτιμήθηκε ο σχηματισμός κάλλου. Η επιτυχία του *ex vitro* εγκλιματισμού των φυταρίων, καταγράφηκε 1 μήνα μετά τη μεταφύτευση των φυταρίων στα εδαφικά υποστρώματα ως το ποσοστό (%) επιβίωσης αυτών.



Εγκατάσταση καλλιεργειών *in vitro* από ενήλικα φυτά

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**4. ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ *IN VITRO* ΑΠΟ ΕΝΗΛΙΚΑ ΦΥΤΑ****4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Το γένος *Arbutus* απαντά στον Ελληνικό χώρο, ως βασικό συστατικό της διάπλασης των αείφυλλων σκληρόφυλλων (βλ. 1.2). Τα τρία ελληνικά είδη (*A. andrachne*, *A. x andrachnoides*, *A. unedo*) έχουν μεγάλη καλλωπιστική αξία που συνίσταται στην ιδιαιτερότητα των ελκυστικών μορφολογικών τους χαρακτηριστικών και είναι φυτά με εν δυνάμει υψηλή οικονομική σημασία λόγω των φαρμακευτικών και χημικών τους ιδιοτήτων (Aburjai *et al.*, 1999, Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2010). Επιπρόσθετα, έχει μεγάλη σπουδαιότητα η υψηλή ικανότητα των φυτών για αναβλάστηση, η αντιδιαβρωτική προστασία που παρέχουν στο έδαφος, η αντοχή τους σε ξηροθερμικές συνθήκες, καθώς και η ευρεία προσαρμοστικότητά τους, αφού απαντούν από τις ακτογραμμές της ηπειρωτικής χώρας έως στις κεντρικές ηπειρωτικές περιοχές, αλλά και σε πληθώρα ελληνικών νησιών (Olmez *et al.*, 2007). Οι πληθυσμοί των φυτών πιέζονται στις περιαστικές περιοχές από την οικιστική ανάπτυξη (Celikel *et al.*, 2008). Το *A. unedo* χρησιμοποιείται πλέον στην Κηποτεχνία, αλλά εξίσου ενδιαφέροντα και κατάλληλα ως φυτά Κηποτεχνίας είναι και τα *A. andrachne*, *A. x andrachnoides*. Η εξεύρεση μιας επιτυχούς μεθόδου *in vitro* πολλαπλασιασμού τους συντελεί στη διάδοση και την αξιοποίηση των φυτών, αλλά και στη διατήρηση της βιοποικιλότητας της Ελληνικής χλωρίδας. Επιστημονικό ενδιαφέρον παρουσιάζει και η συγκριτική μελέτη της ανταπόκρισης των τριών ειδών στην *in vitro* καλλιέργεια.

Ο μικροπολλαπλασιασμός είναι μια ικανή μέθοδος για επιτυχή πολλαπλασιασμό και υπάρχουν αρκετές τεχνικές όπως η σωματική εμβρυογένεση, η οργανογένεση και η καλλιέργεια εκφύτων κόμβων από μασχαλιαίους οφθαλμούς. Η τελευταία είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη στην οικ. Ericaceae. Για το μικροπολλαπλασιασμό του *A. unedo* υπάρχουν αναφορές (Morini and Fiaschi, 2000, Λιμνιάτης *et al.*, 2001, Mereti *et al.*, 2002, Gomes and Canhoto, 2009, Gomes *et al.*, 2010, Mohamed *et al.*, 2010), ενώ υπάρχει μια μόνο αναφορά για μικροπολλαπλασιασμό του *A. andrachne* με έκφυτα από νεαρά σπορόφυτα (Mostafa *et al.*, 2010). Για το *A. x andrachnoides* δεν βρέθηκε καμιά αναφορά

πολλαπλασιασμού. Πολλές αναφορές απαντούν στην βιβλιογραφία για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό άλλων ειδών της οικογένειας Ericaceae, όπως του γένους *Vaccinium* (Reed and Abdelnour-Esquivel, 1991, Yan-qi Jiang *et al.*, 2000, Debnath, 2004, Gajdosova *et al.*, 2006, Sedlak and Paprstein, 2009) που έχει μεγάλη οικονομική σημασία και καλλιεργείται ευρέως για τα φρούτα του στις ΗΠΑ και σε άλλες περιοχές του πλανήτη, καθώς και του γένους *Rhododendron* (Economou and Read, 1984, Briggs *et al.*, 1988, Almeida *et al.*, 2005), ευρέως γνωστού για τα καλλωπιστικά του είδη. Από τις αναφορές αυτές διαπιστώνει κανείς την αποτελεσματικότητα των κυτοκινινών ZEAT και ZIP στα είδη της οικ. Ericaceae.

4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Φυτικό υλικό

Τα μητρικά φυτά για την λήψη εκφύτων όλων των πειραμάτων *in vitro* πολλαπλασιασμού ήταν δύο ενήλικα αυτοφυή φυτά στην Βαρυμπόμπη, ένα *A. andrachne* και ένα *A. unedo* και ένα *A. x andrachnoides* στον Κάλαμο Αττικής (3.1).

4.2.2 Εγκατάσταση καλλιεργειών *in vitro*-Απολύμανση εκφύτων

Για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών αρχικά του *A. andrachne*, έκφυτα κόμβων βλαστών από ενήλικα φυτά του είδους, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα αλάτων WPM, με βιταμίνες Mullin και σακχαρόζη που περιείχαν διάφορα είδη και συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών, υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 3.4.1 και αφού προηγήθηκε απολύμανσή τους όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.3.1. Στα πρώτα στάδια της μελέτης δεν γινόταν πλύσιμο με τρεχούμενο νερό βρύσης (Πίν. 2). Η εγκατάσταση των αρχικών καλλιεργειών ήταν χρονοβόρος και σύνθετη διαδικασία, διότι τα έκφυτα προέρχονταν από μητρικά φυτά που φύονταν μακριά από το Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, αλλά η χρήση δοχείων νερού εξασφάλιζε την ασφαλή μεταφορά τους από την Βαρυμπόμπη και τον Κάλαμο (βλ. 3.3.1). Στα πρώτα στάδια της μελέτης, η προσπάθεια για αρχική εγκατάσταση καλλιέργειας είχε

πλήρη αποτυχία, εξ' αιτίας των επαναλαμβανόμενων μολύνσεων με αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια των καλλιεργειών (Πίν. 2). Διαπιστώθηκε τελικά, ότι το επιμελές πλύσιμο των εκφύτων με τρεχούμενο νερό βρύσης πριν τη διαδικασία απολύμανσης είχε καθοριστική σημασία για την επιτυχή απολύμανση των εκφύτων. Τα έκφυτα τρέχουσας βλάστησης μολύνονταν ακόμα και με τη χρήση υδατικού διαλύματος χλωρίνης εμπορίου σε συγκέντρωση 40% και αλκοόλης 90% (για 10 sec), αν δεν είχε προηγηθεί της απολυμάνσεως πολύ καλό και επιμελές πλύσιμο κάθε ενός εκφύτου ξεχωριστά με νερό βρύσης. Οι καλλιέργειες του *A. andrachne* κατά τους χειμερινούς μήνες πάντα αποτύγχαναν εξ' αιτίας των μολύνσεων.

Σε πειράματα που διεξήχθησαν κατά τα έτη από 2000-2002, δοκιμάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί συγκεντρώσεων των φυτορρυθμιστικών ουσιών NAA και BA, με σκοπό την διερεύνηση του είδους και των συγκεντρώσεων των φυτορρυθμιστικών ουσιών που απαιτούνται για την επιτυχή αντίδραση εκφύτων ενήλικων φυτών του *A. andrachne* σε *in vitro* καλλιέργειες. Χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά υποστρώματα με βάση τα άλατα του WPM, σακχαρόζη 3%, βιταμίνες Mullin και τις φυτορρυθμιστικές ουσίες NAA και BA στις συγκεντρώσεις 0, 0,75, 1,25 mg l⁻¹ και 2,5, 5,0, 7,5 mg l⁻¹ αντίστοιχα, σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς τους. Η επιλογή του είδους και των συγκεντρώσεων των φυτορρυθμιστικών ουσιών, στηρίχθηκε στα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα για την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών *in vitro* του *Arbutus unedo* (Λιμνιάτης, 2001) και *A. xalapensis* (Mackay, 1996). Διερευνήθηκε επίσης η επίδραση της θέσης του εκφύτου καθώς και η επίδραση της εποχής κοπής των εκφύτων στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών *A. andrachne*.

Τα έτη 2003-2005 με βάση βιβλιογραφικές αναφορές έγινε προσπάθεια για την αρχική εγκατάσταση εκφύτων *A. andrachne* στα παρακάτω υποστρώματα:

- WPM με BA (0,5, 1 mg l⁻¹) και NAA (0,5, 1 mg l⁻¹) σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς
- WPM με BA σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹ και NAA (0,5 ή 0,75 mg l⁻¹) ή IBA (0,1 mg l⁻¹)
- WPM, χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες
- WPM/2, χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες
- WPM με προσθήκη 1 mg l⁻¹ BA
- WPM με προσθήκη TDZ (0,1, 0,5, 1, 2 mg l⁻¹)
- MS, χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες

- MS/2, χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες
- MS με προσθήκη 2,5 mg I⁻¹ BA
- WPM με 2,5 mg I⁻¹ ZEAT
- WPM με GA₃ σε συγκέντρωση 0,2 και 2 mg I⁻¹

Εκτιμήθηκε το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς, ο αριθμός βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε, καθώς και το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν. Τέλος μελετήθηκε η επίδραση της θέσης των εκφύτων (κορυφής ή βάσης) στο μητρικό βλαστό στην εγκατάσταση καλλιεργειών *in vitro*. Από το 2004 και μετά στα έκφυτα κορυφής αφαιρείτο πάντοτε το ακραίο μερίστωμα, διότι με αυτόν τον τρόπο η απολύμανση των εκφύτων ήταν πιο αποτελεσματική, σε συνδυασμό με την χρήση υδατικού διαλύματος αιθυλικής αλκοόλης (βλ.3.3.1).

Για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών *A. unedo* και *A. x andrachnoides*, έκφυτα κόμβων βλαστών από τα μητρικά φυτά, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα αλάτων WPM, με βιταμίνες Mullin σακχαρόζη εμπορίου και διάφορα είδη και συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών, υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 3.4.1 και αφού προηγήθηκε απολύμανσή τους όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.3.2.

Σε πειράματα συγκριτικής αξιολόγησης των τριών ειδών που έγιναν τα έτη 2006, 2007, 2008, 2010 (Μάιος και Σεπτέμβριος), χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά υποστρώματα με βάση τα άλατα του WPM, σακχαρόζη 3%, βιταμίνες Mullin και τις φυτορρυθμιστικές ουσίες BA, ZEAT, 2IP, KIN σε συγκέντρωση 2,5 mg I⁻¹. Εξετάστηκε ακόμη η επίδραση αυξίνης NAA σε συγκέντρωση 0,75 mg I⁻¹ ή IBA σε συγκέντρωση 0,1 mg I⁻¹ σε συνδυασμό με 2,5 mg I⁻¹ BA, καθώς και η χρήση MS ή WPM (μάρτυρας) χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες. Η επιλογή του είδους και των συγκεντρώσεων των φυτορρυθμιστικών ουσιών, στηρίχθηκε σε βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς και στα αποτελέσματα που είχαν συγκεντρωθεί από τον προηγούμενο *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. andrachne*, ώστε να μελετηθεί συγκριτικά το μορφογενετικό δυναμικό των τριών ειδών σε καλλιέργειες μικροπολλαπλασιασμού.

Διερευνήθηκε επίσης η επίδραση της εποχής κοπής των εκφύτων στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών των *A. unedo* και *A. x andrachnoides*, καθώς και η επίδραση της θέσης του εκφύτου (1 έως 5 αρχόμενης της αριθμώσεως από της

κορυφής) για τις καλλιέργειες του Μαΐου. Εκτιμήθηκαν το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς, ο αριθμός βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε, καθώς και το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν.

Έγινε επίσης μια συγκριτική αξιολόγηση ανάμεσα στα τρία είδη του ποσοστού των εκφύτων που επιβίωσαν, που αντέδρασαν σχηματίζοντας βλαστούς και που καταστράφηκαν στην απολύμανση.

4.2.3 Πειραματικό Σχέδιο-Στατιστική Ανάλυση

Το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και ο τρόπος της στατιστικής ανάλυσης έχουν περιγραφεί στο 3.8.

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1 Αρχική εγκατάσταση *A. andrachne*

4.3.1.1 Αρχικά πειράματα για εγκατάσταση *A. andrachne*

Με στόχο την διερεύνηση της επίδρασης του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών, της εποχής και θέσης του εκφύτου στην εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών του *A. andrachne in vitro*, εξετάστηκε η χρήση διάφορων φυτορρυθμιστικών ουσιών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις τους, σε δύο εποχές (Μάιο και Σεπτέμβριο) και χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής που έφεραν τον ακραίο οφθαλμό και 2-5 ακόμα οφθαλμούς και έκφυτα βάσης με 1-2 οφθαλμούς. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται συνολικά τα αρχικά πειράματα για την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών του *A. andrachne*.

Τον Μάιο και Σεπτέμβριο του 2001 και 2002 πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας (αρχή και τέλος της βλαστικής περιόδου), με έκφυτα που κόπηκαν από ενήλικα φυτά και καλλιεργήθηκαν σε άλατα WPM με 3% σακχαρόζη, βιταμίνες Mullin και όλους τους δυνατούς συνδυασμούς των συγκεντρώσεων 0, 2,5 και 5 mg l⁻¹ του BA και 0, 0,75 και 1,25 mg l⁻¹ του NAA. Εξετάστηκε η επίδραση του είδους και των συγκεντρώσεων των φυτορρυθμιστικών

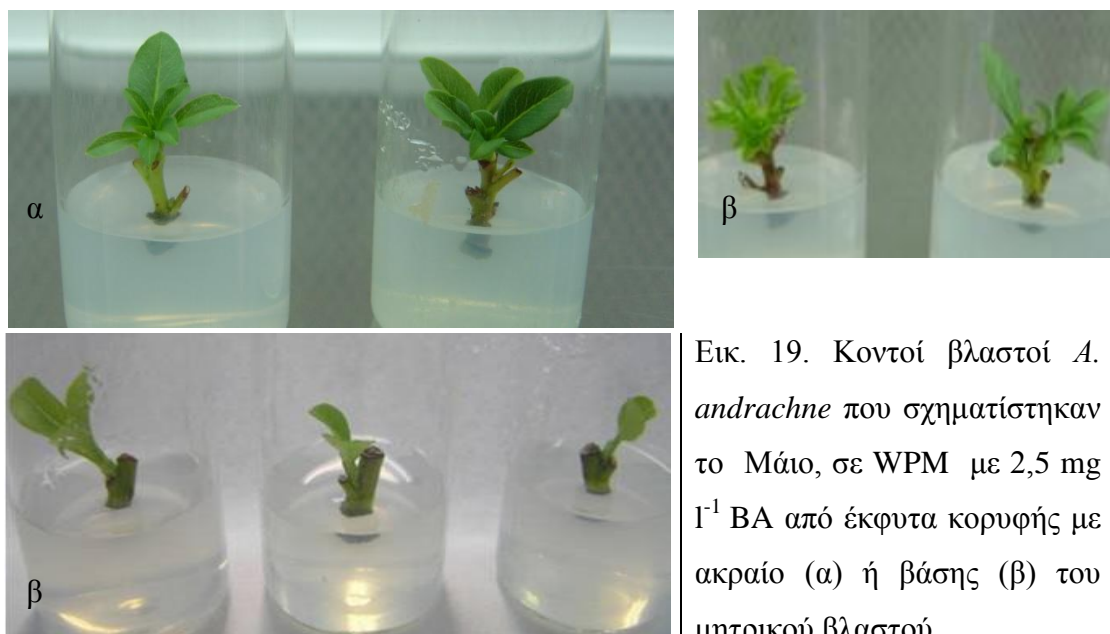
ουσιών που συμπεριλήφθηκαν στα υποστρώματα καλλιέργειας, στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς, στον αριθμό βλαστών που σχηματίστηκε ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν, καθώς και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού, όπως εκφράστηκε από το γινόμενο A και γινόμενο B/0,6 (γινόμενο A=ποσοστό βλαστογένεσης X μέσος αριθμός βλαστών/100, γινόμενο B=γινόμενο A X μέσο μήκος). Το πηλίκο B/0,6 χρησιμοποιήθηκε για την αποτίμηση του αριθμού των εκφύτων που μπορούσαν να ληφθούν από κάθε έκφυτο όπου 0,6 cm είναι κατά προσέγγιση το ελάχιστο αποδεκτό μήκος εκφύτου για υποκαλλιέργεια.

Πίν. 2. Αποτελεσματικότητα απολύμανσης σε πειράματα αρχικής εγκατάστασης εκφύτων από μητρικό φυτό *A. andrachne* στη Βαρυμπόμπη τα έτη 2000-2003.

Έτος	Μήνας	Απολύμανση		Πλύσιμο εκφύτων με τρεχούμενο νερό βρύσης	Μόλυνση (%)
		Συγκέντρωση χλωρίνης εμπορίου (%)	Χρόνος απολύμανσης (min)		
2000	Μάιος	20	15	-	100
	Ιούνιος	30	15	-	100
	Ιούλιος	30	15	-	100
	Σεπ/ριος	30	15	-	100
2001	Ιαν/ριος	40	10	-	100
	Μάιος*	20	15	+	42
	Ιούνιος	20	15	+	100
	Ιούλιος	20	15	+	100
	Σεπ/ριος*	30	10	+	50
	Δεκ/ριος	40	10	+	100
2002	Φεβ/ριος	40	10	+	100
	Μάιος*	20	15	+	45
	Ιούνιος	30	10	+	100
	Ιούλιος	30	10	+	100
	Σεπ/ριος*	30	10	+	48
	Δεκ/ριος	40	10	+	100
2003	Ιαν/ριος	30	10	+	100
	Μάρτιος	30	10	+	100
	Μάιος	30	10	+	100

* Επιτυχής αρχική εγκατάσταση από ενήλικα φυτά (βλ. Πίν. 3, 4, 5, 6)

Το Μάιο, 40 ημέρες μετά την εμφύτευση των εκφύτων κορυφής η συγκέντρωση 2,5 ή 7,5 mg I⁻¹ BA χωρίς NAA έδωσε τον υψηλότερο αριθμό εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς (Πίν. 3, Εικ. 19 α). Το ποσοστό βλαστογένεσης δεν διέφερε στα διάφορα υποστρώματα. Το μέσο μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών δεν ήταν ικανοποιητικό και κυμαινόταν περί τα 0,3-0,4 cm χωρίς διαφορά στα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν μεγαλύτερο στο υπόστρωμα με 2,5 mg I⁻¹ BA. Τον Μάιο, 40 ημέρες μετά την εμφύτευση των εκφύτων βάσης (από τις θέσεις 2-5), ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σχηματίστηκε σε 2,5 mg I⁻¹ BA χωρίς NAA, χωρίς όμως διαφορά από το υπόστρωμα με 7,5 mg I⁻¹ BA (Πίν. 4, Εικ. 19 β). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν μεγαλύτερο στο υπόστρωμα με 2,5 mg I⁻¹ BA. Τον Σεπτέμβριο, στα έκφυτα κορυφής η συγκέντρωση 2,5 mg I⁻¹ BA χωρίς NAA έδωσε τους περισσότερους βλαστούς (Πίν. 5). Το μέσο μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών δεν ήταν ικανοποιητικό και κυμαινόταν περί τα 0,3-0,4 cm. Το ποσοστό βλαστογένεσης δεν διέφερε στα διάφορα υποστρώματα. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν μεγαλύτερο στο υπόστρωμα με 2,5 mg I⁻¹ BA. Σε ότι αφορά στα έκφυτα βάσης ο αριθμός των σχηματιζόμενων βλαστών και το μήκος τους δεν διέφερε στα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίν. 6). Σχηματίστηκαν κοντοί βλαστοί με μέσο μήκος περί τα 0,3 cm. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν μεγαλύτερο στο υπόστρωμα με 2,5 mg I⁻¹ BA. Τον Σεπτέμβριο του 2004 χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής χωρίς ακραίο και έκφυτα βάσης για τη σύγκριση της βλαστογένεσης σε υποστρώματα που περιείχαν BA σε συγκέντρωση 2,5 mg I⁻¹ ή 1 mg I⁻¹ ή ZEAT σε συγκέντρωση 1 mg I⁻¹ (Πίν. 7).



Εικ. 19. Κοντοί βλαστοί *A. andrachne* που σχηματίστηκαν το Μάιο, σε WPM με 2,5 mg I⁻¹ BA από έκφυτα κορυφής με ακραίο (α) ή βάσης (β) του μητρικού βλαστού.

Πίν. 3. Επίδραση του αναγραφόμενου είδους και συγκέντρωσης φυτορυθμιστικών ουσιών, στο ποσοστό των εκφύτων κορυφής με οφθαλμό *A. andrachne* που αντέδρασαν δίνοντας βλαστό, στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μήκος των βλαστών καθώς και στη δυναμικότητα πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας. Καλλιέργεια σε άλατα WPM με βιταμίνες Mullin και 3% σακχαρόζη. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min. Εγκατάσταση εκφύτων τον Μάιο του 2001 και 2002, $n=20-24$.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστο- γένεση (%)	Μέσος Αριθ. Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	ΓΙΝ Α	ΓΙΝ Β
BA (mg l ⁻¹)	NAA (mg l ⁻¹)					/ 0,6
2,5	0	95,00	3,3 a	0,3 a	3,13	1,57
5	0	95,00	1,5 c	0,3 a	1,43	0,71
7,5	0	88,00	2,9 a	0,3 a	2,55	1,28
2,5	0,75	78,00	1,1 c	0,3 a	0,86	0,43
5	0,75	63,00	2,0 b	0,4 a	1,26	0,84
7,5	0,75	75,00	1,3 c	0,3 a	0,98	0,49
2,5	1,25	55,00	1,1 c	0,3 a	0,61	0,30
5	1,25	67,00	1,2 c	0,4 a	0,80	0,54
7,5	1,25	72,00	1,2 c	0,3 a	0,86	0,43
Ανάλυση της συνδιασποράς						
BA (A)				NS		
NAA (B)				NS		
(A) X (B)				*	NS	

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test σε $P=0,05$.

*, **: σημαντικό σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$

Πίν. 4. Επίδραση του αναγραφόμενου είδους και συγκέντρωσης φυτορυθμιστικών ουσιών, στο ποσοστό των εκφύτων βάσης *A. andrachne* που αντέδρασαν δίνοντας βλαστό, στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μήκος των σχηματισθέντων βλαστών καθώς και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού. Καλλιέργεια σε άλατα WPM με βιταμίνες Mullin και 3% σακχαρόζη. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min. Εγκατάσταση εκφύτων τον Μάιο του 2001 και 2002, $n=20-24$.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστο- γένεση (%)	Μέσος Αριθ. Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	ΓΙΝ Α	ΓΙΝ Β
BA (mg l ⁻¹)	NAA (mg l ⁻¹)					/
2,5	0	87,00	1,9 a	0,4 a	1,65	1,10
5	0	80,00	1,7 ab	0,4 a	1,36	0,91
7,5	0	76,00	1,4 cd	0,3 a	1,06	0,53
2,5	0,75	72,00	1,1 de	0,4 a	0,79	0,53
5	0,75	78,00	1,7 abc	0,3 a	1,33	0,66
7,5	0,75	87,00	1,4 bcd	0,4 a	1,22	0,81
2,5	1,25	47,00	1 e	0,3 a	0,47	0,24
5	1,25	73,00	1 e	0,3 a	0,73	0,37
7,5	1,25	68,00	1,4 cd	0,4 a	0,95	0,63
Ανάλυση της συνδιασποράς						
BA (A)				NS		
NAA (B)				NS		
(A) X (B)			*	NS		

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student's test σε $P=0,05$.

*,** : σημαντικά σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$.

Πίν. 5. Επίδραση του αναγραφόμενου είδους και συγκέντρωσης φυτορυθμιστικών ουσιών στο ποσοστό των εκφύτων κορυφής με οφθαλμό *A. andrachne* που αντέδρασαν δίνοντας βλαστό, στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μήκος των σχηματισθέντων βλαστών καθώς και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού. Καλλιέργεια σε άλατα WPM με βιταμίνες Mullin και 3% σακχαρόζη. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min. Εγκατάσταση εκφύτων τον Σεπτέμβριο του 2001 και 2002, $n=20-24$.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστο- γένεση (%)	Μέσος Αριθ. Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	ΓΙΝ Α	ΓΙΝ Β
BA (mg l ⁻¹)	NAA (mg l ⁻¹)					0,6
2,5	0	50,00	1,4 a	0,4 a	0,70	0,47
5	0	33,00	1,0 b	0,4 ab	0,33	0,22
7,5	0	20,00	1,0 b	0,3 c	0,20	0,10
2,5	0,75	42,00	1,0 b	0,4 ab	0,42	0,28
5	0,75	50,00	1,0 b	0,4 ab	0,50	0,33
7,5	0,75	50,00	1,0 b	0,4 ab	0,50	0,33
2,5	1,25	53,00	1,1 b	0,4 ab	0,58	0,39
5	1,25	45,00	1,0 b	0,4 ab	0,45	0,33
7,5	1,25	45,00	1,0 b	0,4 b	0,45	0,30
Ανάλυση της συνδιασποράς						
BA (A)			NS			
NAA (B)			NS			
(A) X (B)			NS *			

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test σε $P=0,05$.

*,** : σημαντικά σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$.

Πίν. 6. Επίδραση του αναγραφόμενου είδους και συγκέντρωσης (mg l^{-1}), των φυτορυθμιστικών ουσιών NAA και BA, στο ποσοστό των εκφύτων βάσης *A. andrachne* που αντέδρασαν δίνοντας βλαστό, στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μήκος των σχηματισθέντων βλαστών καθώς και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού. Καλλιέργεια σε άλατα WPM με βιταμίνες Mullin και 3% σακχαρόζη. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min. Εγκατάσταση εκφύτων τον Σεπτέμβριο του 2001 και 2002, $n=20-24$.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστο- γένεση (%)	Μέσος Αριθ. Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	ΓΙΝ Α	ΓΙΝ Β
BA (mg l^{-1})	NAA (mg l^{-1})					/
2,5	0	45,00	1,0 a	0,3 a	0,45	0,23
5	0	20,00	1,0 a	0,3 a	0,20	0,10
7,5	0	22,22	1,0 a	0,3 a	0,22	0,11
2,5	0,75	21,05	1,0 a	0,3 a	0,21	0,11
5	0,75	59,09	1,0 a	0,3 a	0,59	0,30
7,5	0,75	20,00	1,0 a	0,3 a	0,20	0,10
2,5	1,25	31,58	1,0 a	0,3 a	0,32	0,16
5	1,25	31,58	1,0 a	0,3 a	0,32	0,16
7,5	1,25	26,67	1,2 a	0,3 a	0,32	0,16
Ανάλυση της συνδιασποράς						
BA (A)			NS	NS		
NAA (B)			NS	NS		
(A) X (B)			NS	NS		

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test σε $P=0,05$.

*,** : σημαντικά σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$.

Το ποσοστό βλαστογένεσης και για τα δύο είδη εκφύτων που χρησιμοποιήθηκαν, σε υποστρώματα που περιείχαν ZEAT, ανήλθε στο 100% (Πίν. 7). Ο μέσος αριθμός βλαστών ήταν μεγαλύτερος στα έκφυτα κορυφής σε υποστρώματα με ZEAT. Η μεγαλύτερη επιμήκυνση σημειώθηκε σε υποστρώματα που περιείχαν ZEAT με τα έκφυτα κορυφής να δίνουν πιο επιμηκυσμένους βλαστούς σε σχέση με τα έκφυτα βάσης. Το γινόμενο πολλαπλασιασμού ήταν μεγαλύτερο για τα υποστρώματα με ZEAT με το γινόμενο των εκφύτων κορυφής να είναι σχεδόν διπλάσιο από το γινόμενο των εκφύτων βάσης.

Έκφυτα που εγκαταστάθηκαν σε υποστρώματα που περιείχαν ZEAT, ανεξάρτητα από τη θέση τους στο μητρικό βλαστό, σχημάτισαν βλαστούς σε ποσοστό 100% (Σχ. 1 α). Ο αριθμός βλαστών δεν διέφερε στα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά το μήκος ήταν μεγαλύτερο στα υποστρώματα με ZEAT (Σχ. 1 β, γ, Εικ. 20).

Πίν.7. Επίδραση κυτοκινίνης στην εγκατάσταση των αρχικών καλλιεργειών *A. andrachne*, στο ποσοστό βλαστογένεσης, στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μήκος των σχηματισθέντων βλαστών καθώς και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού (Κ: έκφυτα κορυφής, Β: έκφυτα βάσης). Καλλιέργεια σε WPM με βιταμίνες Mullin και 3% σακχαρόζη. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min. Εγκατάσταση εκφύτων τον Σεπτέμβριο του 2004, $n=24-28$.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστο-	Μέσος	Μέσο Μήκος	ΓΙΝ	ΓΙΝ Β
ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗ	ΕΚΦ	γένεση	Αριθ.	Βλαστών	A	/
(mg l ⁻¹)	ΥΤΟ	(%)	Βλαστών	(cm)		0,6
2,5 ZEAT	K	100,00	2,4 a	0,5 a	2,40	2,00
	B	100,00	1,8 b	0,4 b	1,80	1,20
2,5 BA	K	70,00	2,0 b	0,3 c	1,40	0,70
	B	45,00	1,6 b	0,3 d	0,72	0,36
1,0 BA	K	50,00	1,9 b	0,2 d	0,95	0,32
	B	50,00	1,8 b	0,2 d	0,90	0,30

Ανάλυση της συνδιασποράς

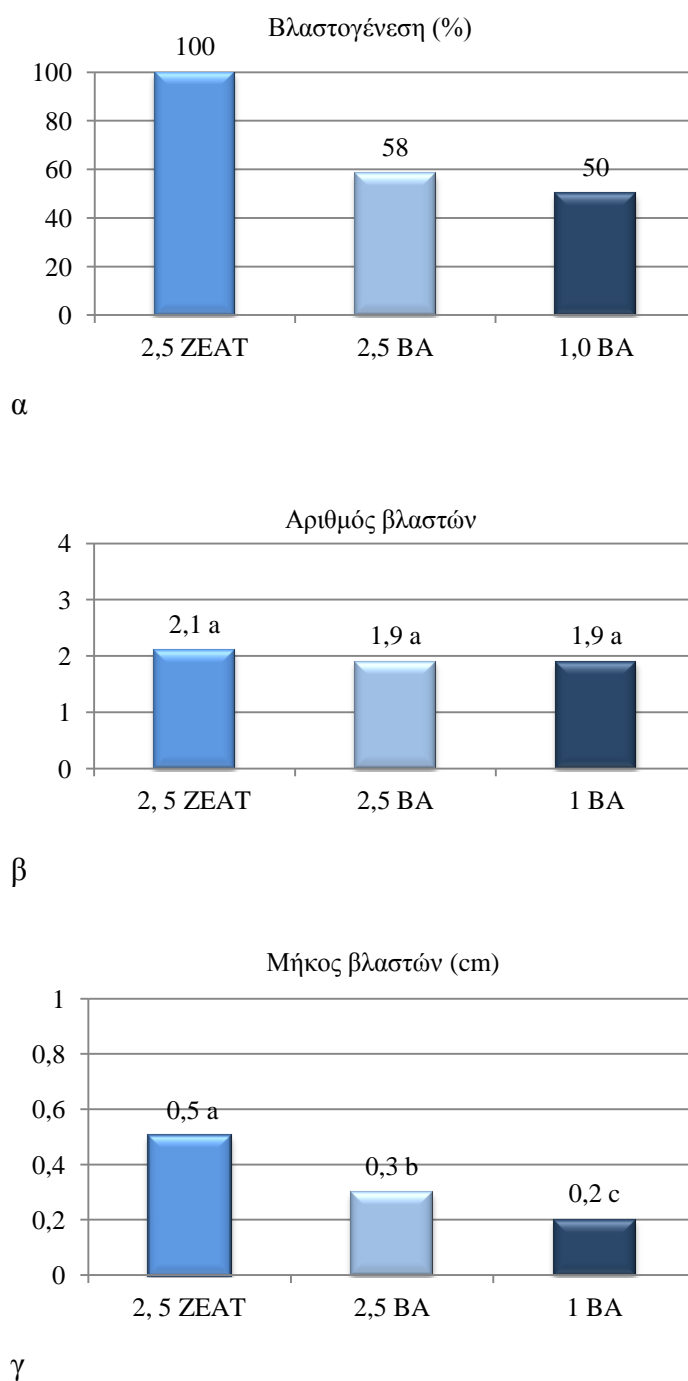
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (A)	NS	
ΤΥΠ ΕΚΦ (B)	**	
(A) X (B)	NS	**

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test σε $P=0,05$.

*, **: σημαντικά σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$.



Εικ. 20. Βλαστογένεση κατά την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών *A. andrachne*, τον Σεπτέμβριο, σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT από έκφυτα κορυφής με ακραίο (α) ή έκφυτα βάσης (β) ή με BA σε συγκέντρωση 1 ή 2,5 mg l⁻¹ από έκφυτα βάσης (γ, δ αντίστοιχα). Διακρίνεται ο προχωρημένος βαθμός ξυλοποίησης των εκφύτων βάσης.



Σχ. 1. Επίδραση της κυτοκινίνης στη βλαστογένεση (α), στον αριθμό (β) και μήκος βλαστών (γ) που σχηματίστηκαν κατά την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών *A. andrachne*, τον Σεπτέμβριο 2004. Σύγκριση των μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n=48$.

Το 2004 εξετάστηκε η δυνατότητα για βλαστογένεση στα παρακάτω υποστρώματα:

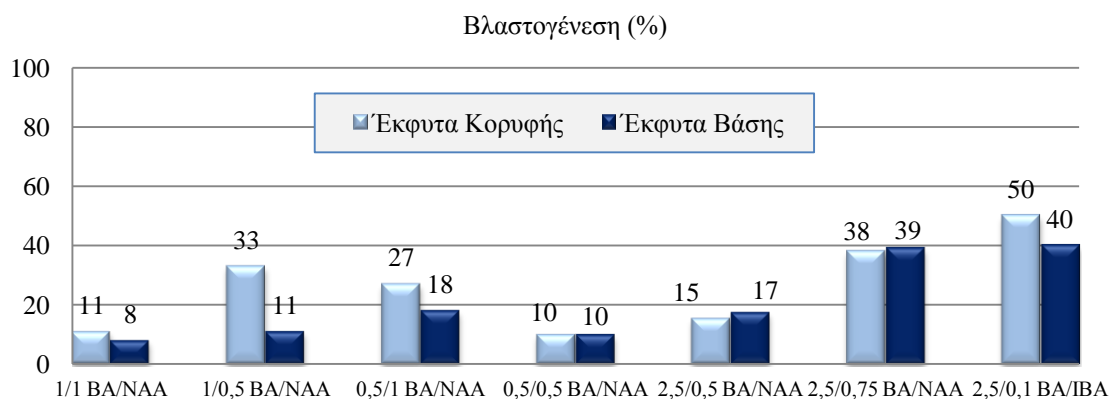
- WPM, χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες
- WPM/2, χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες
- WPM με προσθήκη 1 mg l^{-1} BA
- WPM με προσθήκη TDZ ($0,1, 0,5, 1, 2 \text{ mg l}^{-1}$)
- MS, χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες
- MS/2, χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες
- MS με προσθήκη $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA

Σε κανένα από τα υποστρώματα δεν σημειώθηκε βλαστογένεση, εκτός από τα υποστρώματα που περιείχαν $0,1$ ή $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ στα οποία σχηματίστηκαν βλαστοί σε ποσοστό 30-40% με παραμορφωμένα φύλλα (Εικ. 21).

Ελέγχθηκε ακόμη η επίδραση αυξίνης NAA σε συγκέντρωση $0,5$ ή 1 mg l^{-1} σε συνδυασμό με BA σε $0,5$ ή 1 mg l^{-1} καθώς και $0,75$ NAA ή $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ IBA με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA. Τα έκφυτα βάσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από τις θέσεις 2-5. Το αποτέλεσμα ήταν μικρό ποσοστό βλαστογένεσης που κυμάνθηκε από 10-50% και η μη επιμήκυνση των βλαστών (Σχ. 2). Υψηλότερο ποσοστό παρατηρήθηκε με τη χρήση $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ IBA σε συνδυασμό με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA.



Εικ. 21. Παραμορφωμένοι βλαστοί και φύλλα *A. andrachne* που σχηματίστηκαν τον Σεπτέμβριο, σε WPM με $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ από έκφυτα κορυφής με ακραίο (α, β) ή έκφυτα βάσης (γ, δ).



Σχ. 2. Επίδραση στη βλαστογένεση NAA ή IBA σε συνδυασμό με BA, στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις (mg l^{-1}), κατά την αρχική εγκατάσταση καλλιιεργειών *A. andrachne* σε WPM, τον Σεπτέμβριο 2004. Σύγκριση των μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n=40-48$.

4.3.1.2 Επίδραση της εποχής και της θέσης του εκφύτου στην εγκατάσταση αρχικών καλλιιεργειών *A. andrachne*

Το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν μεγαλύτερο το Μάιο, χωρίς διαφορά μεταξύ εκφύτων κορυφής και βάσης, ενώ και ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν ήταν μεγαλύτερος το Μάιο για τα έκφυτα κορυφής με ακραίο και ακολούθως την ίδια εποχή για τα έκφυτα βάσης. Το μέσο μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών κυμάνθηκε περί τα 0,3-0,4 cm με μεγαλύτερο μήκος για τα έκφυτα κορυφής το Σεπτέμβριο. Το γινόμενο πολλαπλασιασμού ήταν 2-5 φορές μεγαλύτερο για τις καλλιιεργειες του Μαΐου (Πίν. 8).

Ανεξαρτήτως τύπου εκφύτου, το ποσοστό βλαστογένεσης και ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν ήταν μεγαλύτερος το Μάιο από το Σεπτέμβριο (Σχ. 3 α, β). Το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν παρόμοιο μεταξύ εκφύτων κορυφής και βάσης, ενώ ο μέσος αριθμός βλαστών που σχηματίστηκαν ήταν μεγαλύτερος για τα έκφυτα κορυφής σε σχέση με τα έκφυτα βάσης (Σχ. 4 α, β). Στο μήκος δε βρέθηκαν διαφορές και οι βλαστοί παρέμειναν κοντοί (Σχ. 3 γ, 4 γ). Το 2004, (Μάιος, Ιούνιος, Σεπτέμβριος) εξετάστηκε η επίδραση της εποχής εγκατάστασης σε άλατα WPM με βιταμίνες Mullin, 3% σακχαρόζη και $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA. Χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής χωρίς ακραίο μερίστωμα και έκφυτα βάσης. Το ποσοστό βλαστογένεσης

ήταν υψηλότερο την άνοιξη για τα έκφυτα κορυφής (90%) και ακολούθως για τα βάσης (70%), χωρίς διαφορά από τα έκφυτα κορυφής τον Ιούνιο (Πίν. 9).

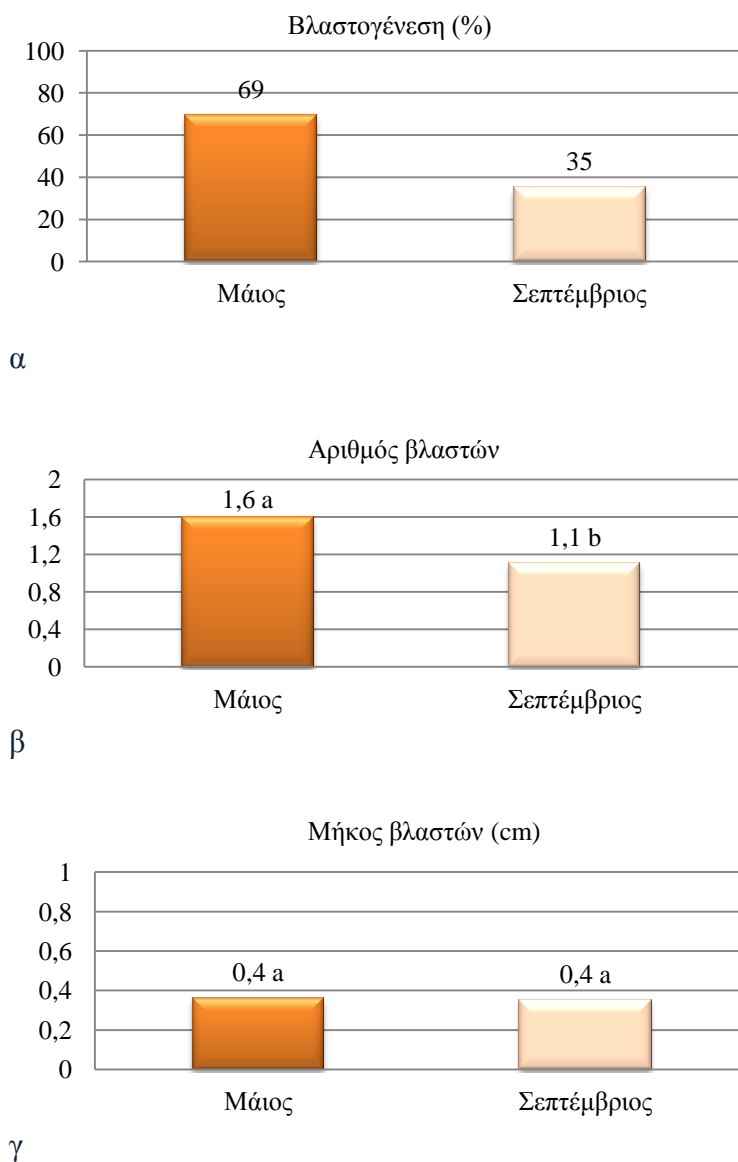
Ο μέσος αριθμός βλαστών για τα έκφυτα κορυφής δεν μεταβλήθηκε από εποχή σε εποχή. Τα έκφυτα κορυφής σχημάτισαν μεγαλύτερο αριθμό βλαστών από τα έκφυτα βάσης, τον Μάιο και Ιούνιο, αλλά τον Σεπτέμβριο δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ τους. Το υψηλότερο γινόμενο πολλαπλασιασμού προήλθε από έκφυτα κορυφής τον Μάιο (Πίν. 9). Το Μάιο, ανεξαρτήτως τύπου εκφύτου, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν υψηλότερο από τον Ιούνιο και τον Σεπτέμβριο (Σχ. 5 α), ο αριθμός βλαστών δεν διέφερε (Σχ. 5 β). Το μήκος ήταν μεγαλύτερο τους μήνες Μάιο και Ιούνιο (Σχ. 5 β και γ αντίστοιχα).

Πίν. 8. Επίδραση της εποχής εγκατάστασης των αρχικών καλλιεργειών *A. andrachne*, καθώς και του τύπου εκφύτου (Κ: κορυφής με ακραίο και Β: βάσης), στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς, στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μήκος των σχηματισθέντων βλαστών, καθώς και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού. Καλλιέργεια σε άλατα WPM με βιταμίνες Mullin, 3% σακχαρόζη και 0, 2,5 ή 5 mg l⁻¹ ΒΑ με 0, 0,75 ή 1,5 mg l⁻¹ ΝΑΑ. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min, n=46-71.

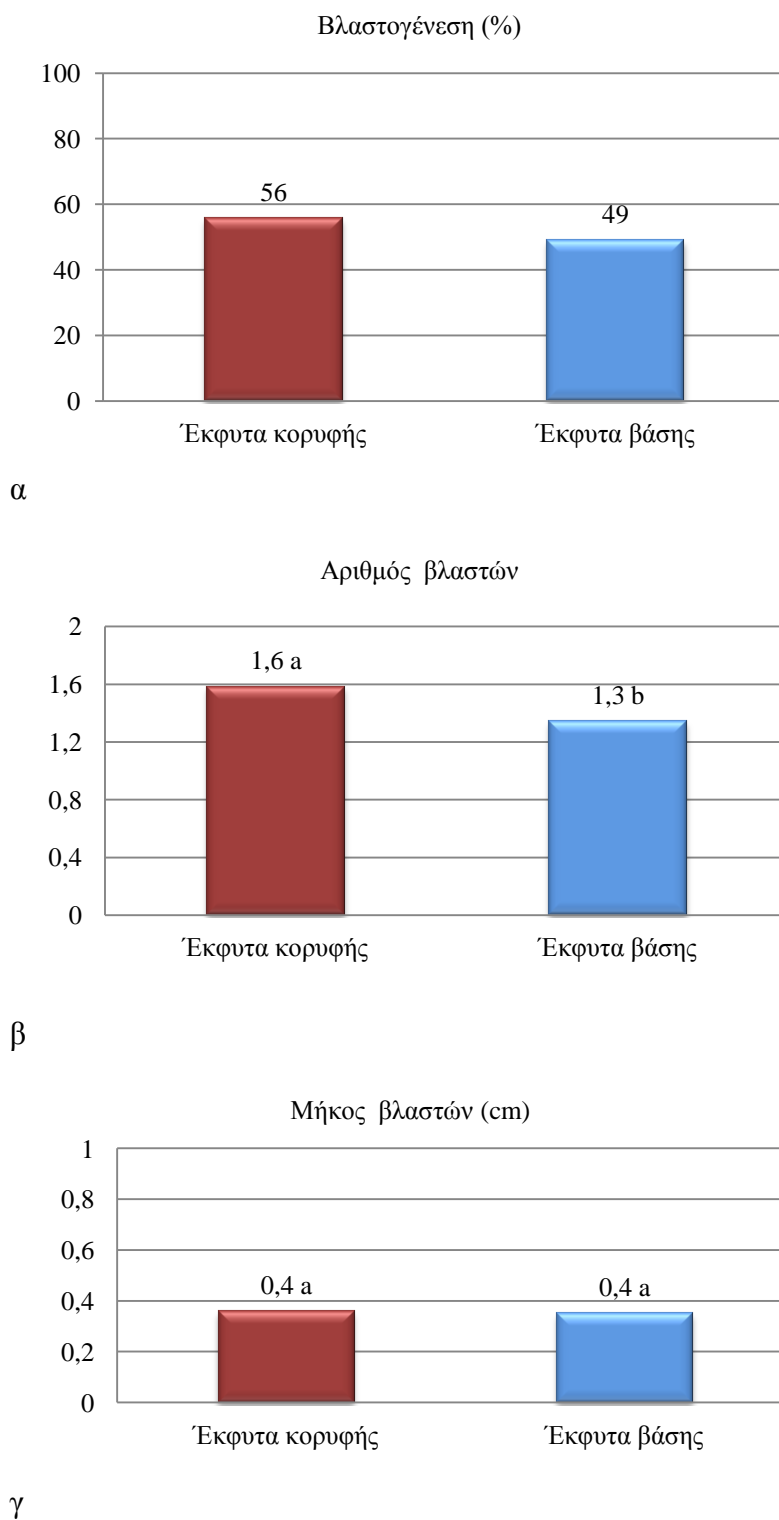
ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστο γένεση (%)	Μέσος Αριθ. Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	ΓΙΝ Α	ΓΙΝ Β
ΕΠΟΧΗ	ΕΚΦΥΤΟ	(%)	Βλαστών	Βλαστών (cm)		0,6
Μάιος	Κ	67,00	1,9 a	0,3 b	1,27	0,64
	Β	71,00	1,4 b	0,3 b	0,99	0,50
Σεπτέμβριος	Κ	44,00	1,1 c	0,4 a	0,48	0,32
	Β	27,00	1,0 c	0,3 c	0,27	0,14
Ανάλυση της συνδιασποράς						
ΕΠΟΧΗ (Α)						
ΘΕΣΗ ΕΚΦ (Β)						
(Α) X (Β)			**	**		

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student's test σε P=0,05.

*, **: σημαντικά σε P=0,05, P=0,01, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε P=0,05.



Σχ. 3. Επίδραση της εποχής εγκατάστασης των εκφύτων *A. andrachne* στη βλαστογένεση (α), στον αριθμό και στο μήκος των βλαστών (β, γ) που σχηματίστηκαν. Σύγκριση μέσω Student's test σε $P=0,05$, $n=117-263$.



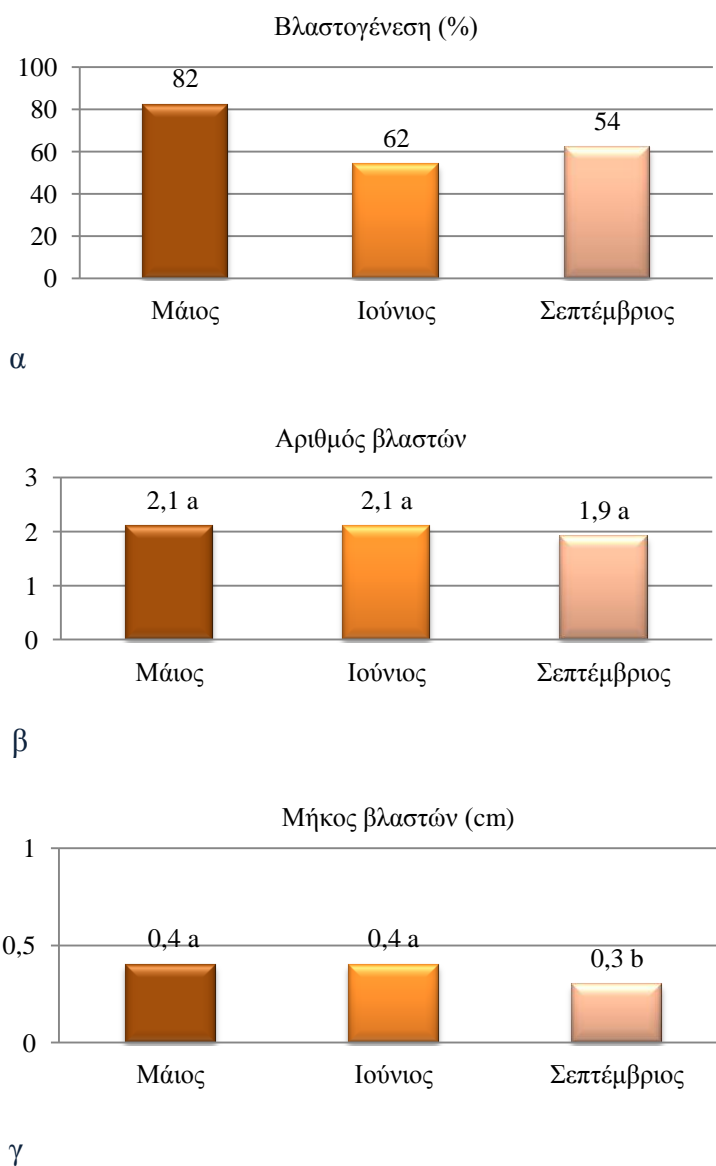
Σχ. 4. Επίδραση του τύπου εκφύτου (κορυφής με ακραίο και βάσης) *A. andrachne* στη βλαστογένεση (α) και στον αριθμό των βλαστών (β) που σχηματίστηκαν. Σύγκριση μέσω Student's test σε $P=0,05$, $n=184-196$.

Πίν. 9. Επίδραση της εποχής στην εγκατάσταση των αρχικών καλλιεργειών *A. andrachne*, καθώς και του τύπου εκφύτου, στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς, στον αριθμό των βλαστών ανά εκφυτο που αντέδρασε, στο μήκος των βλαστών καθώς και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού (Κ: Έκφυτα κορυφής χωρίς μερίστωμα, Β: Έκφυτα βάσης). Καλλιέργεια σε WPM με βιταμίνες Mullin, 3% σακχαρόζη και 2,5 mg l⁻¹ ΒΑ. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min, n=24-66.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστο- γένεση	Μέσος Αριθ. Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	ΓΙΝ Α	ΓΙΝ Β
ΕΠΟΧΗ	ΕΚΦΥΤΟ	(%)				0,6
Μάιος	Κ	90,00	2,4 a	0,4 a	2,16	1,44
	Β	70,00	1,6 b	0,4 ab	1,12	0,75
Ιούνιος	Κ	58,00	2,4 a	0,4 ab	1,39	0,93
	Β	50,00	1,7 b	0,4 a	0,85	0,57
Σεπτέμβρι ος	Κ	70,00	2,0 ab	0,3 b	1,40	0,70
	Β	45,00	1,6 b	0,3 b	0,72	0,36
Ανάλυση της συνδιασποράς						
ΕΠΟΧΗ (Α)			NS	**		
ΕΚΦ (Β)			**	NS		
(Α) X (Β)			NS	NS		

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student's test σε $P=0,05$.

*,**: σημαντικά σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$.



Σχ. 5. Επίδραση της εποχής στη βλαστογένεση (α), στον αριθμό (β) και μήκος βλαστών (γ) που σχηματίστηκαν, κατά την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών *A. andrachne* σε υπόστρωμα WPM με $2,5 \text{ mg}^{-1}$ BA. Σύγκριση των μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n=48-132$.

4.3.1.3 Επίδραση κυτοκινινών στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών *A. andrachne*

4.3.1.3.1 Επίδραση τύπου κυτοκινίνης και εποχής στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών *A. andrachne*

Δοθείσης της αδυναμίας των αυξινών να συμβάλλουν στην αρχική εγκατάσταση των καλλιεργειών του *A. andrachne*, αλλά και του TDZ, εξετάστηκε η επίδραση διαφόρων κυτοκινινών. Το Μάιο και Σεπτέμβριο 2006, 2007, 2008 και 2010, χρησιμοποιήθηκαν BA, ZEAT, 2IP και KIN σε συγκέντρωση $2,5 \text{ mg l}^{-1}$. Στην συγκέντρωση αυτή το BA είχε επιδείξει το υψηλότερο μορφογενετικό δυναμικό. Στις καλλιέργειες του Μαΐου χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής χωρίς ακραίο μερίστωμα (1) καθώς και τα 4 επόμενα (2, 3, 4, 5). Στις καλλιέργειες του Σεπτεμβρίου χρησιμοποιήθηκαν μόνο έκφυτα κορυφής χωρίς ακραίο.

Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης σημειώθηκε στα υποστρώματα με ZEAT ή 2IP, αλλά το ποσοστό βλαστογένεσης σε υπόστρωμα με 2IP τον Μάιο, δεν διέφερε από το ποσοστό βλαστογένεσης σε υποστρώματα με BA τον Μάιο (Πίν. 10). Ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σχηματίστηκε στις καλλιέργειες του Μαΐου σε υποστρώματα με BA και στις καλλιέργειες του Σεπτεμβρίου σε υποστρώματα με ZEAT. Το μεγαλύτερο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε υποστρώματα με ZEAT ή 2IP το Σεπτέμβριο. Οι αρχικές καλλιέργειες του Σεπτεμβρίου σε ZEAT είχαν το υψηλότερο γινόμενο πολλαπλασιασμού (Πίν. 10, Εικ. 22).

Ανεξαρτήτως εποχής, το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης σημειώθηκε στα υποστρώματα με 2IP ή ZEAT, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σε υποστρώματα με BA ή ZEAT. Το μέσο μήκος βλαστών δε διέφερε μεταξύ των υποστρωμάτων που περιείχαν BA, ZEAT ή 2IP (Σχ. 6).

Ανεξαρτήτως κυτοκινίνης, το Μάιο, το ποσοστό βλαστογένεσης και ο αριθμός των σχηματιζόμενων βλαστών δε διέφερε, αλλά το μέσο μήκος ήταν υψηλότερο το Σεπτέμβριο (Σχ. 7).

Πίν. 10. Επίδραση της αναγραφόμενης κυτοκινίνης στην εγκατάσταση των αρχικών καλλιεργειών του *A. andrachne*, καθώς και της εποχής εγκατάστασης, στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς, στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μήκος των σχηματισθέντων βλαστών καθώς και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού (Κ: Έκφυτα κορυφής χωρίς μερίστωμα, Β: Έκφυτα βάσης). Καλλιέργεια σε άλατα WPM με βιταμίνες Mullin και 3% σακχαρόζη. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min, $n=18-84$.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστογ ένεση	Μέσος Αριθ. Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	ΓΙΝ Α	ΓΙΝ Β
ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗ (2,5 mg l ⁻¹)	ΕΠΟ ΧΗ	(%)				/
BA	M	71,00	2,3 a	0,4 b	1,63	1,09
	Σ	57,00	1,7 b	0,3 c	0,97	0,48
ZEAT	M	90,00	1,6 bc	0,2 cd	1,44	0,48
	Σ	100,00	2,2 a	0,6 a	2,20	2,20
2IP	M	88,00	1,1 bc	0,2 cd	0,97	0,32
	Σ	95,00	1,0 c	0,6 a	0,95	0,95
KIN	M	55,00	1,0 c	0,1 d	0,55	0,09
	Σ	36,00	1,0 c	0,2 d	0,36	0,33

Ανάλυση της συνδιασποράς

ΕΠΟΧΗ (Α)

ΚΥΤΟΚΙΝ (Β)

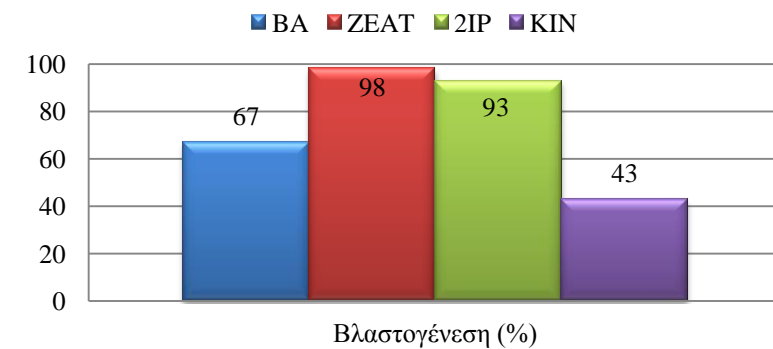
(Α) X (Β)

**

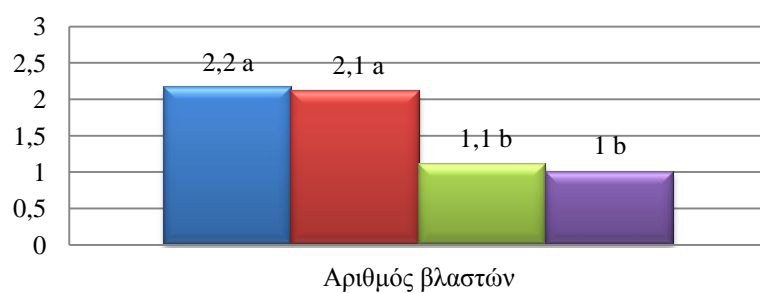
**

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student's test σε $P=0,05$.

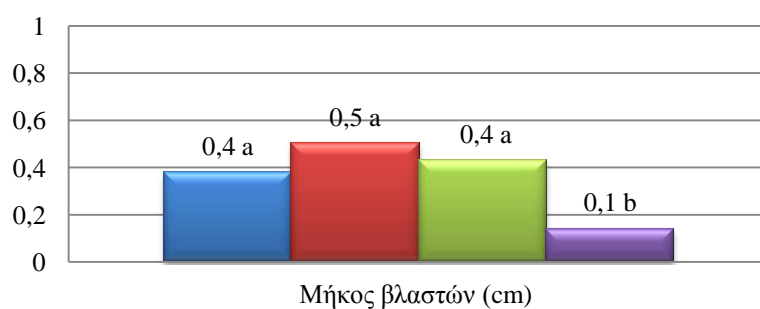
*, **: σημαντικά σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$.



α

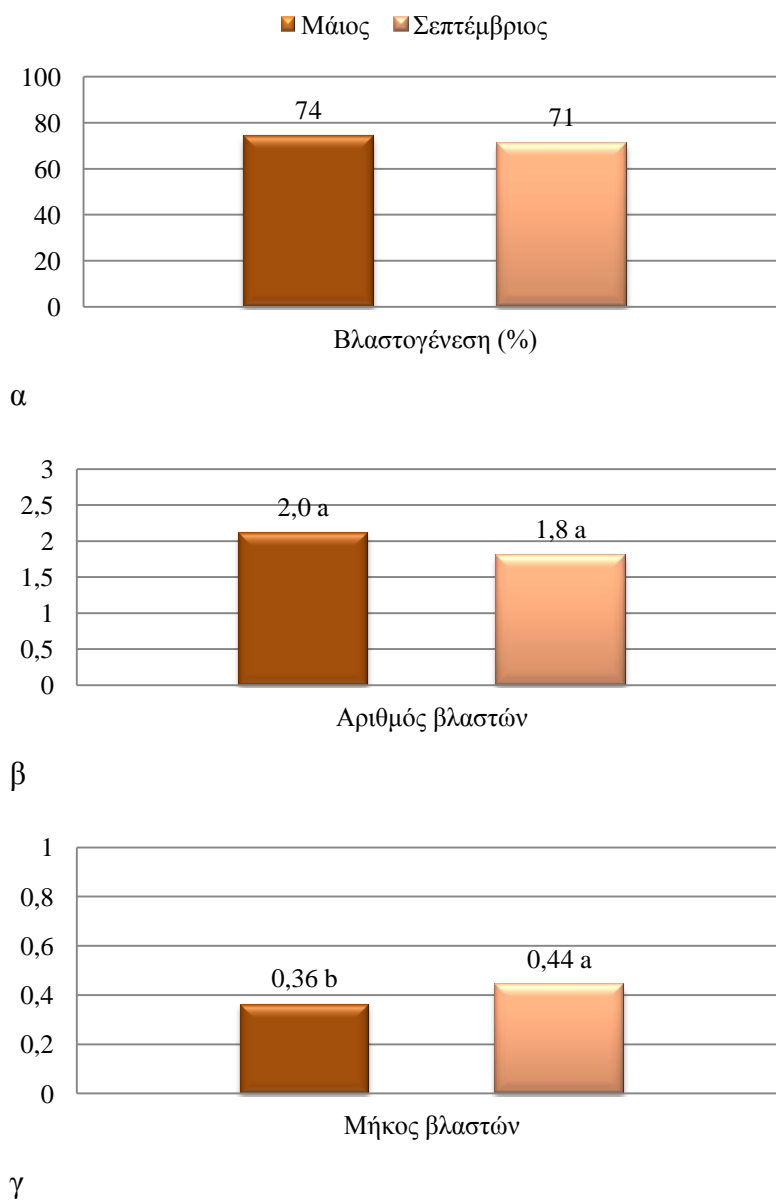


β

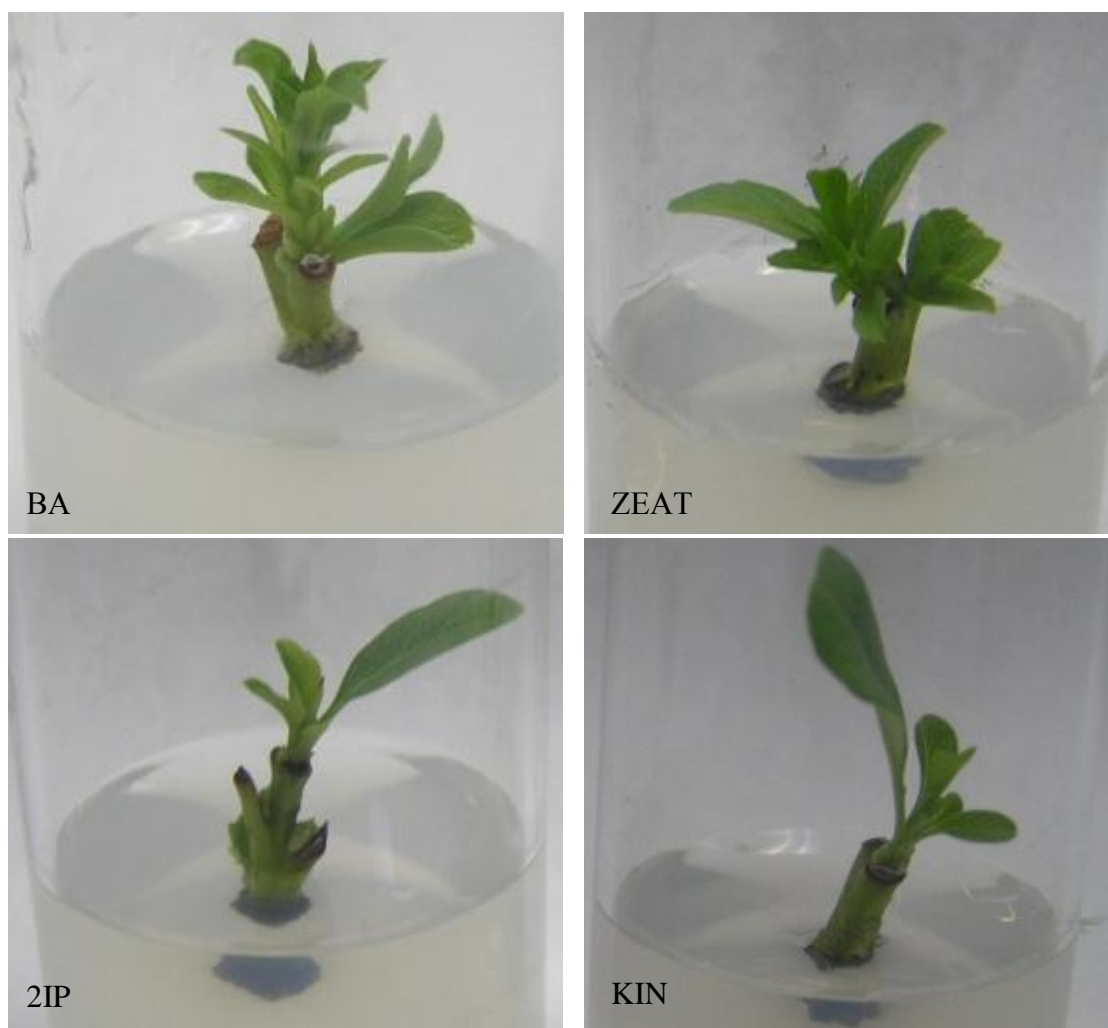


γ

Σχ. 6. Επίδραση του είδους της κυτοκινίνης (και στις δύο εποχές) στη βλαστογένεση (α), στον αριθμό και στο μέσο μήκος των εκπτυχθέντων βλαστών (β, γ αντίστοιχα), κατά την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών *A. andrachne*. Σύγκριση μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n=24-99$.



Σχ. 7. Επίδραση της εποχής (στο σύνολο των κυτοκινινών) στη βλαστογένεση (α), στον αριθμό (β) και μήκος των βλαστών (γ) που σχηματίστηκαν κατά την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών *A. andrachne*. Σύγκριση μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n=63-115$.



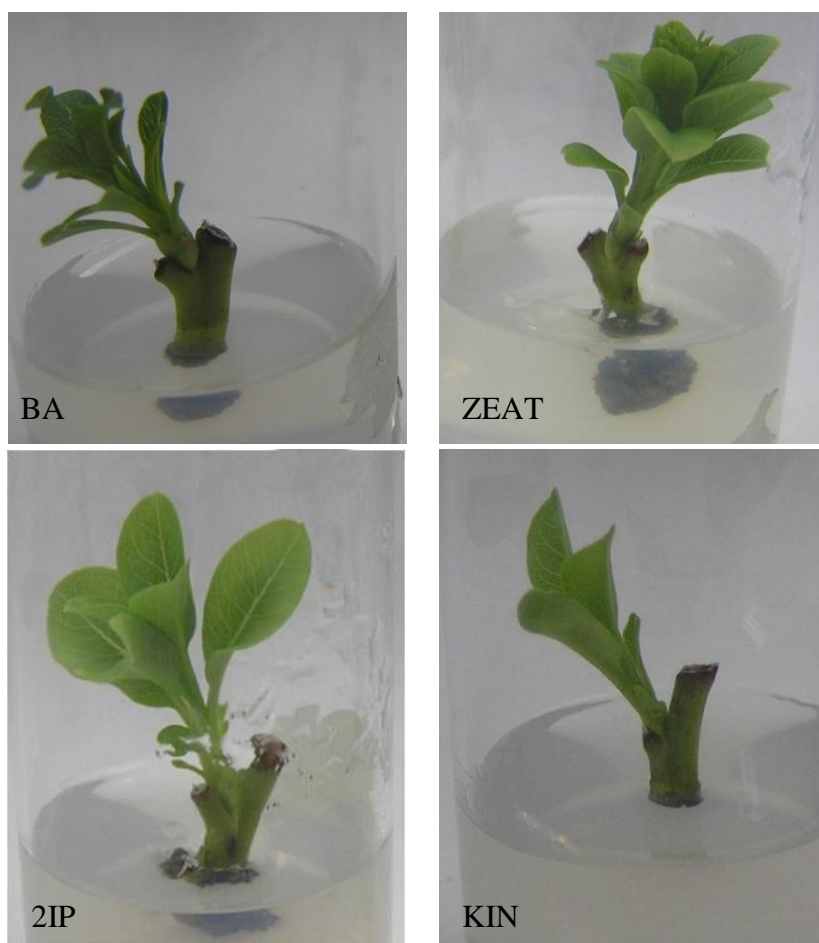
Εικ. 22. Βλαστογένεση σε έκφυτα 1 κατά την αρχική εγκατάσταση *A. andrachne* το μήνα Μάιο, σε WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA, ZEAT, 2IP ή KIN.

4.3.1.3.2 Επίδραση της θέσης του εκφύτου στην αντίδραση κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών *A. andrachne* σε διάφορες κυτοκινίνες

Το μήνα Μάιο σε διάφορα έτη εξετάστηκε η επίδραση της θέσης του εκφύτου στη βλαστογένεση του *A. andrachne* σε υποστρώματα WPM που περιείχαν διάφορες κυτοκινίνες. Το ποσοστό βλαστογένεσης κυμάνθηκε από 45 έως 100% (Πίν. 11). Ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σημειώθηκε σε έκφυτα (1) που καλλιεργήθηκαν σε υποστρώματα BA. Το μεγαλύτερο μέσο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε έκφυτα 3, 4 και 5 που καλλιεργήθηκαν σε υποστρώματα ZEAT (Πίν. 11). Τα ίδια έκφυτα πλέον των εκφύτων (2) σημείωσαν και το υψηλότερο γινόμενο πολλαπλασιασμού (Πίν. 11).

Ανεξαρτήτως της θέσης του εκφύτου, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 69% σε υποστρώματα με BA έως 80 και 86% σε υποστρώματα με 2IP και ZEAT αντίστοιχα. Ο υψηλότερος αριθμός βλαστών σημειώθηκε σε υποστρώματα με BA, αλλά το μεγαλύτερο μήκος σε υποστρώματα με ZEAT (Σχ. 8).

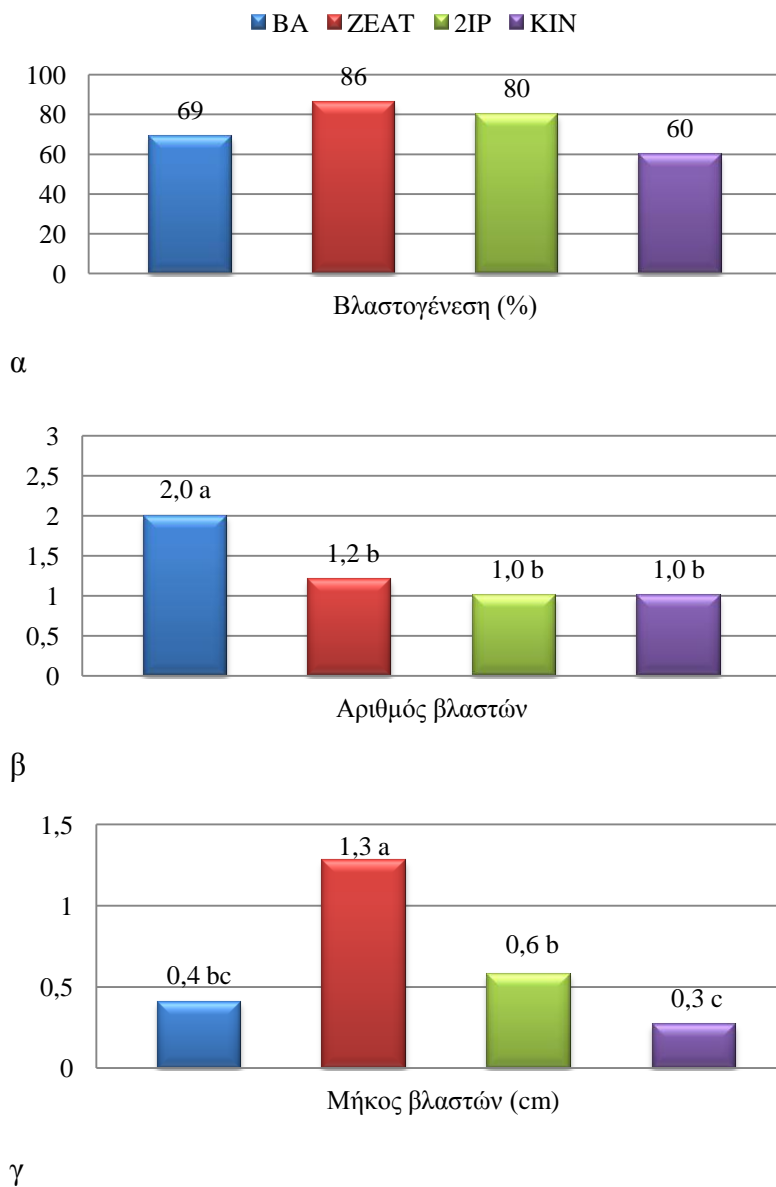
Ανεξαρτήτως της κυτοκινίνης που χρησιμοποιήθηκε, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν από 55 έως 92%. Ο υψηλότερος αριθμός βλαστών προήλθε από τα έκφυτα (1), χωρίς διαφορά από τα έκφυτα 2 και 3. Το μεγαλύτερο μήκος σημειώθηκε στα έκφυτα 5, χωρίς διαφορά από τα έκφυτα 3 και 4 (Σχ. 9, Εικ. 23).



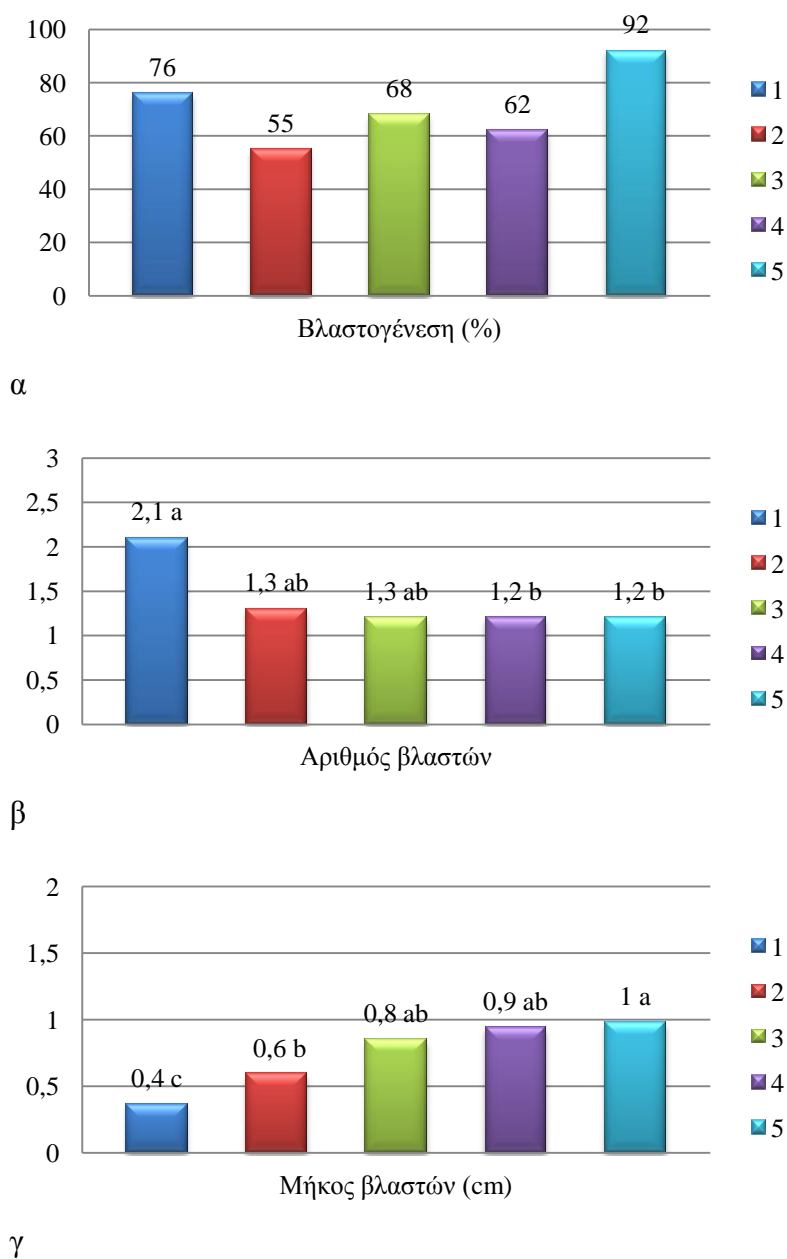
Εικ. 23. Βλαστογένεση σε έκφυτα 2 κατά την αρχική εγκατάσταση *A. andrachne* το μήνα Μάιο, υπόστρωμα WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA, ZEAT, 2IP ή KIN.

Πίν. 11. Επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό βλαστό *A. andrachne*, καθώς και του είδους της κυτοκινίνης, στο ποσοστό βλαστογένεσης, στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μέσο μήκος των βλαστών, καθώς και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού. Καλλιέργεια σε άλατα WPM με βιταμίνες Mullin και 3% σακχαρόζη. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min. Εγκατάσταση: Μάιος 2004, 2006, 2007, 2008, 2010, $n=18-84$.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστο- γένεση (%)	Μέσος Αριθ. Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	ΓΙΝ Α	ΓΙΝ Β / 0,6
ΚΥΤΟΚΙ ΝΙΝΗ 2.5 mg l ⁻¹	ΘΕΣΗ ΕΚΦΥ ΤΟΥ					
BA	1	72,00	2,3 a	0,4 def	1,66	1,13
	2	69,00	1,6 bc	0,4 def	1,10	0,74
	3	55,00	1,7 bc	0,4 cdef	0,94	0,69
	4	56,00	1,9 b	0,4 def	1,06	0,73
	5	92,00	1,8 b	0,5 cdef	1,66	1,32
ZEAT	1	90,00	1,6 bcd	0,2 f	1,44	0,50
	2	92,00	1,1 e	1,2 b	1,01	1,96
	3	76,00	1,0 e	1,4 a	0,76	1,82
	4	74,00	1,2 de	1,5 a	0,89	2,22
	5	96,00	1,2 de	1,5 a	1,15	2,92
2IP	1	88,00	1,1 de	0,2 def	0,97	0,32
	2	71,00	1,1 de	0,5 cdef	0,78	0,59
	3	68,00	1,1 e	0,6 cde	0,75	0,75
	4	72,00	1,0 e	0,6 cd	0,72	0,76
	5	100,00	1,0 e	0,8 bc	1,00	1,40
KIN	1	55,00	1,0 e	0,1 f	0,55	0,09
	2	45,00	1,0 e	0,2 ef	0,45	0,16
	3	72,00	1,0 e	0,3 def	0,72	0,34
	4	47,00	1,0 e	0,4 def	0,47	0,28
	5	81,00	1,0 e	0,4 def	0,81	0,49
Ανάλυση της συνδιασποράς						
ΚΥΤΟΚ (Α)			**	**		
ΘΕΣ ΕΚΦ (Β)			NS	**		
(Α) X (Β)			NS	NS		



Σχ. 8. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών, αριθμός βλαστών και μήκος βλαστών (cm) σε 4 διαφορετικές κυτοκινίνες από έκφυτα διαφορετικών κόμβων πάνω στο μητρικό βλαστό *A. drachne* τον Μάιο. Σύγκριση των μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n=49-189$.



Σχ. 9. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (α), αριθμός βλαστών (β) και μήκος βλαστών (cm) (γ) σε έκφυτα *A. andrachne* από διαφορετικούς κόμβους πάνω στο μητρικό βλαστό τον Μάιο. Σύγκριση των μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n=67-124$.

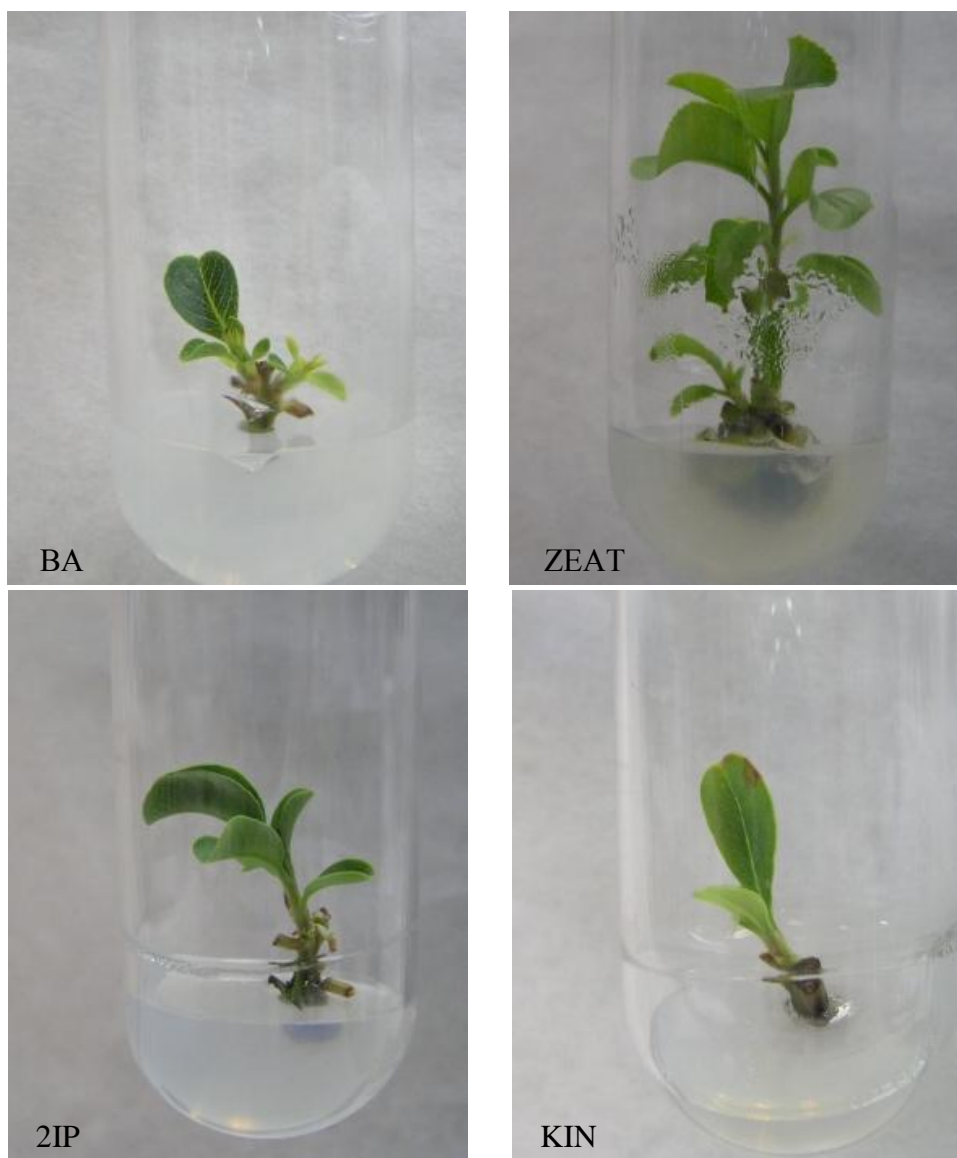
4.3.2 Αρχική εγκατάσταση *A. x andrachnoides*

4.3.2.1 Επίδραση κυτοκινινών στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών *A. x andrachnoides*

4.3.2.1.1 Επίδραση τύπου κυτοκινίνης και εποχής στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών *A. x andrachnoides*

Το Μάιο και Σεπτέμβριο 2006, 2007, 2008 και 2010, εξετάστηκε η επίδραση διαφόρων κυτοκινινών στη βλαστογένεση του *A. x andrachnoides*. Χρησιμοποιήθηκαν BA, ZEAT, 2IP και KIN σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹. Στις καλλιέργειες του Μαΐου χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής χωρίς ακραίο μερίστωμα (1) και τα τέσσερα επόμενα (2, 3, 4, 5). Στις καλλιέργειες του Σεπτεμβρίου χρησιμοποιήθηκαν μόνο έκφυτα κορυφής χωρίς ακραίο. Το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 100% στα υποστρώματα με ZEAT και 96-100% στα υποστρώματα με 2IP, ενώ η βλαστογένεση ήταν γενικώς χαμηλότερη. Στα υποστρώματα με BA ή KIN ήταν (58-97%) ή (43-60%) αντίστοιχα (Πίν. 12). Ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σχηματίστηκε στις καλλιέργειες του Μαΐου σε υποστρώματα με ZEAT ή BA, χωρίς όμως διαφορά από τις καλλιέργειες του Σεπτεμβρίου σε υποστρώματα με 2IP. Το μεγαλύτερο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε υποστρώματα με ZEAT το Μάιο και αμέσως μετά ήταν το μήκος σε ZEAT το Σεπτέμβριο. Οι αρχικές καλλιέργειες του Σεπτεμβρίου και Μαΐου σε ZEAT είχαν το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού, ακολουθούμενες από το δυναμικό πολλαπλασιασμού σε 2IP το Σεπτέμβριο (Πίν. 12, Εικ. 24).

Ανεξαρτήτως εποχής, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν από 98 έως 100% στα υποστρώματα με 2IP και ZEAT αντίστοιχα. Ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σημειώθηκε στα υποστρώματα με BA, ZEAT ή 2IP. Το μέσο μήκος βλαστών ήταν υψηλότερο στα υποστρώματα με ZEAT (Σχ. 10). Ανεξαρτήτως είδους κυτοκινίνης, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 61-89% τον Μάιο και δε βρέθηκε διαφορά στο μέσο αριθμό και μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών στις δύο εποχές (Σχ. 11).



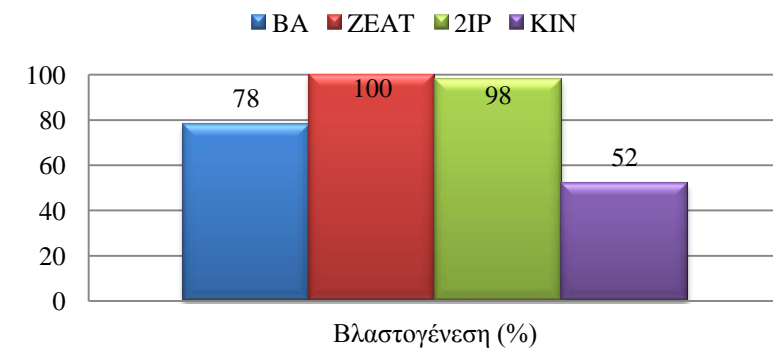
Εικ. 24. Βλαστογένεση σε έκφυτα 1 κατά την αρχική εγκατάσταση *A. x andrachnoides* το μήνα Μάιο, υπόστρωμα WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA, ZEAT, 2IP ή KIN.

Πίν. 12. Επίδραση κυτοκίνης στην εγκατάσταση των αρχικών καλλιεργειών του *A. x andrachnoides*, καθώς και της εποχής εγκατάστασης, στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς, στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μήκος των βλαστών και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού. Καλλιέργεια εκφύτων κορυφής χωρίς μερίστωμα σε άλατα WPM με βιταμίνες Mullin και 3% σακχαρόζη. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min, $n=22-31$.

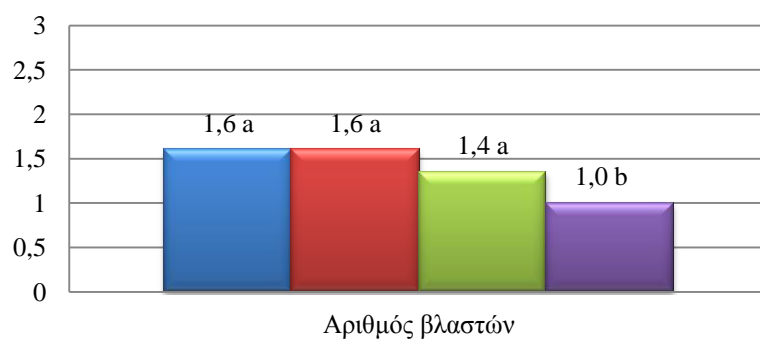
ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστο- γένεση	Μέσος Αριθ. Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	ΓΙΝ Α	ΓΙΝ Β	
ΚΥΤΟΚΙ	ΕΠΟ	(%)				/	
NINH	XH					0,6	
BA	M	97,00	1,7 a	0,4 de	1,65	0,99	
	Σ	58,00	1,2 bc	0,4 de	0,70	0,51	
ZEAT	M	100,00	1,3 bc	1,9 a	1,30	4,18	
	Σ	100,00	2,0 a	1,6 b	2,00	5,30	
2IP	M	100,00	1,0 c	0,5 d	1,00	0,87	
	Σ	96,00	1,6 ab	1,0 c	1,54	2,61	
KIN	M	60,00	1,0 c	0,2 e	0,60	0,18	
	Σ	43,00	1,0 c	0,3 de	0,43	0,19	
Ανάλυση της συνδιασποράς							
ΕΠΟΧΗ (Α)							
ΚΥΤΟΚ(Β)							
(Α) X (Β)			**	**			

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student's test σε $P=0,05$.

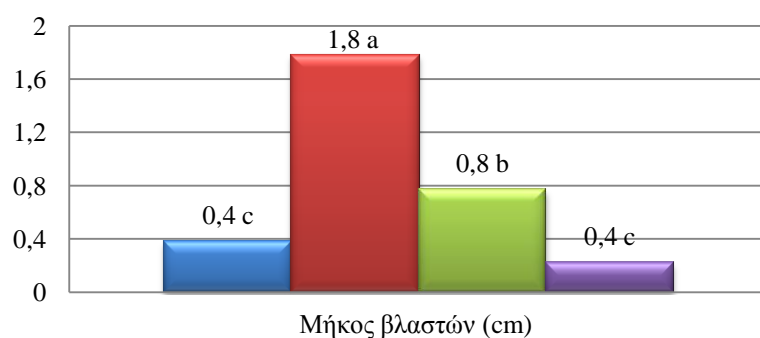
*, **: σημαντικά σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$.



α

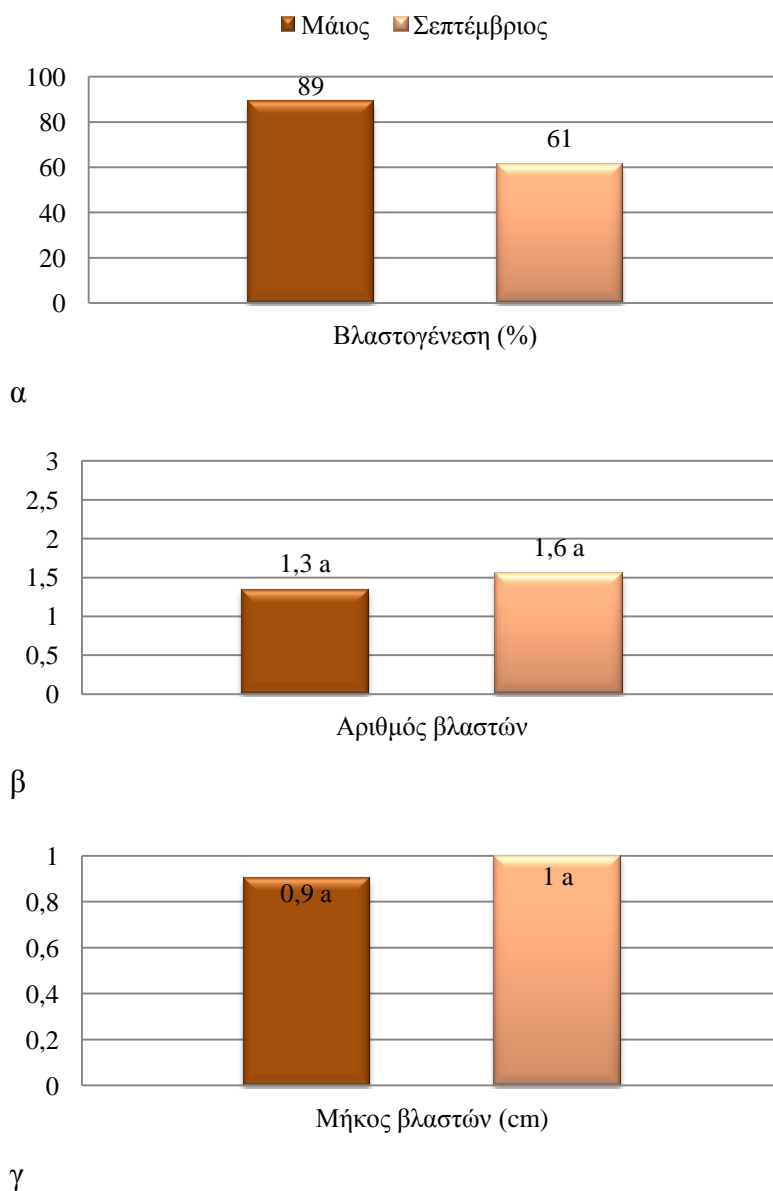


β



γ

Σχ. 10. Επίδραση της κυτοκινίνης στη βλαστογένεση (α), στον αριθμό (β) και στο μέσο μήκος των εκπτυχθέντων βλαστών (γ) που σχηματίστηκαν, κατά την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών *A. x andrachnoides*. Σύγκριση μέσω με Student's test σε $P=0,05$, $n= 24-56$.

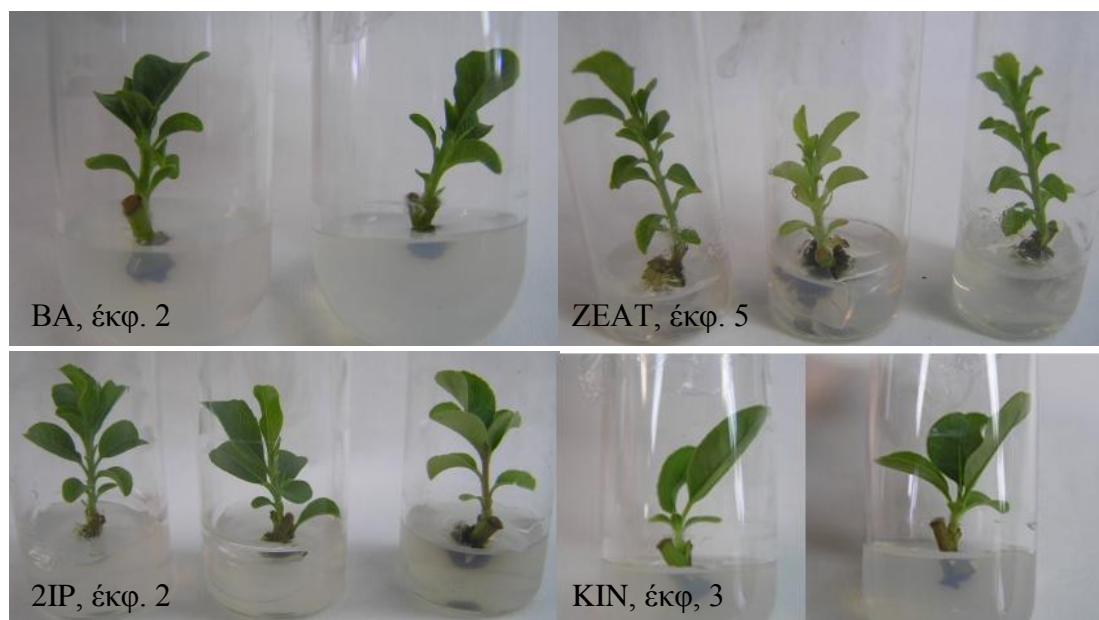


Σχ. 11. Επίδραση της εποχής στη βλαστογένεση (α), στον αριθμό και στο μέσο μήκος των εκπτυχθέντων βλαστών (β, γ αντίστοιχα) και στον αριθμό των φύλλων που σχηματίστηκαν κατά την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών *A. x andrachnoides*. Σύγκριση μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n=76-96$.

4.3.2.1.2 Επίδραση της θέσης του εκφύτου στην αντίδραση κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών *A. x andrachnoides* σε διάφορες κυτοκινίνες

Τον μήνα Μάιο σε διάφορα έτη, εξετάστηκε η επίδραση της θέσης του εκφύτου στη βλαστογένεση του *A. x andrachnoides* σε υποστρώματα WPM που περιείχαν διάφορες κυτοκινίνες. Το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 39-100%. Το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 100% για τα έκφυτα 1 και 2 που καλλιεργήθηκαν σε ZEAT ή 2IP. Ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σημειώθηκε σε έκφυτα No 1 σε υποστρώματα με BA. Το μεγαλύτερο μέσο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε έκφυτα 5 που καλλιεργήθηκαν σε υποστρώματα ZEAT χωρίς διαφορά από έκφυτα 2. Τα έκφυτα σε ZEAT είχαν το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (Πίν. 13, Εικ. 25).

Ανεξαρτήτως της θέσης του εκφύτου, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 86-90% σε υποστρώματα με BA, 2IP ή ZEAT. Ο υψηλότερος αριθμός βλαστών σημειώθηκε σε υποστρώματα με BA και ZEAT, και το μεγαλύτερο μήκος σε υποστρώματα με ZEAT (Σχ. 12). Ανεξαρτήτως της κυτοκινίνης που χρησιμοποιήθηκε, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν από 65-91%. Ο υψηλότερος αριθμός βλαστών προήλθε από τα έκφυτα No 1. Το μεγαλύτερο μήκος σημειώθηκε στα έκφυτα No 5 χωρίς διαφορά από τα έκφυτα No 2, 3, 4 (Σχ. 13, Εικ. 25).



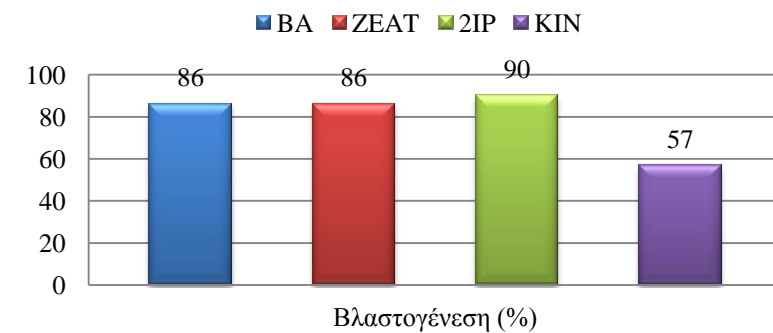
Εικ. 25. Βλαστογένεση σε διάφορα έκφυτα κατά την αρχική εγκατάσταση *A. x andrachnoides* το μήνα Μάιο σε WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA, ZEAT, 2IP ή KIN.

Πίν.13. Επίδραση της θέσης των εκφύτων στο μητρικό βλαστό και της κυτοκινίνης, στο ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν δίνοντας βλαστό, στον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν, καθώς και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού. Καλλιέργεια *A. x andrachnoides* σε άλατα WPM με βιταμίνες Mullin και 3% σακχαρόζη. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min. Εγκατάσταση τον Μάιο 2006, 2007, 2008, 2010, $n=18-39$.

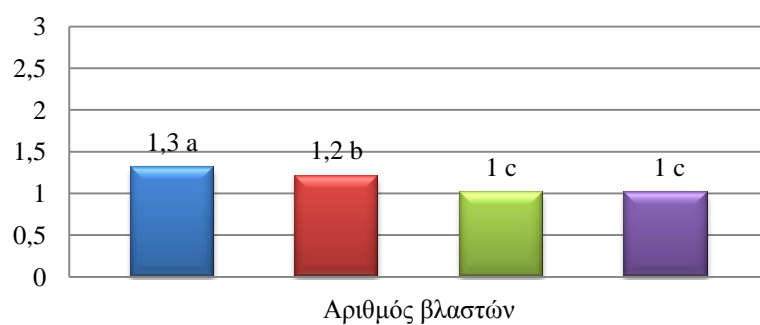
ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστο	Μέσος	Μέσο		GIN A	GIN B
ΚΥΤΟΚΙ	ΕΚΦΥ	γένεση	Αριθ.	Μήκος			/
NINH	ΤΟ	(%)	Βλαστών	Βλαστών			0,6
2,5 mg l ⁻¹				(cm)			
BA	1	97,00	1,7 a	0,4	ghi	1,65	0,99
	2	93,00	1,1 cd	0,6	fg	1,02	1,02
	3	81,00	1,0 cd	0,6	fgh	0,81	0,78
	4	73,00	1,0 cd	0,6	fghi	0,73	0,67
	5	85,00	1,2 bc	0,5	ghi	1,02	0,77
ZEAT	1	100,00	1,3 b	1,9	c	1,30	4,18
	2	100,00	1,2 bcd	2,4	b	1,20	4,86
	3	78,00	1,1 bcd	2,5	ab	0,86	3,56
	4	65,00	1,1 cd	2,2	bc	0,72	2,59
	5	89,00	1,0 d	2,8	a	0,89	4,18
2IP	1	100,00	1,1 cd	0,5	ghi	1,10	0,94
	2	100,00	1,0 d	1,0	d	1,00	1,70
	3	91,00	1,0 d	0,9	def	0,91	1,35
	4	81,00	1,0 cd	0,6	efgh	0,81	0,84
	5	78,00	1,0 cd	1,1	de	0,78	1,43
KIN	1	60,00	1,0 cd	0,2	hi	0,60	0,18
	2	71,00	1,0 cd	0,2	i	0,71	0,25
	3	39,00	1,0 cd	0,3	ghi	0,39	0,20
	4	39,00	1,0 cd	0,4	fghi	0,39	0,28
	5	75,00	1,0 cd	0,4	fghi	0,75	0,46
Ανάλυση της συνδιασποράς							
ΚΥΤΟΚ (A)				**			
ΘΕΣ ΕΚΦ (B)				**			
(A) X (B)			**		NS		

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student's test σε $P=0,05$.

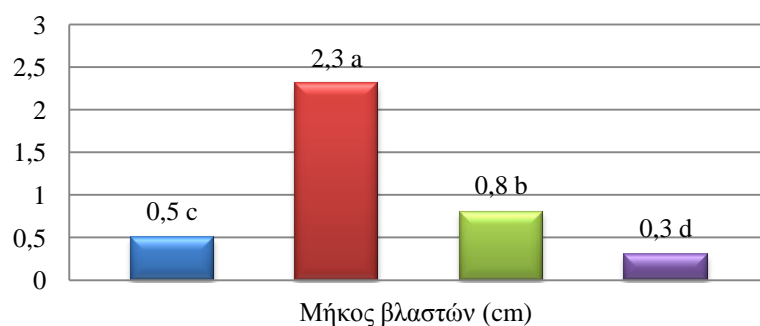
*, **: σημαντικά σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$.



α

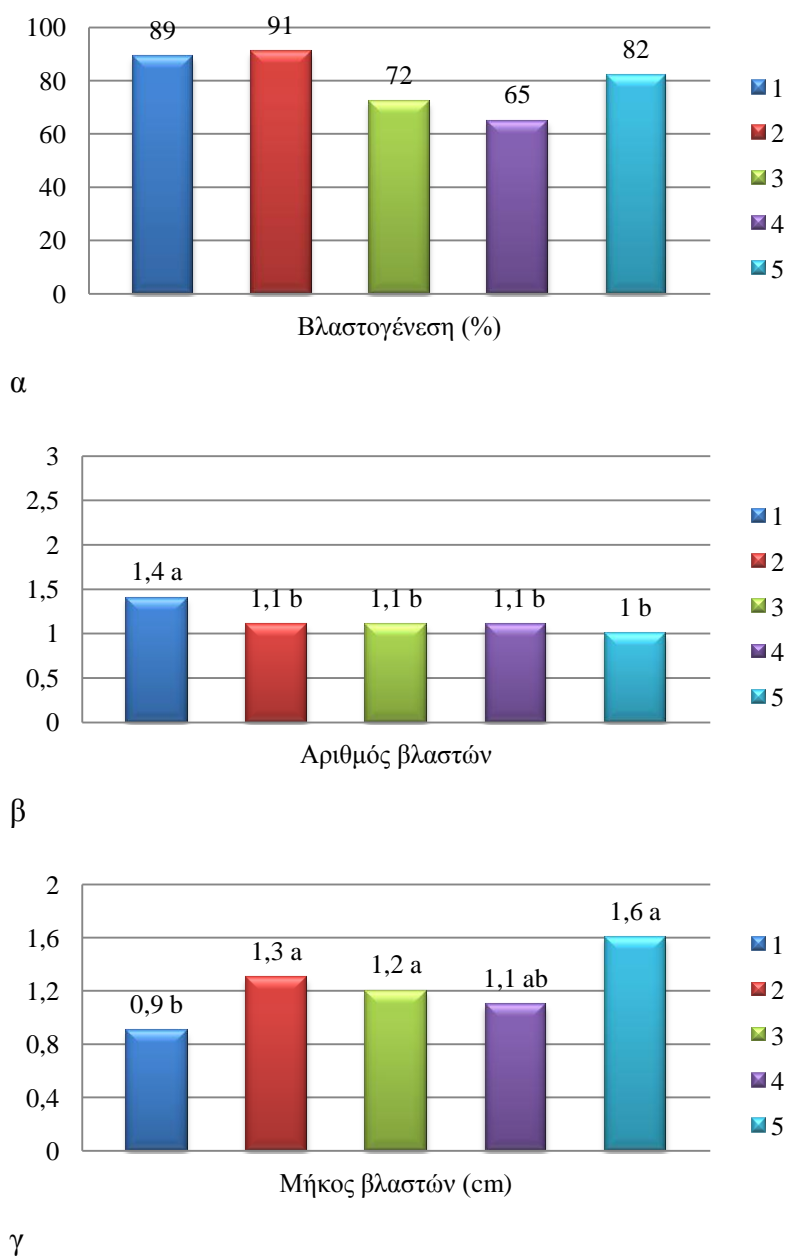


β



γ

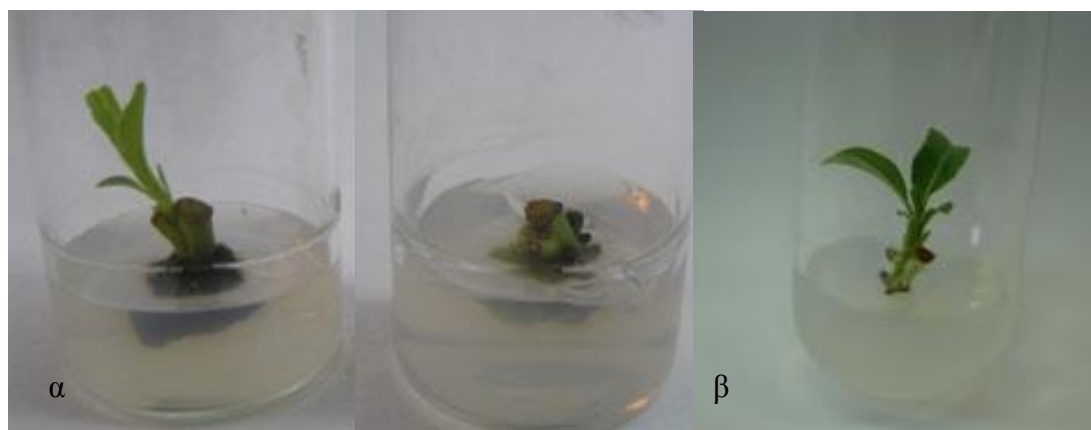
Σχ. 12. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (α), αριθμός βλαστών (β) και μήκος βλαστών (cm) (γ) σε 4 διαφορετικές κυτοκινίνες από έκφυτα διαφορετικών κόμβων πάνω στο μητρικό βλαστό *A. x andrachnoides* το Μάιο. Σύγκριση των μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n=55-149$.



Σχ. 13. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (α), αριθμός βλαστών (β) και μήκος βλαστών (cm) (γ) σε έκφυτα από διαφορετικούς κόμβους πάνω στο μητρικό βλαστό *A. x andrachnoides* τον Μάιο. Σύγκριση των μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n=54-172$.

4.3.2.2 Επίδραση αυξίνης στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών *A. x andrachnoides*

Σε υποστρώματα WPM που περιείχαν $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA προστέθηκε αυξίνη NAA ($0,75 \text{ mg l}^{-1}$) ή IBA ($0,1 \text{ mg l}^{-1}$). Το ποσοστό βλαστογένεσης υπό την παρουσία $0,75 \text{ mg l}^{-1}$ NAA ήταν πολύ χαμηλό (3 και 15% το Μάιο και το Σεπτέμβριο αντίστοιχα), με ταυτόχρονο σχηματισμό κάλου (Εικ. 26 α). Η προσθήκη $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ IBA επέφερε βλαστογένεση σε ποσοστό 79%, χωρίς σχηματισμό κάλου και χωρίς να διαφοροποιήσει τα μορφογενετικά αποτελέσματα της καλλιέργειας από υποστρώματα που περιείχαν μόνο BA. Οι παραγόμενοι βλαστοί παρέμειναν κοντοί, χωρίς να παρατηρηθεί επίδραση στον αριθμό τους (Εικ. 26 β).



Εικ. 26. Βλαστογένεση και σχηματισμός κάλου σε διάφορα έκφυτα κατά την αρχική εγκατάσταση *A. andrachnoides* το μήνα Μάιο, σε WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA και $0,75 \text{ mg l}^{-1}$ NAA (α) ή $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ IBA (β). Στα υποστρώματα με IBA δεν σχηματίστηκε κάλος.

4.3.3 Αρχική εγκατάσταση *A. unedo*

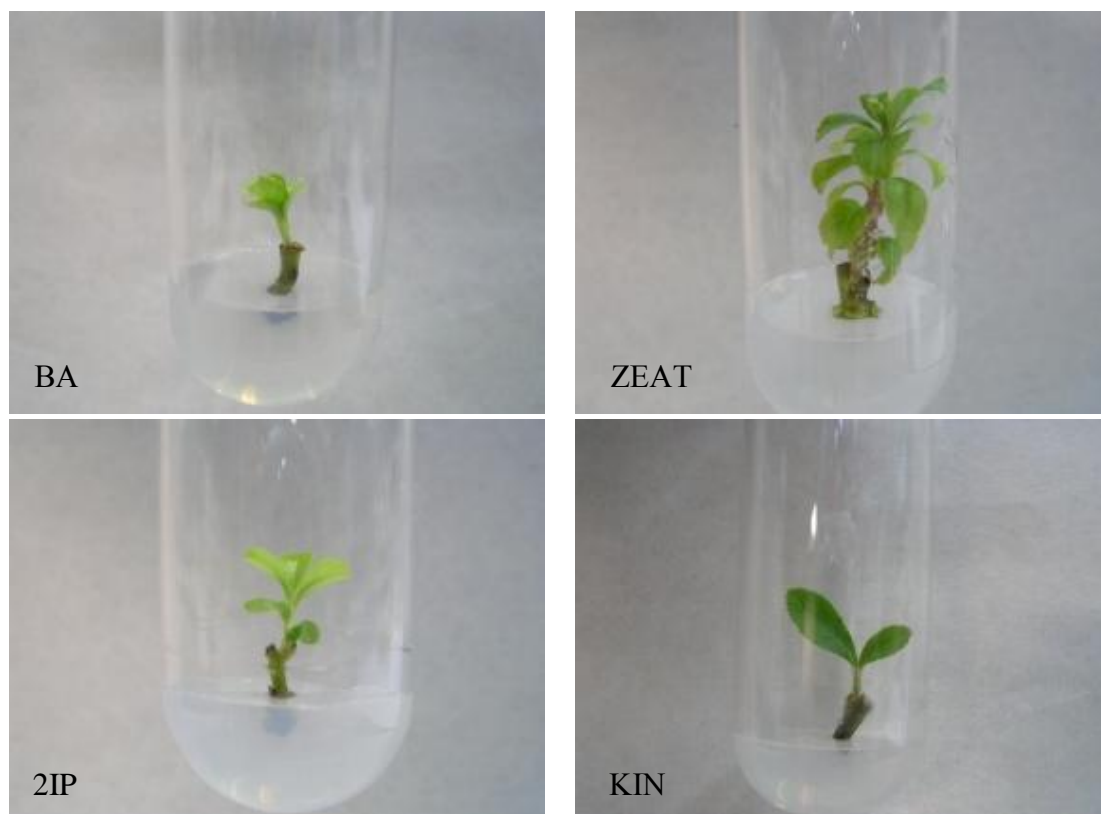
4.3.3.1 Επίδραση κυτοκινινών στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών *A. unedo*

4.3.3.1.1 Επίδραση τύπου κυτοκινίνης και εποχής στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών *A. unedo*

Το Μάιο και Σεπτέμβριο 2006, 2007, 2008 και 2010, εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών κυτοκινινών. Χρησιμοποιήθηκαν BA, ZEAT, 2IP και KIN σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹. Στις καλλιέργειες του Μαΐου χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής χωρίς ακραίο (1) και τα τέσσερα επόμενα (2, 3, 4, 5). Στις καλλιέργειες του Σεπτεμβρίου χρησιμοποιήθηκαν μόνο έκφυτα κορυφής χωρίς ακραίο. Το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν σχεδόν 100% στα υποστρώματα με ZEAT και το Σεπτέμβριο με 2IP (Πίν. 14). Ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σχηματίστηκε στις καλλιέργειες του Σεπτεμβρίου σε υποστρώματα με BA ή ZEAT, χωρίς όμως διαφορά από τις καλλιέργειες του Μαΐου σε υποστρώματα με BA. Το μεγαλύτερο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε υποστρώματα με ZEAT τον Μάιο και τον Σεπτέμβριο. Οι αρχικές καλλιέργειες του Σεπτεμβρίου και Μαΐου σε ZEAT είχαν το υψηλότερο γινόμενο πολλαπλασιασμού (Πίν. 14, Εικ. 27).

Ανεξαρτήτως εποχής, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν από 84-100% στα υποστρώματα με 2IP ή ZEAT. Ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σημειώθηκε στα υποστρώματα με BA ή ZEAT, ενώ το μέσο μήκος βλαστών ήταν υψηλότερο στα υποστρώματα με ZEAT (Σχ. 14).

Ανεξαρτήτως κυτοκινίνης, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 71-93% τον Μάιο. Δεν βρέθηκε διαφορά στον μέσο αριθμό των σχηματιζόμενων βλαστών, αλλά το μέσο μήκος ήταν μεγαλύτερο το Μάιο (Σχ. 15).



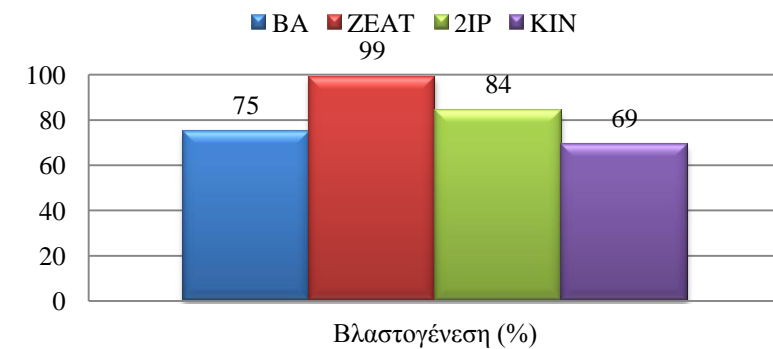
Εικ. 27. Βλαστογένεση σε έκφυτα (No 1) κατά την αρχική εγκατάσταση *A. unedo* το μήνα Μάιο, σε WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA, ZEAT, 2IP ή KIN.

Πίν.14. Επίδραση της αναγραφόμενης κυτοκίνης και της εποχής εγκατάστασης στο ποσοστό των εκφύτων *A. unedo*, που σχημάτισαν βλαστούς κατά την αρχική εγκατάσταση, καθώς και στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μήκος των βλαστών και στη δυναμικότητα πολλαπλασιασμού. Καλλιέργεια εκφύτων κορυφής χωρίς μερίστωμα σε άλατα WPM με 3% σακχαρόζη, βιταμίνες Mullin. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min, $n=22-31$.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστο- γένεση	Μέσος Αριθ. Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	ΓΙΝ Α	ΓΙΝ Β
ΚΥΤΟΚΙΝ	ΕΠΟ	(%)				/
ΙΝΗ	ΧΗ					0,6
2,5 mg l ⁻¹						
BA	M	63,00	1,4 ab	0,3 c	0,88	0,44
	Σ	87,00	1,5 a	0,3 c	1,31	0,65
ZEAT	M	100,00	1,1 b	2,0 a	1,10	3,67
	Σ	98,00	1,6 a	2,2 a	1,57	5,75
2IP	M	69,00	1,0 b	1,0 b	0,69	1,15
	Σ	98,00	1,0 b	1,1 b	0,98	1,80
KIN	M	50,00	1,0 b	0,1 c	0,50	0,08
	Σ	87,00	1,1 b	0,2 c	0,96	0,32
Ανάλυση της συνδιασποράς						
ΕΠΟΧΗ (A)			NS			
ΚΥΤΟΚ (B)			NS			
(A) X (B)			NS **			

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test σε $P=0,05$.

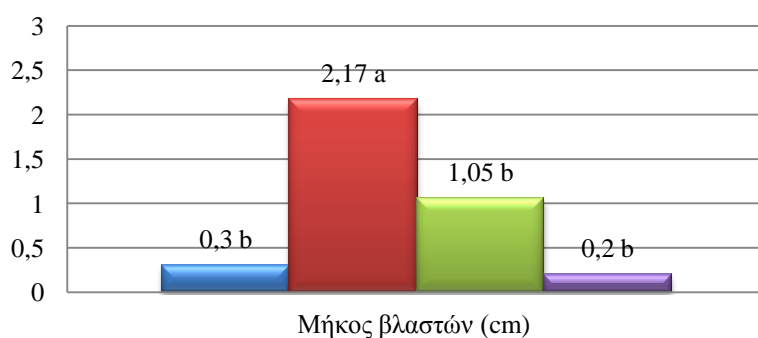
*,**: σημαντικά σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$.



α

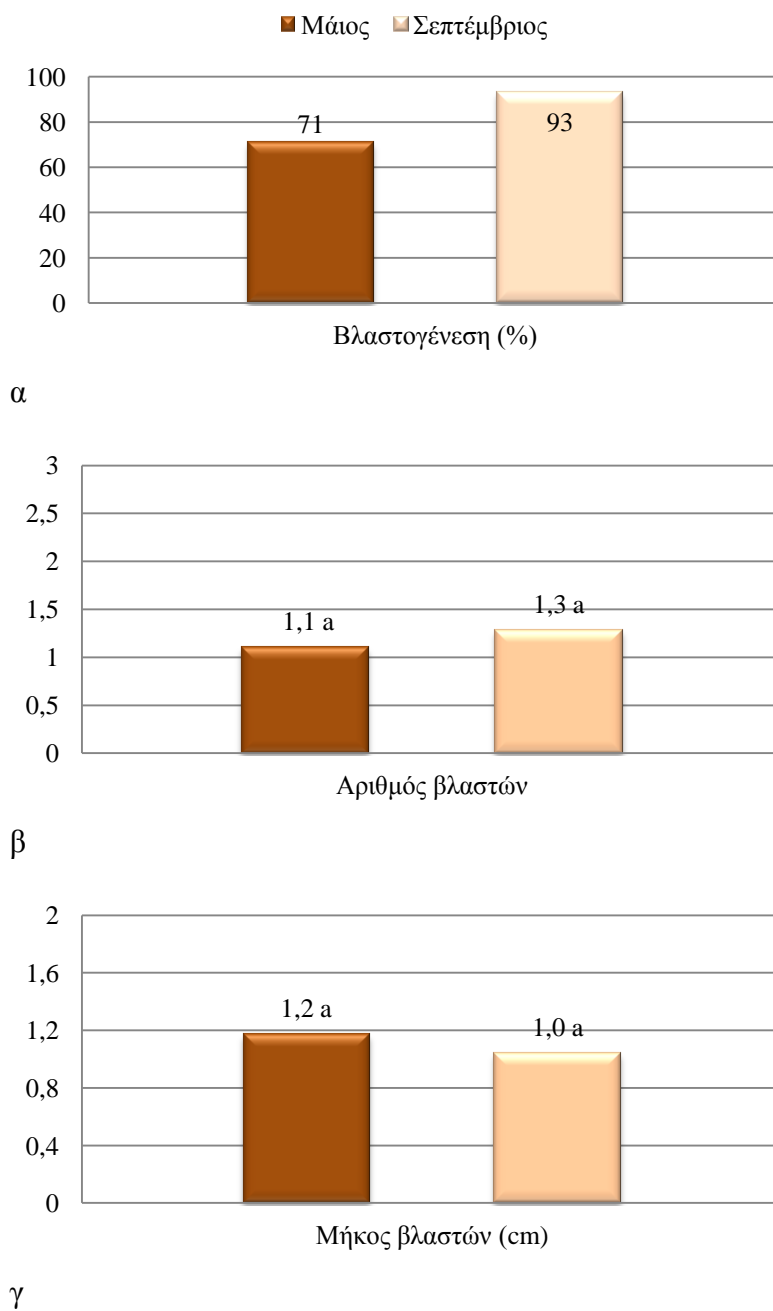


β



γ

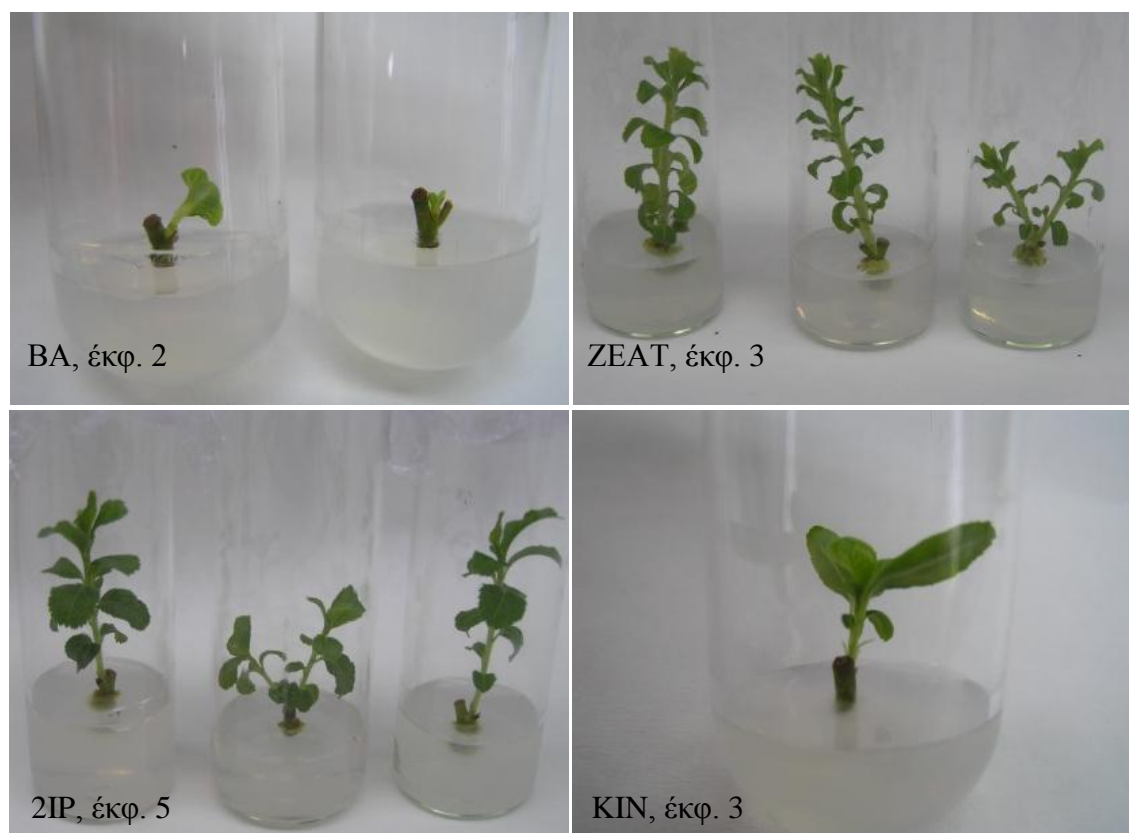
Σχ. 14. Επίδραση του είδους κυτοκινίνης στη βλαστογένεση (α), στον αριθμό (β) και στο μέσο μήκος των εκπτυχθέντων βλαστών (γ) που σχηματίστηκαν, κατά την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών *A. unedo*. Σύγκριση μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n= 33-65$.



Σχ. 15. Επίδραση της εποχής στη βλαστογένεση (α), στον αριθμό (β) και στο μέσο μήκος των εκπτυχθέντων βλαστών (γ) και στον αριθμό των φύλλων που σχηματίστηκαν κατά την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών *A. unedo*. Σύγκριση μέσω Student's test σε $P=0,05$, $n=31-169$.

4.3.3.1.2 Επίδραση της θέσης του εκφύτου στην αντίδραση κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών *A. unedo* σε διάφορες κυτοκινίνες

Το ποσοστό βλαστογένεσης κυμάνθηκε πολύ (22-100%). Η αλληλεπίδραση της κυτοκινίνης που χρησιμοποιήθηκε και της θέσης του εκφύτου στον μέσο αριθμό βλαστών ήταν σημαντική, ενώ το αντίθετο συνέβη στο μέσο μήκος βλαστών. Ο αριθμός βλαστών δεν διέφερε μεταξύ των επεμβάσεων. Το μεγαλύτερο μέσο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε έκφυτα (2 και 3) που καλλιεργήθηκαν σε υποστρώματα ZEAT χωρίς διαφορά από έκφυτα (4 και 5) στο ίδιο υπόστρωμα και έκφυτα (5) σε 2IP. Τα έκφυτα σε ZEAT και τα έκφυτα (5) σε 2IP σημείωσαν το υψηλότερο γινόμενο πολλαπλασιασμού (Πίν. 15). Ανεξαρτήτως της θέσης του εκφύτου, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 89% σε υποστρώματα με ZEAT. Δεν βρέθηκε διαφορά μεταξύ των υποστρωμάτων στον αριθμό βλαστών. Το μεγαλύτερο μήκος σημειώθηκε σε υποστρώματα με ZEAT (Σχ. 16). Ανεξαρτήτως της κυτοκινίνης που χρησιμοποιήθηκε, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν από 48-71%. Δεν βρέθηκε διαφορά στον αριθμό και μήκος βλαστών που σχηματίστηκαν. (Σχ. 17, Εικ. 28).



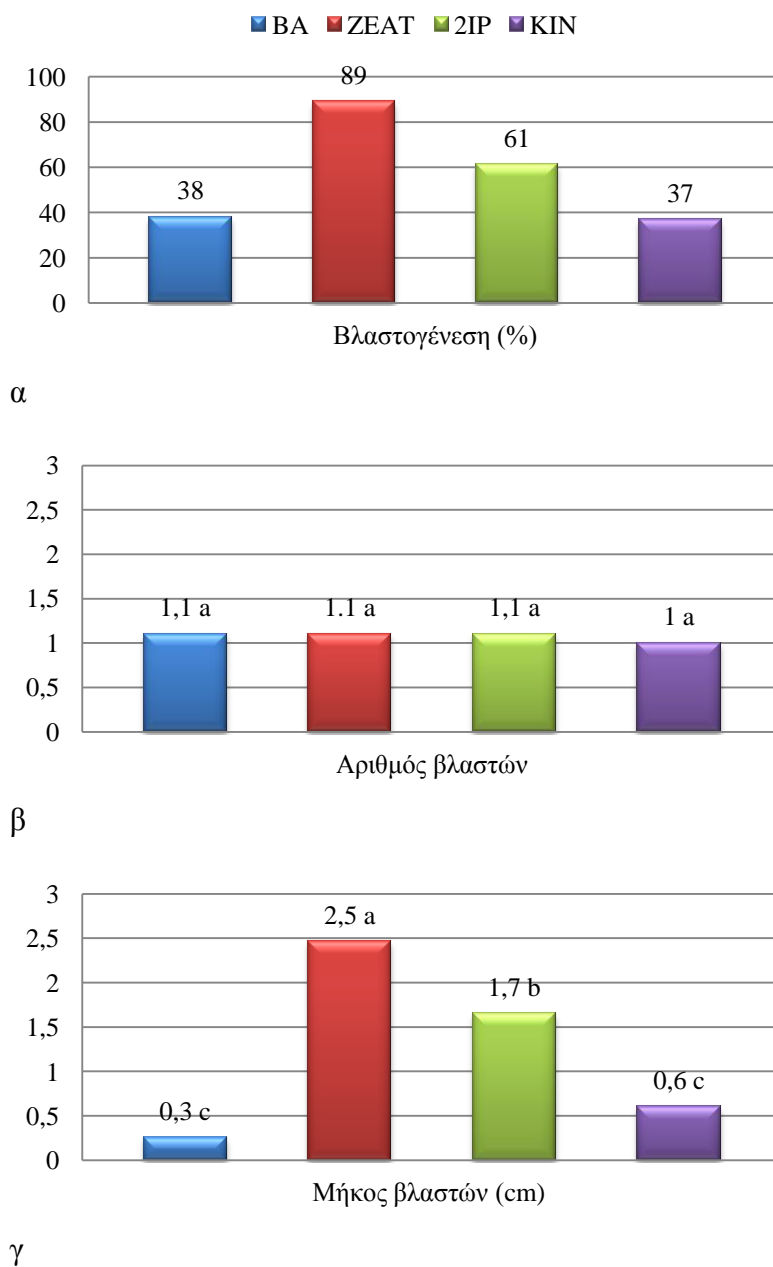
Εικ. 28. Βλαστογένεση σε διάφορα έκφυτα κατά την αρχική εγκατάσταση *A. unedo* το μήνα Μάιο, υπόστρωμα WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA, ZEAT, 2IP ή KIN.

Πίν. 15. Επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό βλαστό και της κυτοκινίνης, στο ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν δίνοντας βλαστό, στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μέσο μήκος των βλαστών, καθώς και στη δυναμικότητα πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας εκφύτων *A. unedo* σε WPM με βιταμίνες Mullin και 3% σακχαρόζη. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min. Εγκατάσταση το Μάιο 2006, 2007, 2008, 2010, $n=18-33$.

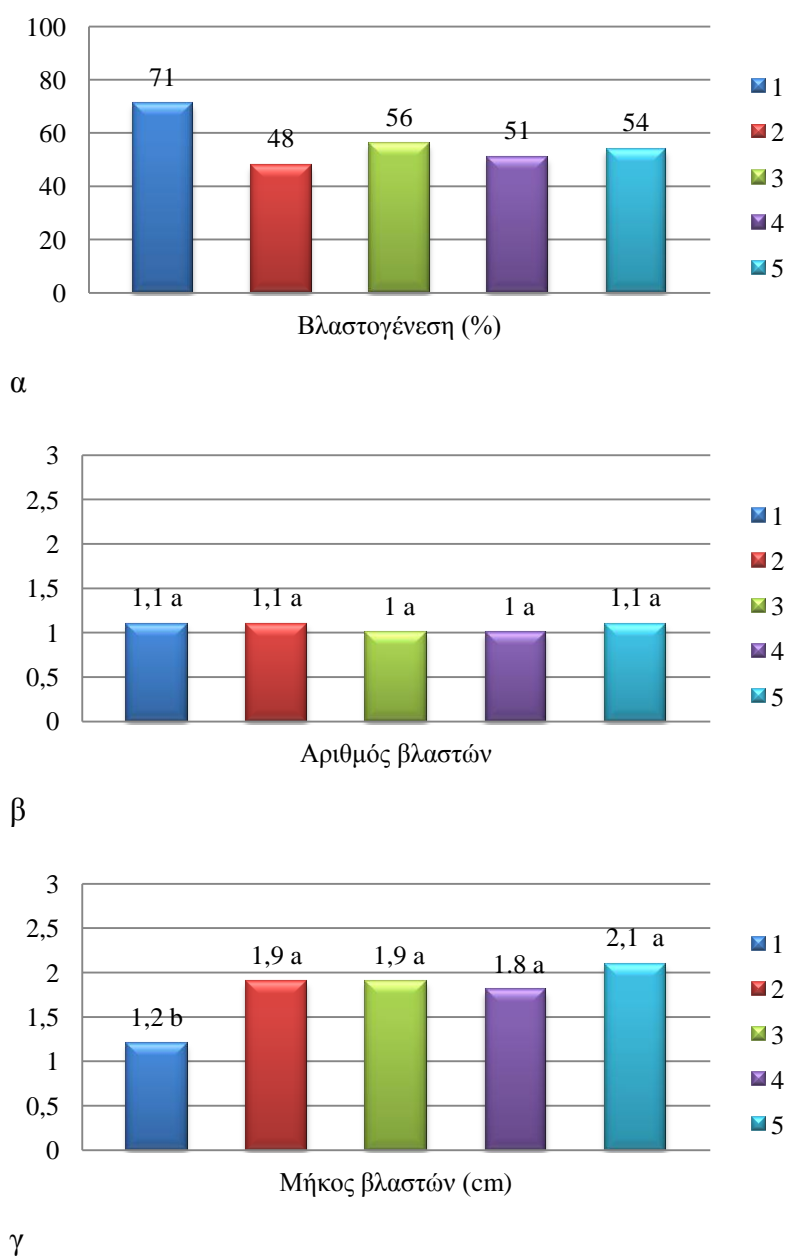
ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστο- γένεση (%)	Μέσος Αριθ. Βλαστών	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)		ΓΙΝ Α	ΓΙΝ Β / 0,6
ΚΥΤΟΚΙ ΝΙΝΗ 2,5 mg l ⁻¹	ΕΚ ΦΥ ΤΟ						
BA	1	63,00	1,4 a	0,3	g	0,88	0,50
	2	24,00	1,0 a	0,3	g	0,24	0,10
	3	44,00	1,0 a	0,2	g	0,44	0,15
	4	27,00	1,0 a	0,3	g	0,27	0,15
	5	31,00	1,0 a	0,2	g	0,31	0,09
ZEAT	1	100,00	1,1 a	2,0	bcd	1,10	3,70
	2	87,00	1,2 a	2,7	a	1,04	4,68
	3	82,00	1,1 a	2,6	a	0,90	3,97
	4	79,00	1,0 a	2,5	ab	0,79	3,23
	5	96,00	1,1 a	2,4	abc	1,06	4,17
2IP	1	69,00	1,0 a	1,0	fg	0,69	1,12
	2	50,00	1,0 a	1,4	def	0,50	1,15
	3	57,00	1,0 a	1,9	cde	0,57	1,79
	4	56,00	1,1 a	1,6	def	0,62	1,59
	5	75,00	1,3 a	2,5	abc	0,98	3,98
KIN	1	50,00	1,0 a	0,1	g	0,50	0,08
	2	29,00	1,0 a	0,8	fg	0,29	0,39
	3	41,00	1,0 a	0,5	g	0,41	0,37
	4	42,00	1,0 a	0,6	g	0,42	0,41
	5	22,00	1,0 a	0,8	efg	0,22	0,29
Ανάλυση της συνδιασποράς							
ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗ							
(A)				**			
ΕΚΦΥΤΟ (B)				NS			
(A) X (B)			**		NS		

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test σε $P=0,05$.

*, **: σημαντικά σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$.



Σχ. 16. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (α), αριθμός βλαστών (β) και μήκος βλαστών (cm) σε 4 διαφορετικές κυτοκινίνες από έκφυτα διαφορετικών κόμβων πάνω στο μητρικό βλαστό *A. unedo* το Μάιο. Σύγκριση των μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n=24-128$.



Σχ. 17. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (α), αριθμός βλαστών (β) και μήκος βλαστών (cm) (γ) σε έκφυτα από διαφορετικούς κόμβους πάνω στο μητρικό βλαστό A. x *unedo* το Μάιο. Σύγκριση των μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n=32-63$.

4.3.2.2 Επίδραση αυξίνης στην αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών *A. unedo*

Σε υποστρώματα WPM που περιείχαν $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA και $0,75 \text{ mg l}^{-1}$ NAA το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν πολύ χαμηλό (12 και 16 % το Μάιο και τον Σεπτέμβριο αντίστοιχα), με τον παράλληλο σχηματισμό κάλου (Εικ. 29). Η προσθήκη IBA σε συγκέντρωση $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ IBA επέφερε βλαστογένεση σε ποσοστό 100% χωρίς τον σχηματισμό κάλου. Οι παραγόμενοι βλαστοί και στα δύο υποστρώματα με αυξίνη ήταν κοντοί. Η αυξίνη δεν επέδρασε ούτε στον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν.



Εικ. 29. Βλαστογένεση κατά την αρχική εγκατάσταση *A. unedo* το μήνα Μάιο, σε WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA και $0,75 \text{ mg l}^{-1}$ NAA.

4.3.4 Συγκριτική παράθεση των τριών ειδών στις αρχικές καλλιέργειες

Ο μέσος αριθμός των σχηματιζόμενων βλαστών από έκφυτα κορυφής χωρίς ακραίο ήταν υψηλότερος για το *A. andrachne* σε BA τον Μάιο, χωρίς όμως διαφορά από υποστρώματα με ZEAT τον Σεπτέμβριο. Το μήκος των βλαστών στο *A. andrachne* ήταν 0,1-0,6 cm και στο *A. x andrachnoides* 0,2-1,9 cm. Το μεγαλύτερο μήκος είχαν βλαστοί *A. unedo* σε υπόστρωμα ZEAT το Σεπτέμβριο, χωρίς διαφορά από τον Μάιο. Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού είχαν έκφυτα *A. x andrachnoides* και *A. unedo* σε υποστρώματα με ZEAT τον Σεπτέμβριο και ακολούθως τον Μάιο (Πίν.16). Ο μέσος αριθμός βλαστών, ανεξαρτήτως κυτοκινίνης ήταν υψηλότερος σε έκφυτα *A. andrachne* που είχαν όμως ταυτόχρονα και το μικρότερος μήκος και αριθμό φύλλων (Σχ. 18). Ανεξαρτήτως κυτοκινίνης και εποχής, ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σχηματίστηκε από έκφυτα *A. andrachne*, που είχαν όμως ταυτόχρονα το μικρότερο μήκος και αριθμό φύλλων. Την αντίστροφη συμπεριφορά είχαν έκφυτα *A. unedo* (Σχ. 19).

Πίν. 16. Συγκριτική επίδραση της εποχής και των κυτοκινινών, σε καλλιέργεια των 3 ειδών *Arbutus*, στο ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν δίνοντας βλαστό, στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν, καθώς και στη δυναμικότητα πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας σε WPM με 3% σακχαρόζη και βιταμίνες Mullin. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 15 min. Εγκατάσταση εκφύτων κορυφής χωρίς ακραίο τον Μάιο και Σεπτέμβριο 2006, 2007, 2008, 2010, $n=18-84$.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ			Βλαστο γένεση (%)	Μέσος Αριθ. Βλαστών/Εκ φυτο	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Φύλλων	ΓΙΝ Α	ΓΙΝ Β / 0,6
Είδος	Εποχή	Κυτοκινίνη 2,5 mg l ⁻¹						
<i>A. andrachne</i>	Μάιος	BA	72,00	2,3 a	0,4 fg	4,3 defgh	1,66	1,10
		ZEAT	90,00	1,6 cdefg	0,2 gh	4,1 efgh	1,44	0,48
		2IP	88,00	1,1 efghi	0,2 gh	2,6 fgh	0,97	0,32
	Σεπτέμ βριος	KIN	55,00	1,0 fghi	0,1 h	2,1 gh	0,55	0,09
		BA	57,00	1,7 cd	0,2 gh	3,4 efgh	0,97	0,32
		ZEAT	100,00	2,2 ab	0,6 e	7,2 d	2,20	2,20
<i>A. x andrachnooides</i>	Μάιος	2IP	95,00	1,1 fghi	0,5 ef	5,8 de	1,05	0,87
		KIN	36,00	1,0 fghi	0,2 gh	1,6 gh	0,36	0,12
		BA	97,00	1,7 cd	0,4 fg	3,0 gh	1,65	1,10
	Σεπτέμ βριος	ZEAT	100,00	1,3 efgh	1,9 b	15,4 b	1,30	4,12
		2IP	100,00	1,1 fghi	0,5 ef	4,0 efg	1,10	0,92
		KIN	60,00	1,0 fghi	0,2 gh	2,3 gh	0,60	0,20
<i>A. unedo</i>	Μάιος	BA	58,00	1,2 efghi	0,4 efgh	5,5 def	0,70	0,46
		ZEAT	100,00	2,0 bc	1,6 c	14,4 b	2,00	5,33
		2IP	96,00	1,6 cde	1,0 d	9,4 c	1,54	2,56
	Σεπτέμ βριος	KIN	43,00	1,0 fghi	0,3 gh	3,7 efgh	0,43	0,22
		BA	63,00	1,4 cdefghi	0,3 efgh	3,9 efgh	0,88	0,44
		ZEAT	100,00	1,1 fghi	2,0 ab	17 ab	1,10	3,67
<i>A. unedo</i>	Μάιος	2IP	69,00	1,0 fghi	1,0 d	6,0 de	0,69	1,15
		KIN	50,00	1,0 fghi	0,1 h	1,0 h	0,50	0,08
		BA	87,00	1,5 defg	0,3 gh	3,7 efgh	1,31	0,65
	Σεπτέμ βριος	ZEAT	98,00	1,6 de	2,2 a	19,1 a	1,57	5,75
		2IP	98,00	1,0 i	1,1	9,8 c	0,98	1,80
		KIN	87,00	1,1 fghi	0,2 gh	3,1 gh	0,96	0,32

Ανάλυση της συνδιασποράς

Είδος (A)

Εποχή (B)

Κυτοκινίνη (Γ)

(A) X (B)

(A) X (Γ)

(B) X (Γ)

(A) X (B) X (Γ)

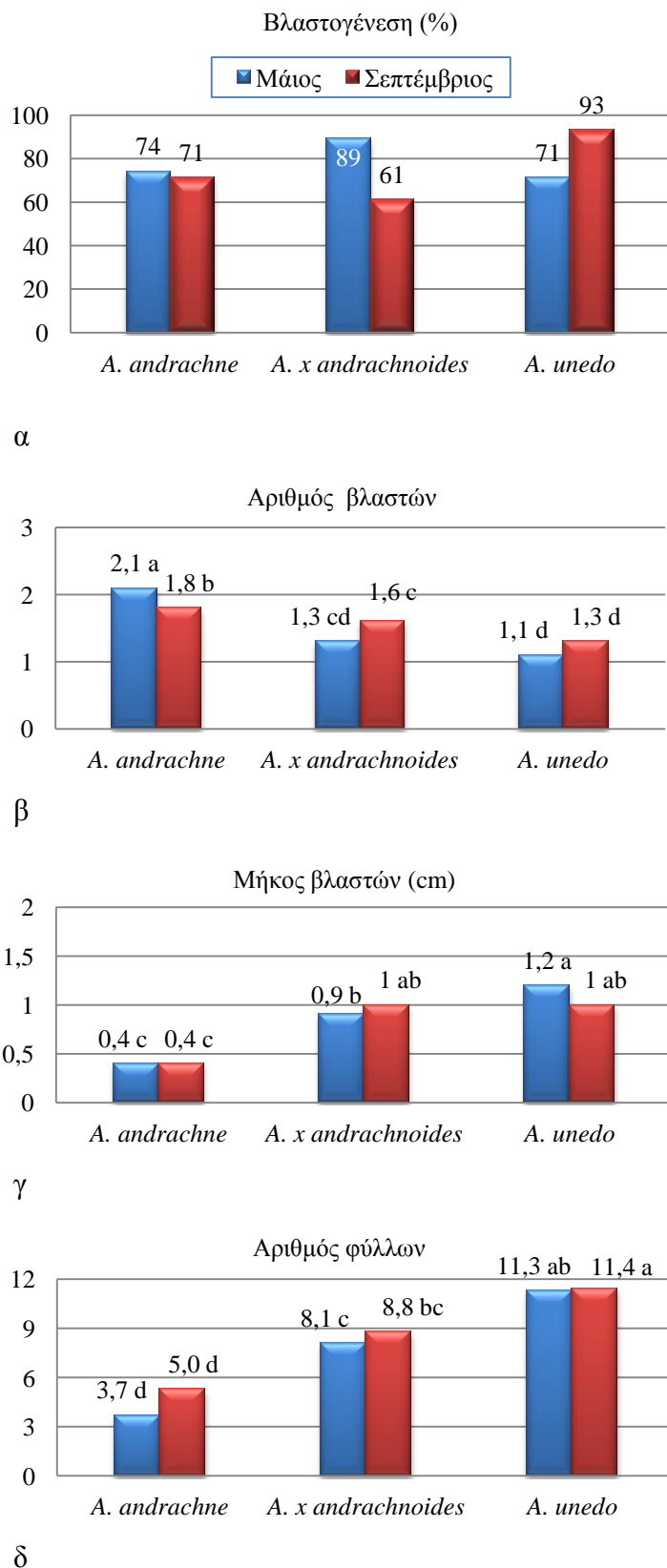
**

**

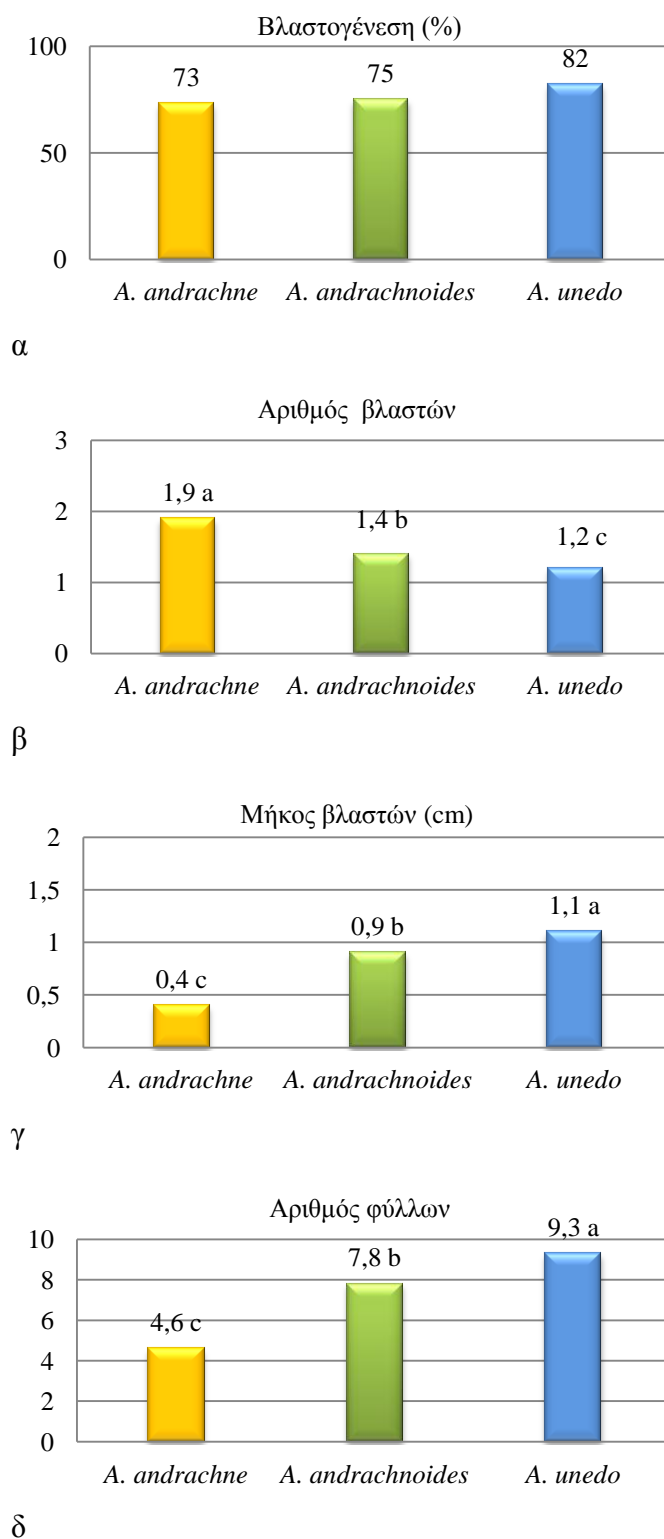
**

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test σε $P=0,05$.

*, **: σημαντικά σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$.



Σχ. 18. Βλαστογένεση (α), αριθμός βλαστών (β), μέσο μήκος (γ) και αριθμός φύλλων (δ) από έκφυτα κορυφής χωρίς ακραίο των *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* το Μάιο και Σεπτέμβριο του 2006, 2007, 2008, 2010, $n=40-169$.



Σχ. 19. Βλαστογένεση (α), αριθμός βλαστών (β), μέσο μήκος (γ) και αριθμός φύλλων (δ) από έκφυτα κορυφής χωρίς ακραίο των *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* τα έτη 2006, 2007, 2008, 2010, $n=172-226$.

Το μήνα Μάιο των ετών 2006, 2007, 2008 και 2010, ανεξαρτήτως της θέσης των εκφύτων στο μητρικό βλαστό, ο υψηλότερος μέσος αριθμός βλαστών προήλθε από έκφυτα *A. andrachne* που καλλιεργήθηκαν σε ΒΑ. Το μεγαλύτερο μήκος και αριθμό φύλλων είχαν οι βλαστοί *A. x andrachnoides* και *A. unedo* που σχηματίστηκαν σε υπόστρωμα με ΖΕΑΤ, καθώς και το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας, το οποίο ήταν περίπου διπλάσιο από το δυναμικό πολλαπλασιασμού εκφύτων *A. andrachne* στο ίδιο υπόστρωμα (Πίν.17).

Στο σύνολο των φυτορυθμιστικών ουσιών, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 54% για το *A. unedo*, ενώ στο *A.andrachne* και *A. x andrachnoides* ήταν 80 και 74% αντίστοιχα. Το *A. andrachne* σχημάτισε το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών, αλλά οι βλαστοί είχαν το μικρότερο μήκος. Το *A. unedo* σχημάτισε το μεγαλύτερο μήκος βλαστών και αριθμό φύλλων (Σχ. 20).

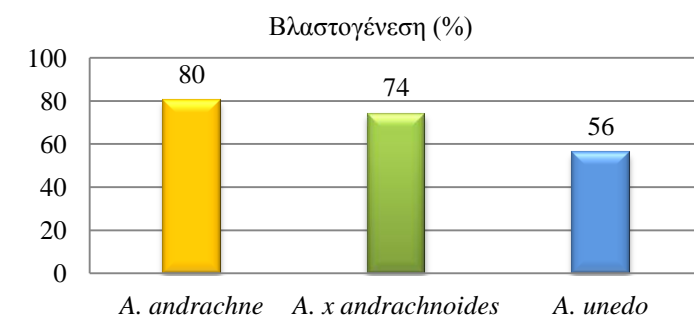
Μελετώντας συγκριτικά το δυναμικό πολλαπλασιασμού (B) των τριών ειδών στις τέσσερις κυτοκινίνες που χρησιμοποιήθηκαν (Σχ. 21, 22) διακρίνεται η υπεροχή της ΖΕΑΤ, ιδίως στα *A. unedo* και *A. x andrachnoides*.

Πίν.17. Συγκριτική επίδραση των κυτοκινινών BA, ZEAT, 2IP και KIN σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹, σε καλλιέργεια των 3 ειδών *Arbutus*, στο ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν δίνοντας βλαστό, στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μέσο μήκος των βλαστών, καθώς και στη δυναμικότητα πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας σε WPM με 3% σακχαρόζη και βιταμίνες Mullin. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min. Εγκατάσταση εκφύτων από τις θέσεις 1-5 τον Μάιο 2006, 2007, 2008, 2010, n=40-189.

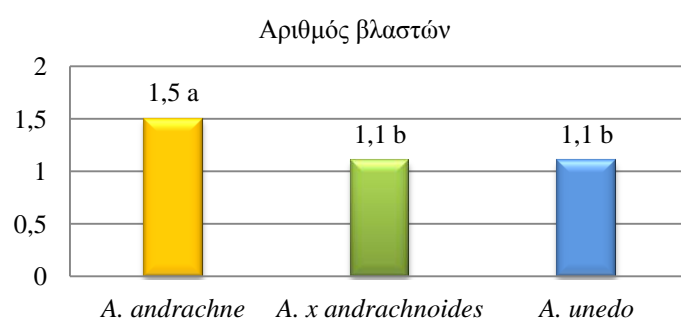
ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστ ογένε ση (%)	Μέσος Αριθ. Βλαστών /Έκφυτο	Μέσο Μήκος Βλαστών (cm)	Μέσος Αριθμός Φύλλων	GIN A	GIN B / 0,6		
ΕΙΔΟΣ	ΚΥΤΟΚΙ NINH 2,5 mg l ⁻¹								
<i>A. andrach</i>	BA	86,00	2,0 a	0,4	ef	4,4	ef	1,72	1,15
	ZEAT	87,00	1,2 bc	1,3	c	13,8	b	1,04	2,26
	2IP	90,00	1,0 cd	0,6	e	6,2	d	0,90	0,90
	KIN	57,00	1,0 d	0,3	f	3,4	fg	0,57	0,29
<i>A. x</i>	BA	69,00	1,3 b	0,5	e	4,2	efg	0,90	0,75
	ZEAT	86,00	1,2 bcd	2,4	a	15,2	a	1,03	4,13
	2IP	80,00	1,0 d	0,8	d	5,1	de	0,80	1,07
	KIN	60,00	1,0 d	0,3	f	2,7	g	0,60	0,30
<i>A. unedo</i>	BA	38,00	1,1 bcd	0,3	f	3,5	efg	0,42	0,21
	ZEAT	89,00	1,1 cd	2,4	a	16,4	a	0,98	3,92
	2IP	61,00	1,1 cd	1,5	b	9,4	c	0,67	1,68
	KIN	37,00	1,0 d	0,4	ef	3,7	efg	0,37	0,25
Ανάλυση της συνδιασποράς									
Είδος (A)									
Κυτοκινίνη (B)									
(A) X (B)			**	**	**				

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student's test σε P=0,05.

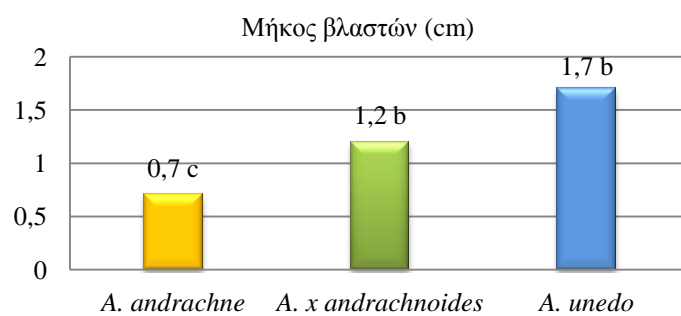
*, **: σημαντικά σε P=0,05, P=0,01, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε P=0,05.



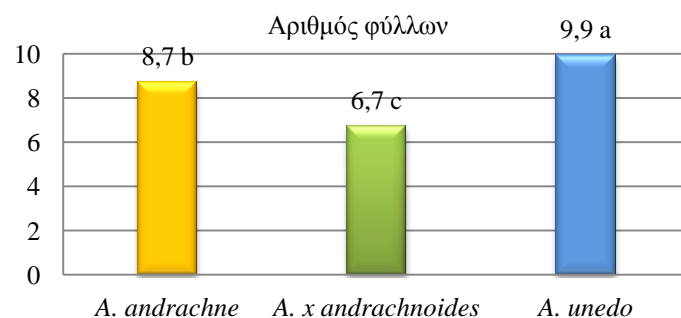
α



β

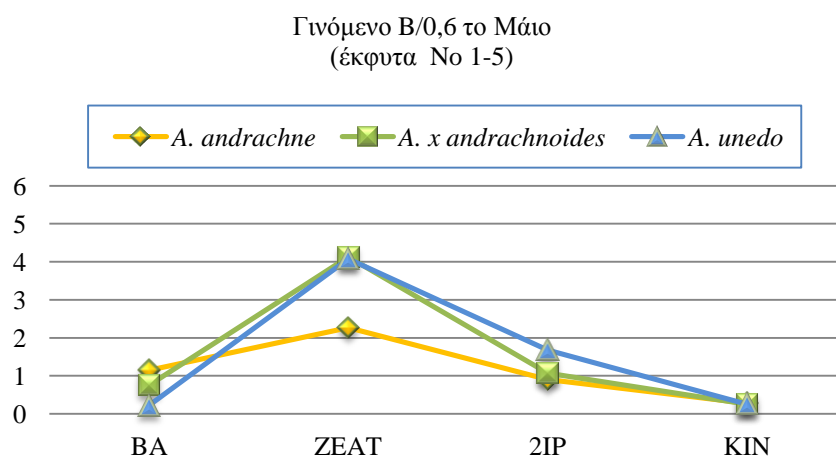


γ

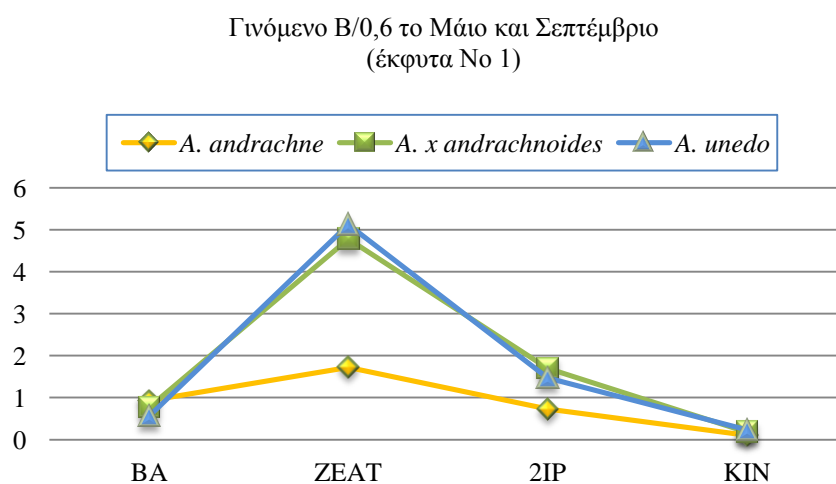


δ

Σχ. 20. Βλαστογένεση (α), αριθμός βλαστών (β), μέσο μήκος (γ) και αριθμός φύλλων (δ) από έκφυτα από τις θέσεις 1-5 των *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* τα έτη 2006, 2007, 2008, 2010, $n=285-430$.



Σχ. 21. Δυναμικό πολλαπλασιασμού (ποσοστό βλαστογένεσης X αριθμός βλαστών X μήκος βλαστών) εκφύτων από τις θέσεις 1-5, σε αρχική εγκατάσταση σε WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA, ZEAT, 2IP ή KIN των *A. Andrachne*, *A. x Andrachnoides* και *A. unedo* τα έτη 2006, 2007, 2008 (Μάιος).



Σχ. 22. Δυναμικό πολλαπλασιασμού (ποσοστό βλαστογένεσης X αριθμός βλαστών X μήκος βλαστών) εκφύτων από τη θέση 1, σε αρχική εγκατάσταση σε WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA, ZEAT, 2IP ή KIN των *A. Andrachne*, *A. x Andrachnoides* και *A. unedo* τα έτη 2006, 2007, 2008 (Μάιος και Σεπτέμβριος αθροιστικά).

4.3.5 Χειμερινή αρχική καλλιέργεια

Το Δεκέμβριο του 2006 εγκαταστάθηκε καλλιέργεια εκφύτων 1-5, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* σε WPM με 2,5 mg I⁻¹ ZEAT. Αρχική καλλιέργεια *A. andrachne* δεν κατέστη δυνατό να εγκατασταθεί με επιτυχία, εξ' αιτίας των μολύνσεων. Τα δύο είδη που εγκαταστάθηκαν δε διέφεραν στη βλαστογένεση, στον αριθμό βλαστών και φύλλων ή στο μέσο μήκος βλαστού (Πίν.18).

Πίν. 18. Συγκριτική επίδραση ZEAT σε συγκέντρωση 2.5 mg I⁻¹, σε καλλιέργεια *A. x andrachnoides* και *A. unedo*, στο ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν δίνοντας βλαστό, στον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν, καθώς και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας. Καλλιέργεια σε άλατα WPM με 3% σακχαρόζη και βιταμίνες Mullin. Απολύμανση εκφύτων με 30% χλωρίνη για 10 min. Εγκατάσταση εκφύτων από τις θέσεις 1-5 το Δεκέμβριο 2006, n=24-40.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ	Βλαστο	Μέσος	Μέσο	Μέσος	GIN A	GIN B
	-	Αριθ.	Μήκος	Αριθμός		/
	γένεση	Βλαστών	Βλαστών	Φύλλων		0,6
	(%)	/Έκφυτο	(cm)			
<i>A. andrachne</i> *	-	-	-	-		
<i>A. x andrachnoides</i>	100,00	1,7 a	1,1 a	6,8 a	1,70	3,06
<i>A. unedo</i>	90,00	1,7 a	1,2 a	7,5 a	1.53	2,95

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student's test σε P=0,05.

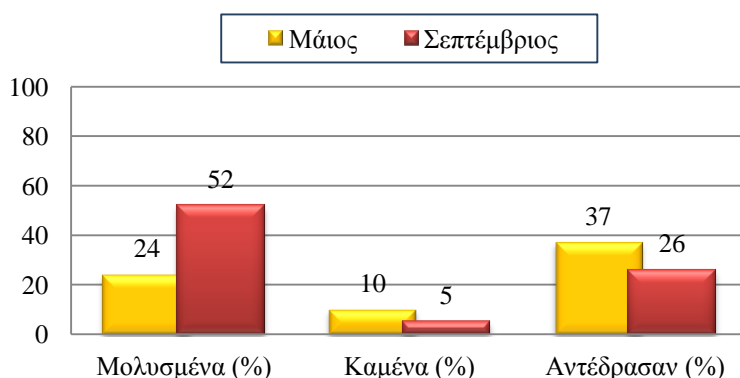
*: δεν κατέστη δυνατή η εγκατάσταση λόγω μολύνσεων.

4.3.6 Συγκριτική εξέταση ποσοστού επιβίωσης και βλαστογένεσης

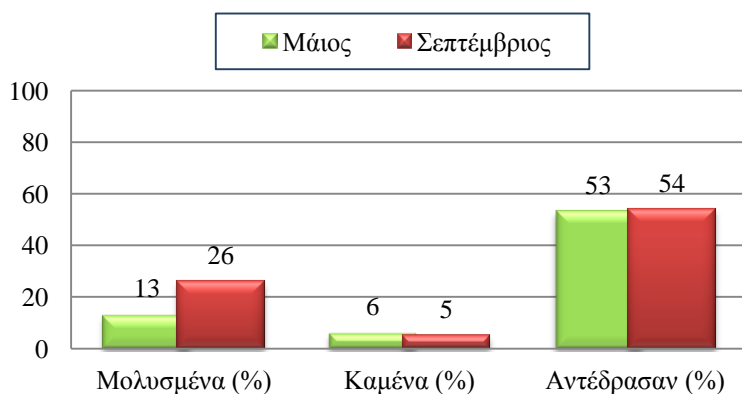
Στα Σχήματα 23, 24, 25 παρουσιάζονται συγκριτικά τα ποσοστά εκφύτων των τριών ειδών *Arbutus* που είτε κάηκαν κατά την απολύμανση, είτε μολύνθηκαν, είτε επιβίωσαν και αντέδρασαν σχηματίζοντας βλαστούς. Το ποσοστό των εκφύτων (έκφυτα 1-5) που αντέδρασε σε όλα συνολικά τα υποστρώματα που ελέγχθηκαν τα

έτη 2006-2010, το μήνα Μάιο ήταν 37% (κυμάνθηκε καθ' έτος από 17-68% επί του συνόλου των εκφύτων) για το *A. andrachne*, 53% (κυμάνθηκε καθ' έτος από 26-72% επί του συνόλου των εκφύτων) για το *A. x andrachnoides* και 31% (κυμάνθηκε καθ' έτος από 20-40% επί του συνόλου των εκφύτων) για το *A. unedo* (επί του συνόλου των εκφύτων που καλλιεργήθηκαν). Ομοίως και το Σεπτέμβριο, τα έκφυτα (έκφυτα 1), το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 26% επί του συνόλου (κυμαινόμενο από 20-28% επί του συνόλου) για το *A. andrachne*, 54% (κυμαινόμενο καθ' έτος από 21-72%) για το *A. x andrachnoides* και 43% (κυμαινόμενο καθ' έτος από 31-67%) για το *A. unedo* (επί του συνόλου των εκφύτων που καλλιεργήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων των εκφύτων που μολύνθηκαν ή δεν αντέδρασαν).

Λιγότερες μολύνσεις εμφάνισε το *A. x andrachnoides* και περισσότερες το *A. andrachne*, ενώ μεγαλύτερη ευασθησία στην απολύμανση εμφάνισαν τα έκφυτα το Μάιο σε σχέση με το Σεπτέμβριο, ιδίως αυτά του *A. unedo*. Μεγαλύτερα ποσοστά αντίδρασης είχαν τα *A. x andrachnoides* (Σχ 24).

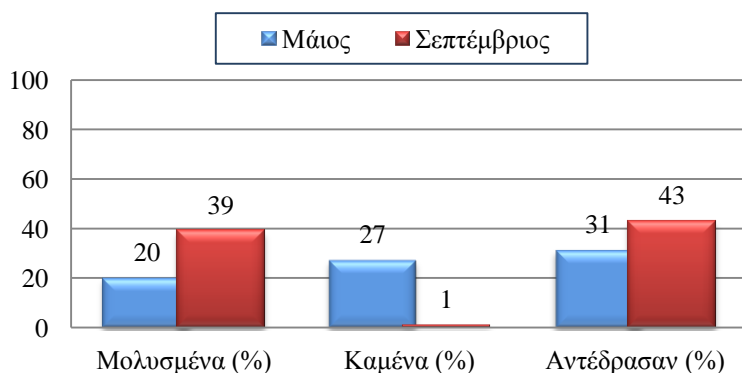


Σχ. 23. Ποσοστό εκφύτων *A. andrachne* που μολύνθηκε, κήκε στην απολύμανση ή αντέδρασε σχηματίζοντας βλαστό, κατά την αρχική εγκατάσταση, τον Μάιο, ($n=964$, έκφυτα 1-5) και Σεπτέμβριο ($n=964$, έκφυτα 1) για τα έτη 2006, 2007, 2008, 2010.



α

Σχ. 24. Ποσοστό εκφύτων *A. x andarchnoides* που μολύνθηκε, κήκε στην απολύμανση ή αντέδρασε σχηματίζοντας βλαστό, κατά την αρχική εγκατάσταση, τον Μάιο ($n=964$, έκφυτα 1-5) και Σεπτέμβριο ($n=964$, έκφυτα 1) για τα έτη 2006, 2007, 2008, 2010.



Σχ. 25. Ποσοστό εκφύτων *A. unedo* που μολύνθηκε, κήκε στην απολύμανση ή αντέδρασε σχηματίζοντας βλαστό, κατά την αρχική εγκατάσταση, τον Μάιο, ($n=964$, έκφυτα 1-5) και Σεπτέμβριο ($n=964$, έκφυτα 1) για τα έτη 2006, 2007, 2008, 2010.

4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι μολύνσεις των αρχικών καλλιεργειών του *Arbutus andrachne*, ήταν πρόβλημα μείζονος σημασίας το οποίο αναφέρεται ότι παρατηρείται πολύ συχνά σε *in vitro* εγκαταστάσεις καλλιεργειών από ενήλικα ενήλικα ξυλώδη φυτά (Nejad, 2005). Οι μολύνσεις ήταν περιοριστικός παράγοντας για την επιτυχή εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας στο γένος *Vaccinium* (Ericaceae), παράγοντας που ποικίλει ακόμα και μεταξύ ποικιλιών του ίδιου είδους (Serres *et al.*, 1994, Jaakola *et al.*, 2001). Στην παρούσα μελέτη περισσότερες μολύνσεις εμφάνισε το *A. andrachne* (Σχ. 23) και λιγότερες το *A. x andrachnoides* (Σχ. 24). Μολύνσεις που έφθαναν σε πολύ υψηλό ποσοστό (80%) αναφέρονται από τους Lakshmanan *et al.* (1997) κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *Ixora coccinea* L. Στην αρχική καλλιέργεια του *Ceratonia siliqua* επίσης αναφέρεται η ολοκληρωτική καταστροφή και απώλεια των εκφύτων από μολύνσεις τους μήνες Νοέμβριο-Δεκέμβριο (Romano *et al.*, 2002) και παρόμοια οι Chitra and Padmaja (2002) συσχέτισαν τους χειμερινούς μήνες με την έξαρση των μολύνσεων των αρχικών καλλιεργειών *Morus alba* L.. Οι Schoene and Yeager (2005) αντιμετώπισαν παρόμοια προβλήματα κατά την εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας *Viburnum odoratissimum*. Το Σεπτέμβριο το ποσοστό των καμένων από την απολύμανση εκφύτων ήταν πολύ μικρό, σχεδόν μηδενικό μικρό (1-5%) και για τα τρία είδη *Arbutus* (Σχ. 23, 24, 25), κάτι που αποδίδεται στην μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην απολύμανση που είχαν αποκτήσει οι ιστοί καθώς είχε προχωρήσει η ξυλοποίησή τους. Τον Μάιο το ποσοστό των καμένων εκφύτων ήταν μεταξύ 6-27% στα τρία είδη, και των μολυσμένων 13-24%, γεγονός που δείχνει ότι το πρωτόκολλο απολύμανσης που χρησιμοποιήθηκε (βλ. 4.2.2) ισορρόπησε με επιτυχία μεταξύ της αποτυχίας της εγκατάστασης από μολύνσεις και της καταστροφής των εκφύτων από την ισχύ του απολυμαντικού μέσου.

Στα ξυλώδη φυτά, οι ενδογενείς ορμόνες, είναι γνωστό ότι έχουν ρόλο σε αρκετές φυσιολογικές διεργασίες και ότι επηρεάζουν την ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την απόδοση. Οι αυξίνες που παράγονται στα μεριστώματα (βλαστών και ριζών) μετακινούνται στα χαμηλότερα σημεία των βλαστών και προάγουν την επιμήκυνση των κυττάρων. Προάγουν επίσης την παραγωγή άλλων ορμονών και σε συνδυασμό με τις κυτοκινίνες ελέγχουν την ανάπτυξη των βλαστών, των ριζών, των ανθέων και των καρπών. Η πιο γνωστή κύρια επίδραση των κυτοκινινών που συντίθενται στις ρίζες, είναι η προώθηση της κυτταρικής διαίρεσης,

της βλαστογένεσης και η διαφοροποίηση των πλευρικών οφθαλμών (Muradoglou, *et al.*, 2010).

Η προσθήκη BA σε συγκέντρωση $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ στο υπόστρωμα κατά την αρχική καλλιέργεια *A. andrachne* είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μεγαλύτερου αριθμού βλαστών σε σχέση με τη συνδυασμένη χρήση BA και NAA σε διάφορες συγκεντρώσεις, η οποία οδήγησε σε μικρότερη παραγωγή βλαστών, ενώ δεν επέφερε την επιδιωκόμενη επιμήκυνση (Πίν. 3, 5). Ο Mackay (1996) παρόμοια, είχε διερευνήσει την δυνατότητα αρχικής εγκατάστασης εκφύτων του *Arbutus xalapensis* H.B.K σε WPM με BA (0,5, 1, 2,5, 5, ή 10 mg l^{-1}) και NAA (0, 0,1, ή 1 mg l^{-1}) σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς και διαπίστωσε ότι θρεπτικό υπόστρωμα με 2,5 ή 5 mg l^{-1} BA, χωρίς την προσθήκη NAA, ήταν το πλέον κατάλληλο. Παρόμοια συμπεριφορά στα υποστρώματα αρχικής καλλιέργειας είχαν και άλλα φυτά της οικογένειας Ericaceae, *Oxydendrum arboreum*, *Kalmia latifolia*, *Vaccinium* sp. (Banko and Stefani, 1989, Chandler and Draper, 1986, Hosier *et al.*, 1985, Lloyd and McCown, 1980, Lyrene, 1978, 1980, Wolfe *et al.*, 1983), στα οποία μάλιστα παρατηρήθηκε ότι το NAA είχε αρνητική επίδραση στο μήκος και στον αριθμό των μικροβλαστών. Παρόμοια δυσμενή επίδραση του NAA είχαν διαπιστώσει και οι Λιμνιάτης *et al.* (2001) στην αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας *A. unedo*. Η δυσμενής επίδραση του NAA θα μπορούσε να αποδοθεί στην μείωση των επιπέδων των ενδογενών κυτοκινινών, συμπεράσμα στο οποίο κατέληξαν οι Vancova *et al.* (1992) αναφέροντας σχετικά ότι η προσθήκη της συνθετικής αυξίνης NAA οδήγησε σε μείωση τα επίπεδα του ενδογενούς 2IP και ZEAT σε κύτταρα καπνού.

Οι Mereti *et al.* (2002), για την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας *A. unedo* χρησιμοποίησαν με επιτυχία WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA. Σε WPM που περιείχε $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ σχηματίστηκαν 2,2 βλαστοί ανά έκφυτο, με μέσο μήκος 1,04 cm και όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση του BA σε $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ σχηματίστηκαν μεν περισσότεροι βλαστοί (3,7), αλλά μειώθηκε το μήκος σε 0,88 cm (όχι όμως σημαντικά). Στην μικρότερη όμως συγκέντρωση BA οι αξιοποιήσιμοι βλαστοί (λόγω ικανοποιητικής επιμήκυνσης) ήταν περισσότεροι. Οι Gomes *et al.* (2010) χρησιμοποίησαν επίσης για την αρχική εγκατάσταση διαφορετικών γενότυπων *Arbutus unedo* BA σε συγκέντρωση $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA. Το BA ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και για την αρχική εγκατάσταση του *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boissier and Reuter) Handel-Mazzeti, (Almeida *et al.*, 2005).

Η αρχική καλλιέργεια εκφύτων *A. andrachne*, κορυφής χωρίς ακραίο ή βάσης, σε WPM με BA και NAA σε διάφορους συνδυασμούς το Μάιο (αρχή της βλαστικής περιόδου) οδήγησε σε υψηλότερο ποσοστό εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς, καθώς και αριθμό βλαστών ανά έκφυτο, σε σχέση με την εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών το Σεπτέμβριο (τέλος της βλαστικής περιόδου) (Πίν. 8). Οι βλαστοί όμως που σχηματίζονταν δεν επιμηκύνονταν και τις περισσότερες φορές ήταν ακατάλληλοι για υποκαλλιέργεια.

Η χρήση BA σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹ επέφερε βελτίωση στο δυναμικό πολλαπλασιασμού των αρχικών καλλιεργειών, ειδικά τον Μάιο, που παρατηρείτο υψηλότερο ποσοστό αντίδρασης και σχηματισμός μεγαλύτερου αριθμού βλαστών (Πίν. 9). Το πρόβλημα όμως που έπρεπε να επιλυθεί ήταν η μη επιμήκυνση των βλαστών. Οι George and De Klerk (2008), αναφέρουν ότι αν τα επίπεδα της κυτοκινίνης είναι πολύ υψηλά, μπορεί να σχηματιστούν υπερενυδατωμένοι ή κοντοί βλαστοί ή να εκπτυχθούν φύλλα ασυνήθιστου σχήματος. Όταν όμως στην μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε μικρότερη συγκέντρωση BA, η βλαστογένεση δεν βελτιώθηκε (Σχ. 1, Πίν. 7).

Γενικά, η επίδραση των κυτοκινινών στην καλλιέργεια εκφύτων κόμβων από βλαστούς, μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία του φυτού, το είδος της κυτοκινίνης και από την προέλευση του εκφύτου (από νεανικό ή ενήλικο ιστό) (Coleman and Ernst, 1989, George and De Klerk, 2008). Το TDZ αν και έχει εισαχθεί από ετών στην αρχική καλλιέργεια ξυλωδών φυτών της οικογένειας Oleaceae (Einset and Alexander, 1985), σε πολλές ποικιλίες αζαλέας (*Rhododendron*, οικ. Ericaceae) που χρησιμοποιήθηκε οδήγησε στο σχηματισμό κοντών και παραμορφωμένων βλαστών (Briggs *et al.*, 1988). Η προσθήκη TDZ στην αρχική καλλιέργεια του *A. andrachne* είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό παραμορφωμένων φύλλων που ίσως να οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση κυτοκινινών, (George and De Klerk, 2008).

Οι El-Sayed *et al.* (2010), αναφέρουν σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα ότι εγκατέστησαν επιτυχώς αρχική καλλιέργεια *A. unedo* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες. Σε δικά μας προκαταρκτικά πειράματα και για τα τρία είδη, δεν στάθηκε δυνατή η εγκατάσταση εκφύτων σε θρεπτικό υπόστρωμα MS. Τα έκφυτα καφέτιαζαν και καταστρέφονταν από οξειδωτικό στρες μέσα σε διάστημα τριών εβδομάδων, σύμφωνα με τη Mereti *et al.* (2002) για το *A. unedo*.

Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι η ZEAT σε συγκέντρωση $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ αύξησε το δυναμικό πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών καθώς αύξησε το ποσοστό βλαστογένεσης και τον αριθμό των σχηματιζόμενων βλαστών, κυρίως όμως προκάλεσε την επιμήκυνση των βλαστών (Πίν. 7, Σχ. 1). Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με τις αναφορές που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για την αποτελεσματικότητα της ZEAT στην αρχική εγκατάσταση εκφύτων ειδών της οικογένειας Ericaceae. Οι Bamko and Stefani (1989) σε καλλιέργεια εγκατάστασης *Oxydendrum arboretum* από ενήλικα φυτά, αναφέρουν ως αποτελεσματική τη χρήση ZEAT σε συγκέντρωση $0,9 \text{ mg l}^{-1}$ σε σύγκριση με BA ή 2IP στην ίδια συγκέντρωση. Οι Norton and Norton (1985) είχαν επίσης διαπιστώσει την αναποτελεσματικότητα του BA σε είδη του γένους *Vaccinium*. Οι Reed and Abdelnour-Esquivel (1991) διαπίστωσαν την αποτελεσματικότητα της ZEAT σε 22 είδη του γένους *Vaccinium*, γένος στο οποίο έχει διερευνηθεί πολύ, λόγω οικονομικού ενδιαφέροντος, ο *in vitro* πολλαπλασιασμός και απαντούν αρκετές ακόμα αναφορές για τη χρήση της ZEAT σε υποστρώματα αρχικής εγκατάστασης (Eccher and Noe, 1989, Reed *et al.*, 1991, Ostrolucká *et al.*, 2002, Gajdosova *et al.*, 2006, Meiners *et al.*, 2007, Debnath, 2008, Tetsumura *et al.*, 2008, Sedlak, and Paprstein, 2009). Η ZEAT ήταν εξίσου αποτελεσματική με το 2IP στην αρχική εγκατάσταση των *Vaccinium myrtillus* L., *V. vitis-idaea* L. (Jaakola *et al.*, 2001). Όπου είναι δυνατόν για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του γένους *Vaccinium* χρησιμοποιείται το 2IP λόγω του μικρότερου κόστους σε σύγκριση με τη ZEAT (Eccher and Noe, 1989). Οι Economou and Read (1984) σε τροποποιημένο υπόστρωμα MS είχαν χρησιμοποιήσει 2IP για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό αζαλέας (Minnesota *Rhododendron*).

Η ευνοϊκή επίδραση της ZEAT στην παραγωγή βλαστών ικανού μήκους εκφύτων ήταν ισχυρότερη στην αρχική καλλιέργεια εκφύτων *A. x andrachnoides* και *A. unedo*. Η χρήση ZEAT στο αρχικό υπόστρωμα εγκατάστασης *A. andrachne* το Μάιο, τριπλασίασε το δυναμικό πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με τη χρήση BA, στο *A. x andrachnoides* το πενταπλασίασε και στο *A. unedo* το αύξησε ακόμα περισσότερο (Πίν. 17). Το 2IP είχε παρόμοια επίδραση με το BA στο δυναμικό πολλαπλασιασμού στο *A. andrachne* και στο *A. x andrachnoides*, δρώντας όμως διαφορετικά: στο υβρίδιο οδήγησε στο σχηματισμό μικρότερου αριθμού βλαστών που όμως είχαν επιμηκυνθεί περισσότερο. Η KIN δεν ήταν καθόλου αποτελεσματική στην αρχική εγκατάσταση και οδήγησε σε αρκετά μεγαλύτερη φυλλική επιφάνεια όπως και το 2IP, σε σύγκριση με ZEAT και BA.

Η επίδραση της εποχής εγκατάστασης των εκφύτων στην αντίδραση τους συμφωνεί με αποτελέσματα άλλων ερευνητών. Η εποχή κοπής των εκφύτων είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για την εγκατάσταση και ανάπτυξη των *in vitro* καλλιεργειών (Siril and Dhar, 1977, Bhatt and Dhar, 2004). Οι Pattnaik and Chand (1997) διαπίστωσαν εποχική διακύμανση στο *Morus cathayana* και οι Sahoo and Chand (1998) αναφέρουν ότι στο είδος *Vitex negundo* έκφυτα που κόπηκαν την περίοδο Ιουνίου-Αυγούστου αντέδρασαν σε υψηλότερα ποσοστά και σχημάτισαν τον υψηλότερο αριθμό βλαστών, ενώ οι Sharma and Ramamurthy (2000), Romano *et al.* (2002), Papafotiou *et al.* (2001), Nejad (2005) και Schoene and Yeager (2005), βρήκαν επίσης εποχιακή διακύμανση της ικανότητας βλαστογέννεσης των εκφύτων στα είδη *Eucalyptus tereticornis*, *Ceratonia siliqua*, *Mammillaria elongata*, *Ficus religiosa* και *Viburnum odoratissimum*, αντίστοιχα. Οι Kartsonas and Papafotiou, (2007) αναφέρουν παρόμοια εποχική διακύμανση και στον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *Quercus euboica* Pap., ενός σπάνιου ενδημικού είδους της Ελλάδος, ενώ η επίδραση της εποχής στην αρχική καλλιέργεια εγκατάστασης αναφέρεται και σε ένα άλλο σπάνιο και επαπειλούμενο είδος, το *Malosorbus florentina* (Zucc.) Browicz (Papafotiou and Martini, 2009). Οι Arora *et al.* (2010), επίσης διαπίστωσαν εποχική διακύμανση στην αρχική εγκατάσταση κόμβων εκφύτων του *Azadirachta indica* A. Juss. (neem), όπως και οι Chaturvedi *et al.* (2004) σε προγενέστερη έρευνα για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του ίδιου φυτού.

Τα τρία είδη *Arbutus* σε όλα τα υποστρώματα που περιείχαν $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEAT σημείωσαν εξ ίσου υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης Μάιο και Σεπτέμβριο. Στα υπόλοιπα μορφογενετικά χαρακτηριστικά που εκτιμήθηκαν υπήρξε μεταβαλλόμενη εικόνα. Συνολικά διαπιστώθηκε και στα τρία είδη ότι η ZEAT σε συγκέντρωση $2,5 \text{ mg l}^{-1}$, το Σεπτέμβριο επέφερε την υψηλότερη παραγωγή βλαστών από όλες τις άλλες κυτοκινίνες στις δύο εποχές, αποτέλεσμα που προήλθε από τον σχηματισμό μεγαλύτερου αριθμού βλαστών σε σχέση με τον Μάιο. Στο υβρίδιο και στην ήμερη κουμαριά η ZEAT έδρασε περίπου 1,5 φορά πιο αποτελεσματικά το Σεπτέμβριο σε σχέση με το Μάιο, ενώ ήταν 4,5 φορές πιο αποτελεσματική στο *Arbutus andrachne*.

Το BA ήταν λιγότερο αποτελεσματικό το Σεπτέμβριο σε σχέση με το Μάιο, για τα *A. andrachne* και *A. x andrachnoides* (Πίν. 10, 12, 14). Η διαφοροποίηση στην αποτελεσματικότητα της δράσης του BA σε σχέση με τη ZEAT, που δεν εμφάνισε διαφορές σε σχέση με την εποχή, πιθανώς συνδέεται με την κατανομή των ενδογενών

κυτοκινινών στα τρία είδη και τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της ΖΕΑΤ στα είδη της οικ. Ericaceae.

Η συγκριτική μελέτη των τριών ειδών κατέδειξε ότι το ποσοστό βλαστογένεσης, ο αριθμός και μήκος βλαστών και ο αριθμός των φύλλων, το Μάιο και Σεπτέμβριο, για όλες τις κυτοκινίνες που ελέγχθηκαν, για το υβρίδιο, είχε τιμές ανάμεσα στο *A. andrachne* και το *A. unedo* και τοποθέτησε το υβρίδιο ανάμεσα στα δύο μητρικά φυτά από τα οποία προέρχεται (Σχ. 18, 19).

Η διπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η κυτοκινίνη που χρησιμοποιήθηκε είχε σημαντική αλληλεπίδραση με την θέση του εκφύτου ως προς τον αριθμό των σχηματιζόμενων βλαστών (*A. x andrachnoides* και *A. unedo*), ενώ στο *A. andrachne*, η αλληλεπίδραση δεν ήταν σημαντική μεν, αλλά η θέση του εκφύτου δεν είχε κύρια επίδραση, όπως είχε συμβεί με την κυτοκινίνη (Πίν. 11). Η θέση των εκφύτων στο μητρικό βλαστό *A. andrachne* και η κυτοκινίνη, είχαν σημαντική επίδραση στο μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών. Ο αριθμός των βλαστών μεγάλωνε από την κορυφή προς τη βάση και το αντίστροφο συνέβαινε για το μήκος (Σχ. 9). Η κυτοκινίνη και ο κόμβος προέλευσης επηρέασαν σημαντικά το μήκος στο *A. x andrachnoides* (Πίν. 13) και ο αριθμός των βλαστών ήταν μεγαλύτερος στα έκφυτα 1, ενώ αντίθετα το μήκος μεγάλωνε με την απομάκρυνση από την κορυφή (Σχ. 13). Η κυτοκινίνη επηρέασε σημαντικά το μήκος στο *A. unedo* (Πίν. 15) και ενώ δεν υπήρξε διαφορά στον αριθμό βλαστών μεταξύ των εκφύτων από διαφορετικούς κόμβους, το μήκος ήταν μεγαλύτερο στα έκφυτα 2, 3, 4 και 5 (Σχ. 17). Ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών στα έκφυτα 1 προέκυψε από τον μεγαλύτερο αριθμό οφθαλμών που έφεραν τα έκφυτα αυτά (2-5) σε σχέση με τον αριθμό οφθαλμών που έφεραν τα έκφυτα 1 (1-2), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.4.1.

Από τη μελέτη φάνηκε διαφορά στο μήκος των βλαστών σε σχέση με την προέλευση του κόμβου, για το *A. andrachne* και *A. x andrachnoides* που μεγάλωνε με την απομάκρυνση από την κορυφή. Έκφυτα από την κορυφή και τη μέση των βλαστών χρησιμοποίησαν οι Mereti *et al.* (2002) για την αρχική εγκατάσταση *A. unedo*, δίχως όμως να αναφέρουν κάποια επίδραση της θέσης των εκφύτων στην αντίδραση των οφθαλμών. Επίδραση του κόμβου προέλευσης αναφέρεται για τα είδη, *Sorbus domestica* (Arrillaga *et al.* 1991), *Juniperus oxycedrus* (Gomez and Segura, 1995) και *Fagus orientalis* (Cuenca *et al.* 2000), τα οποία έδιναν μεγαλύτερη βλαστογένεση σε έκφυτα βάσης. Οι Kartsonas and Papafotiou (2007) επίσης διαπίστωσαν ότι η θέση του εκφύτου πάνω στο μητρικό βλαστό του *Q. euboica* είχε

σημαντική επίδραση στη βλαστογένεση. Έκφυτα από τους κορυφαίους κόμβους των μητρικών βλαστών, εμφάνισαν χαμηλότερο ποσοστό σχηματισμού μικροβλαστών σε σύγκριση με έκφυτα από χαμηλότερους κόμβους. Η διαφορά αυτή στην αντίδραση των εκφύτων από διαφορετικούς κόμβους, ενώ παρατηρήθηκε σε όλες τις περιόδους εγκατάστασης καλλιέργειών, έγινε εντονότερη μετά τον Ιούλιο τόσο σε νεανικής όσο και σε ενήλικης προέλευσης έκφυτα. Φαίνεται λοιπόν ότι στο *Quercus euboica* η φυσιολογική κατάσταση (ωριμότητα, λήθαργος) σχετίζεται και με τη θέση των εκφύτων στο βλαστό, όσο χαμηλότερα βρίσκεται ένας οφθαλμός στο βλαστό, τόσο πιο ώριμος φυσιολογικά είναι αυτός. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και για το *Quercus robur* (Puddephat *et al.*, 1997). Οι Favre and Juncker (1987), συμπεραίνουν ότι το στάδιο ανάπτυξης των βλαστών επηρεάζει την επιτυχία των εκφύτων στην καλλιέργεια και παρατήρησαν ότι ο αριθμός των φύλλων που σχηματίστηκαν σε βλαστούς βαλανιδιών συνδέεται με τον αριθμό των προσηματισμένων φύλλων που υπήρχαν στο μητρικό οφθαλμό. Η χρήση οφθαλμών κοντά στη βάση των βλαστών οδήγησε σε υψηλότερη βλαστογένεση και στο *Maytenus ilicifolia* (Pereira *et al.*, 1995), ενώ μειωμένη αντίδραση και ανάπτυξη παρατηρήθηκε σε κορυφαίους οφθαλμούς αλλά και οφθαλμούς της βάσης των βλαστών και από τους Volkaert *et al.* (1990). Οι Arora *et al.*, (2010), αναφέρουν ότι έκφυτα από τους μεσαίους κόμβους διαφοροποίησαν περισσότερους βλαστούς κατά την αρχική καλλιέργεια του *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem). Οι Papafotiou and Martini (2009) κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *X Malosorbus florentina* Zucc. δε βρήκαν επίδραση προερχόμενη από την θέση του οφθαλμού.

Ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε ήταν χαμηλός και στα τρία είδη. Στο *A. andrachne* όπου δεν βρέθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ θέσης του εκφύτου και είδους κυτοκινίνης, η κυτοκινίνη είχε σημαντική επίδραση τόσο στο σχηματισμό περισσότερων βλαστών, όσο και στο σχηματισμό επιμηκυσμένων βλαστών. Στα άλλα δύο είδη *Arbutus* η κυτοκινίνη είχε κύρια επίδραση μόνο στο μέσο μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών όπου η ZEAT οδήγησε σε σχηματισμό βλαστών με μεγαλύτερο μήκος στα *A. andrachne*, και *A. x andrachnoides*. Στο *A. unedo* ήταν ακόμα ισχυρότερη η επίδραση της ZEAT με αποτέλεσμα το μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών σχεδόν να διπλασιαστεί σε σχέση με τα άλλα δύο είδη. Το ZIP αποδείχθηκε αρκετά αποτελεσματικό στο *A. unedo*, σε σχέση με τα άλλα δύο είδη καθώς συνετέλεσε σε ικανοποιητική αύξηση του μήκους των βλαστών (Πίν. 17).

Μικρό αριθμό βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε παρατήρησαν και οι Λιμνιάτης *et al.*, (2001) στην ήμερη κουμαριά καθώς και οι Kartsonas and Parafotiou (2007) στις καλλιέργειες εγκατάστασης *in vitro* του είδους *Q. euboica* όπου ελάχιστα έκφυτα σχημάτισαν περισσότερους από έναν βλαστούς. Το πρόβλημα αυτό χαρακτηρίζει και άλλα ξυλώδη είδη όπως άλλα είδη του γένους *Quercus* (Puddephat *et al.*, 1997, Vieitez *et al.*, 1993), το *Ceratonia siliqua* (Romano and Martins-Loucao, 2002) και το *Olea europae* L. (Grigoriadou *et al.*, 2002).

Επομένως, η μέθοδος εγκατάστασης *in vitro* καλλιιεργειών από ενήλικα φυτά των τριών ειδών *Arbutus* της Ελλάδας που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη, κρίνεται ικανοποιητική και προτείνεται η καλλιέργεια εκφύτων 2, 3, 4, 5, την άνοιξη, σε άλατα WPM, με βιταμίνες Mullin, 30% σακχαρόζη και 2,5 mg l⁻¹ ZEAT και για τα τρία είδη.



Πολλαπλασιασμός καλλιεργειών *in vitro*

5 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ *IN VITRO*

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

5.1.1 Πολλαπλασιασμός *in vitro* στο γένος *Arbutus* και την οικογένεια *Ericaceae*

Οι μελέτες που αφορούν στον πολλαπλασιασμό με ιστοκαλλιέργεια των ειδών *A. unedo* και *A. xalapensis* αναφέρουν την χρήση διαφόρων θρεπτικών υποστρωμάτων. Ποικιλία θρεπτικών υποστρωμάτων έχει αναπτυχθεί για χρήση στον *in vitro* πολλαπλασιασμό, ανάλογα με το είδος του φυτού και το σκοπό της καλλιέργειας. Το MS (Murashige and Skoog, 1962) είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο, ενώ το WPM (McCown and Lloyd, 1981) χρησιμοποιείται ευρύτατα στα ξυλώδη είδη και αναπτύχθηκε για να ξεπεράσει την ευαισθησία ορισμένων ξυλωδών ειδών στο MS (Gamborg and Philips, 1995). Περιέχει μικρότερη ποσότητα αμμωνιακών ιόντων και είναι γενικά φτωχότερο μέσο, ενώ έχει δεκαπλάσια συγκέντρωση θειαμίνης σε σχέση με το MS. Το B5 (Gamborg *et al.*, 1968) έχει ακόμη μικρότερη συγκέντρωση αλάτων, ειδικά των αμμωνιακών και τροποποιημένη συγκέντρωση όλων τις βιταμινών. Ο Mackay (1996) προτείνει ως υπόστρωμα για τον πολλαπλασιασμό του *A. xalapensis* άλατα WPM με βιταμίνες MS και 2,5 ή 5 mg l⁻¹ BA, χωρίς αυξίνη. Οι Morini and Fiaschi (2000) δοκίμασαν τροποποιημένα υποστρώματα MS, QL (Quoirin and Lepoivre, 1977), DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) και WPM που περιείχαν 0,6 mg l⁻¹ BA, 0,2 mg l⁻¹ GA₃ και 0,06 mg l⁻¹ IBA, και πρότειναν ως καταλληλότερο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού για το *A. unedo* το τροποποιημένο υπόστρωμα QL. Οι Λιμνιάτης *et al.*, (2001), προτείνουν για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. unedo* WPM με την προσθήκη την 5 mg l⁻¹ BA και 0,75 mg l⁻¹ NAA. Η βλαστογένεση ανήλθε σε 45%, και σχηματίστηκαν 1,2 βλαστοί ανά έκφυτο μήκους 1,5 cm. Οι Mereti *et al.* (2002) πρότειναν ως κατάλληλο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού για το *A. unedo*, το WPM με βιταμίνες MS και 2,5 mg l⁻¹ BA. Οι ερευνητές δεν χρησιμοποίησαν μεγαλύτερη συγκέντρωση από 5 mg l⁻¹ BA, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Mackay (1996) ο οποίος χρησιμοποιώντας μεγαλύτερες συγκεντρώσεις BA κατά τον μικροπολλαπλασιασμό του *A. xalapensis* διαπίστωσε ότι δεν είχαν αποτέλεσμα.

Οι Mostafa *et al.* (2010) έλεγξαν τη δράση των κυτοκινινών BA, KIN, 2IP, ZEAT και TDZ σε υποστρώματα MS και B5 (Gamborg *et al.*, 1968) καλλιεργώντας κόμβους από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα *A. andrachne* και διαπίστωσαν ότι η ZEAT ήταν η πλέον αποτελεσματική κυτοκινίνη, για πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών. Οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι το θρεπτικό υπόστρωμα MS ήταν καταλληλότερο από το B5. Οι El-Sayed *et al.* (2010), πολλαπλασίασαν το *A. unedo*, μέσω της καλλιέργειας αρχικά εκφύτων από ημιξυλοποιημένο ιστό σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από όπου 6 εβδομάδες αργότερα εκπύχθηκαν βλαστοί που με την καλλιέργειά τους σε MS με την προσθήκη TDZ σε συγκέντρωση από 0-4 mg I⁻¹ έδωσαν περαιτέρω βλαστογένεση. Οι Gomes and Canhoto (2009) αναφέρουν ως καταλληλότερο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού για το *A. unedo* τροποποιημένο υπόστρωμα AND (Anderson, 1984) με τα μικροσυστατικά του MS και τα οργανικά στοιχεία του FS (De Fossard *et al.*, 1974) και 2 mg I⁻¹ BA, σε σχέση με τροποποιημένο υπόστρωμα AND που περιείχε, είτε υποδιπλασιασμένη ποσότητα των μικροστοιχείων του MS ή τα οργανικά συστατικά του FS.

Οι Gomes *et al.* (2010) χρησιμοποίησαν υπόστρωμα AND για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. unedo* και διαπίστωσαν ότι το BA σε συγκέντρωση 2 mg I⁻¹ επέφερε τα καλύτερα αποτελέσματα στο μέσο μήκος βλαστού (περίπου 2 cm), χωρίς όμως διαφορά από KIN (1,9 mg I⁻¹) ή ZEAT (1,95 mg I⁻¹). Χρησιμοποίησαν επίσης NAA σε συγκέντρωση 0, 0,1, 0,25 ή 0,5 mg I⁻¹ σε συνδυασμό με BA σε συγκέντρωση 2 mg I⁻¹ και διαπίστωσαν ανάσχεση του ρυθμού πολλαπλασιασμού. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η χρήση TDZ δεν ευνόησε τη βλαστογένεση, παρά μόνο την καλογένεση, και στην μελέτη διαφάνηκε η επίδραση που είχαν οι διαφορετικοί γονότυποι στο δυναμικό πολλαπλασιασμού.

Αναφέρεται ότι γενικότερα στην οικογένεια Ericaceae οι φυσικές κυτοκινίνες ZEAT και 2IP είναι πιο αποτελεσματικές για βλαστογένεση (George *et al.*, 2008). Σε μερικά είδη ο συνδυασμός των κυτοκινινών ZEAT και 2IP δίνει καλύτερα αποτελέσματα (Eccher and Noe, 1989). Οι Debnath και McRay (2001) χρησιμοποίησαν για τον πολλαπλασιασμό του *Vaccinium macrocarpon* ait. με επιτυχία θρεπτικό υπόστρωμα MS με 2,5 mg I⁻¹ 2IP. Οι ίδιοι ερευνητές χρησιμοποίησαν ZEAT και 2IP σε διάφορες συγκεντρώσεις για τον πολλαπλασιασμό του *Vaccinium vitis-idaea* L. (Debnath and McRae, 2001 α). Η ZEAT βρέθηκε ότι ήταν πιο αποτελεσματική στο στάδιο πολλαπλασιασμού του *Vaccinium corymbosum* L. (Chandler and Draper, 1986, Eccher and Noe, 1989). Σε υψηλές συγκεντρώσεις

2IP, έχουν αναφερθεί μεν επιβλαβή αποτελέσματα (Serres *et al.*, 1994), αλλά και ευνοϊκή επίδραση στον πολλαπλασιασμό των βλαστών (Hosier *et al.*, 1985, Norton and Norton, 1985) του *Vaccinium vitis-idaea*. Σε μελέτη που έγινε με το *V. vitis-idaea* L. var. *minus*, οι Hosier *et al.* (1985), πρότειναν την χρήση 2IP σε πολύ υψηλή συγκέντρωση (20 mg l^{-1}) για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του είδους. Οι Norton and Norton (1985) ανέφεραν παρόμοια αποτελέσματα συνιστώντας 16 mg l^{-1} 2IP. Οι Serres *et al.* (1994) βρήκαν ότι θρεπτικό υπόστρωμα WPM με 2 mg l^{-1} 2IP ήταν πολύ αποτελεσματικό για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των ποικιλιών «Sussi», «Erntedank», και «Koralle» του *Vaccinium vitis-idaea* (lingonberry).

Οι Banko and Stefani (1989) χρησιμοποίησαν WPM, για τον πολλαπλασιασμό του *Oxydedrum arboretum* και διαπίστωσαν ότι η ZEAT ήταν πιο αποτελεσματική σε σχέση τις BA και 2IP στην ίδια συγκέντρωση, ενώ το TDZ οδήγησε στο σχηματισμό λίγων κοντών βλαστών.

Για τις διάφορες ποικιλίες και είδη του γένους *Vaccinium* έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον πολλαπλασιασμό τα WPM, MS, AND, ZB (Zimmerman and Broome, 1980) ή τροποποιημένα υποστρώματα από τα παραπάνω σε συνδυασμό με κυτοκινίνες, (Debnath, 2001, 2004, 2005, 2005(α) και 2008, Debnath and McRae, 2001 και 2001 (α), Gaidosova *et al.*, 2006, Meiners *et al.*, 2007). Η ZEAT ήταν η πιο αποτελεσματική κυτοκινίνη για τον πολλαπλασιασμό των βλαστών σε αρκετά είδη του γένους *Vaccinium* (Chandler and Draper, 1986, Eccher and Noe, 1989, Debnath and McRae, 2001 (α)). Οι Litwinczuk *et al.* (2005) και Pereira (2006) χρησιμοποίησαν με επιτυχία υπόστρωμα ZB με 2IP. Το επαπειλούμενο με εξαφάνιση *Rhododendron ponticum* με επιτυχία επίσης πολλαπλασιάστηκε σε υπόστρωμα AND με την χρήση ZEAT (Almeida *et al.*, 2005).

5.1.2 Πολλαπλασιασμός καλλιεργειών *in vitro* σε άλλα ξυλώδη είδη

Ο George (1993) αναφέρει ότι η KIN είναι λιγότερο αποτελεσματική σε σύγκριση με την ίδια συγκέντρωση BAP για πολλά δασικά είδη. Οι Corchete *et al.* (1993) πέτυχαν έκπτυξη πολλαπλών βλαστών όταν καλλιέργησαν *in vitro* έκφυτα του είδους *Ulmus pumila* σε υπόστρωμα MS, με $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA (περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του BA, μείωνε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των βλαστών), ενώ μετά από δύο χρόνια συνεχών υποκαλλιεργειών, δε μειώθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού

των καλλιεργειών. Οι Meier and Reuther (1994) εξετάζοντας τα υποστρώματα BTM, GD, MS, SH και WPM στην καλλιέργεια του είδους *Fagus sylvatica*, βρήκαν το WPM ως το καλύτερο για εκφύτα ενήλικης προέλευσης και το GD για νεανικής, γενικά όμως το ποσοστό αντίδρασης ήταν μόλις 40%, ενώ ο αριθμός των βλαστών ήταν επίσης χαμηλός. Εμβολιάζοντας βλαστούς ώριμων δένδρων σε σπορόφυτα ενός έτους αύξησαν την αντίδραση των εκφύτων (αυξήθηκαν το ποσοστό αντίδρασης, ο αριθμός βλαστών και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού). Διαπίστωσαν επίσης την πολύ σημαντική επίδραση του γονότυπου στην αντίδραση των εκφύτων όπως και σε άλλα είδη της οικογένειας που έχουν αργή ανάπτυξη και απείθαρχη βλάστηση. Οι Lakshmanan *et al.* (1997) χρησιμοποίησαν διάφορες κυτοκινίνες σε υποστρώματα πολλαπλασιασμού του *Ixora coccinea* L. και διαπίστωσαν ότι καταλληλότερη κυτοκινίνη ήταν το BA, σε σχέση με KIN, 2IP και ZEAT.

Οι Cuenca *et al.* (2000) βρήκαν ότι το TDZ σε συγκέντρωση 1 mg l^{-1} είναι πιο αποτελεσματική κυτοκινίνη (σε σύγκριση με το BA και ZEAT) στον *in vitro* πολλαπλασιασμό των ειδών *Fagus sylvatica* (Ευρωπαϊκή οξιά) και *F. orientalis* (Βασιλική οξιά) σε WPM. Ο συνδυασμός του TDZ με αυξίνη είχε ευεργετική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών, πιο αποτελεσματικές αυξίνες ήταν το IAA και το IBA, ενώ το NAA είχε αρνητική επίδραση. Οι ερευνητές παρατήρησαν σχηματισμό κάλου στη βάση των βλαστών και διαπίστωσαν την επίδραση του γονότυπου στην αναγέννηση των εκφύτων στα δύο είδη. Από την έρευνά τους προέκυψε ότι το BA σε συγκέντρωση 4 mg l^{-1} ήταν κατάλληλο για το σχηματισμό βλαστών μεγάλου μήκους.

Ο Bunn (2005) αναφέρει το BAP ως την καλύτερη κυτοκινίνη στον πολλαπλασιασμό βλαστών του είδους *Eucalyptus impensa*, σε σύγκριση με ZEAT και KIN. Κατά τον ερευνητή η καλλιέργεια σε υψηλές συγκεντρώσεις BAP προκάλεσε το σχηματισμό παραμορφωμένων-υπερενυδατωμένων βλαστών (hyperhydration). Η χρήση ZEAT έδωσε ρυθμούς πολλαπλασιασμού λίγο χαμηλότερους από το BAP, ενώ η προσθήκη IAA στα υποστρώματα με ZEAT αύξησε την ανάπτυξη των βλαστών, αλλά παράλληλα και το σχηματισμό κάλου. Οι Pruski *et al.* (2005) αναφέρουν ότι για τον πολλαπλασιασμό του *Prunus fruticosa* το BA σε συγκέντρωση $2-4 \text{ mg l}^{-1}$ έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα. Οι Nobre *et al.* (2000) βρήκαν το BA ως τον σημαντικότερο παράγοντα στον πολλαπλασιασμό του είδους *Viburnum tinus* (ο υψηλότερος αριθμός βλαστών 3,8 παρατηρήθηκε μετά από καλλιέργεια των εκφύτων σε υπόστρωμα MS με μισής δύναμης NH_4NO_3 και 10 mg l^{-1}

¹ BA), ενώ κατά τον μικροπολλαπλασιασμό του είδους *Viburnum odoratissimum*, η συγκέντρωση 0,25 mg I⁻¹ του BA, προκάλεσε το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών, ενώ περαιτέρω αύξηση του BA μείωσε το μήκος των βλαστών (Schoene and Yeager, 2005). Οι Santos *et al.* (2003) βρήκαν τον συνδυασμό των 1 mg I⁻¹ BA και 0,1 mg I⁻¹ IBA (σε υπόστρωμα DKW), ως τον καλύτερο στην παραγωγή υψηλότερου αριθμού βλαστών, οι οποίοι είχαν και το μεγαλύτερο μήκος κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του είδους *Olea europaea ssp. maderensis*.

Το TDZ έχει αρκετά ισχυρή δράση παρόμοια με τη δράση κυτοκίνινης έχοντας όμως παράλληλα πολλές φορές αποτελέσματα παρόμοια με αυξίνης (Mok *et al.*, 1982, Visser *et al.*, 1992, Huetteman and Preece, 1993). Οι Faisal *et al.* (2005) πολλαπλασίασαν το υπό εξαφάνιση είδος *Rauwolfia tetraphylla* με μικροπολλαπλασιασμό χρησιμοποιώντας TDZ. Τα έκφυτα παρέμειναν για διάφορα χρονικά διαστήματα στα υποστρώματα με την κυτοκίνη (με αυτό των 4 εβδομάδων να προκαλεί τον υψηλότερο αριθμό βλαστών) και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε υπόστρωμα χωρίς αυτήν. Οι αναφορές για μικροπολλαπλασιασμό του είδους χρησιμοποιώντας τις φυτορρυθμιστικές ουσίες IAA, IBA, NAA, BA και KIN αναφέρουν χαμηλό αριθμό βλαστών, ενώ η χρήση του TDZ σύμφωνα με τους ερευνητές προκάλεσε υψηλό αριθμό σχηματισθέντων βλαστών (στη συγκέντρωση των 0,1 mg I⁻¹ σχηματίστηκαν 4,5 βλαστοί, ενώ μέχρι και το 1 mg I⁻¹ ο αριθμός των βλαστών αύξανε και έφτασε τους 9,2 βλαστούς). Η συνεχής όμως παραμονή σε υπόστρωμα με TDZ προκάλεσε σχηματισμό ανώμαλων βλαστών. Η τοξική επίδραση του TDZ στην ανάπτυξη *in vitro* καλλιεργειών έχει αναφερθεί από τους Bohmer *et al.* (1995) και Murthy (1996). Οι Huetteman and Preece (1993) αναφέρουν επίσης την επίτευξη υψηλών αριθμών μασχαλιαίων βλαστών σε δασικά ξυλώδη φυτά, εάν καλλιεργηθούν σε συγκεντρώσεις του TDZ 0,02-2 mg I⁻¹, όπου οι περισσότερες κυτοκίνινες δεν προκαλούν αντίδραση των εκφύτων. Το TDZ όμως αναφέρεται ότι παρεμποδίζει την επιμήκυνση των βλαστών σε πολλά δασικά είδη (Kaveriappa *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 1997, Prahan *et al.*, 1998, Upreti and Dhar, 1996).

Στο *Malosorbus florentina* προτείνεται η εκ περιτροπής καλλιέργεια σε MS με TDZ 0,1 mg I⁻¹ και MS με 1 mg I⁻¹ BA και 0,1 mg I⁻¹ IBA για επίτευξη υψηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού χωρίς παραμόρφωση των μικροβλαστών (Parafotiou and Martini, 2009). Στο είδος *Rubus pubescens* αναφέρεται (Debnath, 2004) παραγωγή βλαστών σε τροποποιημένο υπόστρωμα MS και παραγωγή επιμήκων βλαστών όταν προστέθηκαν 2 mg I⁻¹ BA και 0,2 mg I⁻¹ IBA. Επίσης ο συνδυασμός του BA με το

IBA, ή με το NAA, ή η χρήση μόνο ZEAT προώθησαν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού βλαστών, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών, παρατηρήθηκε όταν στο υπόστρωμα συμπεριλήφθηκε ZEAT (σε συγκέντρωση 1 mg l^{-1}) σε σύγκριση με το BA. Η ZEAT ήταν επίσης πιο αποτελεσματική από το BA, στον πολλαπλασιασμό βλαστών ελιάς (Grigoriadou, 2002) ενώ το 2IP ήταν η λιγότερο αποτελεσματική από τις κυτοκινίνες που ελέγχθηκαν (ZEAT, BA, 2IP). Σύμφωνα επίσης με τον Debnath (2004), ο αριθμός βλαστών, το μήκος των βλαστών, ο αριθμός των φύλλων και το μέγεθος του κάλου αυξήθηκαν μέχρι την τρίτη υποκαλλιέργεια και στη συνέχεια έμειναν σταθερά, ενώ όταν τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς ορμόνες παράχθηκε μόνο ένας βλαστός ο οποίος δεν διακλαδίζονταν (φαίνεται η πολύ ισχυρή κυριαρχία της κορυφής). Η παρουσία ισχυρής κυριαρχίας της κορυφής είναι σύμφωνα με τον George (1984), ένα μεγάλο πρόβλημα στην ανάπτυξη *in vitro* καλλιεργειών για τον κλωνικό πολλαπλασιασμό πολλών φυτικών ειδών. Η κυριαρχία της κορυφής είναι γνωστό ότι προκαλείται από την δράση της βασιπέταλης μεταφοράς της αυξίνης από την κορυφή προς την βάση και την επακόλουθη παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μασχαλιαίων οφθαλμών (Cline, 1994).

Οι Dhar *et al.* (2000) βρήκαν ότι το πλήρες MS ήταν το καλύτερο υπόστρωμα καλλιέργειας μεταξύ των MS, WPM, B5 και $\frac{1}{2}$ MS για το είδος *Pittosporum napaulensis*. Επίσης αναφέρουν ότι όπως και άλλα είδη δένδρων (Siril and Dhar, 1997) έτσι και σε αυτό η πιο αποτελεσματική κυτοκινίνη ήταν το BA (σε σύγκριση με το TDZ και την KIN), καθώς και σημαντική επίδραση του γονότυπου στην αντίδραση των βλαστών. Οι Bhatia *et al.* (2002) αναφέρουν ότι όσο αυξάνονταν η συγκέντρωση του BAP, μειωνόταν ο αριθμός των βλαστών που σχηματίζονταν. Οι Arrillaga *et al.* (1991) πολλαπλασιάζοντας *in vitro* το είδος *Sorbus domestica*, αναφέρουν ότι ο υψηλότερος ρυθμός πολλαπλασιασμού βλαστών, παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα με 5 mg l^{-1} BA, ενώ βλαστοί με το μεγαλύτερο μήκος σχηματίστηκαν σε υπόστρωμα με $1 \text{ }\mu\text{M}$ BA. Ο επιτυχής πολλαπλασιασμός βλαστών απαιτούσε την παρουσία BA, τόσο για ώριμα όσο και για νεανικά έκφυτα, ενώ ο αριθμός των βλαστών αυξήθηκε σημαντικά όταν χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα με χαμηλή συγκέντρωση ιόντων.

Οι Romano *et al.* (2002), στη φάση του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών του είδους *Ceratonia siliqua*, βρήκαν τις κυτοκινίνες ZEAT και BA, να δίνουν τον υψηλότερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο και το BA να δίνει τους υψηλότερους

βλαστούς. Η αύξηση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης αύξησε τον μέσο αριθμό βλαστών, ενώ σε αντίθεση με άλλα δασικά είδη, ο συνδυασμός των συγκεντρώσεων 0,5 και 1 mg l⁻¹ του BA με αυξίνες, δε βελτίωσε τον ρυθμό πολλαπλασιασμού, ή την επιμήκυνση των βλαστών. Αντίθετα ο συνδυασμός 0,5 mg l⁻¹ BA και 0,1 mg l⁻¹ IAA στο υπόστρωμα καλλιέργειας, έδωσε τον υψηλότερο αριθμό βλαστών και οι βλαστοί που σχηματίστηκαν είχαν το μεγαλύτερο μήκος, κατά τον πολλαπλασιασμό *in vitro* της ποικιλίας βερικοκιάς Μπεμπέκου (Koubouris and Vasilakakis, 2003). Σύμφωνα πάντα με τους Koubouris and Vasilakakis (2003), το μήκος των βλαστών μειώνονταν με την αύξηση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης, ενώ η απόδοση των καλλιεργειών προωθήθηκε σημαντικά όταν αυτές τοποθετήθηκαν στους 4 °C για 300 h και στη συνέχεια επωάζονταν σε κανονικές συνθήκες. Στο είδος *Juniperus oxycedrus* τα εκφύτα αντιδρούσαν καλύτερα σε υπόστρωμα χωρίς BA, ενώ η παρουσία του BA, της KIN ή του συνδυασμού του IAA με το BA, δεν προώθησαν και αντίθετα μείωσαν την αντίδραση των εκφύτων (Gomez and Segura, 1995). Στο ίδιο είδος μάλιστα η χρήση συγκεντρώσεων του BA μεγαλύτερων από 2,25 mg l⁻¹ προκάλεσε νέκρωση των εκφύτων σύμφωνα πάντα με τους Gomez and Segura (1995). Επίσης κατά τον μικροπολλαπλασιασμό του είδους *Thymus piperella* από τους Saez *et al.* (1994), εμφανίσθηκαν βλαστοί με ανώμαλη μορφολογία (οι βλαστοί είχαν μικρότερα φύλλα και κοντύτερα μεσογονάτια), η οποία γινόταν εντονότερη με την αύξηση της συγκέντρωσης του BA (στα 1,5-2,0 mg l⁻¹). Η καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα με BA ή ZEAT είχε τη μεγαλύτερη βλαστογένεση σε σχέση με KIN και ZIP (Kartsonas and Papafotiou, 2007).

Συνεχείς υποκαλλιέργειες σε MS με 1 mg l⁻¹ BA και 0,1 mg l⁻¹ IBA, με διάρκεια έξι εβδομάδων η κάθε μία, είχε ως αποτέλεσμα υψηλούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού στο *Malosorbus florentina* Zucc. (Papafotiou and Martini, 2009).

5.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.1 Μητρικό υλικό

Βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro* τεμαχίζονταν σε εκφύτα κόμβων μήκους 5-6 mm που περιελάμβαναν 1-2 οφθαλμούς, αφαιρούνταν τα φύλλα που είχαν σχηματιστεί και τοποθετούνταν σε δοχεία καλλιέργειας (βλ 3.7.3). Από τα

έκφυτα κορυφής αφαιρείτο το ακραίο μερίστωμα. Τοποθετούνταν τέσσερα έκφυτα ανά δοχείο όγκου 100 ml και 5 έκφυτα ανά δοχείο όγκου 180 ml. Στην υποκαλλιέργεια κάλου που είχε σχηματιστεί σε υπόστρωμα με TDZ, γινόταν τεμαχισμός σε τμήματα 0,5 x 0,5 cm.

5.2.2 Υποστρώματα-Μέθοδοι και συνθήκες καλλιέργειας

Τα υποστρώματα των καλλιεργειών πολλαπλασιασμού παρασκευάστηκαν όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 3.2.2, ενώ τα δοχεία καλλιέργειας με τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν στις συνθήκες που αναφέρονται στο κεφάλαιο 3.7.2.

5.2.3 Καλλιέργειες πολλαπλασιασμού *in vitro*

5.2.3.1 Καλλιέργειες πολλαπλασιασμού *in vitro* του *A. andrachne*

Ο αρχικός στόχος των καλλιεργειών του *A. andrachne*, ήταν όπως αναφέρθηκε η αύξηση του ποσοστού των εκφύτων που σχηματίζουν βλαστούς κατά την καλλιέργεια, καθώς και η παραγωγή μεγάλου αριθμού βλαστών με μεγάλο μήκος ανά έκφυτο που τοποθετείται. Με βάση λοιπόν τις βιβλιογραφικές αναφορές για τον μικροπολλαπλασιασμό άλλων ειδών του γένους *Arbutus*, άλλων ειδών της οικογένειας Ericaceae και άλλων δασικών ειδών (5.1.1), εξετάστηκε αρχικά σε υπόστρωμα WPM η επίδραση του NAA, σε συγκέντρωση 0,5, 0,75 ή 1,25 mg l⁻¹ σε συνδυασμό με 2,5, 5 ή 7,5 mg l⁻¹ σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς. Λόγω έλλειψης επιμηκυμένων μικροβλαστών στα υποστρώματα μεταφοράς-υποκαλλιέργειας μεταφέρονταν δύο τύποι εκφύτων, είτε ολόκληροι οι μικροβλαστοί μήκους περίπου 0,4 cm ή ολόκληρο το έκφυτο της αρχικής καλλιέργειας το οποίο έφερε εκπτυγμένο οφθαλμό (0,1-0,3 cm) με ανανέωση της τομής.

Σε WPM, χρησιμοποιήθηκε επίσης IBA σε συγκέντρωση 0,5 mg l⁻¹ και GA₃ σε συγκέντρωση 0,2, 0,5, 1 ή 2,5 mg l⁻¹, σε συνδυασμό με 2,5 mg l⁻¹ IBA με στόχο την επιμήκυνση των μικροβλαστών. Εξετάστηκε ακόμα η επίδραση KIN σε συγκέντρωση 2,5, 5,0 ή 10 mg l⁻¹ καθώς και BA σε συγκέντρωση 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 ή 10 mg l⁻¹. Διερευνήθηκε επίσης η επίδραση του είδους του θρεπτικού υποστρώματος

(WPM ή MS, πλήρες ή υποδιπλασιασμένης δύναμης) σε συνδυασμό με την προσθήκη BA σε συγκέντρωση 1,0, 2,5, 5,0 και 10 mg I⁻¹ BA ή TDZ σε συγκέντρωση 0,05, 0,2, 0,5 και 1,0 mg I⁻¹ ή ZEAT σε συγκέντρωση 2,5 mg I⁻¹.

Στη συνέχεια, αφού μεσολάβησε σειρά διαδοχικών υποκαλλιέργειών, εξετάστηκε η επίδραση των κυτοκινινών BA, ZEAT, KIN και 2IP, σε διάφορες συγκεντρώσεις, ώστε να βρεθεί το είδος της κυτοκινίνης καθώς και η συγκέντρωσή της, η οποία θα επιφέρει τη μεγαλύτερη παραγωγή μικροβλαστών. Οι παραπάνω κυτοκινίνες χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 0,5, 1,0, 2,5 ή 5,0 mg I⁻¹. Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε δοχεία όγκου 100 ml που καλύφθηκαν με καπάκι τύπου magenta.

5.2.3.2 Καλλιέργειες πολλαπλασιασμού *in vitro* του *A. x andrachnoides* και *A. unedo*

Στα *A. x andrachnoides* και *A. unedo* ιερευνήθηκε συγκριτικά η επίδραση των κυτοκινινών BA, ZEAT, KIN και 2IP, σε συγκέντρωση 2,5 mg I⁻¹ σε υπόστρωμα WPM συγκριτικά ώστε να μελετηθούν συγκριτικά με το *A. andrachne* στα ίδια υποστρώματα, κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια, με έκφυτα που ελήφθησαν από τα ίδια αρχικά υποστρώματα εγκατάστασης. Επίσης εξετάστηκε συγκριτικά η βλαστογένεση και σε υπόστρωμα που περιείχε BA και NAA σε συγκέντρωση 2,5 και 0,75 mg I⁻¹. Εξετάστηκε επιπλέον συγκριτικά η ικανότητα για βλαστογένεση των 3 ειδών σε διαδοχικές υποκαλλιέργειες, η επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος (WPM ή MS) με 2,5 mg I⁻¹ στην πρώτη και δεύτερη υποκαλλιέργεια, καθώς και η επίδραση TDZ (0,01, 0,02, 0,20 και 0,50 mg I⁻¹) σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM. Τέλος εξετάστηκε συγκριτικά η βλαστογένεση των 3 ειδών στην πρώτη υποκαλλιέργεια με υπόστρωμα WPM και 0,1 mg I⁻¹ IBA με έκφυτα που ελήφθησαν από το ίδιο υπόστρωμα αρχικής εγκατάστασης. Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε δοχεία όγκου 100 ml που καλύφθηκαν με καπάκι τύπου magenta.

5.2.4 Πειραματικό Σχέδιο-Στατιστική Ανάλυση

Το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και ο τρόπος της στατιστικής ανάλυσης έχουν περιγραφεί στο 3.8.

5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.3.1 Πολλαπλασιασμός των καλλιεργειών του *A. andrachne*

5.3.1.1 Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση και επιμήκυνση κατά την 1η μεταφύτευση-υποκαλλιέργεια εκφύτων *A. andrachne*

Όταν ξεκίνησε η παρούσα μελέτη στο *A. andrachne* δεν υπήρχαν αναφορές για *in vitro* πολλαπλασιασμό. Έτσι βασιστήκαμε στους Λιμνιάτη *et al.* (2001) που χρησιμοποίησαν 2,5, 5 ή 7,5 mg l⁻¹ BA με 0,75 ή 1,25 mg l⁻¹ NAA σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς για την υποκαλλιέργεια του *A. unedo*. Στη μελέτη τους αναφέρεται ότι η αύξηση του NAA οδήγησε σε μείωση του αριθμού των σχηματιζόμενων βλαστών και ότι το ποσοστό βλαστογένεσης στη μικρότερη συγκέντρωση NAA που ελέγχθηκε κυμάνθηκε από 45-70% ενώ μικρός ήταν και ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών ανά έκφυτο (περίπου 1,2). Με δεδομένα τα αποτελέσματα αυτά, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά στα υποστρώματα καλλιέργειας μικρές συγκεντρώσεις της αυξίνης NAA, μαζί με την κυτοκινίνη BA και εξετάστηκε η επίδρασή τους στη βλαστογένεση των εκφύτων. Η μεταφύτευση (μεταφορά με ανανέωση τομής) των εκφύτων της αρχικής καλλιέργειας σε WPM με τις συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων της αρχικής καλλιέργειας 0, 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ BA και 0, 0,75 ή 1,25 mg l⁻¹ NAA σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς καθώς και 5 mg l⁻¹ BA με 0,2 mg l⁻¹ NAA είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κάλου στα υποστρώματα που περιείχαν NAA χωρίς οι βλαστοί να επιμηκύνονται. Σε WPM με KIN σε συγκέντρωση 2,5, 5,0 ή 10 mg l⁻¹ τα μεταφερόμενα έκφυτα δεν αντέδρασαν και ξεράθηκαν. Στα υποστρώματα WPM με BA σε συγκέντρωση 0,5, 1,0, 5,0 ή 10 mg l⁻¹ οι μεταφερόμενοι βλαστοί παρέμεναν κοντοί (Πίν. 19, Εικ. 30).



Εικ. 30. Μεταφύτευση εκφύτων *A. andrachne* με ανανέωση της τομής τους από το υπόστρωμα αρχικής εγκατάστασης (WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA) σε υπόστρωμα WPM με, $2,5$, $5,0$ ή $10,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA (α, β, γ αντίστοιχα).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα μεταφυτεύτηκαν έκφυτα που προέρχονταν από αρχική καλλιέργεια σε WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS ή WPM πλήρους ή μισής δύναμης χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες και MS ή WPM με BA σε συγκέντρωση $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ και NAA σε συγκέντρωση $0,1$, $0,2$, $0,5$, $0,75$ ή $1,25 \text{ mg l}^{-1}$ αντίστοιχα με στόχο την επιμήκυνση των βλαστών. Τα έκφυτα δεν αντέδρασαν, δεν σημειώθηκε καθόλου βλαστογένεση, παρά μόνο σχηματισμός κάλου. Η συγκέντρωση των $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA επιλέχθηκε, γιατί από την αρχική εγκατάσταση (βλ. 4.3.1) είχε καλύτερη απόδοση σε σχέση με $1,0$, $5,0$ ή $7,5 \text{ mg l}^{-1}$ που είχε ελεγχθεί. Η μεταφύτευση κοντών βλαστών σε υπόστρωμα WPM με $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA και $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA οδήγησε σε μικρό ποσοστό βλαστογένεσης (40%), και οι βλαστοί παρέμειναν κοντοί.

Με βάση βιβλιογραφικές αναφορές εξετάστηκε στη συνέχεια η επίδραση της προσθήκης του γιββεριλικού οξέος GA₃ στο υπόστρωμα μεταφοράς στην επιμήκυνση των μικροβλαστών. Το GA₃ σε συγκέντρωση 0,2, 1,0 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹, σε WPM που περιείχε 2,5 mg l⁻¹ BA, είχε αποτέλεσμα ποσοστό βλαστογένεσης 30-40%, χωρίς αποτέλεσμα στην επιμήκυνση (μήκος βλαστού 0,4 cm σε όλες τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν).

Ύστερα από την αδυναμία βλαστογένεσης και επιμήκυνσης στα παραπάνω υποστρώματα, και με βάση βιβλιογραφικές αναφορές για τον πολλαπλασιασμό του *Arbutus unedo* και άλλων ξυλωδών ειδών χρησιμοποιήθηκε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS ή WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ή με τις κυτοκινίνες BA ή TDZ (σε συγκέντρωση 1, 2,5 και 5 mg l⁻¹ ή 0,05, 0,2, 0,5 και 1,0 mg l⁻¹ αντίστοιχα). Έκφυτα που μεταφυτεύτηκαν με ανανέωση τομής σε υπόστρωμα MS ή WPM που περιείχε TDZ σε συγκέντρωση 0,05, 0,2, 0,5 ή 1,0 mg l⁻¹ αντέδρασαν σε μικρό ποσοστό (40%) σε υπόστρωμα MS και σε ποσοστό 82-100% σε υπόστρωμα WPM σχηματίζοντας κάλο και μικρούς παραμορφωμένους βλαστούς (Πίν. 19, Εικ. 31, 32).

Το πρόβλημα του σχηματισμού μικρού αριθμού κοντών βλαστών εξακολουθούσε να παραμένει και για να αντιμετωπιστεί εξετάστηκε με βάση βιβλιογραφικές αναφορές και για άλλα είδη της οικ. Ericaceae η επίδραση ZEAT. Όλα τα έκφυτα που μεταφυτεύτηκαν από υπόστρωμα αρχικής καλλιέργειας WPM με 2,5 mg l⁻¹ BA σε υπόστρωμα WPM που περιείχε 2,5 mg l⁻¹ ZEAT αντέδρασαν (ποσοστό αντίδρασης 100%), σχηματίστηκαν 4 βλαστοί ανά έκφυτο και επετεύχθη επιμήκυνση: το μέσο μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών ήταν 1,3 cm, αλλά κάποιοι βλαστοί ήταν πολύ μακρύτεροι από αυτό (Πίν. 19, Εικ. 33).

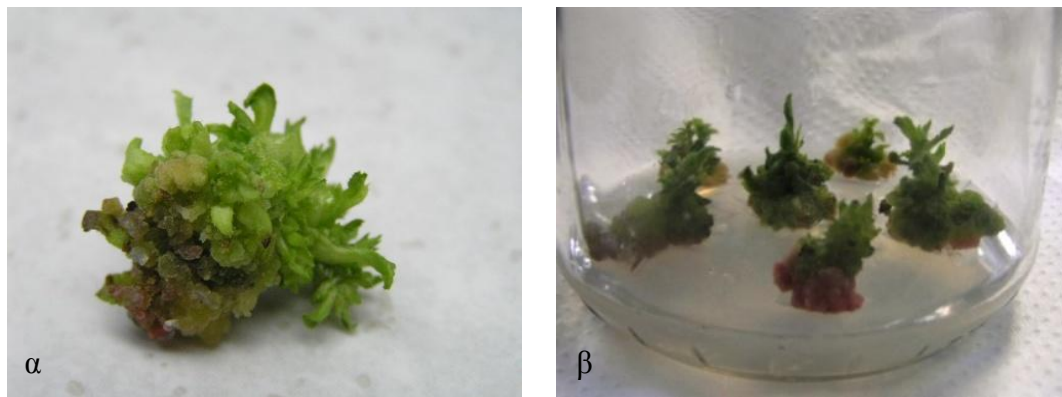
Πίν. 19. Επίδραση του αναγραφόμενου υποστρώματος και είδους κυτοκινινών, στη βλαστογένεση (%), μήκος βλαστών και αριθμό φύλλων σε υποστρώματα μεταφοράς WPM ή MS με ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ή με BA σε συγκέντρωση 1,0, 2,5, 5,0 ή 10,0 mg l⁻¹ BA, TDZ σε συγκέντρωση 0,05 ή 0,2 ή 0,5 mg l⁻¹ ή ZEAT σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹. Τα έκφυτα ήταν κοντοί βλαστοί ή έκφυτα με ανανέωση τομής που είχαν σχηματιστεί σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ BA, n=24-48.

Υπόστρωμα Μεταφύτευσης		Βλαστογ ένεση (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Αριθμός φύλλων	
MS	(Hf) Hormone free	0	-			
	Hf Μισής δύναμης	0	-			
	BA	1,00 mg l ⁻¹	0	-		
		2,50 mg l ⁻¹	0	-		
		5,00 mg l ⁻¹	0	-		
		10,00 mg l ⁻¹	0	-		
	TDZ	0,05 mg l ⁻¹	40	M.Δ.Κ.		
		0,20 mg l ⁻¹	40	M.Δ.Κ.		
		0,50 mg l ⁻¹	40	M.Δ.Κ.		
1,00 mg l ⁻¹		20	M.Δ.Κ.			
WPM	(Hf) Hormone free	0	-			
	Hf Μισής δύναμης	0	-			
	BA	1,00 mg l ⁻¹ *	90	1	<0,3	
		2,50 mg l ⁻¹ *	85	1 a	0,4 b	3,7 b
		5,00 mg l ⁻¹ *	90	1	<0,3	
		10,00 mg l ⁻¹ *	80	1	<0,3	
	TDZ	0,05 mg l ⁻¹	100	M.Δ.Κ.		
		0,20 mg l ⁻¹	100	M.Δ.Κ.		
		0,50 mg l ⁻¹	100	M.Δ.Κ.		
1,00 mg l ⁻¹		82	M.Δ.Κ.			
**	ZEAT 2,5 mg l ⁻¹	100	4 b	1,3 a	11,3 a	

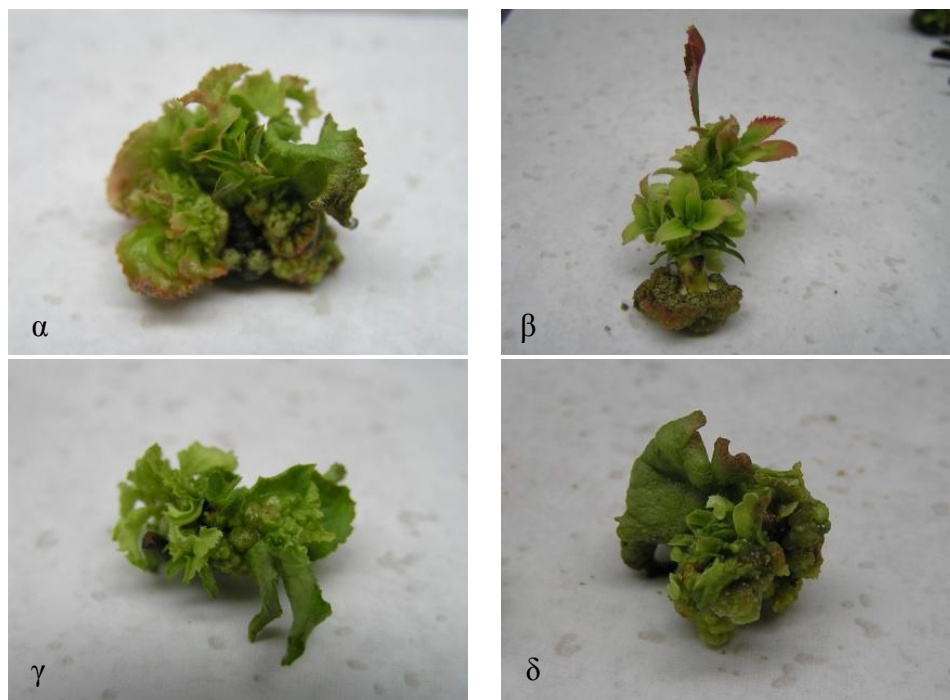
* Στα υποστρώματα WPM με BA δεν σχηματίστηκαν νέοι βλαστοί, παρά ελαφρά εξέλιξη (ελάχιστη επιμήκυνση και πλήρης έκπτυξη φύλλων) των ήδη σχηματισμένων κοντών βλαστών στα υποστρώματα εγκατάστασης.

M.Δ.Κ. : Μη δυνάμενοι να καταμετρηθούν βλαστοί.

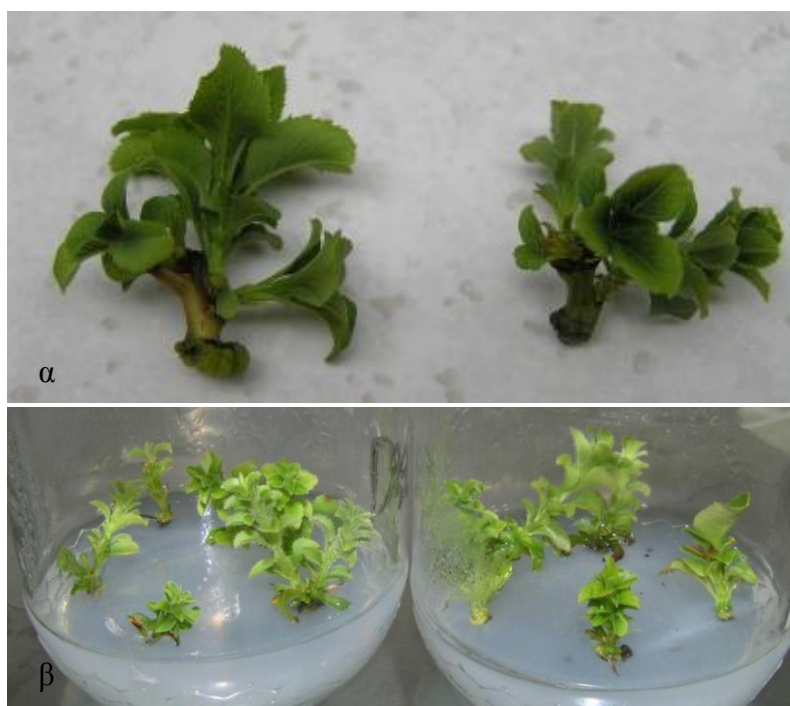
**Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student' s test σε P=0,05.



Εικ. 31. Υποκαλλιέργεια εκφύτων *A. andrachne* από WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA σε MS με $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ (α) ή σε WPM με $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ (β).



Εικ. 32. Επίδραση του TDZ σε συγκέντρωση $0,1$ ή $0,5 \text{ mg l}^{-1}$, σε δύο τύπους εκφύτων *A. andrachne* που μεταφυτεύτηκαν από υπόστρωμα αρχικής εγκατάστασης, WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA: έκφυτα στα οποία πριν τη μεταφύτευση έγινε ανανέωση της αρχικής τομής (α, β), και έκφυτα που προήλθαν από κοντούς βλαστούς που υποκαλλιεργήθηκαν (αφαιρεθέντος του μεριστώματος) (γ, δ). Και για τους δύο τύπους εκφύτων το αποτέλεσμα ήταν ο σχηματισμός κάλου και παραμορφωμένων βλαστών.



Εικ. 33. Βλαστογένεση σε έκφυτα *A. andrachne* σε υπόστρωμα WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEAT. Η βλαστογένεση αφορά έκφυτα που απλά μεταφυτεύτηκαν με ανανέωση τομής από το αρχικό υπόστρωμα καλλιέργειας ή έκφυτα που ελήφθησαν από μικρό αριθμό κοντών βλαστών δυνάμενων όμως να αποσπαστούν ως έκφυτα και είχαν σχηματιστεί στο αρχικό υπόστρωμα εγκατάστασης με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA.

5.3.1.2 Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στην βλαστογένεση και επιμήκυνση *A. andrachne* στην 2^η-3^η υποκαλλιέργεια

Με στόχο την επιμήκυνση των βλαστιδίων που σχηματίστηκαν σε υπόστρωμα MS ή WPM με $0,05$, $0,2$ ή $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ, ακολούθησε 2η υποκαλλιέργεια σε υποστρώματα WPM και MS χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία μισής ή πλήρους δύναμης, ή πλήρους δύναμης με BA σε συγκέντρωση 1 ή $2,5 \text{ mg l}^{-1}$. Οι κάλοι με τα βλαστίδια τεμαχίστηκαν σε τμήματα $0,5 \times 0,5 \text{ cm}$ και ακολούθησε η μεταφύτευσή τους. Στα υποστρώματα που περιείχαν MS, δεν σημειώθηκε καμία αντίδραση. Στα υποστρώματα που περιείχαν WPM, σημειώθηκε βλαστογένεση σε πολύ χαμηλό ποσοστό όταν καμία φυτορρυθμιστική ουσία δεν προστέθηκε. Η προσθήκη BA σε συγκέντρωση 1 ή $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ βελτίωσε τη βλαστογένεση σε ότι αφορά στο ποσοστό αντίδρασης, αλλά το μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών

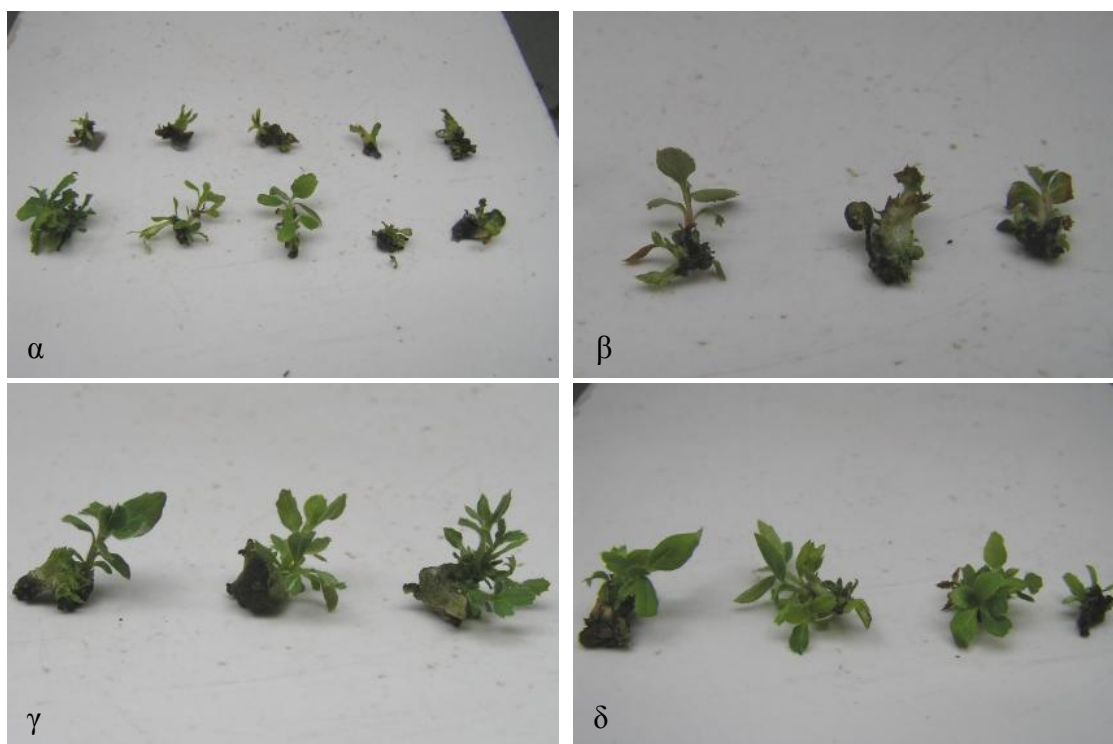
παρέμεινε πολύ μικρό. Ως εκ τούτου το δυναμικό πολλαπλασιασμού της υποκαλλιέργειας ήταν πολύ χαμηλό (Πίν. 20, Εικ. 34).

Πίν. 20. Επίδραση του είδους του θρεπτικού υποστρώματος και της αναγραφόμενης συγκέντρωσης κυτοκινίνης στο ποσοστό βλαστογένεσης (%), καθώς και στον αριθμό, το μήκος και τον αριθμό φύλλων των βλαστών του *A. andrachne*. Καλλιεργήθηκαν τεμάχια κάλου με βλαστίδια που είχαν σχηματιστεί σε υπόστρωμα MS με 0,05 ή 0,2 mg l⁻¹ TDZ, n=24.

Υπόστρωμα	Βλαστο	Αριθμός	Μήκος	Αριθμό	ΓΙΝ	B/
Μεταφύτευσης	γένεση	βλαστών	βλαστώ	ς	A	0,6
	(%)		ν (cm)	φύλλων		
MS						
Hf* μισής δύναμης	0,0					
Hf πλήρες	0,0					
BA 1,0 mg l ⁻¹	0,0					
2,5 mg l ⁻¹	0,0					
WPM						
Hf* μισής δύναμης	12,5	3,0 a	0,6 a	6,5 a	0,38	0,38
Hf πλήρες	12,5	3,0 a	0,5 a	6,0 a	0,38	0,32
BA 1,0 mg l ⁻¹	50,0	2,5 a	0,6 a	6,0 a	1,25	1,25
2,5 mg l ⁻¹	50,0	2,5 a	0,7 a	6,6 a	1,25	1,46

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student' s test σε P=0,05.

*Hf: Hormone free, θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία



Εικ. 34. Καλλιέργεια τμημάτων κάλου *A. andrachne* με βλαστίδια σε WPM χωρίς φυτ/κή ουσία, πλήρους ή μισής δύναμης (α, β αντίστοιχα) ή με BA σε συγκέντρωση 1 ή 2,5 mg l⁻¹ (γ, δ αντίστοιχα). Τα έκφυτα προέρχονταν από καλλιέργεια σε MS ή WPM με 0,05 ή 0,2 mg l⁻¹ TDZ.

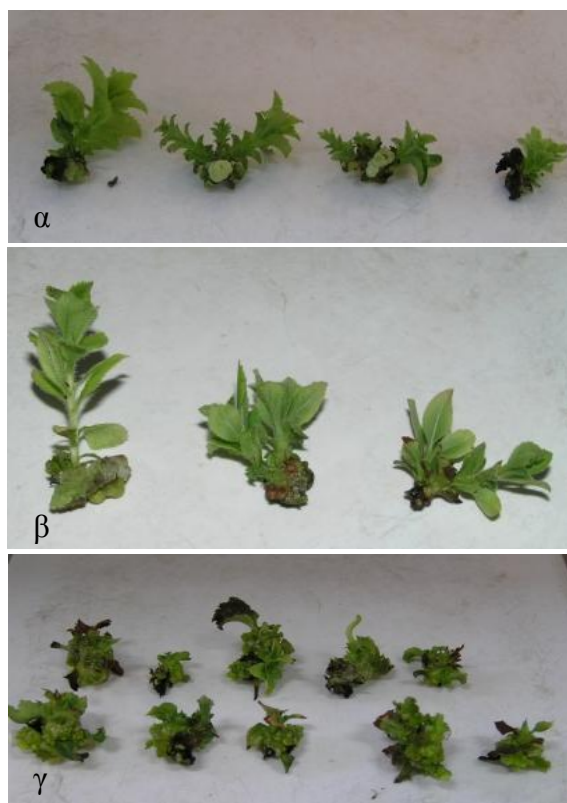
Στη συνέχεια επιλέχθηκε πάλι η χρήση ZEAT σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹ για την 3^η υποκαλλιέργεια, σε υπόστρωμα WPM. Το ποσοστό αντίδρασης ήταν 100% και σχηματίστηκαν 5,4 βλαστοί/έκφυτο μέσους μήκους 2,2 cm και 11 φύλλα/βλαστό (Εικ. 35).



Εικ. 35. Σχηματισμός βλαστών, κατά την 3^η υποκαλλιέργεια εκφύτων κόμβων *A. andrachne* σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT. Οι βλαστοί προέρχονταν από υπόστρωμα (2^η υποκ/γεια) WPM χωρίς φυτορυθμιστική ουσία, πλήρους ή μισής δύναμης με BA (1 ή 2,5 mg l⁻¹), προερχόμενοι όμως από υπόστρωμα (1^η υποκαλλιέργεια) MS ή WPM με προσθήκη TDZ σε συγκέντρωση 0,05 ή 0,2 mg l⁻¹.

Ακολούθως, αποφασίστηκε να ελεγχθεί η πιθανή επίδραση του TDZ στο υπόστρωμα προέλευσης και ελήφθησαν τεμάχια κάλου με βλαστίδια που σχηματίστηκαν από την πρώτη υποκαλλιέργεια σε WPM με TDZ σε συγκέντρωση

0,2 και 0,5 mg I⁻¹ και μεταφέρθηκαν σε WPM με 2,5 mg I⁻¹ ZEAT, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό επιμηκυμένων βλαστών με ποσοστό βλαστογένεσης από 50-85% (σε 0,5 και 0,2 mg I⁻¹ TDZ αντίστοιχα). Σχηματίστηκαν 2,2-2,3 βλαστοί/έκφυτο ενώ και το μήκος ήταν παρόμοιο (1,2-1,4 cm) (Εικ. 36), χωρίς να βρεθεί διαφορά οφειλόμενη στην ύπαρξη διαφορετικών συγκεντρώσεων TDZ στο υπόστρωμα προέλευσης.



Εικ. 36. Βλαστογένεση *A. andrachne* σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg I⁻¹ ZEAT από τεμάχια κάλου με βλαστίδια που σχηματίστηκαν στην 1^η υπ/γεια σε WPM με 0,2 (α) ή 0,5 mg I⁻¹ TDZ (β). Η μεταφορά στη συνέχεια στο αυτό υπόστρωμα, επέφερε σχηματισμό κάλου με παραμορφωμένους βλαστούς (γ).

Σε ένα άλλο πείραμα ελέγχθηκε η πιθανή επίδραση του TDZ που είχε προστεθεί σε υπόστρωμα αρχικής εγκατάστασης καλλιέργειας. Μεταφέρθηκαν έκφυτα που αρχικά καλλιεργήθηκαν σε WPM με 0,5 mg I⁻¹ TDZ σε υποστρώματα WPM με διάφορες κυτοκινίνες (Πίν. 21). Μόνο στα υποστρώματα που περιείχαν ZEAT σημειώθηκε ικανοποιητική βλαστογένεση.

Πίν. 21. Επίδραση του είδους και της αναγραφόμενης συγκέντρωσης κυτοκινίνης στο ποσοστό βλαστογένεσης (%), μήκος βλαστών και αριθμό φύλλων *A. andrachne* σε υπόστρωμα μεταφοράς WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ή με BA (2,5 mg l⁻¹), TDZ (0,1 ή 0,2 ή 0,5 mg l⁻¹, ZEAT (2,5 mg l⁻¹) ή KIN (2,5 mg l⁻¹). Τα έκφυτα είχαν σχηματιστεί σε WPM με 0,5 mg l⁻¹ TDZ, n=28-32.

Υπόστρωμα Μεταφύτευσης WPM	Βλαστογένεση (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Αριθμός φύλλων
Hf* μισής δύναμης	0			
Hf πλήρες	0			
BA ** 0,5 mg l ⁻¹	0			
1,0 mg l ⁻¹	0			
2,5 mg l ⁻¹	0			
5,0 mg l ⁻¹	0			
TDZ 0,05mg l ⁻¹	100	M.Δ.Κ.	<0,1	
0,2 mg l ⁻¹	100	M.Δ.Κ.	<0,1	
0,5 mg l ⁻¹	100	M.Δ.Κ.	<0,1	
ZEAT 2,5 mg l ⁻¹	100	1,7	1,5	12,2
KIN** 2,5 mg l ⁻¹	0	1,0	<0,2	

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student' s test σε $P=0,05$.

*Hf: Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (Hormone free)

** Στα υποστρώματα WPM με BA ή KIN δεν σχηματίστηκαν νέοι βλαστοί, παρά ελαφρά εξέλιξη των ήδη σχηματισμένων κοντών βλαστών στα υποστρώματα εγκατάστασης.

M.Δ.Κ. : Βλαστοί μη δυνάμενοι να καταμετρηθούν.

5.3.1.3 Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών κατά τον πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών *A. andrachne*

Όταν έγιναν τα πειράματα για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. andrachne* δεν υπήρχαν αναφορές και ως εκ τούτου ελέγχθηκε η επίδραση διαφόρων κυτοκινινών (BA, ZEAT, KIN, 2IP και TDZ) ώστε να βρεθεί το είδος της

κυτοκινίνης, καθώς και η συγκέντρωση της, η οποία θα προκαλεί την μεγαλύτερη βλαστογένεση των εκφύτων, καθώς και υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας. Ύστερα από αριθμό υποκαλλιεργειών σε υποστρώματα WPM με 2,5 g l⁻¹ ZEAT, καλλιεργήθηκαν έκφυτα κόμβων *in vitro* αναπτυσσόμενων βλαστών, σε άλατα WPM με 3% σακχαρόζη, βιταμίνες Mullin και τις συγκεντρώσεις 0,5, 1,0, 2,5, ή 5,0 mg l⁻¹, των κυτοκινινών KIN, ZEAT, BA, ή 2IP. Εξετάστηκε όμως επιπρόσθετα και η επίδραση του TDZ στις εξής συγκεντρώσεις: 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 και 2,0 mg l⁻¹. Λόγω της διαμεσολάβησης των υποκαλλιεργειών σε ZEAT, διερευνήθηκε ξανά η δυνατότητα συνδυασμένης χρήσης BA με NAA, αν και στην πρώτη υποκαλλιέργεια δεν είχε αποτελεσματικότητα. Ελέγχθηκε η επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης, στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς, στον αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν, καθώς και στη δυναμικότητα πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας.

Το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς επηρεάστηκε από την κυτοκινίνη που χρησιμοποιήθηκε και ήταν μεγαλύτερο στα υποστρώματα με ZEAT και 2IP σε συγκέντρωση 1,0, 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ χωρίς διαφορά από τα υποστρώματα με ZEAT ή 2IP σε συγκέντρωση 0,5 mg l⁻¹ και 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ BA. Στα υποστρώματα χωρίς KIN (Hf) σημειώθηκε το χαμηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης, χωρίς όμως διαφορά από τα υποστρώματα που περιείχαν κυτοκινίνη σε συγκέντρωση 1, 2,5 ή 5 mg l⁻¹ (Πίν. 22). Ανεξαρτήτως συγκεντρώσεως το υψηλότερο ποσοστό αντίδρασης και σχηματισμού βλαστών, σημειώθηκε σε υπόστρωμα με ZEAT ή 2IP (Σχ. 26).

Έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε υποστρώματα με ZEAT, ανεξαρτήτως συγκεντρώσεως σχημάτισαν τον υψηλότερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε και έπονταν τα έκφυτα σε BA ή 2IP χωρίς όμως διαφορά από τα έκφυτα σε υποστρώματα Hf (Σχ. 26). Ο αριθμός βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε ήταν υψηλότερος σε υποστρώματα που περιείχαν ZEAT σε συγκέντρωση 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹, αλλά ο αριθμός βλαστών που σχηματίστηκαν σε 2,5 mg l⁻¹ δε διέφερε από τον αριθμό βλαστών σε υπόστρωμα με 1 mg l⁻¹ ZEAT (Πίν. 22, Σχ. 27).

Το μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν ανεξαρτήτως συγκεντρώσεως ήταν μεγαλύτερο στα υποστρώματα με ZEAT, 2IP ή Hf (Σχ. 26). Το μεγαλύτερο μήκος βλαστών σχηματίστηκε σε υποστρώματα με 5,0 mg l⁻¹ 2IP ή 0,5 mg l⁻¹ ZEAT. Οι βλαστοί με το αμέσως μικρότερο μήκος σχηματίστηκαν στα υποστρώματα που περιείχαν τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις ZEAT ή 2IP ή στο υπόστρωμα Hf. Το

μικρότερο μήκος βλαστών σχηματίστηκε σε υποστρώματα που περιείχαν ΒΑ και ΚΙΝ (Πίν. 22, Εικ. 37, 38, 39, 40, Σχ. 27).

Ο αριθμός των φύλλων ανά βλαστό ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, ήταν υψηλότερος στα υποστρώματα που περιείχαν ΖΕΑΤ και ακολούθως στο υπόστρωμα που δεν περιείχε καμία κυτοκινίνη (Σχ. 26). Η δυναμικότητα πολλαπλασιασμού, που αποτελεί ένδειξη της ικανότητας των εκφύτων για ταχύτερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού, ήταν σημαντικά ψηλότερη, όταν στα υποστρώματα καλλιέργειας συμπεριλήφθηκε ΖΕΑΤ σε όλες τις συγκεντρώσεις ή $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ 2IP (Πίν. 22, Εικ. 39 και 40, Σχ. 27), ενώ σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία (Εικ. 41), το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν περίπου το 1/3 του προηγούμενου και παράλληλα σημειώθηκε ριζοβολία σε μικρό ποσοστό (περίπου 20%) (Πίν. 22, Εικ. 42).

Το ΝΑΑ δεν ήταν αποτελεσματικό όταν προστέθηκε στα υποστρώματα, αν και είχαν μεσολαβήσει υποκαλλιέργειες σε ΖΕΑΤ. Αυξανόμενη της συγκέντρωσής του και της αναλογίας του στο υπόστρωμα, η βλαστογένεση παρεμποδίστηκε ολοκληρωτικά και μόνο κάλος σχηματίστηκε. Κάλος σχηματίστηκε επίσης σε όλα τα υποστρώματα που περιείχαν ΖΕΑΤ, και στα υποστρώματα που περιείχαν 2IP στις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις (2,5 και $5,0 \text{ mg l}^{-1}$). Το TDZ αποδείχθηκε ακατάλληλο και στις πολύ μικρές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε. Σχηματιζόταν κάλος και πολύ κοντοί βλαστοί μη δυνάμενοι να καταμετρηθούν (Πίν. 22).

Στο Σχήμα 27, αποδίδονται γραφικά τα εκτιμώμενα μορφολογικά χαρακτηριστικά (Πίν. 22) σε κάθε συγκέντρωση κυτοκινίνης που χρησιμοποιήθηκε. Είναι εμφανής η υπεροχή της ΖΕΑΤ στον αριθμό των βλαστών που σχηματίζονται και η θετική επίδραση του 2IP στο μήκος των βλαστών.

Πίν. 22. Επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών, σε WPM στο ποσοστό των εκφύτων *A. andrachne* που αντέδρασαν δίνοντας βλαστό, στον αριθμό σχηματιζόμενων βλαστών ανά αντιδρούν εκφυτο, στον αριθμό φύλλων ανά βλαστό, στο μήκος σχηματισθέντων βλαστών, καθώς και στη δυναμικότητα πολ/μού, (αθροιστικά αποτελέσματα από δύο πειράματα με χρήση εκφύτων από 3^η και 5^η υποκαλλιέργεια), $n=32-38$.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλαστ	Μέσος	Μέσο	Μέσος	ΓΙΝ	ΓΙΝ
ΦΥΤ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ογένε	Αριθ.	Μήκος	Αριθμ.	A	B
ΟΥΣ	(mg l ⁻¹)	ση	Βλαστών	Βλαστών	Φύλλων		/
		(%)		(cm)			0,6
Hf		75,00	1,5 efg	0,8 bc	6,7 c	1,13	1,50
BA	0,5	87,50	1,0 g	0,4 e	3,8 efg	0,88	0,58
	1,0	90,60	1,3 fg	0,4 d	4,0 ef	1,18	0,79
	2,5	93,70	2,1 cd	0,4 e	3,7 efg	1,97	1,31
	5,0	93,70	2,0 cde	0,4 e	3,0 fgh	1,87	1,25
ZEAT	0,5	93,80	2,1 cd	1,2 a	9,5 a	1,97	3,94
	1,0	100,00	2,7 b	0,9 b	6,9 c	2,70	4,05
	2,5	100,00	3,1 ab	0,9 b	7,7 bc	3,10	4,65
	5,0	100,00	3,5 a	0,9 b	8,2 b	3,50	5,25
2IP	0,5	93,70	1,2 fg	0,9 b	4,5 d	1,12	1,88
	1,0	100,00	1,5 fg	0,9 b	5,0 d	1,50	2,25
	2,5	100,00	1,7 def	0,9 b	5,4 d	1,70	2,55
	5,0	100,00	2,2 c	1,2 a	6,7 c	2,20	4,40
KIN	0,5	84,40	1,0 g	0,4 d	2,6 h	0,84	0,56
	1,0	81,30	1,1 g	0,5 cd	2,8 gh	0,89	0,74
	2,5	81,20	1,1 g	0,5 cd	2,8 gh	0,89	0,74
	5,0	78,10	1,0 g	0,3 d	2,0 gh	0,78	0,39
TDZ	0,01 ^{1,3}	85,00					
	0,05 ^{1,3}	80,00					
	0,1, 0,2, 0,5 ή 1,0 ^{1,3}	85,00					
	2,0	0,00					
BA/	2,5/0,01 ¹	50,00	1,0	0,4	3,4	0,2	0,3
NAA	2,5/0,1 ¹	50,00	1,0	0,4	3,4	0,2	0,3
	2,5/0,2 ¹	45,00	1,0	0,4	3,4	0,2	0,3
	2,5/0,5 ¹	50,00	1,0	0,4	3,5	0,2	0,3
	2,5/0,75, 1,0, 1,25 ή 1,5 ^{1,2}	0,00					
	5/0,75, 1,25 ή 1,5	0,00					
Ανάλυση της συνδιασποράς							
ΦΥΤ ΟΥΣΙΑ			**	**	**		

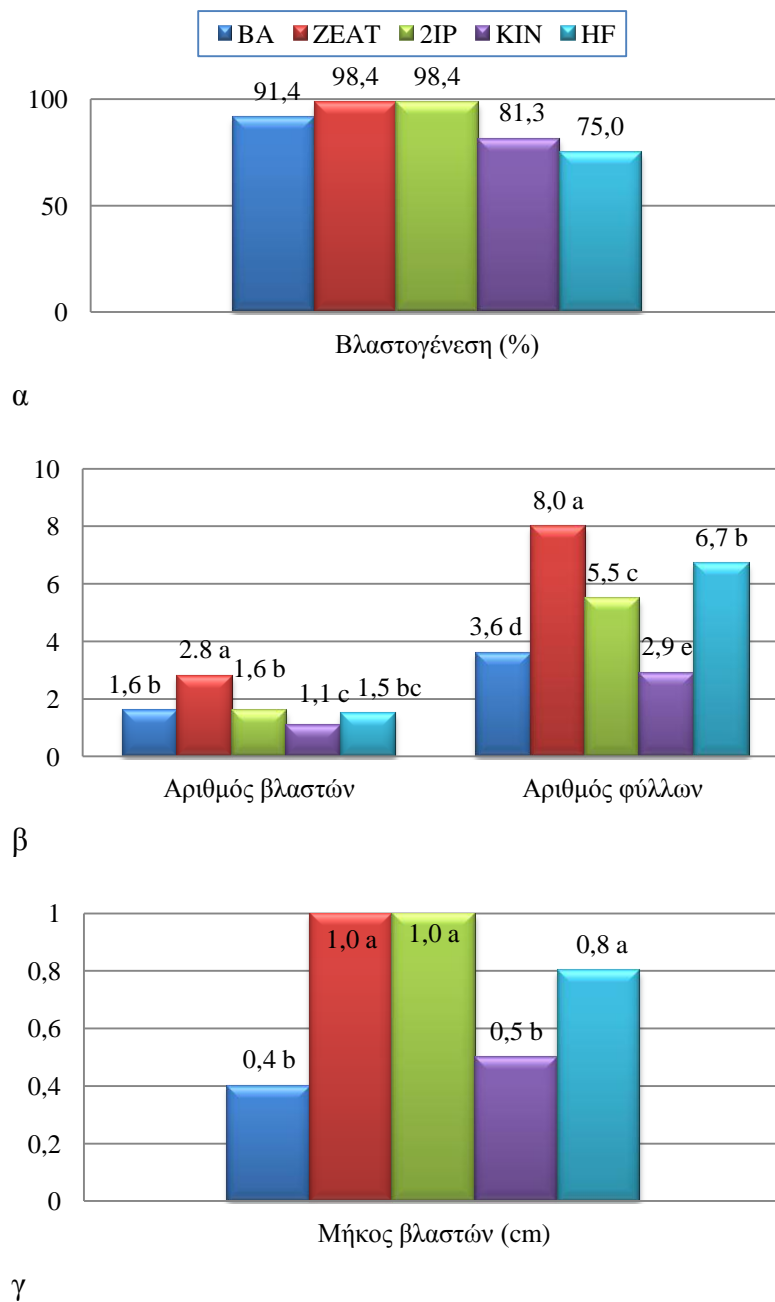
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test σε $P=0,05$.

*, **: σημαντικά σε $P=0,05$, $P=0,01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0,05$.

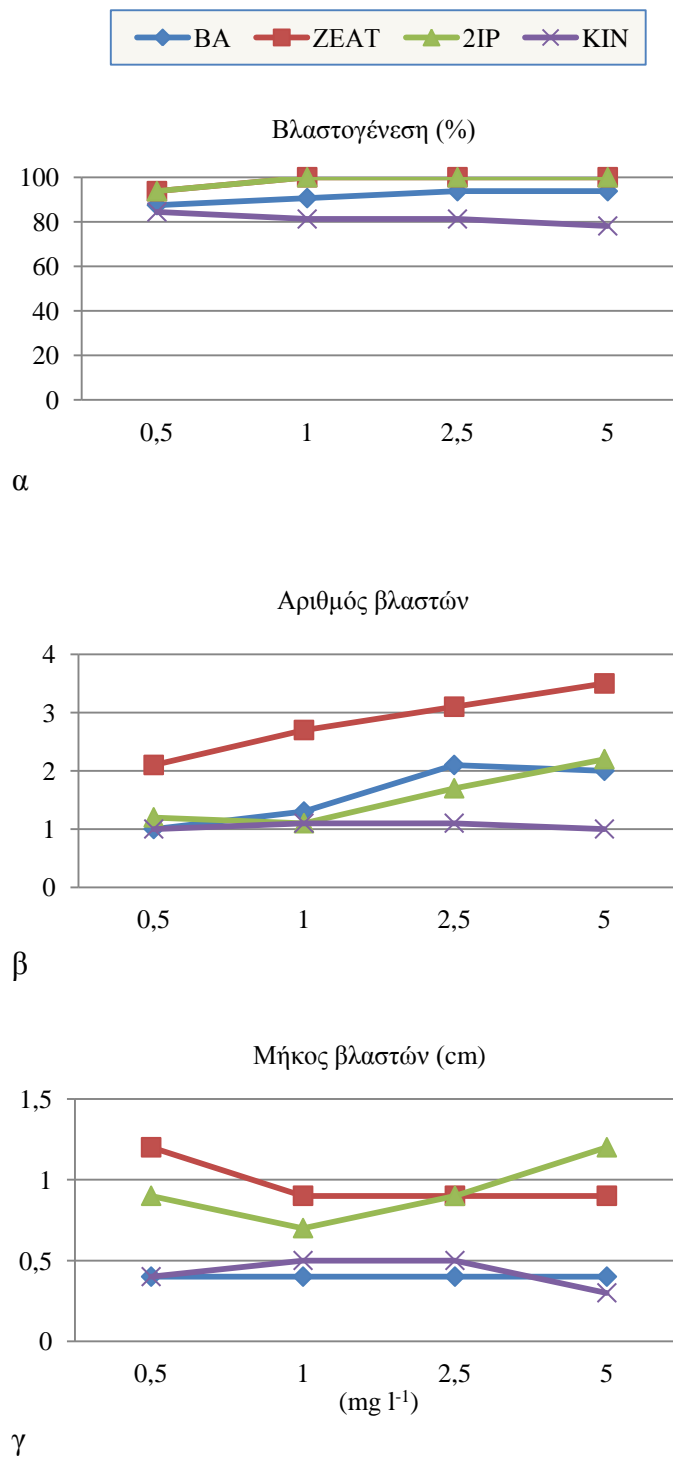
¹: Δεν συμπεριλήφθησαν στην στατιστική επεξεργασία

²: Σχηματίστηκε μόνο κάλος

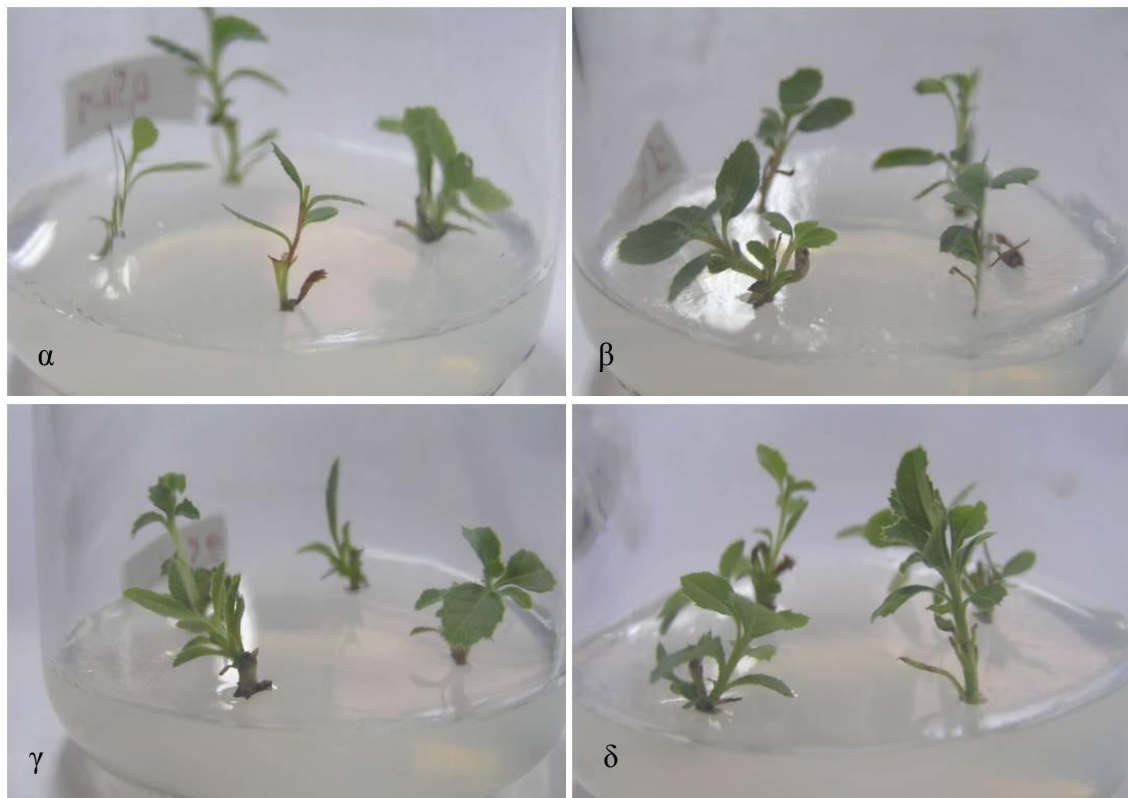
³: Σχηματίστηκε κάλος με διάμετρο 1-2 cm και πολύ κοντούς βλαστούς.



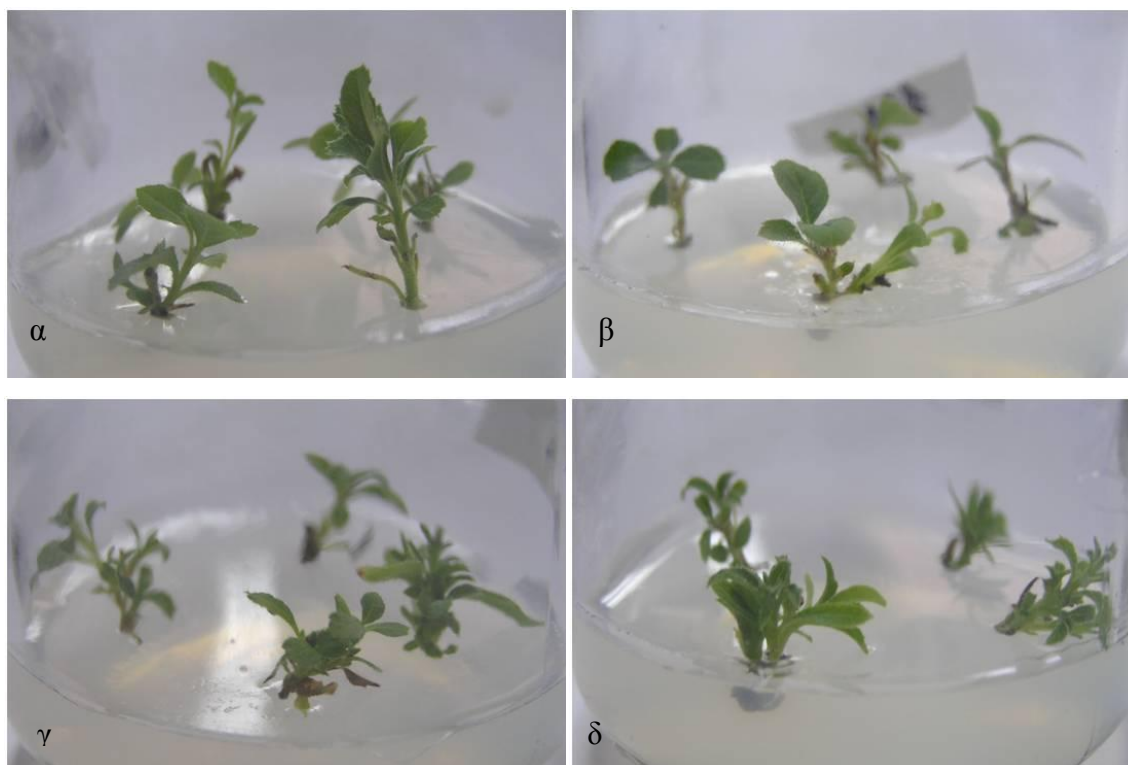
Σχ. 26. Επίδραση του είδους της κυτοκινίνης, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης στη βλαστογένεση (α), στον αριθμό βλαστών ανά έκφυτο, στο μέσο μήκος των βλαστών (β, γ αντίστοιχα) και στον αριθμό των φύλλων ανά βλαστό (β) που σχηματίστηκαν, κατά την υποκαλλιέργεια *A. andrachne*. Σύγκριση μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n= 96-120$.



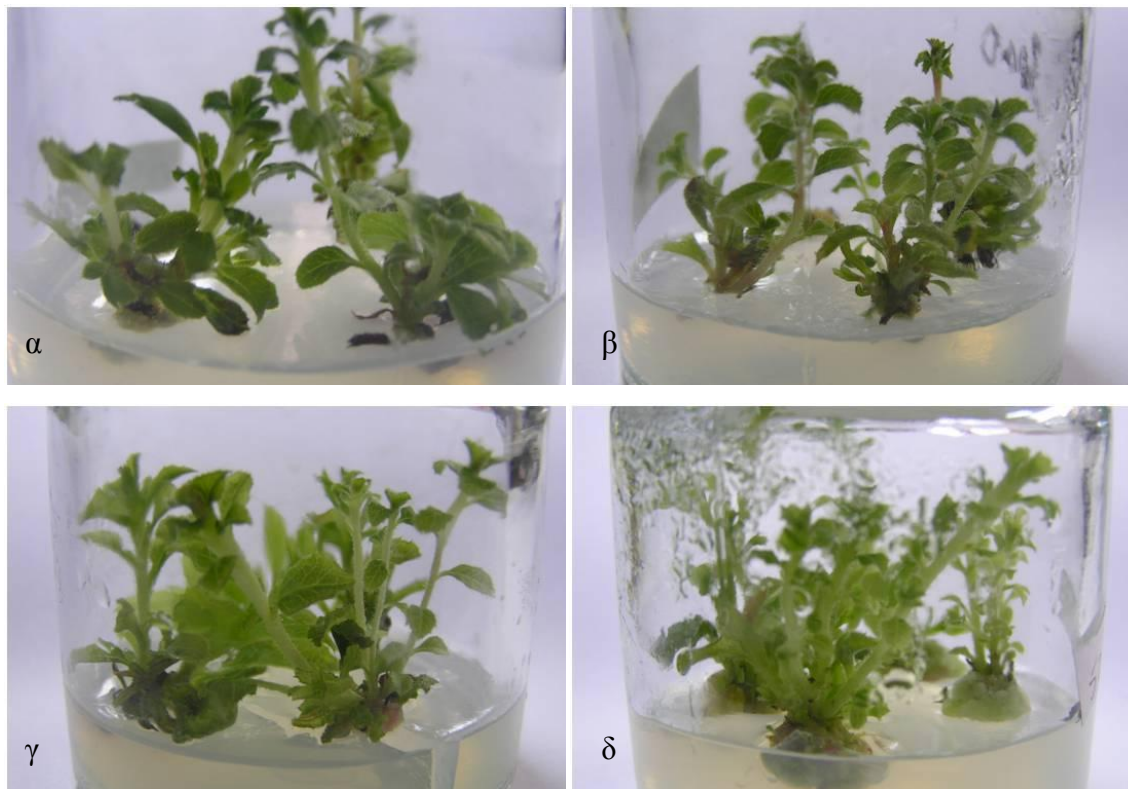
Σχ. 27. Γραφική απόδοση της επίδρασης των διαφόρων κυτοκινινών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την υποκαλλιέργεια *A. andrachne*.



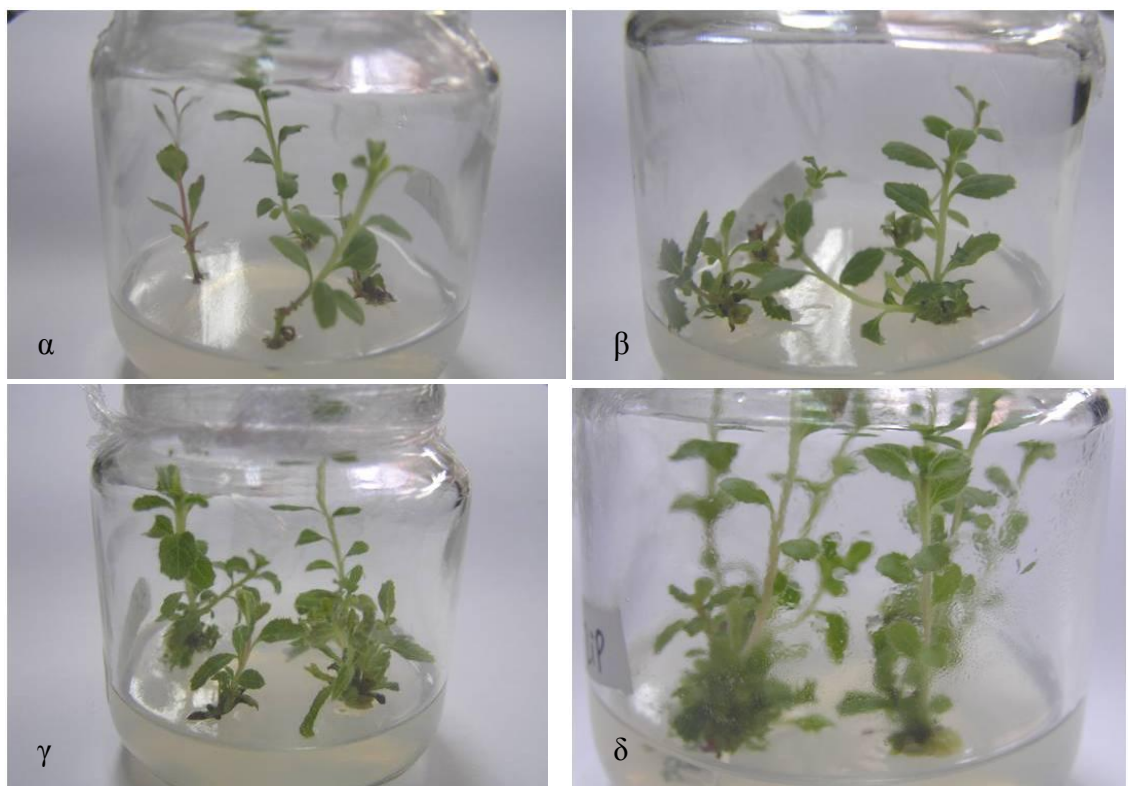
Εικ. 37. Βλαστογένεση σε έκφυτα *A. andrachne* κατά την υποκαλλιέργεια σε WPM με 0,5, 1,0, 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ BA (α, β, γ, δ, αντίστοιχα).



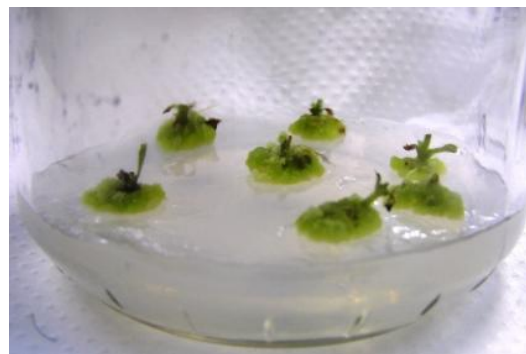
Εικ. 38. Βλαστογένεση σε έκφυτα *A. andrachne* κατά την υποκαλλιέργεια σε WPM με 0,5, 1,0, 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ KIN (α, β, γ, δ, αντίστοιχα).



Εικ. 39. Βλαστογένεση σε έκφυτα *A. andrachne* κατά την υποκαλλιέργεια σε WPM με 0,5, 1,0, 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ ZEAT (α, β, γ, δ, αντίστοιχα).



Εικ. 40. Βλαστογένεση σε έκφυτα *A. andrachne* κατά την υποκαλλιέργεια σε WPM με 0,5, 1,0, 2,5 ή 5,0 mg l⁻¹ 2IP (α, β, γ, δ, αντίστοιχα).



Εικ. 41. Βλαστογένεση σε έκφυτα *A. andrachne* κατά την υποκαλλιέργεια σε WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες. Εικ. 42. Σχηματισμός κάλου σε έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ BA και 1 mg l⁻¹ NAA.

5.3.1.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του TDZ στο υπόστρωμα προέλευσης στην εν συνεχεία υποκαλλιέργεια και πολλαπλασιασμό καλλιεργειών *A. andrachne*

Με στόχο την επιμήκυνση των βλαστών που είχαν σχηματιστεί στα υποστρώματα με TDZ (βλ. κεφ. 5.2.1.3.) έγινε υποκαλλιέργεια σε WPM που περιείχε BA ή KIN ή 2IP ή ZEAT σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹ ή WPM με 0,5 mg l⁻¹ NAA και 2,5 mg l⁻¹ BA, αφού ο κάλος με τους βλαστούς τεμαχίστηκε σε τμήματα 0,5 x 0,5 cm. (Εικ. 43). Στο υπόστρωμα με NAA σχηματίστηκε μόνο κάλος. Στο υπόστρωμα με ZEAT σημειώθηκε η υψηλότερη βλαστογένεση, ενώ ο υψηλότερος αριθμός βλαστών σχηματίστηκε στο υπόστρωμα με ZEAT που προερχόταν από καλλιέργεια σε 0,1 mg l⁻¹ TDZ. Στα ίδια υποστρώματα σημειώθηκε και το μεγαλύτερο μήκος, χωρίς όμως διαφορά από το μήκος βλαστών που προέρχονταν από υπόστρωμα με 0,5 mg l⁻¹ TDZ. Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού σημειώθηκε στις καλλιέργειες που προέρχονταν από υπόστρωμα με 0,1 mg l⁻¹ TDZ, ακολουθούμενο από αυτό που έδωσαν καλλιέργειες σε 0,5 ή 1,0 mg l⁻¹ TDZ (Πίν. 23). Στα υποστρώματα με KIN δε σημειώθηκε καθόλου βλαστογένεση.

Πίν. 23. Επίδραση της συγκέντρωσης του TDZ στο υπόστρωμα προέλευσης, στην καλλιέργεια τεμαχίων κάλου και βλαστών *A. andrachne* σε WPM με τέσσερις διαφορετικές κυτοκινίνες (BA, ZEAT, 2IP, KIN) σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹, n=36-48.

WPM		Βλαστογ	Αριθμός	Μήκος	ΓΙΝ	ΓΙΝ
Προέλευση	Καλλιέργεια	ένεση	Βλαστών	Βλαστών	A	B/0,6
(mg l ⁻¹)	(mg l ⁻¹)	(%)		(cm)		
0,1 TDZ	2,5 BA	41,00	1,4 cd	0,6 c	0,57	0,57
0,5 TDZ		50,00	1,3 cd	0,6 c	0,65	0,65
1,0 TDZ		50,00	1,0 d	0,5 c	0,50	0,42
0,1 TDZ	2,5 ZEAT	83,00	2,6 a	1,2 a	2,16	4,32
0,5 TDZ		83,00	2,0 b	1,0 ab	1,66	2,77
1,0 TDZ		80,00	1,8 bc	0,8 b	1,44	1,92
0,1 TDZ	2,5 2IP	58,00	1,3 cd	0,6 c	0,75	0,75
0,5 TDZ		50,00	1,2 d	0,6 c	0,60	0,60
1,0 TDZ		55,00	1,3 cd	0,5 c	0,72	0,60
0,1 TDZ	2,5 KIN	0,00				
0,5 TDZ		0,00				
1,0 TDZ		0,00				
0,1 TDZ	2,5/1,25	0,00 ¹				
0,5 TDZ	BA/NAA	0,00 ¹				
1,0 TDZ		0,00 ¹				
Ανάλυση της συνδιασποράς						
Προέλευση (A)		NS	**	**		
Καλλιέργεια (B)		**	**	**		
(A) X (B)		NS	NS	NS		

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student's test σε P=0,05.

*, **: σημαντικά σε P=0,05, P=0,01, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε P=0,05.

¹: Σχηματίστηκε μόνο κάλος



Εικ. 43. Βλαστοί *A. andrachne* που σχηματίστηκαν (7^η υποκαλλιέργεια) σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ BA (α) ή ZEAT (β). Τα έκφυτα προέρχονται από τεμάχια κάλου 0,5 x 0,5 cm με κοντά-μη επιμηκυσμένα βλαστίδια που είχαν σχηματιστεί σε WPM με 0,1, 0,5 ή 1,0 mg l⁻¹ TDZ (1, 2, 3 αντίστοιχα).

5.3.1.5 Επίδραση της ZEAT σε διαδοχικές υποκαλλιέργειες *A. andrachne*

Η διατήρηση μητρικού υλικού *A. andrachne in vitro* γινόταν με επιτυχία σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT και διατηρήθηκαν καλλιέργειες έως και 18 μήνες μετά την αρχική τους εγκατάσταση κατά την διεξαγωγή της διατριβής, δηλαδή για 14 υποκαλλιέργειες. Το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν σταθερά πολύ υψηλό (100%) κατά τη διάρκεια των υποκαλλιεργειών και ο μεγαλύτερος μέσος αριθμός βλαστών σχηματίστηκε στην 3-4^η υποκαλλιέργεια, χωρίς να υπάρχει διαφορά από την 5^η. Το μεγαλύτερο μέσο μήκος βλαστού παρατηρήθηκε στην 2^η υποκαλλιέργεια, χωρίς όμως διαφορά από την 1η (Σχ. 28, Εικ. 44, 45, 46).



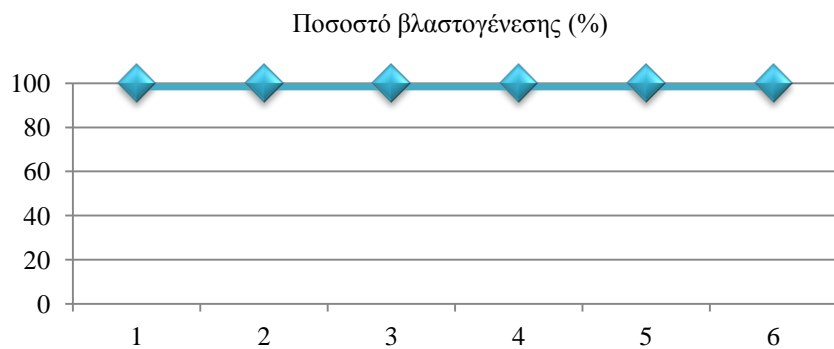
Εικ. 44. 1^η υποκαλλιέργεια *A. andrachne* σε WPM με 2,5 ZEAT. Τα έκφυτα προέρχονται από αρχική καλλιέργεια σε WPM 2,5 BA.



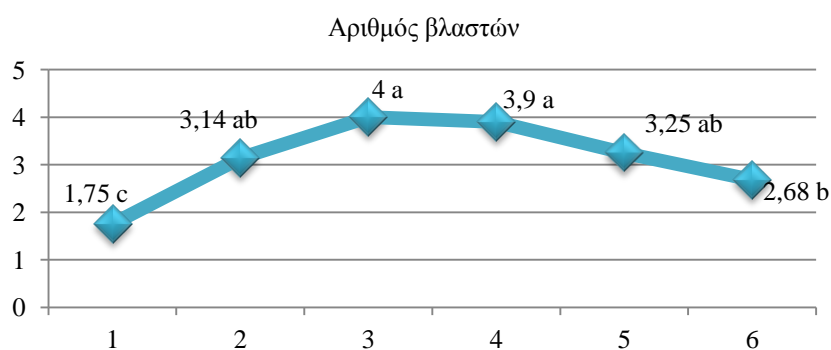
Εικ. 45. 5^η υποκαλλιέργεια *A. andrachne* σε υπόστρωμα WPM με 2,5 ZEAT. Τα έκφυτα προέρχονται από αρχική καλλιέργεια σε WPM 2,5 BA.



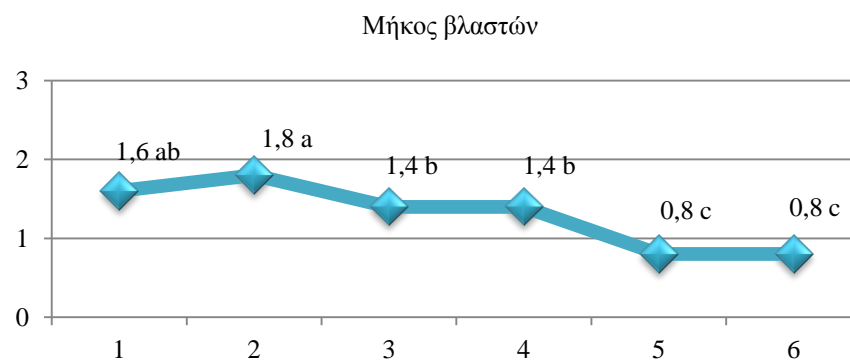
Εικ. 46. 6^η υποκαλλιέργεια *A. andrachne* σε WPM με 2,5 ZEAT. Τα έκφυτα προέρχονται από αρχική καλλιέργεια σε WPM με 2,5 BA. Οι σχηματιζόμενοι βλαστοί εξακολουθούν να έχουν μεγάλη ζωηρότητα.



α



β



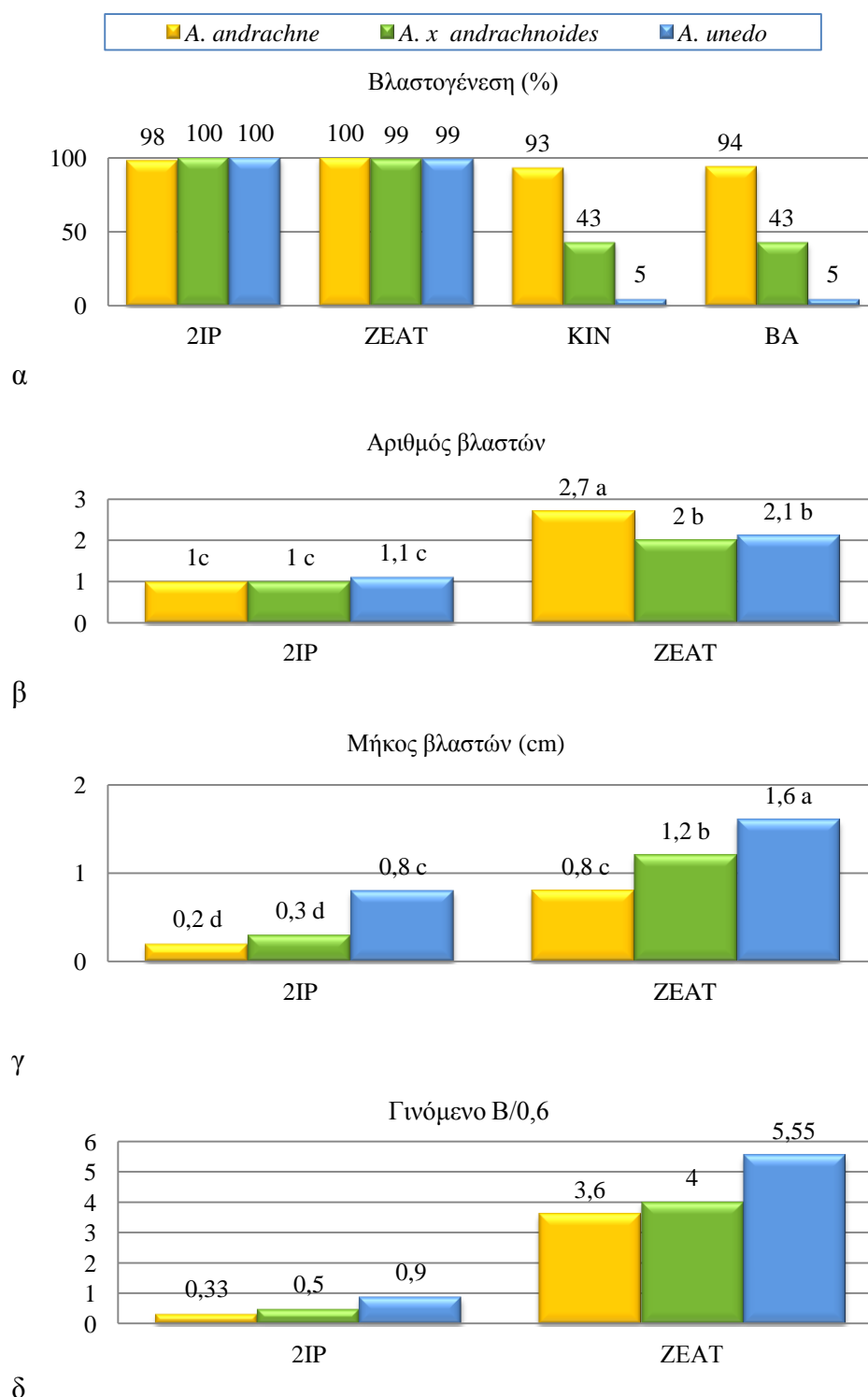
γ

Σχ. 28. Βλαστογένεση, μήκος βλαστών και αριθμός βλαστών ανά έκφυτο σε 6 διαδοχικές υποκαλλιέργειες *A. andrachne*. Αρχική εγκατάσταση σε WPM με 2,5 mg I⁻¹ BA την 20/6/2004. Σύγκριση των μέσων με Student's test σε P=0,05, n=24-34.

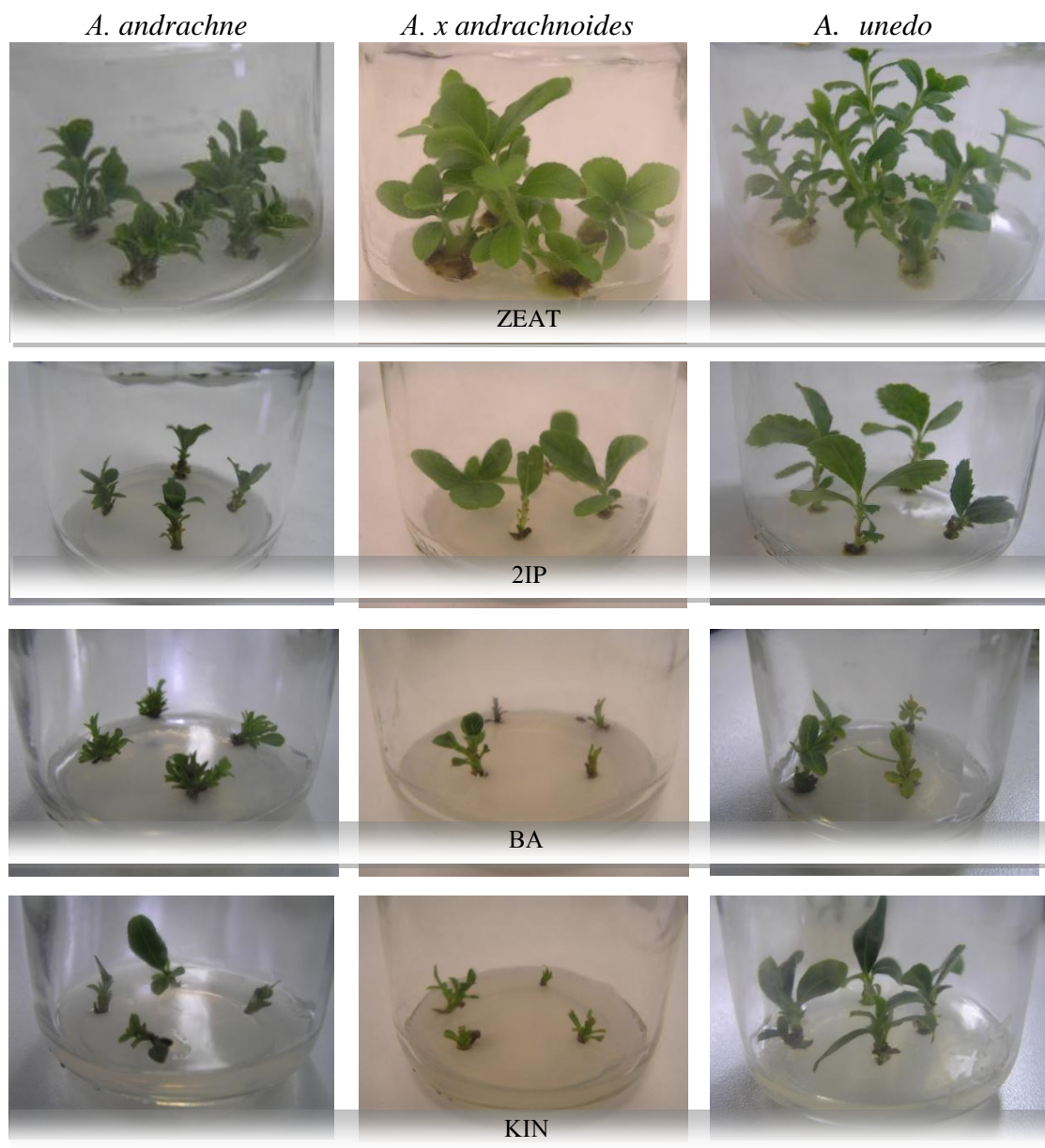
5.3.1.6 Συγκριτική αξιολόγηση της επίδρασης του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορυθμιστικών ουσιών στον πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo*

Με σκοπό τη συγκριτική μελέτη των τριών ειδών *Arbutus*, έγινε υποκαλλιέργεια εκφύτων από τα τρία είδη σε WPM που περιείχε 2,5 mg I⁻¹ BA, KIN, 2IP ή ZEAT. Η εγκατάσταση των εκφύτων έγινε τον Ιούλιο και τον Οκτώβριο του 2006, 2007, 2008 (τα έκφυτα προήλθαν από τις αντίστοιχες αρχικές καλλιέργειες των τριών ετών).

Κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια της άνοιξης, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν πάνω από 98% (Σχ. 29 α) και στα τρία είδη, όταν στα υποστρώματα καλλιέργειας προστέθηκε 2IP και ZEAT σε συγκέντρωση 2,5 mg I⁻¹. Το *A. andrachne* σημείωσε υψηλό ποσοστό αντίδρασης και σε υπόστρωμα που περιείχε 2,5 mg I⁻¹ KIN ή BA σχηματίζοντας πολύ κοντούς βλαστούς με μηδενική σχεδόν επιμήκυνση, ενώ τα έκφυτα *A. unedo* δεν αντέδρασαν και ξεράθηκαν στη συντριπτική πλειοψηφία. Οι βλαστοί που σχηματίζονταν στα δύο αυτά υποστρώματα και για τα τρία είδη δεν συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική επεξεργασία λόγω του πολύ μικρού αριθμού επαναλήψεων του *A. unedo* (Σχ. 29 α, Εικ. 47). Ο αριθμός βλαστών που σχηματίστηκε σε υπόστρωμα με 2,5 mg I⁻¹ 2IP ήταν πολύ μικρός χωρίς διαφορά μεταξύ των ειδών (1-1,1 βλαστός/έκφυτο), ενώ σε υπόστρωμα με 2,5 mg I⁻¹ ZEAT αυξήθηκε σημαντικά και το *A. andrachne* σχημάτισε τον υψηλότερο αριθμό βλαστών (2,7 βλαστοί/έκφυτο). Ο αριθμός βλαστών δεν διέφερε μεταξύ των δύο άλλων ειδών όπου σχηματίστηκαν περίπου 2 βλαστοί/έκφυτο (Σχ. 29 β). Το *A. unedo* σχημάτισε τους βλαστούς με το μεγαλύτερο μήκος σε υπόστρωμα που περιείχε 2,5 mg I⁻¹ ZEAT (1,6 cm), ακολούθησε το *A. x andrachnoides* (1,2 cm) και εν συνεχεία το *A. andrachne* (0,8 cm) (Σχ. 29 γ, Εικ. 47).



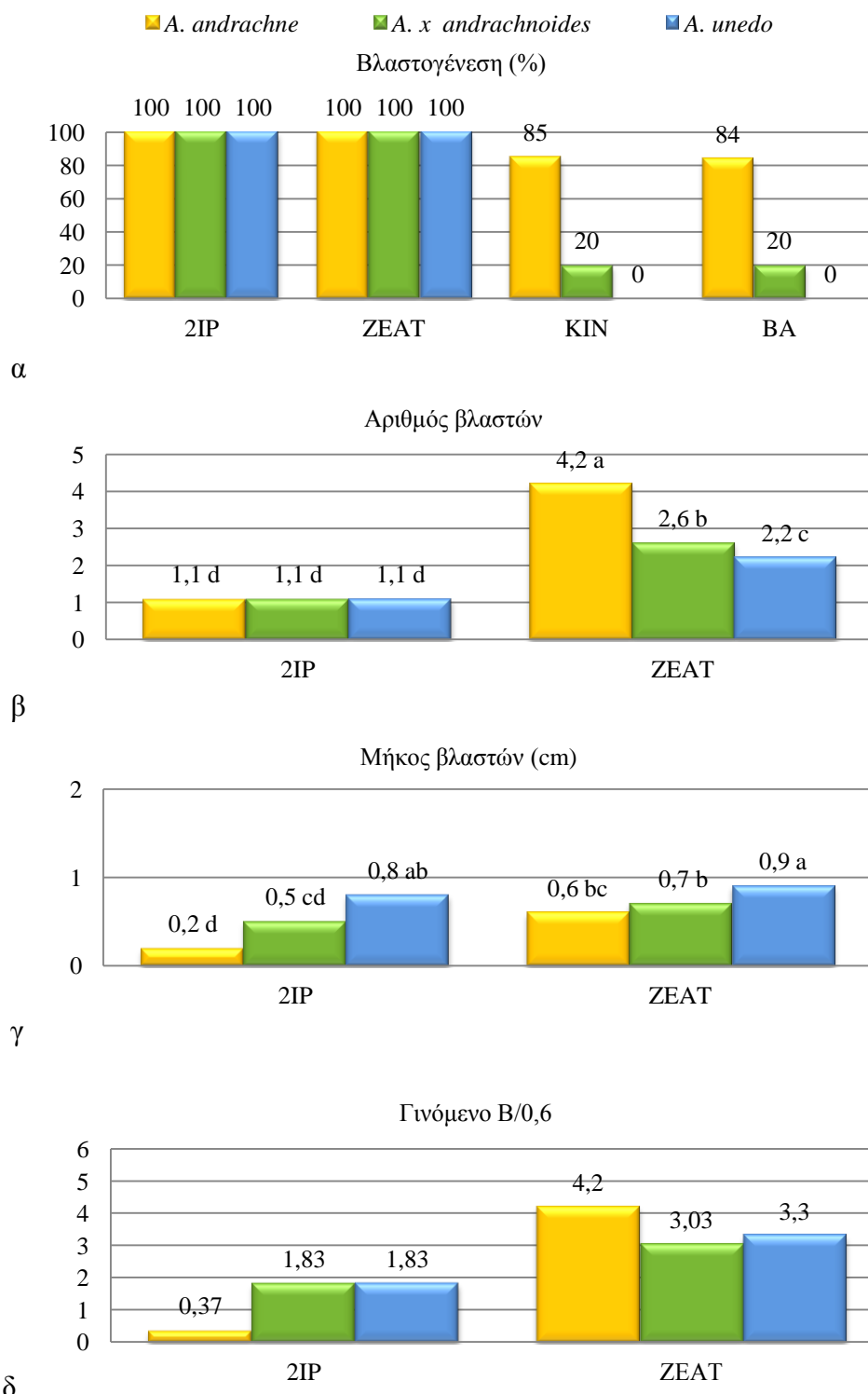
Σχ. 29. Επίδραση των αναγραφόμενων κυτοκινινών σε συγκεντρώσεις 2,5 mg l⁻¹ στη βλαστογένεση (%) (α), αριθμό και μήκος (cm) βλαστών (β, γ, αντίστοιχα) και γινόμενο B (δ) της 1^{ης} υποκ/γείας (2006-7-8) των τριών ειδών *Arbutus*. Οι αρχικές καλλιέργειες ήταν του μηνός Μαΐου. Λόγω του μικρού αριθμού επαναλήψεων του *A. unedo* σε KIN και BA, οι επεμβάσεις δεν συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική επεξεργασία. Σύγκριση μέσων με Student's test σε P=0,05, n= 24-131.



Εικ. 47. 1^η Υποκαλλιέργεια κόμβων *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* σε WPM με ZEAT, 2IP, BA ή KIN σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹. Η αρχική καλλιέργεια είχε γίνει τον Μάιο 2007 στα ίδια υποστρώματα.

Κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια του φθινοπώρου, το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 100% και στα τρία είδη, όταν στα υποστρώματα καλλιέργειας προστέθηκε 2IP και ZEAT σε συγκέντρωση $2,5 \text{ mg l}^{-1}$. Το *A. andrachne* σημείωσε υψηλό ποσοστό αντίδρασης και σε υποστρώματα που περιείχαν $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ KIN ή BA (85 και 84% αντίστοιχα) όπως είχε συμβεί και κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια της άνοιξης, ενώ κανένα έκφυτο *A. unedo* δεν σχημάτισε βλαστούς (Σχ. 30 α) και γι' αυτό δεν συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική επεξεργασία. Ο αριθμός βλαστών που σχηματίστηκε σε υπόστρωμα με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ 2IP ήταν πολύ μικρός χωρίς διαφορά μεταξύ των ειδών (1.1 βλαστός/έκφυτο), ενώ σε υπόστρωμα με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEAT αυξήθηκε σημαντικά και το *A. andrachne* σχημάτισε τον υψηλότερο αριθμό βλαστών (4.2 βλαστοί/έκφυτο). Ο αριθμός βλαστών διέφερε μεταξύ των δύο άλλων ειδών και το *A. x andrachnoides* σχημάτισε περισσότερους βλαστούς από το *A. unedo* (Σχ. 30 β). Το *A. unedo* σχημάτισε βλαστούς με μεγαλύτερο μήκος σε υπόστρωμα που περιείχε $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEAT, και ακολούθησε το *A. x andrachnoides* χωρίς διαφορά από το *A. andrachne* (Σχ. 30 γ, Εικ. 47).

Στην διαγραμματική απεικόνιση της δυναμικής πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια και του Ιουλίου και του Οκτωβρίου, αποτυπώνεται η εμφανής υπεροχή του υποστρώματος που περιέχει ZEAT σε σχέση με τα υποστρώματα που περιέχουν 2IP (Σχ. 29 δ, 30 δ).



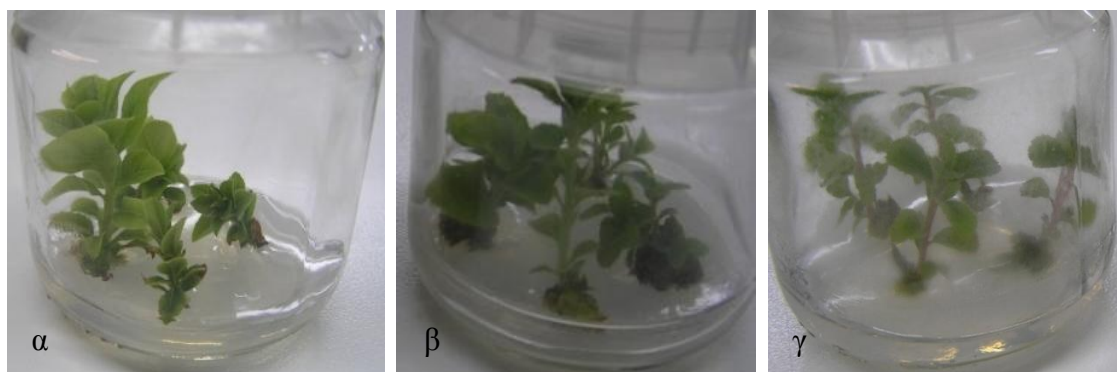
Σχ. 30. Επίδραση των αναγραφόμενων κυτοκινινών σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹ στη βλαστογένεση (%) (α), αριθ. & μήκος (cm) βλαστών (β, γ αντίστοιχα) και γινόμενο B (δ) της 1^{ης} υποκ/γείας (2006-7-8) των τριών ειδών *Arbutus*. Οι αρχικές καλλιέργειες ήταν του μηνός Σεπτεμβρίου. Λόγω της μηδενικής βλαστογένεσης του *A. unedo* σε KIN και BA, εξαιρέθηκαν από την στατ. ανάλυση. Σύγκριση μέσων με Student's test σε P=0,05, n= 42-78.

5.3.1.7 Σύγκριση μεσαίας και τελικής καλλιέργειας σε WPM με ZEAT στα *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo*

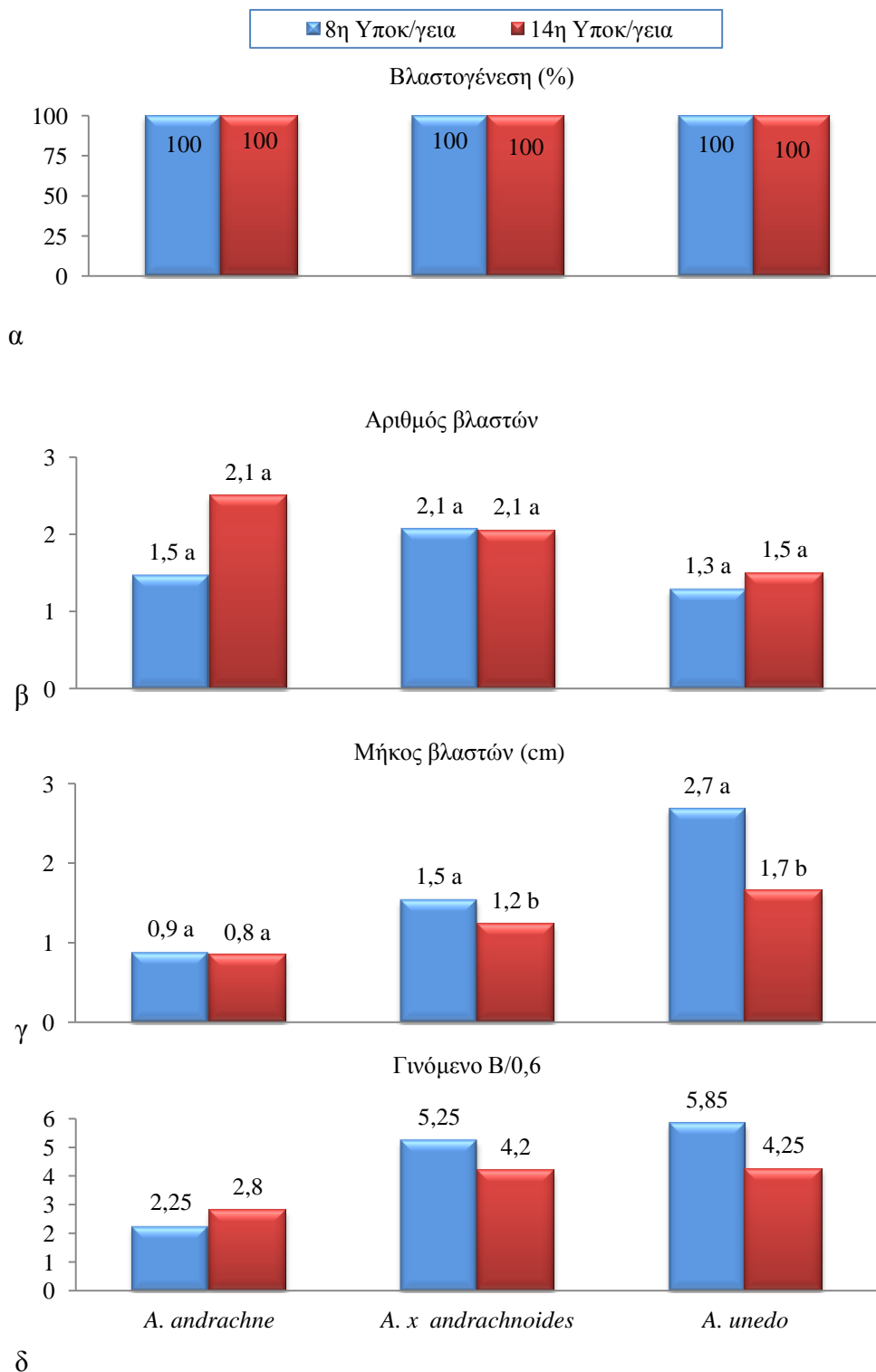
Έκφυτα από και από τα τρία είδη που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, υποκαλλιεργήθηκαν επιτυχώς σε 14 διαδοχικούς κύκλους. Στο σχήμα 32 παρουσιάζεται η βλαστογένεση κατά το μέσον του κύκλου, κατά την 8^η υποκαλλιέργεια (Εικ. 48), συγκριτικά με τη 14^η υποκαλλιέργεια.

Στο *A. andrachne* δεν παρατηρήθηκε διαφορά ανάμεσα στις 2 υποκαλλιέργειες ούτε στον αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν, ούτε στο μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν. Το ποσοστό αντίδρασης και σχηματισμού βλαστών ήταν 100% και το δυναμικό πολλαπλασιασμού 1,4-1,7.

Τα *A. x andrachnoides* και *A. unedo* είχαν επίσης 100% ποσοστό αντίδρασης και σχηματισμού βλαστών στην 8^η και 14^η υποκαλλιέργεια. Ο αριθμός των σχηματιζόμενων βλαστών επίσης δε διέφερε ανάμεσα στις δύο υποκαλλιέργειες και για τα δύο είδη, αλλά και στα δύο είδη το μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών ήταν μικρότερο στην 14^η υποκαλλιέργεια από ότι στην 8^η.



Εικ. 48. Βλαστογένεση κατά την 8^η υποκαλλιέργεια σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT των *A. andrachne* (α), *A. x andrachnoides* (β) και *A. unedo* (γ).



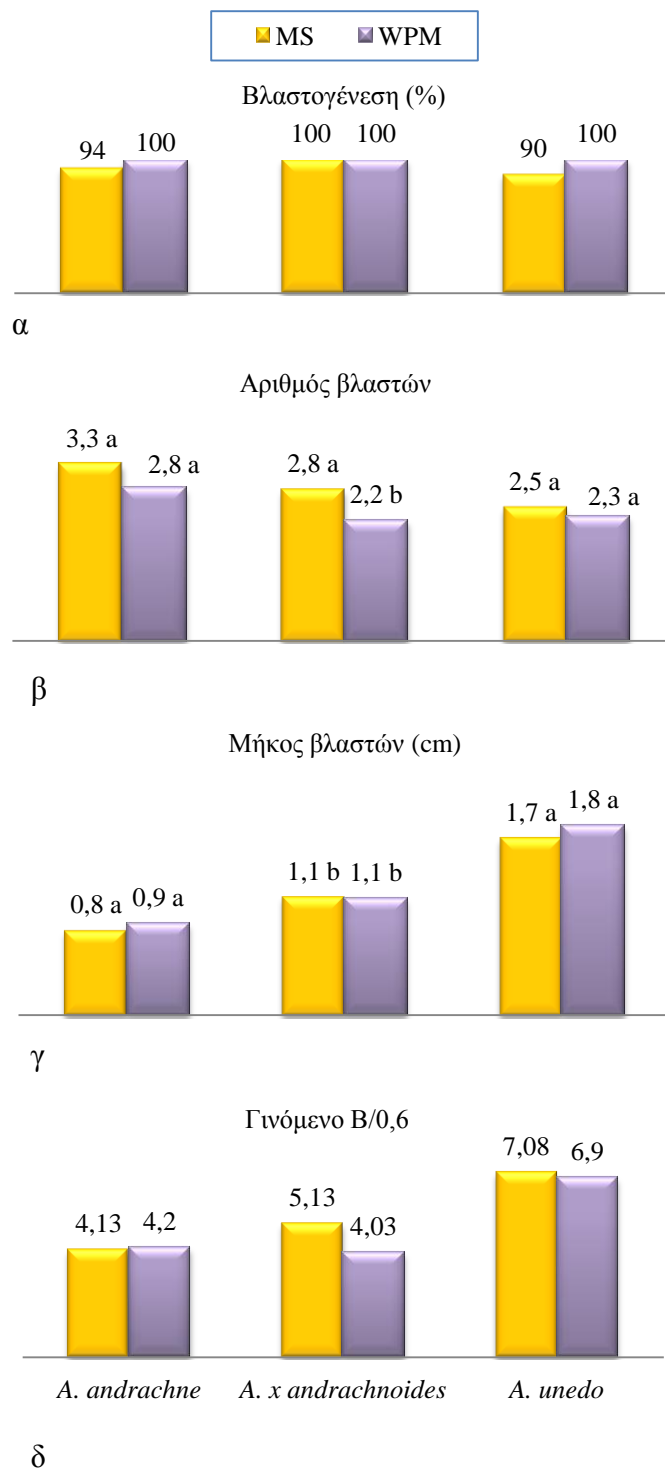
Σχ. 31. Βλαστογένεση (%) (α), αριθμός βλαστών (β), μήκος (cm) (γ) βλαστού και γινόμενο B (δ) της 8^{ης} και 14^{ης} υποκαλλιέργειας σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT. Σύγκριση μέσων με Student's test σε P=0,05, n= 24.

5.3.1.8 Επίδραση θρεπτικού υποστρώματος, WPM ή MS, στον πολλαπλασιασμό των καλλιέργειών *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo*

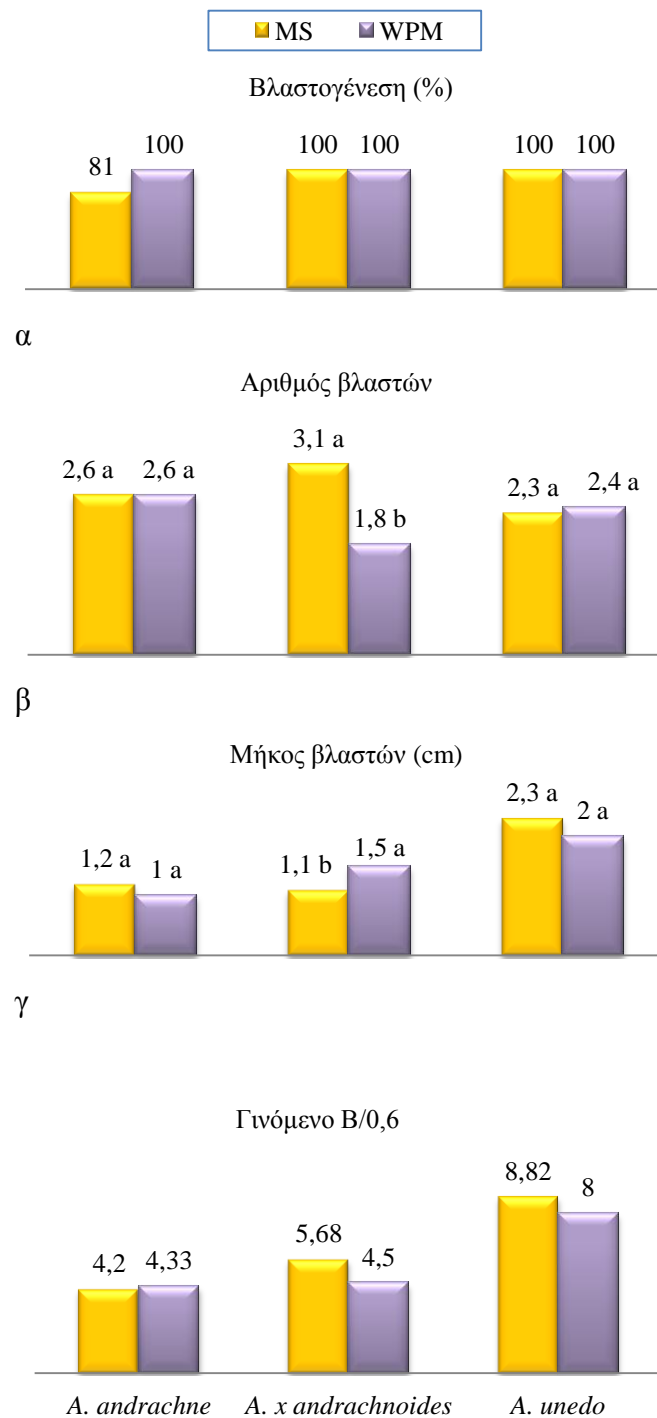
Την άνοιξη του 2010, έγινε αρχική εγκατάσταση καλλιέργειας σε MS ή WPM και των τριών ειδών με στόχο την διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης MS στην *in vitro* καλλιέργεια και των τριών ειδών *Arbutus*. Ως ορμόνη ριζοβολίας χρησιμοποιήθηκε ZEAT σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹ ZEAT. Τα αποτελέσματα της αρχικής καλλιέργειας σε MS δίνονται στο κεφ. 4.3.1.1.

Στην πρώτη υποκαλλιέργεια το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 94-100% για το *A. andrachne*, σε MS και WPM αντίστοιχα, 100% για το *A. x andrachnoides* και 90-100% για το *A. unedo*. Στον αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των δύο υποστρωμάτων στα *A. andrachne* και *A. unedo*, ενώ το MS επέφερε το σχηματισμό περισσότερων βλαστών στο *A. x andrachnoides*. Τα δύο υποστρώματα δεν επέδρασαν στο μήκος βλαστών που σχηματίστηκαν (Σχ. 29, Εικ. 49).

Στην δεύτερη υποκαλλιέργεια το *A. andrachne* είχε μειωμένη κάπως βλαστογένεση στο MS, ενώ πάλι το *A. x andrachnoides* σχημάτισε περισσότερους βλαστούς στο MS (Σχ. 30).

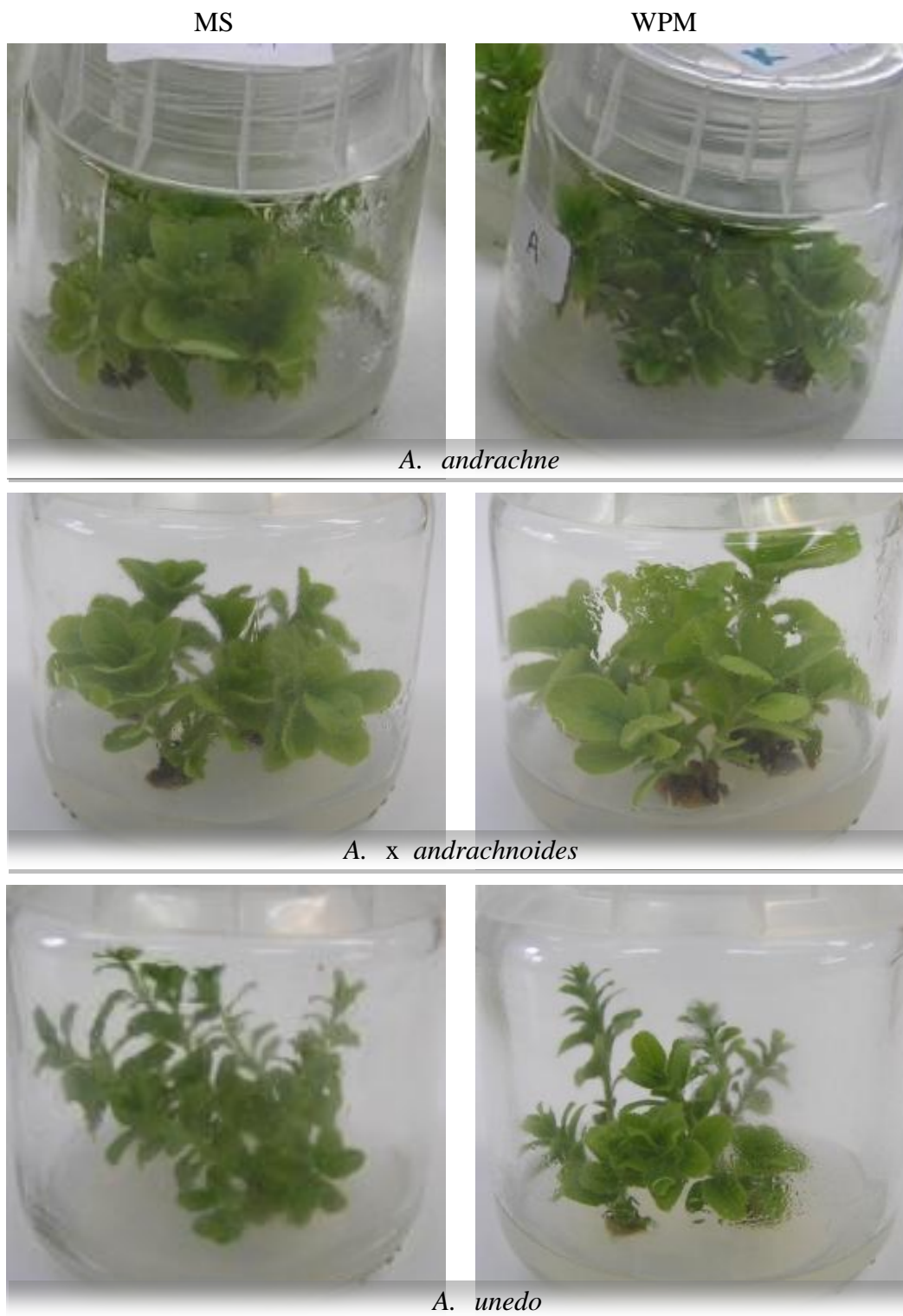


Σχ. 32. Βλαστογένεση (%) (α), αριθμός και μήκος (cm) βλαστών (β και γ αντίστοιχα) και γινόμενο B (δ) της 1^{ης} υποκαλλιέργειας, σε WPM ή MS με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT. Η αρχική καλλιέργεια είχε γίνει τον Μάιο 2010, στα ίδια υποστρώματα. Σύγκριση μέσω Student's test σε P=0,05, n= 24-38.



δ

Σχ. 33. Βλαστογένεση (%) (α), αριθμός και μήκος (cm) βλαστών (β και γ αντίστοιχα) και γινόμενο B (δ) της 2^{ης} υποκαλλιέργειας, σε WPM ή MS με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT. Η αρχική καλλιέργεια είχε γίνει τον Μάιο 2010, στα ίδια υποστρώματα. Σύγκριση μέσων με Student's test σε P=0,05, n= 24-38.



Εικ. 49. Βλαστογένεση κατά την 1^η υποκαλλιέργεια σε MS ή WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEAT των *A. andrachne* (α), *A. x andrachnoides* (β) και *A. unedo* (γ). Η αρχική καλλιέργεια είχε γίνει τον Μάιο 2010, σε WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEAT. Σύγκριση μέσων με Student's test σε $P=0,05$, $n= 24-38$.

5.3.1.9 Συγκριτική αξιολόγηση της επίδραση TDZ σε WPM στον πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo*

Με στόχο την συγκριτική αξιολόγηση των τριών ειδών στη χρήση TDZ, εξετάστηκε η επίδραση σε συγκέντρωση 0,01, 0,05, 0,2 ή 2,0 mg I⁻¹, κατά την δεύτερη υποκαλλιέργεια των εκφύτων (κόμβων), αφού είχαν αρχικά εγκατασταθεί σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg I⁻¹ ZEAT και υποκαλλιεργηθεί για μία φορά στο υπόστρωμα αυτό. Το *A. unedo* σχημάτισε βλαστούς στα μισά των εκφύτων και στις δύο χαμηλότερες συγκεντρώσεις TDZ που ελέγχθηκαν. Η βλαστογένεση των *A. andrachne* και *A. x andrachnoides* ήταν κάπως μειωμένη στη χαμηλότερη συγκέντρωση TDZ. Η επιμήκυνση των σχηματιζόμενων βλαστών ήταν πολύ μικρή με αποτέλεσμα το πολύ χαμηλό δυναμικό των καλλιεργειών (Πίν. 24, Εικ. 50). Το γινόμενο B/0,6 ήταν ανεξαρτήτως συγκεντρώσεως πολύ μικρό και για τα τρία είδη (Σχ. 34). Τα έκφυτα στην συνέχεια υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα WPM με 2.5 mg I⁻¹ ZEAT, όπου τα έκφυτα του *A. unedo* αντέδρασαν ξανά σε πολύ μικρό ποσοστό (20%). Τα έκφυτα του *A. andrachne* και του *A. x andrachnoides* αντέδρασαν σε ποσοστό 100% και σχημάτισαν 1 βλαστό με μήκος 0,3 cm (n=16-26).

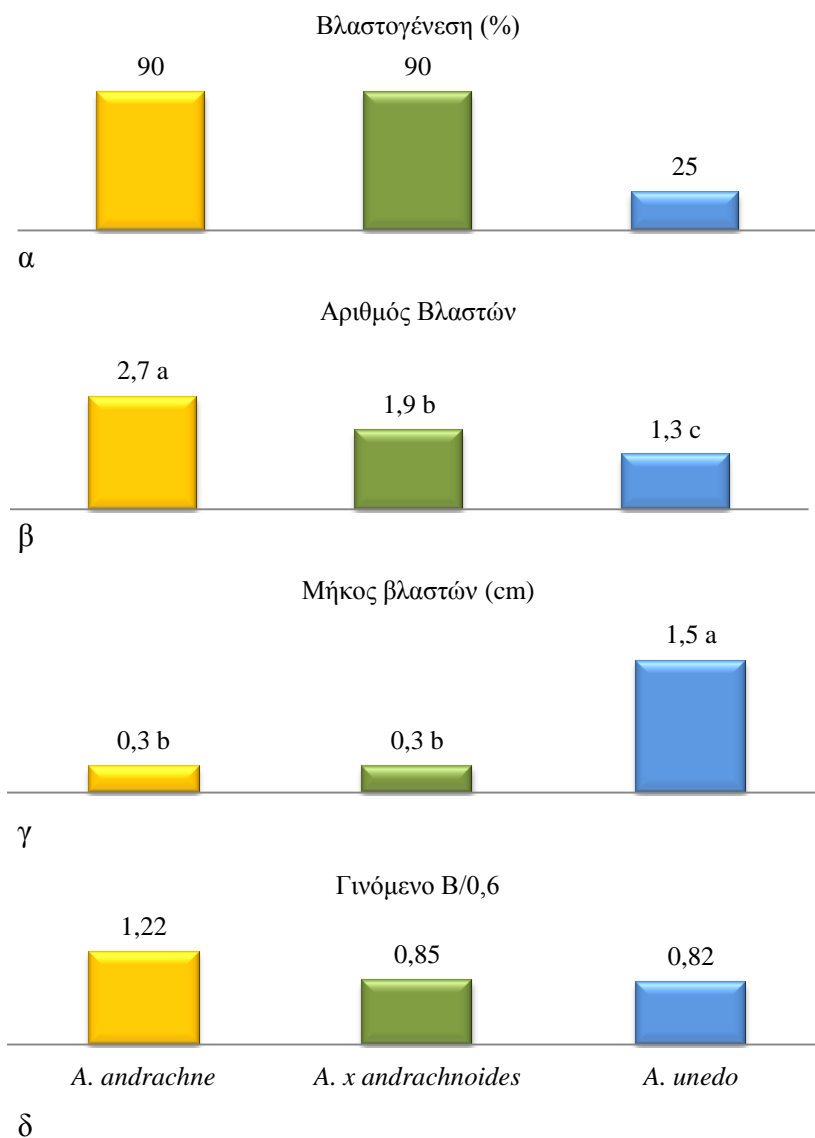
Πίν. 24. Επίδραση του TDZ στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις στην αντίδραση εκφύτων κόμβων από μικροβλαστούς των τριών ειδών *Arbutus* που είχαν σχηματιστεί σε καλλιέργεια σε WPM με 2,5 mg I⁻¹ ZEAT, n=24.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ		Βλα	Μέσος	Μέσο	ΓΙΝ	ΓΙΝ Β
Είδος	TDZ (mg I ⁻¹)	στο γένε ση (%)	Αριθ. Βλαστών /Έκφυτο	Μήκος Βλαστών (cm)	Α	/
<i>A. andrachne</i>	0,01	80,00	2,5 bc	0,3 c	2,00	1,00
	0,05	100,00	2,8 b	0,4 c	2,80	1,87
	0,20	100,00	3,3 a	0,3 c	3,30	1,65
	2,00	100,00	2,1 c	0,3 c	2,10	1,05
<i>A. x andrachnoides</i>	0,01	80,00	1,5 de	0,3 c	1,20	0,60
	0,05	100,00	1,6 d	0,4 c	1,60	1,07
	0,20	100,00	2,5 bc	0,2 c	2,50	0,83
	2,00	100,00	2,3 c	0,2 c	2,30	0,77
<i>A. unedo</i>	0,01	50,00	1,5 de	1,4 b	0,75	1,75
	0,05	50,00	1,0 e	1,7 a	0,50	1,42
	0,20	0,00				
	2,00	0,00				

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με Student's test σε P=0,05.



Εικ. 50. Υποκαλλιέργεια κόμβων *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* σε WPM με TDZ σε συγκέντρωση 0,01, 0,02, 0,2 ή 0,5 mg l⁻¹ (α, β, γ, δ, αντίστοιχα). Τα έκφυτα προέρχονταν από υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT.



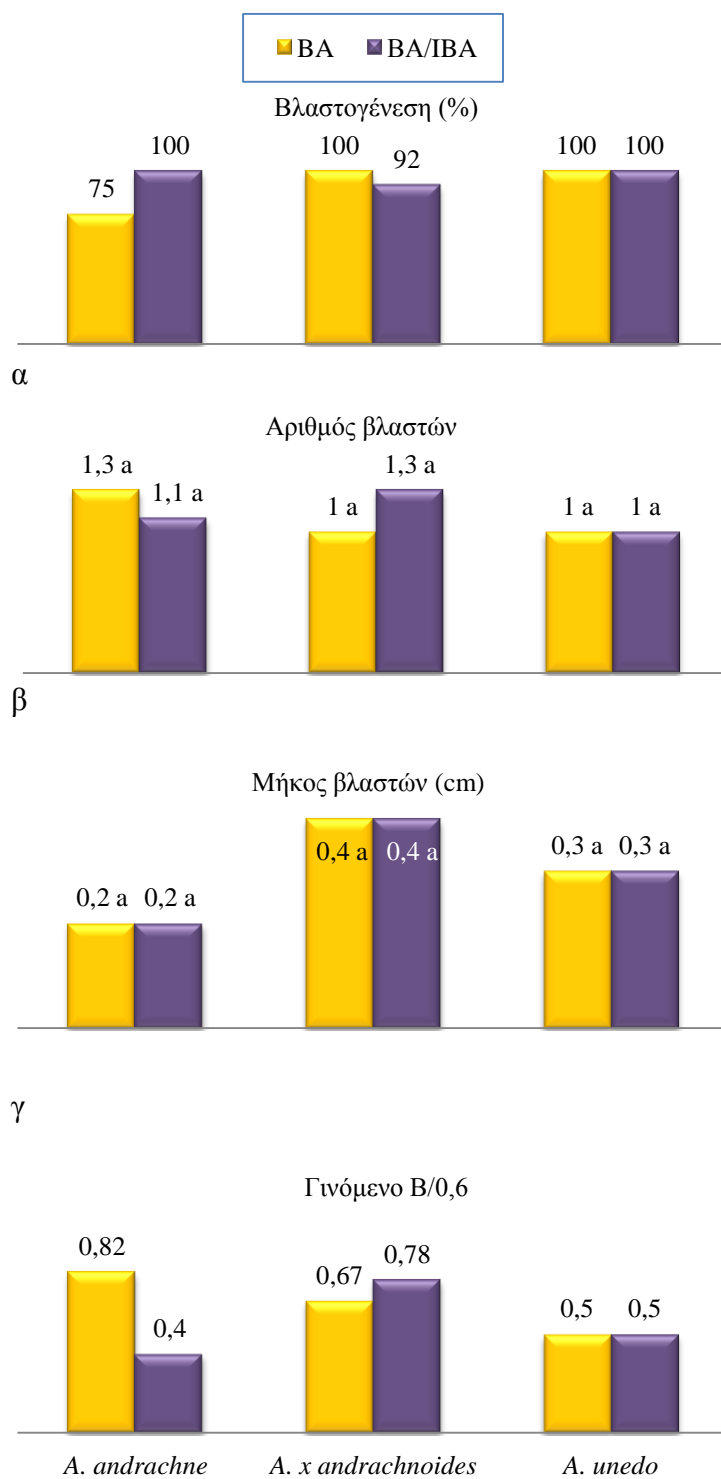
Σχ. 34. Βλαστογένεση (%) (α), αριθμός βλαστών (β), μήκος (cm) (γ) βλαστών και γινόμενο B (δ) της 3^{ης} υποκαλλιέργειας, τεμαχίων κάλου με βλαστούς που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα WPM με TDZ σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις TDZ (0,01, 0,05, 0,02 και 2,0 mg l⁻¹). Η αρχική καλλιέργεια ήταν του μηνός Μαΐου 2010 σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT και τα έκφυτα υποκαλλιεργήθηκαν μια φορά στο αυτό υπόστρωμα πριν τη μεταφύτευσή τους σε υπόστρωμα με TDZ. Σύγκριση μέσω Student's test σε P=0,05, n= 16-26.

5.3.1.10 Συγκριτική αξιολόγηση της επίδρασης μη ισχυρής αυξίνης στο WPM, στον πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo*

Εξετάστηκε η επίδραση μικρής συγκέντρωσης IBA ($0,1 \text{ mg l}^{-1}$) κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια εκφύτων και των τριών ειδών που είχαν εγκατασταθεί σε WPM με $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ZEAT. Δεν κατέστη όμως δυνατή η βελτίωση της μορφογενετικής ικανότητας των καλλιεργειών σε κανένα από τα τρία είδη, το IBA δεν αύξησε τον αριθμό των σχηματιζόμενων βλαστών ή το μήκος τους σε σχέση με το υπόστρωμα που περιείχε BA μόνο σε συγκέντρωση $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ (Εικ. 51, Σχ. 35).



Εικ. 51. 1^η υποκαλλιέργεια βλαστών σε WPM με $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ IBA. Τα έκφυτα ήταν κοντοί μη επιμηκυσμένοι βλαστοί *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* (α, β, γ αντίστοιχα) που είχαν σχηματιστεί στο ίδιο υπόστρωμα αρχικής καλλιέργειας τον Μάιο του 2010.



Σχ. 35. Βλαστογένεση (%) (α), αριθμός βλαστών (β) και μήκος (cm) (γ) βλαστού και γινόμενο B (δ) της 1^{ης} υποκαλλιέργειας, σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ BA με ή χωρίς IBA σε συγκέντρωση 0,1 mg l⁻¹. Αρχική καλλιέργεια: Μάιος 2010 σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT. Σύγκριση μέσων με Student's test σε P=0,05, n= 16-26.

5.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το στάδιο του πολλαπλασιασμού των *in vitro* καλλιεργειών, είναι ιδιαίτερα σημαντικό κατά τη δημιουργία ενός πρωτοκόλλου μικροπολλαπλασιασμού. Το ζητούμενο στο στάδιο αυτό είναι από ποσοτικής πλευράς η απόκτηση σε μικρό χρονικό διάστημα ενός μεγάλου αριθμού βλαστών, με μεγάλο μήκος και από ποιοτικής άποψης η φαινοτυπική ομοιότητα των παραγόμενων βλαστών με τα μητρικά φυτά από όπου προήλθαν. Οι παραγόμενοι βλαστοί πρέπει επίσης να είναι ανατομικά, φυσιολογικά λειτουργικοί. Αναφέρεται για παράδειγμα το ενδεχόμενο της εμφάνισης σωμακλωνικής παραλλακτικότητας με την χρήση μεγάλων συγκεντρώσεων 2IP (Marcotrigiano and McGlew, 1991). Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα βέβαια, αποδίδεται τις περισσότερες φορές σε καλλιέργεια τυχαίων βλαστών (De Klerk, 1990). Έχει λοιπόν ιδιαίτερη σημασία για την ομοιομορφία του παραγόμενου φυτικού υλικού, ο πολλαπλασιασμός των καλλιεργειών να διεξάγεται μέσω της έκπτυξης μαχαλιαίων βλαστών και όχι από τυχαίους. Για την διαπίστωση της γενετικής ομοιομορφίας είναι βέβαια απαραίτητη η χρήση μοριακών δεικτών όπως τα RAPDS, που χρησιμοποιούνται ευρέως για την μελέτη της παρατηρούμενης σωμακλωνικής παραλλακτικότητας σε *in vitro* καλλιέργειες (βλ. 9). Οι Miñano *et al.* (2009) χρησιμοποίησαν RAPDS για την μελέτη της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας σε έξι ποικιλίες δρεπτού χρυσάνθεμου και δύο γλαστρικού. Ενδιαφέρον έχει ότι σε έναν κύκλο εννέα συνεχόμενων υποκαλλιεργειών, για εννέα μήνες, ελέγχθηκε η γενετική ομοιομορφία του φυτικού υλικού σε κάθε υποκαλλιέργεια και μόνο στην 7η υποκαλλιέργεια ο βλαστός μιας ποικιλίας έδειξε σωμακλωνική παραλλακτικότητα.

Όπως ήδη αναφέρθηκε (βλ. 5.1.1), δεν βρέθηκαν πληροφορίες στην βιβλιογραφία για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. andrachne* κατά την εποχή διεξαγωγής των πειραμάτων, ενώ μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αναφορά για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. x andrachnoides*. Οι πρώτες προσπάθειες στην διατριβή για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό αφορούσαν στην επιμήκυνση των σχηματισθέντων βλαστών κατά την αρχική καλλιέργεια, είτε με υποκαλλιέργεια των κοντών βλαστών, είτε με μεταφορά των εκφύτων σε υποστρώματα που περιείχαν NAA σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων ή IBA. Το NAA χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό ή όχι με BA και όχι μόνο δεν επέφερε επιμήκυνση, αλλά αποδείχθηκε αναποτελεσματικό στις καλλιέργειες πολλαπλασιασμού του *A. andrachne* (Πίν. 22). Το αποτέλεσμα

συμφωνεί με άλλους ερευνητές που εξέτασαν την επίδραση του NAA στο *A. unedo* (Mereti, *et al.*, 2002, Gomes *et al.*, 2010) και στο *A. xalapensis* (Mackay, 1996) και διαπίστωσαν την αρνητική του επίδραση. Το NAA χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση $0,75 \text{ mg l}^{-1}$ σε υπόστρωμα WPM που περιείχε και $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA και στα *A. x andrachnoides* και *A. unedo*, αλλά κανένα έκφυτο δεν αντέδρασε. Το IBA σε συγκέντρωση ($0,1$ ή $0,5 \text{ mg l}^{-1}$), δεν είχε σημαντική επίδραση κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια στο *A. andrachne*, σε σχέση με το BA, ενώ και στα άλλα δύο είδη στην συγκέντρωση $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ δεν διαφοροποίησε ουσιαστικά την επίδραση του BA, δίνοντας επίσης βλαστούς που δεν επιμηκύνονταν (Σχ. 35). Παρόμοια αρνητική επίδραση αναφέρει ο Κάρτσωνας (2008), σύμφωνα με τον οποίο σε καλλιέργειες πολλαπλασιασμού του *Quercus euboica*, όταν προστέθηκε NAA στις συγκεντρώσεις των $0,1$ και $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ (σε συνδυασμό με διάφορες συγκεντρώσεις BA), τόσο ο αριθμός των βλαστών όσο και το ποσοστό βλαστογένεσης μειώθηκε. Οι Vieitez *et al.* (1993) κατά τον πολλαπλασιασμό του *Q. robur in vitro*, παρατήρησαν μείωση του αριθμού των βλαστών, ακόμα και όταν χρησιμοποίησαν το NAA σε μικρές συγκεντρώσεις ($0,01$, ή $0,1 \text{ mg l}^{-1}$). Αντίθετα, σε άλλα είδη δασικών φυτών οι Bunn (2005), Cuenca *et al.* (2000), Debnath (2004), Santos *et al.* (2003), Vieitez *et al.* (1993) και Romano, (1992), αναφέρουν ότι ο συνδυασμός κυτοκίνινης και αυξίνης στα υποστρώματα των *in vitro* καλλιεργειών, αύξησε τον αριθμό των βλαστών.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η δράση του GA_3 σε συγκέντρωση από $0,3$ - $10,0 \text{ mg l}^{-1}$ στη βλαστογένεση σε ξυλώδη ή άλλα φυτικά είδη όπως *Chrysanthemum* (Earle and Langhans, 1974), *Saussurea lappa* (Arora and Bhojwani, 1989), *Ocimum* (Pattnaik and Chand, 1996, Sahoo *et al.*, 1997) και *Vitex negundo* L. (Sahoo and Chand, 1998), και ότι μπορεί να προκαλέσει επιμήκυνση (Osborne and McManus, 2005). Φέρεται όμως να έχει αμφιλεγόμενη δράση, όπως για παράδειγμα στη διαφοροποίηση οφθαλμών σε συγκέντρωση $0,1$ - $3,0 \text{ mg l}^{-1}$ στα *Begonia* (Heide, 1969), *Plumbago indica* (Nitsch and Nitsch, 1967), *Nicotiana* (Thorpe and Murashige, 1970) και *Duboisia myoporoides* (Kukreja and Mathur, 1985), όπου είχε δυσμενή επίδραση στη διαφοροποίηση των οφθαλμών. BA και GA_3 σε αναλογία $0,2/0,3 \text{ mg l}^{-1}$ είχαν ευνοϊκό αποτέλεσμα σε τροποποιημένο υπόστρωμα WPM για την επιμήκυνση βλαστών του *Elaeagnus angustifolia* τα οποία είχαν προέλθει από την καλλιέργεια τεμαχίων φύλλου (Economou & Maloupa, 1994). Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η δυνατότητα χρήσης του στην αρχική εγκατάσταση του *A. andrachne*, χωρίς αποτέλεσμα, αφού δεν επέφερε επιμήκυνση, ούτε επέδρασε στη

βλαστογένεση αν και ο Λιμνιάτης (2000) ανέφερε ότι συνετέλεσε στην επιμήκυνση κατά την φάση του πολλαπλασιασμού του *A. unedo*. Σε ένα άλλο είδος της οικ. Ericaceae, αναφέρεται πάντως ότι είχε αρνητική επίδραση του αριθμού των παραγόμενων βλαστών του *Vaccinium macrocarpon* Ait. (Marcotrigiano and McGlew, 1991).

Μετά την αδυναμία αποτελεσματικής αντιμετώπισης πολλαπλασιασμού του *A. andrachne* με χρήση BA, δοκιμάστηκαν πολλά είδη κυτοκινινών, που έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο μικροπολλαπλασιασμό άλλων ειδών του γένους, σε διάφορες συγκεντρώσεις τους, για την εύρεση του ιδανικού είδους και συγκέντρωσης κυτοκινίνης, που θα επέφερε υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι η ZEAT ήταν αποτελεσματική τόσο για βλαστογένεση όσο και επιμήκυνση των μικροβλαστών τόσο του *A. andrachne* (Πίν. 22). Οι βλαστοί που παράγονταν σε υποστρώματα με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT ήταν ζωηροί, με έντονη ανάπτυξη και ομοιόμορφα μορφολογικά χαρακτηριστικά, ενώ σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σχηματίζονταν μικρότερα φύλλα και οι μικροβλαστοί ήταν υπερυδατωμένοι με μεγαλύτερη διάμετρο. Η ZEAT σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹ χρησιμοποιήθηκε και στα *A. x andrachnoides* και *A. unedo* συγκριτικά και βρέθηκε ακόμα πολύ αποτελεσματική το Μάιο (Σχ. 30, 31). Παρόμοια αποτελεσματικότητα της ZEAT αναφέρεται για τον πολλαπλασιασμό ειδών του γένους *Vaccinium* (Ericaceae) (Chandler and Draper, 1986, Eccher and Noe, 1989, Debnath and McRae, 2001), αλλά και άλλων ξυλωδών φυτικών ειδών όπως το *Populus deltoids* (Coleman and Ernst, 1990) και Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L., Tetsumura, 1997). Ικανοποιητικά αποτελέσματα επέφερε και η χρήση 2IP.

Στο *A. andrachne* έγιναν διαδοχικές σε υπόστρωμα με ZEAT και βρέθηκε ότι ο αριθμός των βλαστών αυξανόταν ότι έως και την 4^η υποκαλλιέργεια, ενώ στη συνέχεια μειωνόταν. Το μήκος των βλαστών άρχισε να μειώνεται από την δεύτερη υποκαλλιέργεια και μετά. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλό, στην ίδια στάθμη, από την δεύτερη έως την τέταρτη υποκαλλιέργεια και το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 100% σε όλα τα στάδια (Σχ. 28). Οι συνεχείς υποκαλλιέργειες έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία γενετικά αποκλινόντων φυτών (Jones and Murashige, 1974) και γενικά στις εμπορικές εφαρμογές του μικροπολλαπλασιασμού οι υποκαλλιέργειες δεν ενδείκνυται να επαναλαμβάνονται περισσότερο από 3-4 φορές (Murashige, 1977 και Murashige, 1977(α)). Στην παρούσα μελέτη όμως δεν

παρατηρήθηκε κάποια απόκλιση στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μικροβλαστών, κατά τη διάρκεια των υποκαλλιέργειών του *A. andrachne*.

Ύστερα από τα αποτελέσματα του *A. andrachne* στους διαδοχικούς κύκλους υποκαλλιέργειας, εξετάστηκε συγκριτικά η δυνατότητα για διαδοχική υποκαλλιέργεια και των *A. x andrachnoides* και *A. unedo*. Τα είδη επίσης υποκαλλιεργήθηκαν με επιτυχία, για 14 κύκλους, παρουσιάζοντας ισοδύναμο δυναμικό πολλαπλασιασμού μεταξύ τους και μεγαλύτερο από το *A. andrachne* (Σχ. 31). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν οι Tetsumura *et al.* (2008), οι οποίοι υποκαλλιεργήσαν επί 20 διαδοχικές φορές ποικιλίες ενός ακόμα είδους της οικ. Ericaceae, του *Vaccinium corymposum* και του *V. Virgatum*, όπως συνέβη και στο *V. x corymposum* L. cv. "Herbert" (Litwinczuk *et al.*, 2005) που υποκαλλιεργήθηκε συνεχώς για ένα έτος με επιτυχία. Σε είδη άλλων οικογενειών αναφέρεται παρόμοια δυνατότητα για υποκαλλιέργεια πάνω από ένα έτος στο *Populus deltoides* (Coleman and Ernst, 1990) και στο *Litsea cuebeba* (Lours.) Pers. στο οποίο απαιτούνται 3-4 υποκαλλιέργειες για το σχηματισμό πολλαπλών βλαστών σε καλλιέργεια εκφύτων από ώριμο μητρικό υλικό (Mao *et al.*, 2000). Ο αυξημένος χρόνος ίσως να δηλώνει την ανάγκη για επαναφορά της νεανικότητας που έχει παρατηρηθεί και σε έξι ξυλώδη είδη και ποικιλίες της οικ. Rosaceae, τα οποία υποκαλλιεργήθηκαν για εννέα μήνες με επιτυχία σε κύκλους του ενός μηνός (Norton and Norton, 1986), σε υπόστρωμα LS (Linsmaier and Skoog, 1965), με BA σε συγκέντρωση 0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 ή 10 mg l⁻¹. Οι ερευνητές διαπίστωσαν αύξηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού στις πρώτες υποκαλλιέργειες και στην συνέχεια μείωση, με την εξαίρεση μόνο ενός είδους σε συγκέντρωση BA 5 mg l⁻¹. Η υποκαλλιέργεια επαναλαμβανόταν κάθε μήνα, σε θρεπτικό υπόστρωμα LS, για εννέα μήνες.

Σε συγκριτικά πειράματα ελέγχθηκε η δυνατότητα πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών και στα τρία είδη *Arbutus*. Η ZEAT και το 2IP έδωσαν ποσοστό βλαστογένεσης πολύ υψηλό, αλλά μόνο η ZEAT ήταν ικανή για επιμήκυνση και βλαστογένεση στη συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹ και στα τρία είδη, επιφέροντας το σχηματισμό σημαντικά περισσότερων και πιο επιμηκυμένων βλαστών. Το αυτό παρατηρήθηκε και στις δύο εποχές (Ιούλιο και Οκτώβριο), με εξαίρεση ότι στην υποκαλλιέργεια του Οκτωβρίου, δεν βρέθηκε διαφορά στο μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών του *A. unedo* μεταξύ ZEAT και 2IP (Σχ. 29, 30). Τα αποτελέσματα για τη δράση της ZEAT συμφωνούν με τους (Mostafa *et al.*, 2010), οι οποίοι μελετώντας τον πολλαπλασιασμό του *A. andrachne* ξεκινώντας από

σπορόφυτα, διαπίστωσαν επίσης την υπεροχή της ZEAT σε σχέση με BA, KIN, 2IP ή TDZ. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν δύο υποστρώματα MS ή B5 όπου και στα δύο διαπιστώθηκε η υπεροχή της ZEAT, η οποία σε υπόστρωμα MS και συγκέντρωση 8 mg l⁻¹, είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό 22,8 βλαστών με πολύ ικανοποιητικό μήκος 2,35 cm. Η προέλευση όμως των εκφύτων ήταν νεαρά σπορόφυτα που είχαν αναπτυχθεί *in vitro*, κάτι που θα μπορούσε να έχει επιδράσει στην βλαστογένεση, όπως συνέβη στην παρούσα μελέτη, αλλά όχι σε αυτήν την έκταση, για το *A. andrachne* και *A. x andrachnoides* (βλ. 6.2.2, Πίν. 25, 26, 27).

Τις χειρότερες επιδόσεις έχει η KIN και στα τρία είδη (Σχ. 29, 30), κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τους Gomez *et al.* (2010) που αναφέρουν ότι στο *A. unedo*, η KIN σε συγκέντρωση 1,9 mg l⁻¹ έδωσε συνολικά τα καλύτερα αποτελέσματα, χωρίς όμως σημαντική διαφορά από BA ή ZEAT στην ίδια συγκέντρωση. Οι ερευνητές όμως είχαν χρησιμοποιήσει ως θρεπτικό υπόστρωμα FS, και για αυτό το λόγο θα είχε ενδιαφέρον λοιπόν εξεταστεί το FS συγκριτικά με το WPM ώστε εξηγηθεί η διαφορά αυτή στα αποτελέσματα.

Στην παρούσα μελέτη το BA επίσης δεν επέδειξε αποτελεσματικότητα στις υποκαλλιέργειες (Σχ. 29, 30), ιδιαίτερα στο *A. unedo*. Μόνο 5% των εκφύτων έδωσαν βλαστογένεση σε WPM με 2,5 mg l⁻¹BA, τον Ιούνιο. Τον Οκτώβριο μάλιστα το ποσοστό αυτό μηδενίστηκε. Τα ευρήματα αυτά δεν συμφωνούν με τους Mereti *et al.* (2002), οι οποίοι στον πολλαπλασιασμό του *A. unedo*, από ενήλικα φυτά, χρησιμοποίησαν με επιτυχία στην φάση του πολλαπλασιασμού WPM με σκέτο BA (2,5 ή 5 mg l⁻¹) και σχηματισμό ικανοποιητικού αριθμού βλαστών (2,2) με μέσο μήκος 1,04 cm. Πιθανόν η επίδραση του γονότυπου να ευθύνεται για αυτήν τη διαφορά.

Και τα τρία είδη της μελέτης μετά την αρχική επιτυχή εγκατάσταση σε WPM με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT, υποκαλλιεργήθηκαν για δύο συνεχόμενες φορές σε MS ή WPM που περιείχε ZEAT σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹ (Σχ. 32, 33). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν ισοδύναμο μεταξύ των δύο υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, για το *A. andrachne* και *A. unedo*, αλλά για το *A. x andrachnoides* και στις δύο υποκαλλιέργειες διαπιστώθηκε ότι το MS είχε σταθερά μια μικρή υπεροχή, προερχόμενη κυρίως από το μεγαλύτερο μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στα άλλα δύο είδη. Από την στιγμή που εγκαθίστανται οι βλαστοί και ξεκινά ο πολλαπλασιασμός, οι απαιτήσεις για την ανάπτυξη των βλαστών αλλάζουν. Οι Tetsumura *et al.*, (2008),

χρησιμοποίησαν για ποικιλίες *Vaccinium* υπόστρωμα με σύνθεση 1 MS : 1 WPM, προκειμένου να αποφύγουν την εμφάνιση υπερενυδατωμένων βλαστών εξ' αιτίας της υψηλής συγκέντρωσης ιόντων αμμωνίου που έχει το MS (τετραπλάσια ποσότητα αζώτου σε σχέση με το WPM) (Pâques, 1991). διαπιστώθηκε λοιπόν ότι το MS θα μπορούσε να χρησιμοποιείται επιτυχώς στην φάση του πολλαπλασιασμού και για τα τρία είδη. Η χρήση εξ' άλλου έτοιμου θρεπτικού υποστρώματος MS προσδίδει το πλεονέκτημα της απλούστευσης της διαδικασίας του πολλαπλασιασμού, αφού αποφεύγεται η προσθήκη των βιταμινών Mullin στο υπόστρωμα.

Για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. unedo*, έχουν με επιτυχία χρησιμοποιηθεί και άλλα υποστρώματα. Οι Gomez and Canhoto (2009) έλεγξαν τρία τροποποιημένα υποστρώματα AND στην φάση του πολλαπλασιασμού του *A. unedo* με BA: α) AND: Άλατα Anderson (Anderson, 1984), MS μικρο-στοιχεία, οργ. στοιχεία FS (de Fossard *et al.*, 1974), β) Το (α), αλλά με ½ μακρο-στοιχείων MS, γ) Το (α), αλλά με μακρο-στοιχεία FS. Οι ερευνητές διαπίστωσαν καλύτερη απόδοση για το υπόστρωμα FS, αποδίδοντάς την ή στη μειωμένη περιεκτικότητα NH_4^+ και NO_3^- ή στην αυξημένη συγκέντρωση Na. Στην παρούσα μελέτη το MS και το WPM (που περιέχουν ίδια συγκέντρωση Na) είχαν παρόμοια αντίδραση στη βλαστογένεση του *A. unedo*. Δοθείσης της μεγαλύτερης συγκέντρωσης σε ολικό N του MS σε σχέση με το WPM που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι αρκετά πιθανή η δεύτερη υπόθεση των Gomez and Canhoto (2009), ότι δηλαδή η υψηλότερη συγκέντρωση Na ευθύνεται για την συνολικά καλύτερη απόδοση στον πολλαπλασιασμό του *A. unedo* στα υποστρώματα που έλεγξαν. Στο *A. andrachne* επίσης δεν υπήρχε διαφορά στον αριθμό των σχηματιζόμενων βλαστών καθώς και στο μήκος τους, αλλά στο *A. x andrachnoides* ο αριθμός βλαστών ήταν μεγαλύτερος στο MS και στις δύο υποκαλλιέργειες. Επειδή όμως έχει σημασία και ο ρόλος του $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ και όχι μόνο το ολικό ποσό (N) (George *et al.*, 2008), χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για την επίδραση του N στον *in vitro* πολλαπλασιασμό των τριών ειδών *Arbutus*.

Το MS ήταν επίσης κατάλληλο και για τον πολλαπλασιασμό εκφύτων κόμβου και των τριών ειδών από νεαρά σπορόφυτα (βλ. 6), σύμφωνα με τους Mostafa *et al.* (2010) που διαπίστωσαν την υπεροχή του MS σε σχέση με το B5 στην φάση του πολλαπλασιασμού του *A. andrachne* ξεκινώντας επίσης από νεανικούς ιστούς. Οι El-Sayed El-Mahrouk *et al.*, (2010) επίσης χρησιμοποίησαν MS στα υποστρώματα

πολλαπλασιασμού του *A. unedo*, ενώ ο Mackay (1996), για τον πολλαπλασιασμό του *A. xalapensis* είχε χρησιμοποιήσει θεραπευτικό υπόστρωμα WPM.

Με στόχο την αύξηση της παραγωγής βλαστών δοκιμάστηκε η χρήση TDZ. Το TDZ αναφέρεται ότι έχει ισχυρή δράση, ανάλογη των καθ' εαυτό κυτοκινινών, έχοντας όμως παράλληλα αποτελέσματα παρόμοια με αυξίνης, (Mok *et al.*, 1982, Visser *et al.*, 1992, Huettelman and Preece, 1993). Δρα προστατεύοντας την οξειδωση των κυτοκινινών από την δράση του ενζύμου CKX: όλες οι εξωγενώς χορηγούμενες κυτοκινίνες παροδικά αυξάνουν την δραστηριότητα του ενζύμου CKX, αλλά δεν αδρανοποιούνται όλες στον ίδιο βαθμό (Nikolić *et al.*, 2006). Είναι κατάλληλο για δύστροπα δασικά και άλλα ξυλώδη είδη (Yusnita *et al.*, 1990, Gray and Benton, 1991, Huettelman and Preece, 1993, Murthy *et al.*, 1998).

Η χρήση του TDZ όμως θέλει ιδιαίτερη προσοχή στην ιστοκαλλιέργεια, διότι αποτελεί παράγοντα σωμακλωνικής παραλλακτικότητας (Bairu *et al.*, 2011). Το TDZ επέφερε τον σχηματισμό κάλου, που αυξανόταν αυξανόμενης της συγκεντρώσεως του, με πολύ κοντούς και παραμορφωμένους βλαστούς. Το TDZ χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0,01, 0,05, 0,20 ή 1,00 mg l⁻¹ και σε κανένα από τα τρία είδη δε βελτίωσε την βλαστογένεση (Πίν. 24) και παρόμοια αρνητικά επίδραση του TDZ στο *A. unedo*, αναφέρεται από τους Gomez *et al.* (2010). Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των El-Sayed El-Mahrouk *et al.* (2010), οι οποίοι αναφέρουν, ότι αφού εγκατέστησαν αρχική καλλιέργεια *A. unedo* σε θεραπευτικό υπόστρωμα MS, στη συνέχεια επετεύχθη σε υπόστρωμα πολλαπλασιασμού έκπτυξη μασχαλιαίων βλαστών με την προσθήκη TDZ σε συγκέντρωση από 0 έως ακόμα και 3 mg l⁻¹ (3,9 βλαστοί/έκφυτο). Στην παρούσα μελέτη το TDZ δεν επέφερε μάλιστα καθόλου βλαστογένεση σε συγκέντρωση 0,2 ή 2,0 mg l⁻¹ στο *A. unedo*. Η αρνητική επίδραση γενικά του TDZ αναφέρεται και σε είδη *Vaccinium* (οικ. Ericaceae) (Marcotrigiano *et al.*, 1996, Qu *et al.*, 2000, Cao and Hammerschlag, 2000, Cao and Hammerschlag, 2002, Debnath, 2005).

Κατά το μικροπολλαπλασιασμό ειδών της οικογένειας Fagaceae, έχει δειχθεί αύξηση του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο όταν στο υπόστρωμα καλλιέργειας προστέθηκε η TDZ (Corchete *et al.*, 1993, για το *Ulmus pumila* και Cuenca *et al.*, 2000, για τα *Fagus sylvatica* και *F. orientalis*). Στο *Quercus euboica* (Kartsonas and Parafotiou, 2007) η προσθήκη του TDZ στα υποστρώματα καλλιέργειας, στις συγκεντρώσεις 0,2 και 0,02 mg l⁻¹, όχι απλά δεν αύξησε, αλλά αντίθετα μείωσε την αντίδραση των εκφύτων, προκάλεσε σχηματισμό κάλου, καθώς και παραγωγή

μικρού αριθμού ανώμαλων βλαστών. Η τοξική επίδραση του TDZ στην ανάπτυξη καλλιεργειών *in vitro* έχει επίσης αναφερθεί από τους Bohmer *et al.* (1995) και Murthy (1996). Οι Faisal *et al.* (2005) αναφέρουν και αυτοί σχηματισμό ανώμαλων βλαστών, όταν έκφυτα του *Rauwolfia tetraphylla* παρέμειναν συνεχώς σε υπόστρωμα με TDZ, ενώ η παραμονή τους μόνο για 4 εβδομάδες στο TDZ, οδήγησε στον επιτυχή πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών. Το TDZ επέφερε την αύξηση του αριθμού των σχηματιζόμενων βλαστών ανά έκφυτο αλλά μείωσε το μήκος τους σε σχέση με τον μάρτυρα στο *Malosorbus florentina* (Martini and Papafotiou, 2011).

Οι Cao *et al.* (2003) διαπίστωσαν σε ένα άλλο μέλος της οικ. Ericaceae, το *Vaccinium corymbosum*, την θετική επίδραση της σακχαρόζης στον *in vitro* πολλαπλασιασμό του είδους, παράγοντας η επίδραση του οποίου που θα μπορούσε να ελεγχθεί και στα είδη της παρούσας μελέτης. Η σακχαρόζη είναι σημαντικός παράγοντας στα υποστρώματα πολλαπλασιασμού των ξυλωδών ειδών (George *et al.*, 2008) και είχε χρησιμοποιηθεί σε συγκέντρωση 30 mg l⁻¹ όπως στην παρούσα μελέτη από τους Mereti *et al.* (2002) και Gomes and Canhoto (2009).

Η σταθεροποίηση των υποκαλλιεργειών είναι ένα σημαντικό βήμα για την περαιτέρω έρευνα με βιοτεχνολογικές τεχνικές και την απομόνωση και καλλιέργεια πρωτοπλαστών, με στόχο την παραγωγή διαειδικών υβριδίων που δεν μπορούν με συμβατικές μεθόδους να παραχθούν.



Εγκατάσταση και πολλαπλασιασμός από ιστούς σποροφύτων

6 IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ ΣΠΟΡΟΦΥΤΩΝ

6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο μικροπολλαπλασιασμός με αρχικό υλικό ιστούς *in vitro* ανεπτυγμένων σποροφύτων, έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε αρκετά είδη. Για το *A. andrachne* υπάρχει μια πρόσφατη αναφορά (Mostafa *et al.*, 2010) σύμφωνα με την οποία σπόροι αποτέλεσαν το αρχικό υλικό για τον μικροπολλαπλασιασμό του. Το είδος *Sorbus domestica* πολλαπλασιάστηκε επιτυχώς *in vitro* από τους Arrillaga *et al.* (1991), από βλαστούς νεαρών σποροφύτων που είχαν βλαστήσει *in vitro*, όπως και τα *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (Cid *et al.*, 1999) και *Ilex aquifolium* L. (Majada *et al.*, 2000). Οι Shen *et al.*, (2009) αναφέρουν πρωτόκολλο *in vitro* πολλαπλασιασμό του υβριδίου *Casuarina equisetifolia* L. x *Casuarina glauca* Sieber ex Sieber). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρησιμοποίηση νεανικών ιστών που έχουν αναπτυχθεί *in vitro* για τα είδη που απειλούνται με εξαφάνιση, όπως το *Rhododendron ponticum* L. Subsp. Baeticum (Boissier & Reuter) (Almeida *et al.*, 2005) και *Vaccinium cylindraceum* (Ericaceae) (Pereira, 2006).

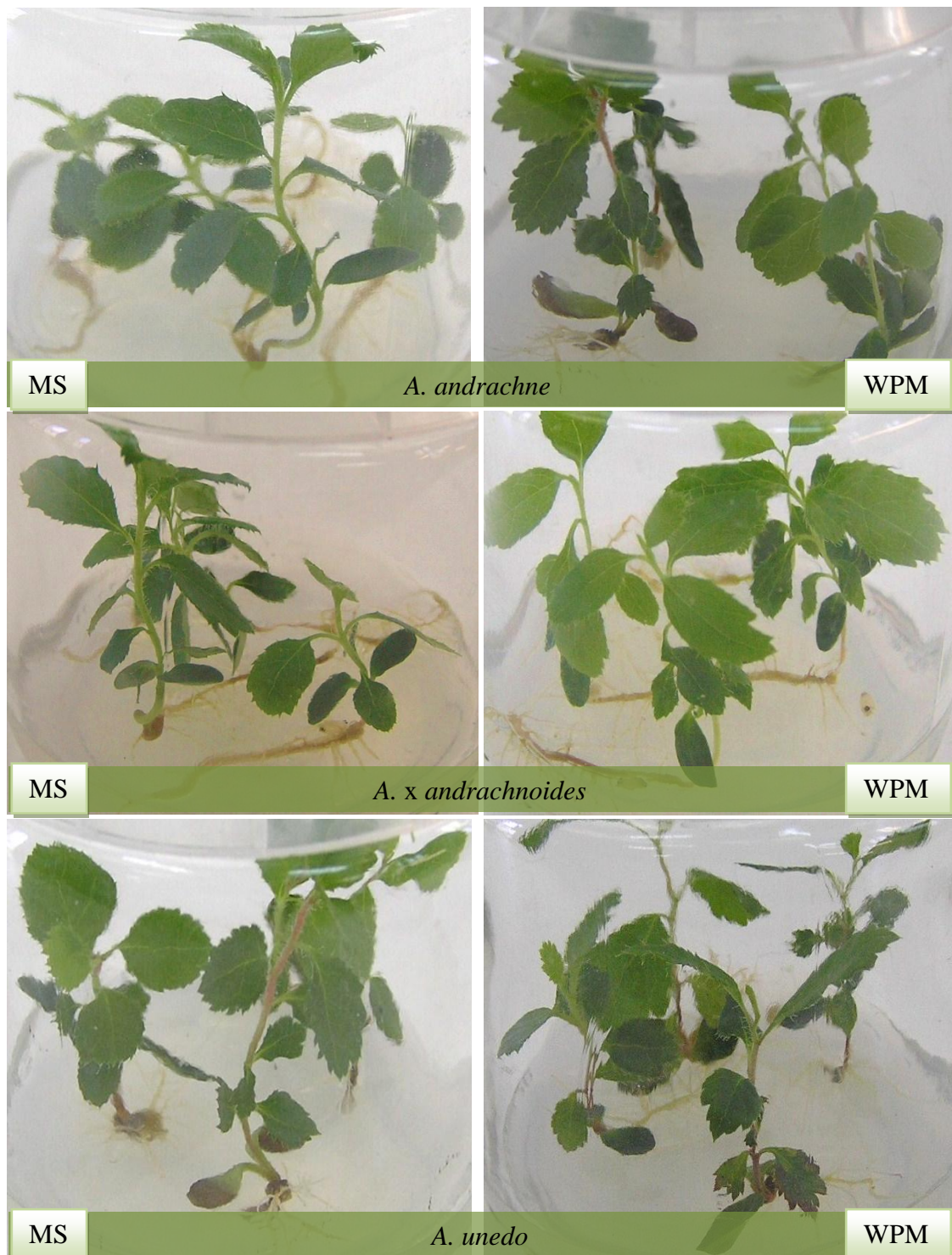
Με στόχο λοιπόν αρχικά την επιτυχή εγκατάσταση των *in vitro* καλλιεργειών του *A. andrachne* εξετάστηκε η επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών που συμπεριλήφθησαν στο υπόστρωμα. Στην συνέχεια τα αποτελέσματα στο *A. andrachne* χρησιμοποιήθηκαν για την συγκριτική μελέτη των τριών ειδών, στην αντίδραση σε MS ή WPM με ZEAT ή TDZ. Εκτιμήθηκε η επίδραση των φυτορρυθμιστικών ουσιών στην βλαστογένεση των εκφύτων.

6.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.2.1 Φυτικό υλικό

Για τη λήψη του αρχικού φυτικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν οι σπόροι από τα μητρικά φυτά στην Βαρυμπόμπη και στον Κάλαμο και σπορόφυτα ανεπτυγμένα *in vitro* (βλ. 3.1, 8). Τα σπορόφυτα οι νεανικοί ιστοί των οποίων χρησιμοποιήθηκαν για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των τριών ειδών, προέρχονταν από σπόρους που είχαν βλαστήσει *in vitro*, σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS,

υποδιπλασιασμένης δύναμης 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. 52).



Εικ. 52. Σπορόφυτα *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* σε MS ή WPM με 1 mg l⁻¹ IBA, που αποτέλεσαν το αρχικό υλικό για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό.

6.2.2 Εγκατάσταση καλλιέργειών *in vitro*

Αρχικά, μελετήθηκε στο *A. andrachne*, η επίδραση του IBA σε συγκέντρωση 0,2, 1,0, 2,0, 3,0 ή 4,0 mg I⁻¹ στη βλαστογένεση από σπορόφυτα που προέρχονταν από σπόρους που είχαν βλαστήσει σε MS υποδιπλασιασμένης δύναμης. Στη συνέχεια έγιναν πειράματα και στα τρία είδη *Arbutus* που αφορούσαν την επίδραση των κυτοκινινών και του θρεπτικού υποστρώματος στη βλαστογένεση. Σε αυτά τα πειράματα σπορόφυτα είχαν μεταφερθεί σε γυάλινα δοχεία καλλιέργειας όγκου 100 ml με πλαστικό καπάκι (Magenta B-caps, Sigma) που περιείχαν MS ή WPM (McCown and Lloyd, 1981), εμπλουτισμένο με 30 g I⁻¹ σακχαρόζη και 1 mg I⁻¹ IBA, για περαιτέρω ανάπτυξη, στους 25 °C για 40 ημέρες. Τεμάχια βλαστού ενός κόμβου από τα σπορόφυτα τοποθετήθηκαν σε MS ή WPM, με TDZ ή ZEAT (0,2 ή 2,0 και 2,5 ή 5,0 mg I⁻¹ αντίστοιχα) ή στα ανωτέρω υποστρώματα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (μάρτυρες). Η καλλιέργεια έγινε στους 25 °C, 16 h φωτοπερίοδο, υπό 37,5 μmol m⁻² s⁻¹ fluorescent φως. Το pH των υποστρωμάτων ρυθμίστηκε στο 5,7 πριν την αποστείρωση στους 121 °C για 20 min. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε 40 ημέρες μετά την εγκατάσταση της καλλιέργειας. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας υπολογίστηκε ως το γινόμενο (B) του ποσοστού βλαστογένεσης, του μέσου αριθμού βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε και του μέσου μήκους των βλαστών προς το 0,6 (βλ. 3.8.2). Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς και η σύγκριση των μέσων έγινε με Student's *t*, σε *P*=0,05.

6.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.2.1 Επίδραση του IBA στην βλαστογένεση του *A. andrachne*

Δεδομένης της αδυναμίας του NAA και του BA να συμβάλουν στην βλαστογένεση του *A. andrachne* σε προπειράματα με αρχικό υλικό νεαρά σπορόφυτα, χρησιμοποιήθηκε το IBA σε συγκέντρωση 0,2, 1,0, 2,0, 3,0 ή 4,0 mg I⁻¹. Το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν υψηλό (85-96%) σε όλες τις συγκεντρώσεις. Σχηματίστηκε 1 βλαστός/έκφυτο με μήκος 1,5-1,9 cm, χωρίς διαφορά, στις διάφορες συγκεντρώσεις IBA. Σχηματίστηκαν 7,1-9,4 κόμβοι σε όλες τις συγκεντρώσεις IBA, αλλά ο υψηλότερος αριθμός (12,9) σχηματίστηκε σε 1 mg I⁻¹. Ταυτόχρονα οι βλαστοί

ριζοβόλησαν σε ποσοστό 100% στις δύο χαμηλότερες συγκεντρώσεις IBA και σε ποσοστό 85% στις τρεις υψηλότερες (σύγκριση των μέσων με Student's *t* test, $P=0,05$, $n=32$).

6.2.2 Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος και των κυτοκινινών στην βλαστογένεση του *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo*

Το ποσοστό βλαστογένεσης στο *A. andrachne* στα δύο υποστρώματα, MS ή WPM, που περιείχαν ZEAT ήταν πολύ υψηλό, ενώ σε αυτά με TDZ και στους μάρτυρες ήταν χαμηλότερο (Πίν. 25, Εικ. 53). Η ZEAT προκάλεσε το σχηματισμό περισσότερων και μεγαλύτερου μήκους βλαστών και στα δύο θρεπτικά υποστρώματα σε σχέση με το TDZ, καθώς ο μέσος αριθμός βλαστών ήταν διπλάσιος στα υποστρώματα που περιείχαν ZEAT και το μέσο μήκος 2-3 φορές μεγαλύτερο. Ο μεγαλύτερος αριθμός φύλλων σχηματίστηκε υπό 2,5 mg l⁻¹ ZEAT, αλλά στο MS ο αριθμός δεν διέφερε από το σκέτο MS. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν αρκετά υψηλότερο και στα δύο υποστρώματα που περιείχαν ZEAT (Πίν. 25).

Στο *A. x andrachnoides* το ποσοστό βλαστογένεσης στο WPM με TDZ ήταν χαμηλό (Πίν. 26). Η ZEAT προκάλεσε το σχηματισμό περισσότερων και μεγαλύτερου μήκους βλαστών και στα δύο είδη υποστρώματος. Το TDZ αύξησε τον αριθμό των βλαστών σε σχέση με τον μάρτυρα μόνο στο WPM. Σε ότι αφορά στον αριθμό των φύλλων των βλαστών η επίδραση των υποστρωμάτων, καθώς και του είδους και της ποσότητας της κυτοκινίνης, ήταν ανάλογη με αυτή στο μήκους των βλαστών. Το μήκος των βλαστών, καθώς και ο αριθμός των κόμβων, τόσο σε MS όσο και σε WPM, ήταν υπερδιπλάσιος και στις δύο συγκεντρώσεις της ZEAT, συγκρινόμενος με το μέσο μήκος των βλαστών και τον αριθμό των κόμβων στις δύο συγκεντρώσεις του TDZ, που έδωσε παρόμοιο μήκος βλαστών και αριθμό κόμβων με το μάρτυρα (Πίν. 26, Εικ. 54).

Και στο *A. unedo* υψηλότερη βλαστογένεση παρατηρήθηκε στα δύο υποστρώματα που περιείχαν ZEAT (Πίν. 27). Η ZEAT επίσης προκάλεσε το σχηματισμό περισσότερων και μεγαλύτερου μήκους βλαστών και στα δύο είδη υποστρώματος. Το TDZ αύξησε τον αριθμό των βλαστών σε σχέση με το μάρτυρα μόνο στο WPM, όπου στη συγκέντρωση 2 mg l⁻¹ έδωσε όσους βλαστούς και η ZEAT αλλά πολύ μικρότερου μήκους. Σε ότι αφορά στον αριθμό των φύλλων των βλαστών

η επίδραση των υποστρωμάτων, καθώς και του είδους και της ποσότητας της κυτοκινίνης, ήταν ανάλογη με αυτή στο μήκος των βλαστών. Το μήκος των βλαστών, καθώς και ο αριθμός των φύλλων, τόσο σε MS όσο και σε WPM, ήταν σχεδόν τριπλάσιος και στις δύο συγκεντρώσεις της ZEAT, από το μήκος των βλαστών και τον αριθμό των φύλλων στις δύο συγκεντρώσεις του TDZ, που έδωσε παρόμοιο μήκος βλαστών και αριθμό φύλλων με το μάρτυρα (Πίν. 27, Εικ. 55).

Πίν. 25. Επίδραση κυτοκινινών (TDZ και ZEAT, σε συγκέντρωση 0,2 ή 2 mg l⁻¹ και 2,5 ή 5 mg l⁻¹ αντίστοιχα) στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβου από *in vitro* σπορόφυτα *A. andrachne*, σε υπόστρωμα MS ή WPM, n=24-40.

Υπόστρωμα	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός κόμβων	Μέσος αριθμός φύλλων	Γιν Β /0,6
MS	63	1,0 b	0,9 a	5,6 ab	7,2 ab	0,10
MS/0,2 TDZ	70	2,5 b	0,4 c	1,9 c	3,9 c	1,33
MS/2 TDZ	75	2,3 b	0,3 c	1,4 c	3,0 c	0,83
MS/2,5 ZEAT	94	5,0 a	0,9 a	6,4 a	9,2 a	7,00
MS/5 ZEAT	100	4,6 a	0,7 b	4,0 b	6,8 b	5,33
WPM	88	1,5 b	0,7 b	4,3 b	6,0 bc	1,50
WPM/0,2 TDZ	70	2,0 b	0,4 c	3,7 bc	5,8 bc	1,00
WPM/2 TDZ	75	2,3 b	0,3 c	2,4 c	4,4 c	0,83
WPM/2,5 ZEAT	100	4,3 a	1,1 a	6,7 a	8,3 a	7,83
WPM/5 ZEAT	94	4,3 a	0,8 b	4,8 b	7,3 ab	5,33

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες, ανά θρεπτικό υπόστρωμα, με Student's test, P=0,05.

Πίν. 26. Επίδραση κυτοκινινών (TDZ και ZEAT σε συγκέντρωση 0,2 ή 2 mg l⁻¹ και 2,5 ή 5 mg l⁻¹ αντίστοιχα) στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβου από *in vitro* σπορόφυτα *A. x andrachnoides*, σε υπόστρωμα MS ή WPM, n=24-38.

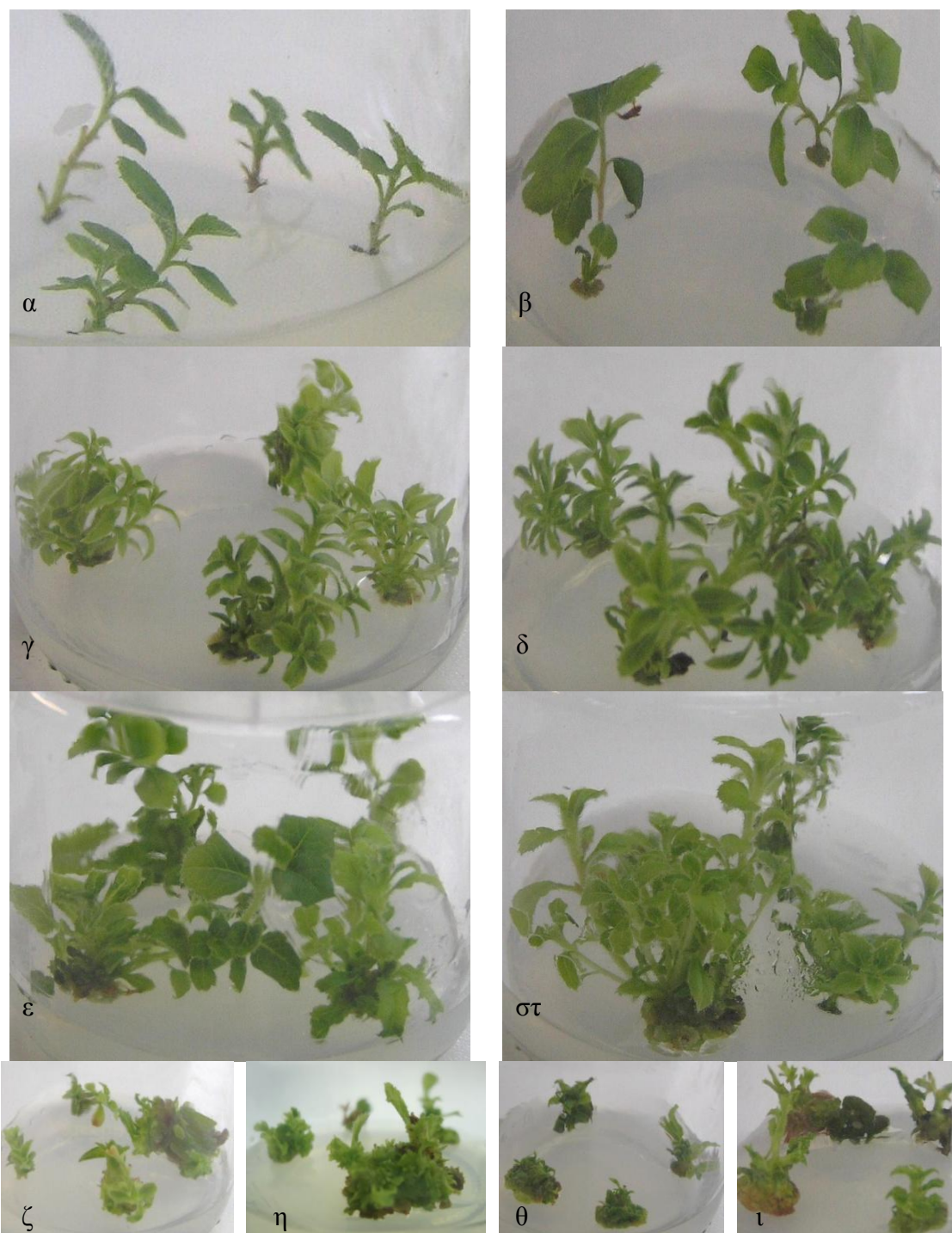
Υπόστρωμα	Βλαστο ογένε ση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός κόμβων	Μέσος αριθμός φύλλων	Γιν Β /0,6
MS	96	1,3 b	0,6 ab	4,0 a	6,3 b	1,25
MS/0,2 TDZ	79	1,5 b	0,4 c	2,4 b	4,0 c	0,78
MS/2 TDZ	83	1,5 b	0,4 bc	1,6 b	3,5 c	0,83
MS/2,5 ZEAT	100	3,7 a	0,8 a	3,6 a	6,9 ab	4,93
MS/5 ZEAT	100	3,4 a	0,7 a	4,1 a	8,2 a	3,97
WPM	100	1,0 d	0,5 b	2,9 b	4,8 b	0,83
WPM/0,2 TDZ	53	1,9 c	0,4 b	2,2 bc	5,3 b	0,67
WPM/2 TDZ	34	2,2 c	0,1 c	1,0 c	2,4 c	0,12
WPM/2,5 ZEAT	100	3,0 b	1,0 a	5,5 a	8,5 a	5,00
WPM/5 ZEAT	100	3,8 a	0,8 a	5,6 a	8,6 a	5,07

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες, ανά θρεπτικό υπόστρωμα, με Student's test, P=0,05.

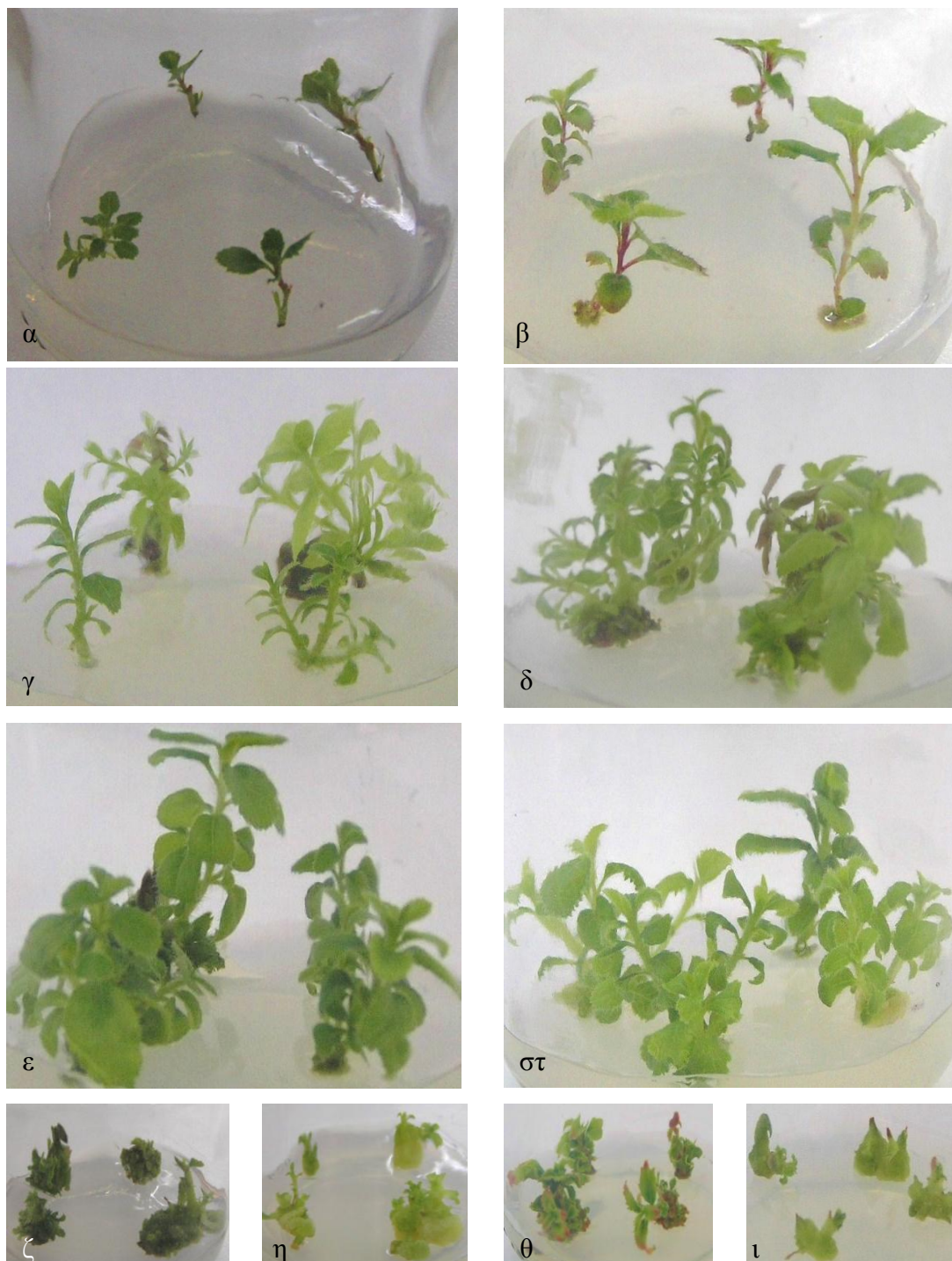
Πίν. 27. Επίδραση κυτοκινινών (TDZ και ZEAT, σε συγκέντρωση 0,2 ή 2 mg l⁻¹ και 2,5 ή 5 mg l⁻¹ αντίστοιχα) στη βλαστογένεση εκφύτων κόμβου από *in vitro* σπορόφυτα *A. unedo*, σε υπόστρωμα MS ή WPM, n=22-39.

Υπόστρωμα	Βλαστο γένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός κόμβων	Μέσος αριθμός φύλλων	Γιν Β /0,6
MS	83	1,1 b	0,3 c	1,7 c	4,1 c	0,67
MS/0,2 TDZ	89	1,3 b	0,2 c	1,4 c	2,2 d	0,33
MS/2 TDZ	77	1,2 b	0,3 c	1,2 c	2,2 d	0,50
MS/2,5 ZEAT	93	2,3 a	0,7 a	4,1 a	7,5 a	2,50
MS/5 ZEAT	100	2,5 a	0,6 b	3,2 b	6,4 b	2,50
WPM	93	1,0 c	0,2 b	1,1 c	1,9 c	0,33
WPM/0,2 TDZ	69	1,5 b	0,3 b	2,6 b	3,8 b	0,50
WPM/2 TDZ	75	1,6 ab	0,2 b	1,8 bc	3,3 bc	0,33
WPM/2,5 ZEAT	100	2,0 a	1,1 a	6,4 a	8,1 a	3,67
WPM/5 ZEAT	93	1,9 ab	0,9 a	5,5 a	8,1 a	2,67

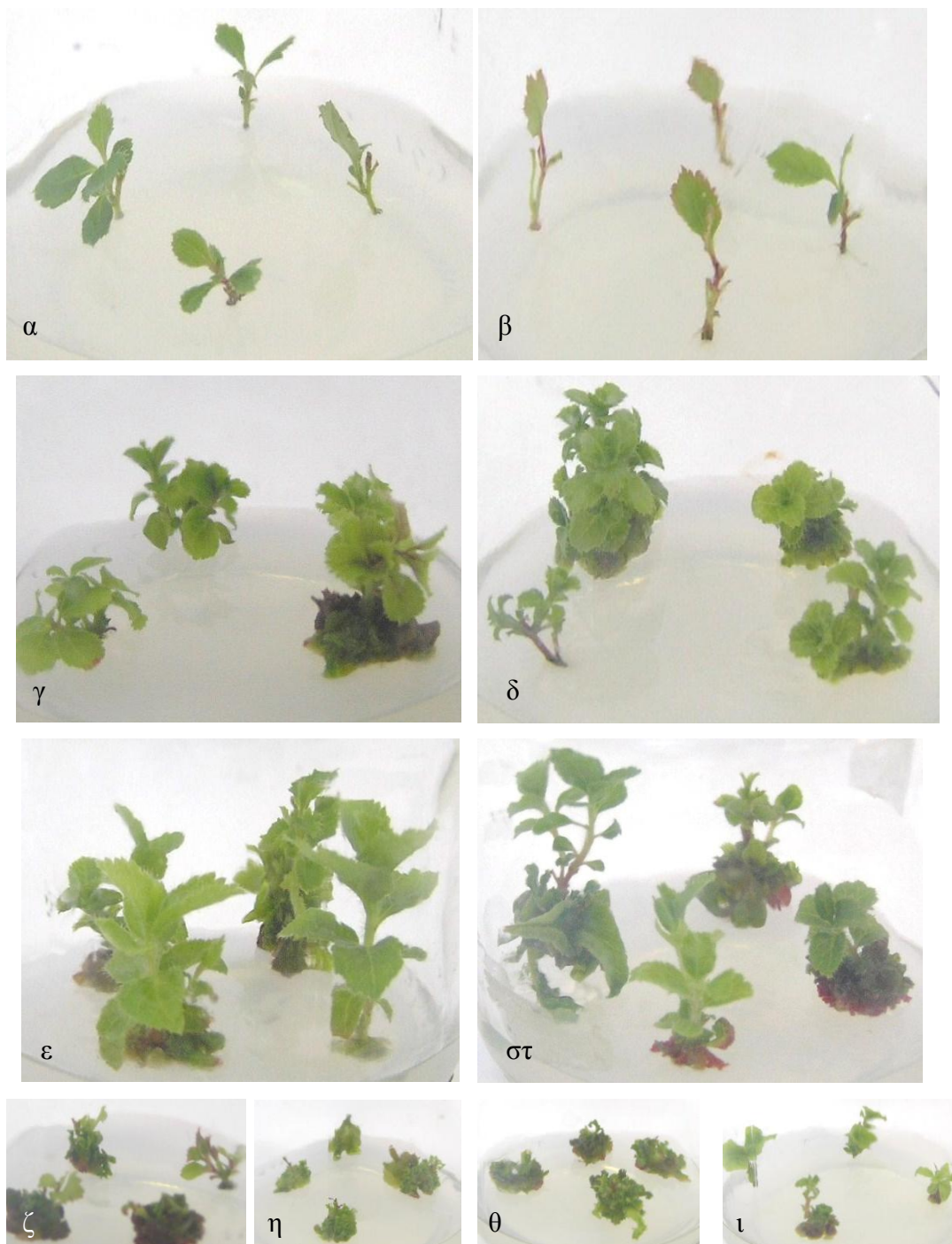
Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες με Student's test, P=0,05.



Εικ. 53. Καλλιέργεια κόμβων σποροφύτων *A. andrachne* σε υπόστρωμα MS, μάρτυρας (α) ή WPM, μάρτυρας (β), σε MS με 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEAT (γ και δ αντίστοιχα), σε WPM με 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEAT (ε και στ αντίστοιχα), σε MS με 0,2 και 2,0 mg l⁻¹ TDZ (ζ και η αντίστοιχα) ή σε WPM με 0,2 και 2,0 mg l⁻¹ TDZ (θ και ι αντίστοιχα).



Εικ. 54. Καλλιέργεια κόμβων σποροφύτων *A. x andrachnoides* σε MS, μάρτυρας (α) ή WPM, μάρτυρας (β), σε MS με 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEAT (γ και δ αντίστοιχα), σε WPM με 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEAT (ε και στ αντίστοιχα), σε MS με 0,2 και 2,0 mg l⁻¹ TDZ (ζ και η αντίστοιχα) και σε WPM με 0,2 και 2,0 mg l⁻¹ TDZ (θ και ι αντίστοιχα).



Εικ. 55. Καλλιέργεια κόμβων σποροφύτων *A. unedo* σε υπόστρωμα MS, μάρτυρας (α) ή WPM, μάρτυρας (β), σε MS με 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEAT (γ και δ αντίστοιχα), σε WPM με 2,5 και 5,0 mg l⁻¹ ZEAT (ε και στ αντίστοιχα), σε MS με 0,2 και 2,0 mg l⁻¹ TDZ (ζ και η αντίστοιχα) ή σε WPM με 0,2 και 2,0 mg l⁻¹ TDZ (θ και ι αντίστοιχα).

6.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αναφορές ότι οι φυσικές κυτοκινίνες ZEAT και 2IP είναι γενικά πιο αποτελεσματικές για μικροπολλαπλασιασμό ειδών της οικογενείας Ericaceae (Ostrolucká *et al.*, 2002, George *et al.*, 2008). Παρόμοια αποτελεσματικότητα της ZEAT στη βλαστογένεση έχει δειχθεί με έκφυτα που προέρχονταν από ενήλικα φυτά και των τριών ειδών (βλ. 5). Το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 99% σε υπόστρωμα WPM με 2,5 mg l⁻¹ και για τα τρία είδη από ενήλικα φυτά και 100% από σπορόφυτα (Σχ. 29, Πίν. 25, 26, 27). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού εκφύτων από κόμβους σποροφύτων όπως εκφράστηκε από το γινόμενο B, ήταν διπλάσιο για το *A. andrachne*, λίγο υψηλότερο για το *A. x andrachnoides* και χαμηλότερο για το *A. unedo*, σε σχέση με το δυναμικό εκφύτων από ενήλικα φυτά στην πρώτη υποκαλλιέργεια (αρχική Μάιος). Η διαφορά αυτή προήλθε από τον υψηλότερο αριθμό βλαστών για τα το *A. andrachne* και *A. x andrachnoides* από κόμβους σποροφύτων και το μεγαλύτερο μήκος εκφύτων από κόμβους ενήλικων φυτών.

Η χρήση ZEAT για το *A. andrachne* είχε πενταπλάσιο δυναμικό πολλαπλασιασμού από το IBA και τον σχηματισμό ενός μόνο βλαστού με μήκος περίπου 1 cm. Από την χρήση νεαρού φυτικού υλικού, αποδείχτηκε ότι η ZEAT σε συγκέντρωση 2,5 mg l⁻¹ είτε σε MS ή σε WPM μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και του *A. unedo*, από κόμβους που προέρχονται από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα σε MS ή WPM με 1 mg l⁻¹ IBA. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ZEAT προκάλεσε σε μικρό βαθμό υπερενυδάτωση στους βλαστούς, ενώ το TDZ ήταν ακατάλληλο για τον πολλαπλασιασμό των τριών ειδών.

Από τη μελέτη αποδείχθηκε ότι το MS είναι εξ' ίσου κατάλληλο υπόστρωμα για τον πολλαπλασιασμό και των τριών ειδών, όπως και το WPM στην καλλιέργεια εκφύτων από νεανικά φυτά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πολλαπλασιασμού από ενήλικα φυτά (βλ. 5.2.1.8, Σχ. 32, 33) και σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Mostafa *et al.*, (2010) για την καλλιέργεια εκφύτων κόμβων *A. andrachne* επίσης από σπορόφυτα. Η αναφορά τους για σχηματισμό 1 βλαστού/έκφυτο σε θρεπτικό υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη, ενώ σε WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες σχηματίστηκε 1,5 βλαστού/έκφυτο. Τα υποστρώματα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες και στα *A. x*

andrachnoides και *A. unedo* έδωσαν μικρό αριθμό βλαστών/έκφυτο (1,0-1,3) (Πίν. 25, 26, 27).

Το TDZ επέφερε τον σχηματισμό παραμορφωμένων βλαστών και είχε δυσμενή αποτελέσματα στη μορφογενετική ικανότητα των καλλιεργειών μειώνοντας ακόμη περισσότερο το γινόμενο B, σε σχέση με τις καλλιέργειες εκφύτων από κόμβους ενήλικων φυτών (Πίν. 24, 25, 26, 27). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν και οι Gomez *et al.*, (2010) για την επιβλαβή δράση του TDZ (βλ. 5.4).



Ριζοβολία μικροβλαστών - Εγκλιματισμός *ex vitro* φυταρίων

7. ΡΙΖΟΒΟΛΙΑ ΜΙΚΡΟΒΛΑΣΤΩΝ - ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ *EX VITRO* ΦΥΤΑΡΙΩΝ

7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

7.1.1 Ριζοβολία μικροβλαστών ξυλωδών ειδών

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δεν βρέθηκαν αναφορές για *in vitro* ριζοβολία στο *A. drachne*. Ο Mackay (1996), είχε χρησιμοποιήσει WPM υποδιπλασιασμένης δύναμης με IBA ή IAA για την ριζοβολία του *Arbutus xalapensis* H.B.K. Οι Morini and Fiaschi (2000) αναφέρουν ότι η ριζοβολία μικροβλαστών του *A. unedo* κατέστη δυνατή σε θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν διάφορες συγκεντρώσεις IBA μόνο όταν προηγήθηκε παραμονή των δοχείων καλλιέργειας σε σκοτάδι για μία εβδομάδα. Οι Mereti *et al.* (2003) αναφέρουν ότι WPM με την προσθήκη αυξίνης IBA ή IAA είχε ευνοϊκό αποτέλεσμα στην *in vitro* ριζοβολία μικροβλαστών του *Arbutus unedo*, με το IBA να είναι όμως πιο αποτελεσματικό. Οι Gomes and Canhoto (2009) αναφέρουν ότι οι μικροβλαστοί του *A. unedo* σημείωσαν υψηλό ποσοστό ριζοβολίας ακόμα και σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς αυξίνη. Πρόσφατα οι Mostafa *et al.* (2010) χρησιμοποίησαν για την ριζοβολία μικροβλαστών (από νεανικό μητρικό υλικό) *A. drachne* L. MS, με NAA, IAA ή IBA και βρήκαν το NAA ως πιο αποτελεσματικό σε συγκέντρωση 1 mg l⁻¹. Οι αυξίνες συνέβαλαν θετικά επίσης στην *in vitro* ριζοβολία και άλλων ειδών από γένη της οικογενείας Ericaceae, όπως του *Oxydendrum arboretum* (Banko and Stefani, 1989), ειδών του γένους *Vaccinium* (Jaakola *et al.*, 2001, Ostrolucká *et al.*, 2004, Meiners *et al.*, 2007, Sedlak and Paprstein, 2009) και του *Leucopogon verticillatus* (Anthony *et al.*, 2004).

Η παρουσία αυξίνης αναφέρεται επίσης ως απαραίτητη για τη ριζοβολία μικροβλαστών ξυλωδών ειδών όπως του γένους *Quercus* (Manzanera and Pardos, 1990, Romano *et al.*, 1992, Marks and Simpson, 2000, Purohit *et al.*, 2002, Romano and Martins-Loucao, 2003, Kartsonas and Papafotiou, 2007), του *Actinidia deliciosa* A. Chev. (Rugini *et al.*, 1991), *Castanea sativa* (Goncalves *et al.*, 1998), *Sorbus domestica* (Arrillaga *et al.*, 1991), *Cercis canadensis* var *mexicana* (Mackay *et al.*, 1995), *Vitex negundo* L. (Sahoo and Chand, 1998), *Ceratonia siliqua* (Romano *et al.*, 2002), *Daphne cneorum* (Mala and Bylinsky, 2004). Οι Leifert *et al.* (1992)

χρησιμοποίησαν αυξίνη για τη ριζοβολία φυτών *Daphne*, *Choisya* και *Photinia*. Η αύξηση της συγκέντρωσης της αυξίνης οδήγησε σε υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας στο *Acer rubrum* L. “Red Sunset”, *Betula nigra* L. και *Malus x domestica* Borkh “MvIntosh”, αλλά υποβάθμισε τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά καθώς οι ρίζες ήταν υδαρείς και λεπτές με επακόλουθο μειωμένη ικανότητα για εγκλιματισμό (McClelland *et al.*, 1990). Αναφέρεται όμως ότι μικροβλαστοί των ειδών *Fagus sylvatica* (Ευρωπαϊκή οξιά) και *F. orientalis* (Βασιλική οξιά) ριζοβόλησαν σε υπόστρωμα που δεν περιελάμβανε αυξίνη (Cuenca *et al.*, 1991). Ο Debnath (2008), αναφέρει ότι διάφοροι κλώνοι από το είδος *Vaccinium macrocarpon* (οικ. Ericaceae) ριζοβόλησαν σε θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν ZEAT.

Υπάρχουν αναφορές από αρκετούς ερευνητές για καλύτερη ριζοβολία μικροβλαστών που προήλθε ύστερα από μείωση της συγκέντρωσης των αλάτων του θρεπτικού υποστρώματος ριζοβολίας. Ο Rugini (1984), χρησιμοποίησε θρεπτικό υπόστρωμα Knor ή MS υποδιπλασιασμένης δύναμης για τη ριζοβολία του *Olea europaea sativa* L, όπως και οι Rugini *et al.* (1991) για το *Actinidia deliciosa* A. Chev. Οι Leifert *et al* (1992) χρησιμοποίησαν WPM υποδιπλασιασμένης δύναμης για τη ριζοβολία φυτών *Daphne*, *Choisya* και *Photinia* και MS υποδιπλασιασμένης δύναμης για τη ριζοβολία φυτών *Delphinium*, *Hemerocallis*, *Hosta* και *Iris*. Για τη ριζοβολία του *Cercis canadensis* var *mexicana* χρησιμοποιήθηκε ½ WPM (Mackay *et al.*, 1995). Οι Juncker and Favre (1989) και Vieitez *et al.* (1994) ριζοβόλησαν με επιτυχία μικροβλαστούς του *Q. robur*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης και GD υποτριπλασιασμένης δύναμης, οι Manzanera and Pardos (1990) μικροβλαστούς του *Q. suber* σε μισής ή 1/10 δύναμης του υποστρώματος Sommers and Hellers και τέλος οι Purohit *et al.* (2002) μικροβλαστούς των *Q. leucotrichophora* and *Q. glauca* σε μισής δύναμης WPM. Ο Κάρτσωνας (2008) όμως, αναφέρει ότι το ποσοστό ριζοβολίας μικροβλαστών *Quercus euboica* σε WPM υποδιπλασιασμένης δύναμης με 3 % σακχαρόχη μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με το ποσοστό σε υπόστρωμα πλήρους δύναμης. Όταν μειώθηκε όμως η συγκέντρωση σε σακχαρόζη σε 1,5 % δεν παρατηρήθηκε διαφορά ανάμεσα στα δύο υποστρώματα. Οι Sahoo and Chand (1998) και οι Romano *et al.* (2002) χρησιμοποίησαν MS υποδιπλασιασμένης δύναμης για τη ριζοβολία των *Vitex negundo* L. και *Ceratonia siliqua* αντίστοιχα.

Η επαγωγή της ριζοβολίας και η επιμήκυνση των ριζών είναι μια σύνθετη διαδικασία, η οποία επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως ο γονότυπος, το

είδος και η συγκέντρωση των φυτορρυθμιστικών ουσιών και οι συνθήκες καλλιέργειας (Bennett *et al.* 1994, Mylona and Dolan, 2002). Πολλοί ερευνητές αναφέρονται στη σημαντική επίδραση του γονοτύπου και της ηλικίας των μητρικών φυτών στη ριζοβολία των μικροβλαστών (Chalupa, 1988, Juncker and Favre, 1989, Manzanera and Pardos, 1990, Vieitez *et al.*, 1994). Ως εκ τούτου, δεν πρέπει να προκαλεί εντύπωση ότι οι συνθήκες για την επίτευξη ριζοβολίας ποικίλουν μεταξύ των διαφορετικών ειδών, μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους, αλλά ακόμη και φυτών της ίδιας ποικιλίας. Ο στόχος της έρευνας ήταν η εξεύρεση ενός ικανοποιητικού πρωτοκόλλου *in vitro* ριζοβολίας μικροβλαστών που προέρχονταν είτε από τις καλλιέργειες πολλαπλασιασμού από βλαστούς ενήλικων φυτών, είτε από βλαστούς ληφθέντες από νεανικούς ιστούς *in vitro* ανεπτυγμένων σποροφύτων.

7.1.2 Εγκλιματισμός ριζοβολημένων μικροβλαστών ξυλωδών ειδών

Η επιτυχία κάθε μεθόδου *in vitro* πολλαπλασιασμού εξαρτάται και συνδέεται από το τελευταίο στάδιο, το στάδιο δηλαδή του επιτυχούς εγκλιματισμού. Μόνο τότε μπορεί να θεωρηθεί επιτυχής όταν γίνει δηλαδή εφικτός ο εγκλιματισμός και η επιβίωση ενός ικανού αριθμού φυτών που θα έχουν πλέον μεταφερθεί, εγκλιματιστεί και επιβιώσει με επιτυχία σε φυσικές συνθήκες (Ziv, 1986). Η μεταφύτευση των ριζοβολημένων φυταρίων γίνεται με μεγάλη προσοχή για να μην τραυματιστούν οι ρίζες κατά το ξέπλυμα και την απομάκρυνση του θρεπτικού υποστρώματος. Η τύρφη και ο περλίτης είναι δύο από τα βασικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στη μεταφύτευση. Έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές που εφαρμόζονται μετά τον πολλαπλασιασμό για την αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των ριζοβολημένων μικροβλαστών (Hazarika, 2003). Αυτές περιλαμβάνουν την διέγερση του μηχανισμού αυτοτροφίας, τη χρήση επιβραδυντών ανάπτυξης, τον περιορισμό της υγρασίας και την εφαρμογή αντιδιαπνευστικών ουσιών και ανάπτυξη μεθόδων για ταυτόχρονη ριζοβολία και εγκλιματισμό (Preece and Sutter, 1991, Bhojwani and Razdan, 1996).

Η διέγερση του μηχανισμού αυτοτροφίας περιλαμβάνει είτε τον περιορισμό της συγκέντρωσης του οξυγόνου, ώστε να μειωθεί ο ρυθμός φωτοσύνθεσης (Sharma *et al.*, 1999), είτε τον περιορισμό των υδατανθράκων στο υπόστρωμα με ταυτόχρονη αύξηση του φωτισμού και την συγκέντρωση οξυγόνου (Hazarika, 2003). Η χρήση των επιβραδυντών ανάπτυξης έχει προκαλέσει ανάμικτα αποτελέσματα και

χρειάζεται προσοχή, γιατί είναι φυτοτοξικά σκευάσματα (Hazarika, 2003). Σε συνθήκες υψηλής υγρασίας παρατηρείται χαμηλή εναπόθεση επιδερμικού κηρού και ανωμαλίες στα στομάτια και τον επιδερμικό ιστό. Οι Isutsa *et al.* (1994) για να αντιμετωπιστεί αυτή η κατάσταση προτείνουν αύξηση της πίεσης γύρω από τον ιστό. Η μείωση της σχετικής υγρασίας *in vitro* μπορεί να επιτευχθεί μέσω της εφαρμογής ειδικών ουσιών, με κάλυψη του υποστρώματος με έλαια ή ανοίγοντας τα δοχεία ιστοκαλλιέργειας ή με τη χρήση ειδικών καλυμμάτων για τα δοχεία ή με μείωση της θερμοκρασίας στους θαλάμους. Η αύξηση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης ή του άγαρ στο υπόστρωμα ή η ρύθμιση ωσμωτικών αντιδραστηρίων όπως polyethylene glycol στο υπόστρωμα επίσης οδηγεί σε μείωση της σχετικής υγρασίας (Hazarika, 2003). Οι Sharma *et al.* (1999) αναφέρουν ότι ο εγκλιματισμός και η σκληραγώγηση μπορούν να επιτευχθούν με εμπλουτισμό της ατμόσφαιρας με CO₂ και ειδικές συνθήκες φωτισμού σε ειδικά σχεδιασμένους θαλάμους σκληραγώγησης. Οι Kartsonas and Papafotiou (2010) μελέτησαν την επίδραση που είχαν διαφορετικά υλικά κάλυψης των δοχείων ιστοκαλλιέργειας σε μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά του φύλλου του *Quercus euboica*. Κατά τα πρώτα στάδια του εγκλιματισμού είναι πολύ βασικό να διατηρείται υψηλή η σχετική υγρασία γύρω από τα φυτά (90-100%). Η υγρασία περιορίζεται σταδιακά ώστε να σκληραγωγηθούν τα φυτά. Τα φυτά υφίστανται το πρώτο περιβαλλοντικό στρες καθώς από ένα περιβάλλον πλούσιο σε οργανικά στοιχεία μεταφέρονται σε περιβάλλον που τους παρέχει μόνο ανόργανα υλικά (Bhojwani and Razdan, 1996). Η χρήση διάφανου, εύκαμπτου πλαστικού για την κάλυψη των φυτών με οπές που σταδιακά μεγαλώνουν μέχρι να απομακρυνθεί τελείως γύρω από τα φυτοδοχεία, είναι από τις πλέον χρησιμοποιούμενες.

Από πολλούς ερευνητές αναφέρεται επίσης ο σημαντικός ρόλος που μπορούν να έχουν στον επιτυχή εγκλιματισμό οι μυκόριζες, γιατί τα φυτά που παράγονται με μικροπολλαπλασιασμό τόσο στα *in vitro* στάδια ανάπτυξής τους, όσο και κατά τον εγκλιματισμό τους, δεν έχουν στο περιβάλλον των ριζών μυκόρριζες, αφού οι συνθήκες ανάπτυξής τους αποτρέπουν την παρουσία τους. Οι Martins *et al.* (1996) αναφέρουν σημαντική αύξηση της ανάπτυξης και του ποσοστού επιβίωσής φυταρίων του είδους *Castanea sativa* που είχαν παραχθεί *in vitro* όταν χρησιμοποίησαν το είδος μυκόρριζας *Pisolithus tinctorius*, και οι Reddy and Satyanarayana (1998) χρησιμοποίησαν το ίδιο είδος μυκόρριζας για το *Eucalyptus tereticornis*. Τέλος, οι Kartsonas and Papafotiou (2009) αναφέρουν ότι ο εγκλιματισμός στο *Quercus*

euboica Par. κατέστη δυνατός μόνο σε εδαφικό υπόστρωμα από το περιβάλλον που φυόταν το είδος.

7.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.2.1 Ριζοβολία μικροβλαστών

Μικροβλαστοί μήκους 1-2 cm τοποθετούνταν στο υπόστρωμα ριζοβολίας όπου παρέμεναν για 40 ημέρες στο θάλαμο σταθερών συνθηκών (βλ. 3.5, 3.7.2). Με σκοπό να βρεθούν οι ιδανικές συγκεντρώσεις του IBA που οδηγούν στο σχηματισμό ριζών στο *A. andrachne*, σε αρχικές προσπάθειες ριζοβολίας μικροβλαστών, χρησιμοποιήθηκαν αναγνωριστικά στα υποστρώματα καλλιέργειας (και με βάση της βιβλιογραφικές αναφορές για άλλα είδη του γένους *Arbutus* και της οικογένειας Ericaceae) οι συγκεντρώσεις 0,2, 0,5, και 1 mg l⁻¹ IBA, ενώ ελέγχθηκε και η δυνατότητα ριζοβολίας σε υπόστρωμα WPM υποδιπλασιασμένης δύναμης, χωρίς αυξίνη (Οκτώβριος και Δεκέμβριος 2004, Ιανουάριος, Φεβρουάριος, Μάρτιος, Απρίλιος, 2005). Στη συνέχεια έγινε συγκριτική μελέτη της ριζοβολίας των τριών ειδών σε υπόστρωμα WPM που περιείχε 1 mg l⁻¹ IBA (για τις καλλιέργειες από 2006-2008). Στις καλλιέργειες νεανικών ιστών από σπορόφυτα (βλ. 6) μικροβλαστοί που προήλθαν από τη δεύτερη υποκαλλιέργεια τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα MS ή WPM με 1 ή 2 mg l⁻¹ IBA.

7.2.2 Εγκλιματισμός φυταρίων

Φυτάρια και των τριών ειδών που ριζοβόλησαν *in vitro*, μετά την απομάκρυνση του υποστρώματος από το ριζικό τους σύστημα (3.6) φυτεύονταν στα δοχεία εγκλιματισμού σε μίγμα από compost (Max Ericaceous Compost, Klansmann-Deilmann GmbH, Geeste, Germany, pH 4,5-5,5) ή τύρφη (pH 5,5) και περλίτη (1:1, v/v) και τοποθετούνταν αρχικά για 2 εβδομάδες σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (Εικ. 57) (25 °C, 16 h φωτοπερίοδος, βλ 3.7.3) και στη συνέχεια σε θερμαινόμενο θερμοκήπιο, μέχρι την παρέλευση 1 μηνός για την

εκτίμηση του εγκλιματισμού. Κατά την ανάπτυξη των φυταρίων στο θερμοκήπιο ανάλογα με την εποχή εφαρμόζονταν τεχνητός φωτισμός ώστε αυτά να βρίσκονται πάντα σε φωτοπερίοδο 16 h.

Ριζοβολημένα *in vitro* φυτάρια και των τριών ειδών, προωθήθηκαν για εγκλιματισμό από Νοέμβριο 2004 έως Μάιο 2005, από Φεβρουάριο 2006 έως Μάιο 2006, από Οκτώβριο 2007 έως Μάιο 2008, Φεβρουάριο και Μάιο 2009 και τοποθετούνταν σε μίγμα από υπόστρωμα compost (Max Ericaceous Compost, Klansmann-Deilmann GmbH, Geeste, Germany, pH 4,5-5,5) ή τύρφη (pH 5,5) και περλίτη (1:1, v/v).

Μικροβλαστοί που προήθαν μετά από δύο υποκαλλιέργειες καλλιέργειας που εγκαταστάθηκε από νεανικούς ιστούς σποροφύτων (βλ. 6), τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα. Για εγκλιματισμό σε *ex vitro* συνθήκες τα φυτάρια μεταφυτεύθηκαν σε τέσσερα υποστρώματα, ήτοι τύρφη τύρφη-περλίτης (1:1 v/v), κόμποστ κόμποστ-περλίτης (1:1 v/v), σε πλαστικά δοχεία, όγκου 2 l, σε υδρονέφωση, θερμαινόμενου θερμοκηπίου. Τα συστατικά των υποστρωμάτων περιγράφονται ανωτέρω.

7.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

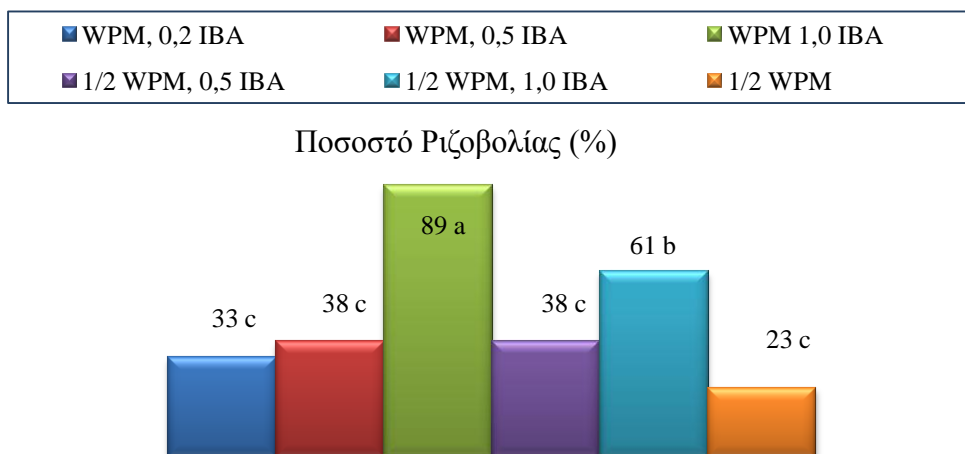
7.3.1 Ριζοβολία μικροβλαστών

Στο σύνολο των πειραμάτων ριζοβολίας βλαστών από καλλιέργειες ενήλικων φυτών, το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας παρατηρήθηκε σε WPM με 1 mg l^{-1} IBA (Σχ. 36), ενώ το ποσοστό ριζοβολίας μειώθηκε όταν υποδιπλασιάστηκε η δύναμη του υποστρώματος. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις IBA ή απουσία IBA επηρέασαν αρνητικά την ριζοβολία. Επίσης η ριζοβολία σε υπόστρωμα WPM υποδιπλασιασμένης δύναμης χωρίς IBA, δεν στάθηκε δυνατή (Σχ. 36).

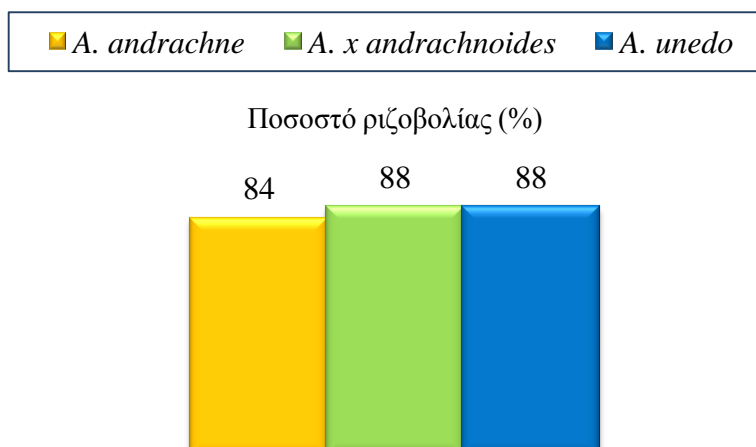
Σε συγκριτικά πειράματα που έλαβαν χώρα από Σεπτέμβριο 2007 έως Μάιο 2009, παρατηρήθηκε ότι τα τρία είδη *Arbutus* ριζοβόλησαν σε παρόμοια ποσοστά (84-88%), σε WPM που περιείχε 1 mg l^{-1} IBA (Σχ. 37, Εικ. 56).

Όταν χρησιμοποιήθηκαν ως μητρικό υλικό, νεανικοί ιστοί *in vitro* ανεπτυγμένων σποροφύτων (βλ. 6), το ποσοστό ριζοβολίας του *A. andrachne* σε υπόστρωμα MS με 1 ή 2 mg l^{-1} IBA ήταν 41 και 43% αντίστοιχα, ενώ σε WPM, το

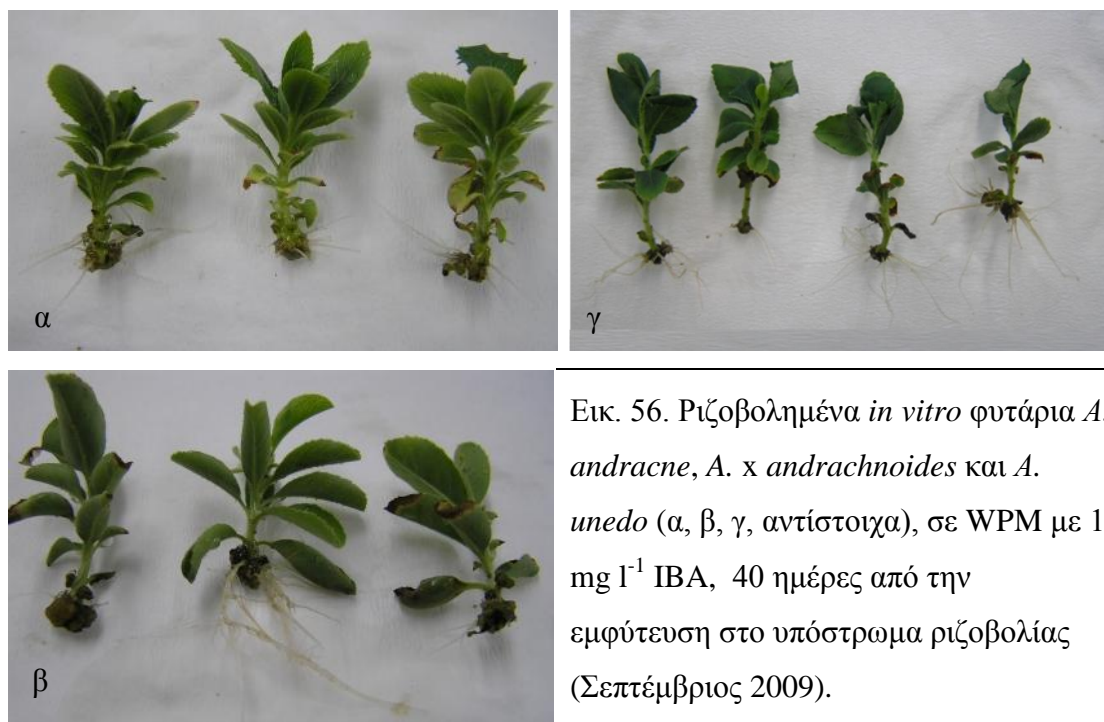
ποσοστό ριζοβολίας ήταν 90 και 86% αντίστοιχα (Εικ. 61). Το ποσοστό ριζοβολίας του *A. andrachnoides* σε υπόστρωμα MS με 1 ή 2 mg I⁻¹ IBA ήταν 50 και 42% αντίστοιχα, ενώ σε WPM ήταν 90 και 82% αντίστοιχα (Εικ. 62). Το ποσοστό ριζοβολίας του *A. unedo* σε υπόστρωμα MS με 1 ή 2 mg I⁻¹ IBA ήταν 73 και 55% αντίστοιχα, ενώ σε WPM, το ποσοστό ριζοβολίας ήταν 93 και 97% αντίστοιχα (εικ. 63).



Σχ. 36. Επίδραση της δύναμης του WPM και της συγκέντρωσης IBA στο ποσοστό ριζοβολίας του *A. andrachne*. Τα αποτελέσματα είναι συγκεντρωτικά των πειραμάτων ριζοβολίας που διεξήχθησαν Οκτώβριο και Δεκέμβριο 2004, Ιανουάριο-Απρίλιο 2005, $n=24-187$.



Σχ. 37. Ποσοστό ριζοβολίας του *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo*, σε WPM με 0,1 mg I⁻¹ IBA. Τα αποτελέσματα είναι συγκεντρωτικά των πειραμάτων ριζοβολίας που διεξήχθησαν από Σεπτέμβριο 2007 έως Μάιο 2009, $n=120-204$.

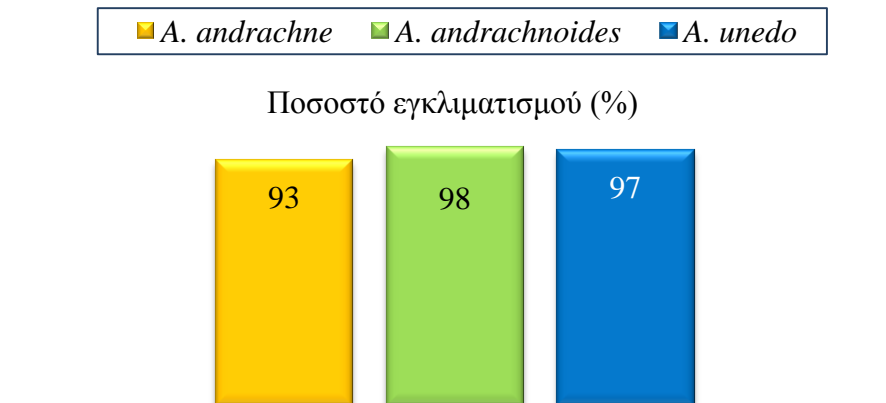


Εικ. 56. Ριζοβολημένα *in vitro* φυτάρια *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* (α, β, γ, αντίστοιχα), σε WPM με 1 mg l^{-1} IBA, 40 ημέρες από την εμφύτευση στο υπόστρωμα ριζοβολίας (Σεπτέμβριος 2009).

7.3.1 Εγκλιματισμός φυταρίων

Μετά από παρέλευση 1 εβδομάδας στον θάλαμο σταθερών συνθηκών των δοχείων καλλιέργειας αφαιρείτο το κάλυμμα (Εικ. 58). Στα φυτάρια που προέκυψαν από καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν *in vitro* από ενήλικα φυτά, το τελικό ποσοστό εγκλιματισμού και στα δύο υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν (1 τύρφη : 1 περλίτης και 1 κομπόστα: 1 περλίτης), ήταν πολύ υψηλό (Σχ. 38). Τα εγκλιματισμένα φυτάρια μεταφυτεύτηκαν σε γλαστράκια διαμέτρου 10 cm, ύστερα από 40 περίπου ημέρες για να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους (Εικ. 59, 60). Στο Ανθοκομείο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, βρίσκονται φυτά που έχουν επιτυχώς εγκατασταθεί, ηλικίας 3,5 ετών.

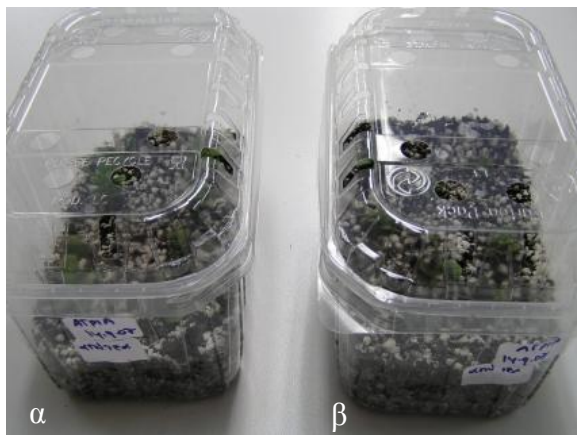
Τα ριζοβολημένα φυτάρια και των τριών ειδών που προήλθαν από νεαρά σπορόφυτα, εγκλιματίστηκαν σε πολύ υψηλό ποσοστό, από 88-100% σε *ex vitro* συνθήκες και στα τέσσερα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Εικ. 64). Μετά το τέλος του εγκλιματισμού, ακολούθησε μεταφύτευση για περαιτέρω ανάπτυξη σε γλαστράκια διαμέτρου 10 cm (21.12.2010) (Εικ. 65).



Σχ. 38. Ποσοστό εγκλιματισμού *ex vitro, in vitro* ριζοβολημένων φυταρίων του *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo*, σε υπόστρωμα 1 : 1 (κομπόστα ή τύρφη : περλίτη v/v). Τα αποτελέσματα είναι συγκεντρωτικά των πειραμάτων εγκλιματισμού που διεξήχθησαν από Οκτώβριο 2007 έως Μάιο 2009, $n= 120-282$.



Εικ. 57. Φυτάρια *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo*, κατά την έναρξη του εγκλιματισμού, τοποθετημένα, σε υπόστρωμα 1:1 (κομπόστα ή τύρφη : περλίτη v/v), σε θάλαμο με σταθερές συνθήκες (Σεπτέμβριος 2009).



A. andrachne



A x andrachnoides



A. unedo

Εικ. 58. Φυτάρια *A. andrachne*, *A x andrachnoides* και *A. unedo*, τοποθετημένα στα δοχεία εγκλιματισμού, σε υπόστρωμα 1 κομπόστα : 1 περλίτης, (α) ή 1 τύρφη : 1 περλίτης (β), σε θάλαμο με σταθερές συνθήκες, τον Οκτώβριο του 2007, 1 εβδομάδα μετά την έναρξη του σταδίου εγκλιματισμού, στο στάδιο αφαίρεσης του καλύμματος του δοχείου.

Εικ. 59. Εγκλιματισμένα φυτάρια *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* (α, β, γ αντίστοιχα), ηλικίας περίπου 40 ημερών, που μεταφυτεύτηκαν σε γλαστράκια με διάμετρο 10 cm με υπόστρωμα 1 : 1 (κομπόστα : περλίτης, v/v), το Δεκέμβριο του 2007, για περαιτέρω ανάπτυξη σε υαλόφρακτο θερμαινόμενο θερμοκήπιο.

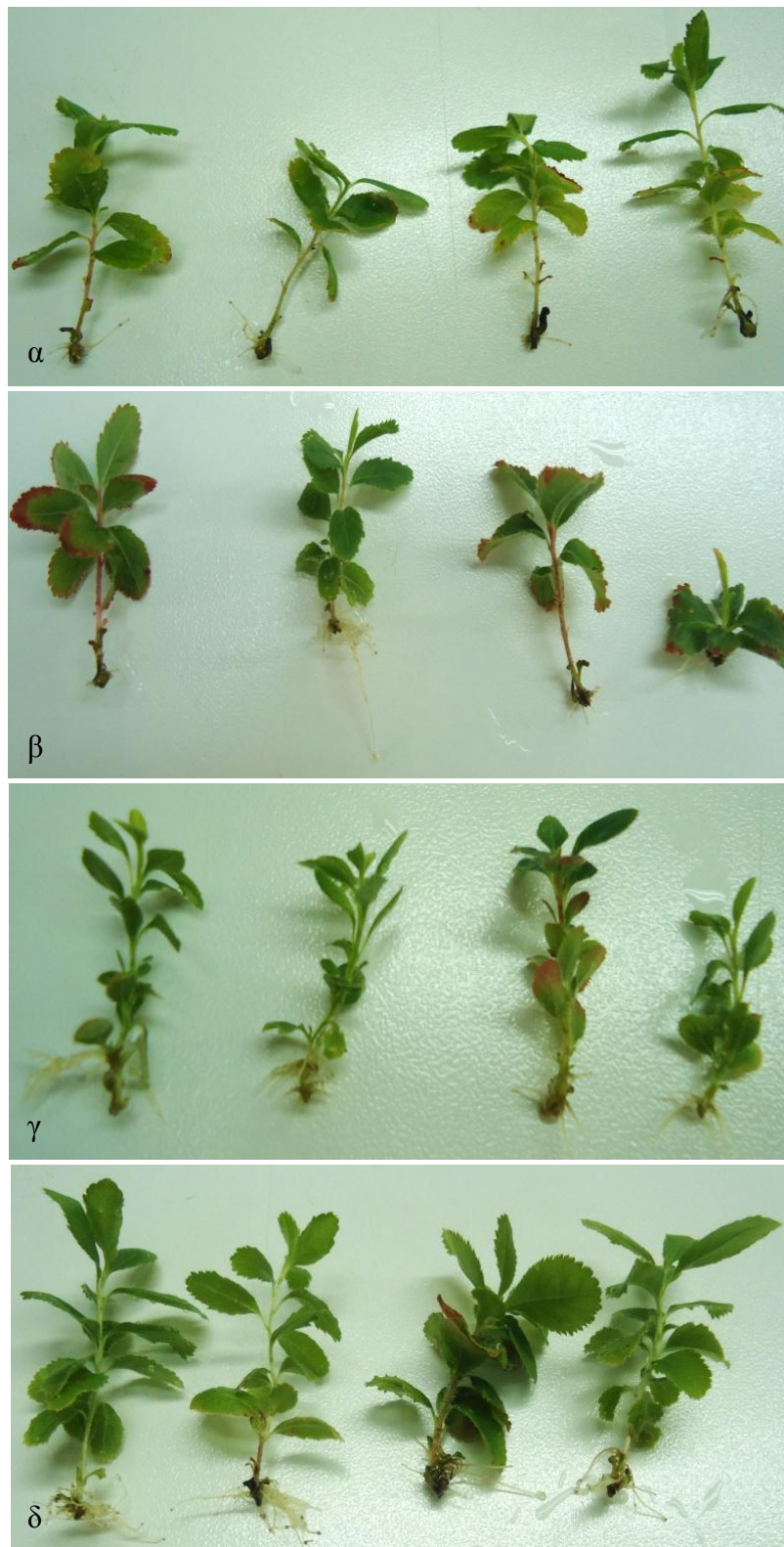


Εικ. 60.
 Εγκλιματισμένα
 φυτάρια
A. andrachne (α),
A. x andrachnoides
 (β)
 ηλικίας 2,5 μηνών
 και *A. unedo* (γ),
 ηλικίας 3,5 μηνών, σε
 υπόστρωμα 1 : 1
 (κομπόστα : περλίτης,
 ν/ν), το Φεβρουάριο
 του 2009.





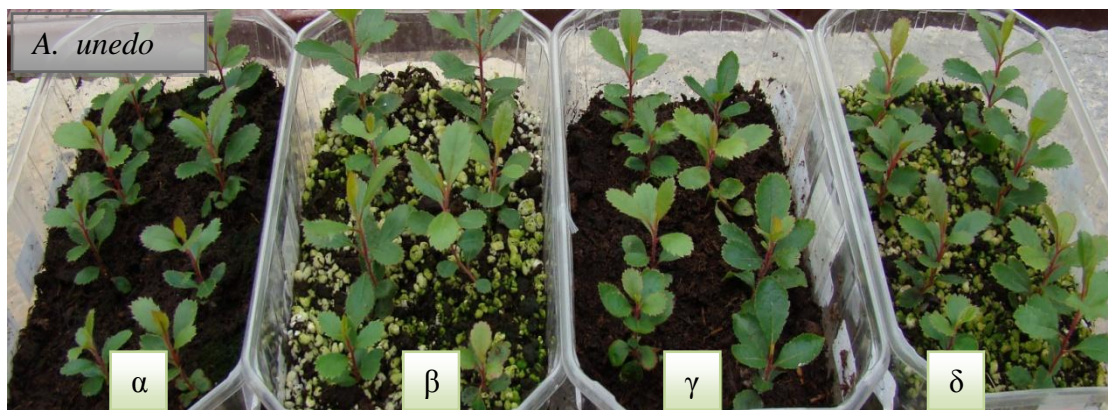
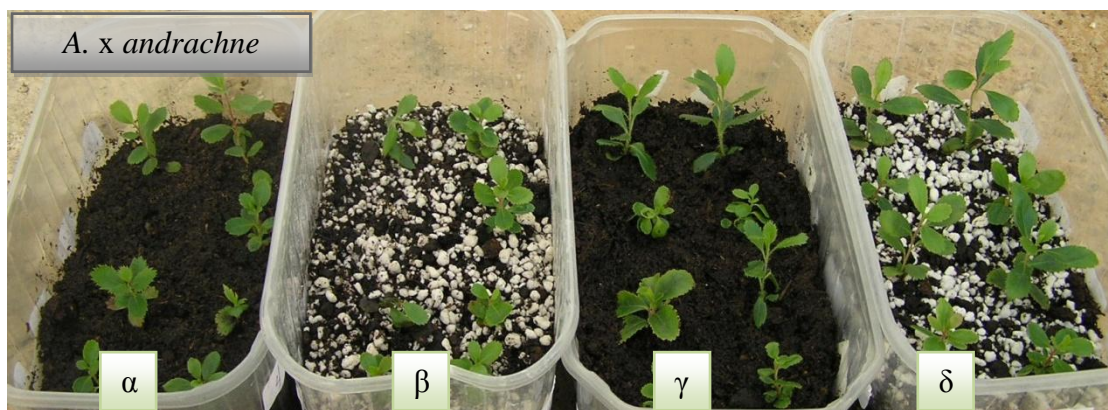
Εικ. 61. Ριζοβολία φυταρίων *A. andrachne* σε MS με 1 ή 2 mg I⁻¹ IBA (α και β αντίστοιχα) ή WPM με 1 ή 2 mg I⁻¹ IBA (γ και δ αντίστοιχα).



Εικ. 62. Ριζοβολία φυταρίων *A. x andrachnoides* σε MS με 1 ή 2 mg l⁻¹ IBA (α και β αντίστοιχα) ή WPM με 1 ή 2 mg l⁻¹ IBA (γ και δ αντίστοιχα).



Εικ. 63. Ριζοβολία φυταρίων *A. unedo* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 1 ή 2 mg l⁻¹ IBA (α και β αντίστοιχα) ή WPM με 1 ή 2 mg l⁻¹ IBA (γ και δ αντίστοιχα).



Εικ. 64. Εγκλιματισμός ριζοβολημένων φυταρίων *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* σε: (α) τύρφη, (β) τύρφη : περλίτη, (γ) compost, (δ) compost:περλίτη.

Εικ. 65.
 Ανάπτυξη φυτών *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo*, προερχόμενα από *in vitro* καλλιέργειες εγκατεστημένες από σπορόφυτα:
 (α) τελικό στάδιο εγκλιματισμού,
 (β) μεταφύτευση για περαιτέρω ανάπτυξη σε γλαστράκια διαμέτρου 10 cm (21.12.2010). Τα φυτά βρίσκονται στο χώρο υαλόφρακτου θερμαινόμενου θερμοκηπίου.



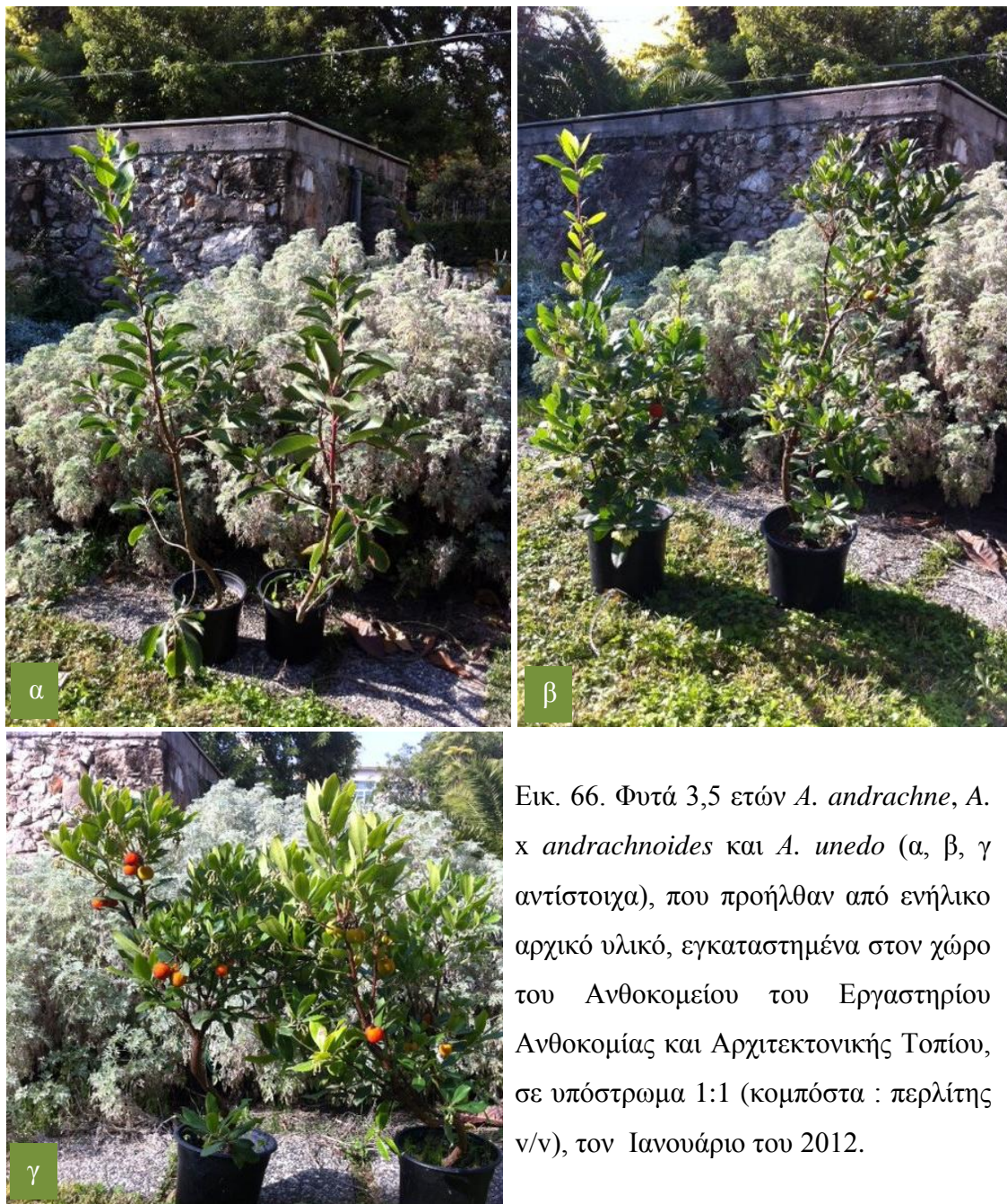
7.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το στάδιο της ριζοβολίας και του εγκλιματισμού είναι κριτικής σημασίας για την επιτυχία του πρωτόκολλου μικροπολλαπλασιασμού. Όλα τα είδη *Arbutus* ριζοβόλησαν χωρίς δυσκολία. Οι προερχόμενοι από ενήλικα αυτοφυή μικροβλαστοί, ριζοβόλησαν σε υψηλό ποσοστό 84-88% (Σχ. 37) και σχημάτισαν καλά αναπτυγμένο ριζικό σύστημα, σε WPM με IBA σε συγκέντρωση 1 mg l^{-1} . Παρόμοια ευχέρεια στην ριζοβολία μικροβλαστών *A. unedo* από ενήλικα φυτά, είχαν διαπιστώσει και οι Mereti *et al.* (2002), σε WPM με IAA σε συγκέντρωση $1,75 \text{ mg l}^{-1}$ ή IBA σε συγκέντρωση 2 mg l^{-1} (ποσοστό ριζοβολίας 82 και 92%, αντίστοιχα), ενώ στη συγκέντρωση του 1 mg l^{-1} το IBA έδωσε χαμηλότερο ποσοστό ριζοβολίας (75%) σε

σύγκριση με την παρούσα μελέτη (88%). Η ριζοβολία των μικροβλαστών είναι μια σύνθετη διαδικασία και επηρεάζεται από παράγοντες όπως ο γονότυπος, ο τύπος και η συγκέντρωση των φυτορρυθμιστικών ουσιών (Mylona and Dolan, 2002), κάτι που μπορεί να εξηγήσει τις διαφορές που παρατηρήθηκαν. Τα παρόντα αποτελέσματα στη ριζοβολία συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Gomes and Canhoto (2009) που αναφέρουν υψηλό ποσοστό ριζοβολίας σε διάφορες συνθήκες για μικροβλαστούς *A. unedo*, ακόμα και σε υπόστρωμα χωρία αυξίνη. Στο *A. xalapensis* επίσης αναφέρεται υψηλό ποσοστό ριζοβολίας (Mackay, 1996), σε WPM με 1,25 mg I⁻¹ IBA για μία εβδομάδα και ακολούθως μεταφορά των μικροβλαστών σε υπόστρωμα χωρίς αυξίνη. Στην παρούσα μελέτη και στα τρία είδη, για μικροβλαστούς που προήλθαν από νεανικούς ιστούς διαπιστώθηκε μικρότερο ποσοστό ριζοβολίας σε υπόστρωμα MS με 1 ή 2 mg I⁻¹ IBA, σε σχέση με WPM σε συμφωνία με τα μειωμένα ποσοστά (20-40%) που αναφέρουν οι Mostafa *et al.* (2010) στη ριζοβολία μικροβλαστών *A. andrachne* από νεανικό μητρικό υλικό, σε 1/2MS με συγκέντρωση 0,25, 0,50, 1,0, 2,0 ή 3,0 mg I⁻¹ IBA ή NAA.

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). Το υψηλό ποσοστό εγκλιματισμού ριζοβολημένων *in vitro* φυταρίων που επιτεύχθηκε τόσο όταν χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό υλικό ενήλικα φυτά (Σχ. 38), όσο και όταν χρησιμοποιήθηκαν νεαρά σπορόφυτα, είναι σε ακολουθία με τις αναφορές που υπάρχουν για εύκολα εγκλιματιζόμενα φυτά *A. unedo* (Gonçalves and Roseiro, 1994, Gomes and Canhoto, 2009), *A. andrachne* (Mostafa *et al.*, 2010), αλλά και άλλα είδη της οικογένειας Ericaceae όπως είδη του γένους *Vaccinium* (Isutsa *et al.*, 1994). Οι Mereti *et al.* (2002) αναφέρουν χαμηλό ποσοστό εγκλιματισμού (όχι πάνω από 38%) στο *A. unedo* και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποίησαν μέθοδο για ταυτόχρονη ριζοβολία και εγκλιματισμό (Preece and Sutter, 1991, Bhojwani and Razdan, 1996).

Όλα τα εγκλιματισμένα φυτά που προήλθαν από ενήλικο μητρικό υλικό (Εικ. 66) είχαν φυσιολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, χωρίς παρεκκλίσεις από τα τυπικά χαρακτηριστικά των τριών ειδών. Τα εγκλιματισμένα φυτά που προήλθαν από νεανικό μητρικό υλικό, είχαν επίσης μεγάλη ομοιομορφία, γιατί όλα προήλθαν από ένα συγκεκριμένο άτομο για το κάθε είδος, σε συνδυασμό με το ότι τα φυτά είναι αυτογονιμοποιούμενα (Εικ. 67). Τα φυτά με επιτυχία εγκαταστάθηκαν στο χώρο του Ανθοκομείου του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής και Τοπίου.



Εικ. 66. Φυτά 3,5 ετών *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo* (α, β, γ αντίστοιχα), που προήλθαν από ενήλικο αρχικό υλικό, εγκαταστημένα στον χώρο του Ανθοκομείου του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, σε υπόστρωμα 1:1 (κομπόστα : περλίτης v/v), τον Ιανουάριο του 2012.



Εικ. 67. Φυτά *A. andracne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo*, από *in vitro* καλλιέργειες προερχόμενες από σπορόφυτα. Τα φυτά εγκαταστάθηκαν με επιτυχία στον χώρο του Ανθοκομείου, (Εργαστήριο Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου). Τα φυτά βρίσκονται σε γλάστρες διαμέτρου 14 cm, με υπόστρωμα 1 : 1 (κομπόστα : περλίτης v/v) και είναι ηλικίας (1,5 έτους) (Απρίλιος 2012).

The background of the page features several young Arbutus seedlings. Each seedling consists of a dark, elongated seed at the top, a thin, light green stem, and a small, emerging green shoot. The seedlings are scattered across the white background, with some appearing more developed than others.

Οικοφυσιολογία του σπόρου των τριών ειδών *Arbutus* της Ελλάδας

8 ΟΙΚΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΣΠΟΡΟΥ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΕΙΔΩΝ *ARBUTUS* ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ

8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κατανόηση της οικολογίας του σπόρου είναι θεμελιώδους σημασίας για τον πολλαπλασιασμό, διάδοση και διάσωση των ειδών, αλλά για να γίνει εφικτή πρέπει να συνεκτιμηθούν παράγοντες όπως η ύπαρξη ή όχι λήθαργου, οι κατάλληλες συνθήκες για βλάστηση και οι κλιματολογικές συνθήκες στο φυσικό περιβάλλον που αναπτύσσεται ο σπόρος στο διάστημα από την ωρίμανσή του έως τη βλάστηση. Ένας ασφαλής, γενικός κανόνας είναι να συλλέγουμε τους σπόρους όταν ξεκινά ή διασπορά τους στη φύση (Baskin and Baskin, 2001). Οι σπόροι πρέπει να συλλέγονται στο στάδιο πλήρους ωρίμανσης αν και υπάρχουν σπόροι που μπορούν να βλαστήσουν ανώριμοι, αν τοποθετηθούν αμέσως μετά τη συλλογή τους για βλάστηση (Hume, 1984). Το φως μπορεί να επιδράσει στη βλαστικότητα των σπόρων και σε είδη με λήθαργο μπορεί να υποκατασταθεί από το ψύχος όπως στο *Picea mariana* (Farmer *et al.*, 1984). Σε άλλα είδη αντίθετα η υψηλή θερμοκρασία υποκατέστησε την ανάγκη σε φως για βλάστηση των σπόρων του *Hygrophila auriculata* (Amritphale *et al.*, 1989). Η ανάγκη σε φως μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη θερμοκρασία (Baskin and Baskin, 2001).

Η Nicolaeva (1969) ταξινόμησε πρώτη το λήθαργο των σπόρων σε έξι κατηγορίες. Ο λήθαργος διακόπτεται με την έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία Nicolaeva (1969), ενώ αναφέρεται ότι η διατήρηση των σπόρων, ξηρών, σε θερμοκρασία δωματίου, μπορεί να απομακρύνει τον λήθαργο του σπόρου (Toole and Toole, 1941). Ο λήθαργος μπορεί να διακοπεί με χημικές ουσίες με συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες τις γιββερελλίνες. Οι σπόροι των δένδρων της εύκρατης ζώνης δεν έχουν συνήθως λήθαργο στο στάδιο της ωριμότητας, και όταν παρατηρείται λήθαργος συνήθως πρόκειται για μη βαθύ, φυσιολογικό λήθαργο. Η άριστη θερμοκρασία για βλάστηση των σπόρων των δένδρων της εύκρατης ζώνης είναι περί τους 20 °C (Baskin and Baskin, 2001). Από 49 είδη της εύκρατης ζώνης που αναφέρουν οι Baskin and Baskin (2001), τα 48 βλαστάνουν το ίδιο καλά σε φως ή σκοτάδι.

Ο Haywood (1994) μελέτησε την βλάστηση των σπόρων του είδους *Quercus falcata*. Τα βαλανίδια βλάσταναν μόνο τον πρώτο χρόνο από την συγκομιδή τους και καθόλου τα επόμενα έτη. Η τοποθέτηση των σπόρων για βλάστηση κάτω από στρώμα φύλλων παρεμπόδισε την βλάστηση των σπόρων. Η στρωμάτωση των σπόρων αύξησε το ποσοστό βλάστησής τους από το 40 στο 76%, ενώ η τοποθέτηση τους σε έδαφος δάσους σε σύγκριση με τεχνητό εδαφικό υπόστρωμα αύξησε το ποσοστό βλάστησης από το 45 στο 68%. Οι Tilki and Alptekin (2006), κατατάσσουν τις βαλανιδιές σε δύο ομάδες, την ομάδα των άσπρων βαλανιδιών (white oaks) και την ομάδα των κόκκινων βαλανιδιών (red oaks). Με ελάχιστες εξαιρέσεις τα είδη που ανήκουν στην ομάδα των άσπρων βαλανιδιών, παρουσιάζουν μικρό ή καθόλου λήθαργο των σπόρων τους και φυτρώνουν μετά την ωρίμανση, ενώ οι σπόροι των ειδών της ομάδας των κόκκινων βαλανιδιών εμφανίζουν ποικίλες μορφές λήθαργου.

Στην φυτωριακή πρακτική για να επιτευχθεί ομοιόμορφο φύτρωμα των σπόρων εφαρμόζεται στρωμάτωση ή έκθεση των σπόρων σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για τα είδη της ομάδας των κόκκινων βαλανιδιών προτείνεται παραμονή των σπόρων τους για 4-12 εβδομάδες σε θερμοκρασία 0-4 °C και για τα είδη της ομάδας των άσπρων βαλανιδιών περίοδος μέχρι 8 εβδομάδες, αντίστοιχα στην ίδια θερμοκρασία. Σύμφωνα με τους ίδιους συγγραφείς, η κριτικά ελάχιστη περιεκτικότητα σε υγρασία των σπόρων βρέθηκε να είναι 10–12% για το *Q. nigra*. Σπόροι ειδών που δεν μπορούν με ασφάλεια να αφυδατωθούν σε υγρασία μικρότερη του 12% και που δεν μπορούν να αποθηκευτούν με ασφάλεια σε χαμηλές θερμοκρασίες αναφέρονται ως απείθαρχοι ή σπόροι ευαίσθητοι στην αφυδάτωση.

Η προσβολή από ασθένειες έχει μεγάλη σημασία στη βλάστηση των σπόρων. Οι Crawley και Long (1995) που μελέτησαν δάση *Q. robur* στη βορειοανατολική Αγγλία, βρήκαν ότι 30–80% των καρπών του είδους νεκρώνονταν από τα έντομα που προσβάλλουν αυτούς. Οι Siscart *et al.* (1999) αναφέρουν ότι η προσβολή σχετίζεται με το μέγεθος των καρπών και έτσι προσβεβλημένα βαλανίδια μεγαλύτερου μεγέθους συνήθως δεν εμφάνισαν καταστροφή του εμβρύου και ήταν ικανά να βλαστήσουν. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι βαλανίδια που είχαν προσληφθεί από έντομα βλαστάνουν με χαμηλότερο ποσοστό από μη μολυσμένα βαλανίδια (Siscart *et al.*, 1999, Branco *et al.*, 2002). Οι Leiva and Fernandez-Ales (2005) συμπέραναν ότι η επίδραση της προσβολής των εντόμων, στην βιωσιμότητα των βαλανιδιών ήταν σχετικά μικρή. Το αποτέλεσμα αυτό υποστηρίζουν ότι σχετίζεται με το μεγάλο

μέγεθος των βαλανιδιών (υψηλό ξηρό βάρος σπόρων) που παράγονταν στην περιοχή της μελέτης τους.

Τα φυτά του γένους *Arbutus* πολλαπλασιάζονται στο φυσικό τους περιβάλλον με σπόρο. Η παραγωγή καρπών του *A. unedo* διαφέρει πολύ από έτος σε έτος και από περιοχή σε περιοχή και η ποσότητα και η ποιότητα των σπόρων επηρεάζονται από την ένταση και τη διάρκεια των θερινών-ξηρών περιόδων (Herrera, 1988, Molina *et al.*, 2011). Η διασπορά των σπόρων γίνεται με διάφορα σπονδυλωτά (πτηνά, νυχτερίδες, αγριογούρουνα, ελάφια κλπ, βλ. 1.2.2). Οι σπόροι των ξυλωδών φυτών μπορεί να αποτελέσουν το αρχικό υλικό για τον πολλαπλασιασμό των ειδών με *ex vitro* και *in vitro* μεθόδους ειδικά για τα είδη που άλλοι μέθοδοι αγενούς πολλαπλασιασμού δεν έχουν επιτυχή αποτελέσματα (βλ. 2). Η διατήρηση των σπόρων υπό σταθερές συνθήκες αποτελεί εξ' άλλου την πλέον αποτελεσματική μέθοδο για τη διατήρηση της βιοποικιλότητας (González-Benito and Martin, 2011). Η βελτίωση της απόδοσης, της γεύσης και της αντοχής σε εχθρούς και ασθένειες για είδη που πολλαπλασιάζονται κλωνικά, μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση του γενετικού υλικού που απαντά σε αυτοφυείς γονότυπους (Wada and Reed, 2011).

Το *A. unedo* περιλαμβάνεται στα επαπειλούμενα είδη της Σλοβενίας (Garzuglia, 2006). Το *A. andrachne* θεωρείται ευάλωτο είδος στην Ουκρανία και επαπειλούμενο στην Αλβανία (Garzuglia, 2006) και Ιορδανία (Al-Tellawi, 1989), ενώ το *A. x andrachnoides* περιλαμβάνεται στη λίστα των ειδών υπό προστασία την Κροατία (Šatović, 2002).

Οι Mesléard and Lepart (1991) μελετώντας τη βλαστικότητα και το δυναμικό βλάστησης σπόρων σε φυτοκοινωνία *Arbutus unedo* και *Erica arborea* σε δάση της Κορσικής, διαπίστωσαν ότι οι σπόροι του *Arbutus unedo* στο στάδιο της ωριμότητας δεν έχουν λήθαργο. Η αναφορά αυτή έρχεται σε αντίθεση με τις μετέπειτα αναφορές από άλλους ερευνητές για την ύπαρξη φυσιολογικού λήθαργου στα *Arbutus unedo* και *A. andrachne* και χρήση διαφόρων μεθόδων προμεταχείρισης των σπόρων για διακοπή του λήθαργου πριν την τοποθέτηση για βλάστηση (Köse, 1998, Karam and Al-Salem, 2001, Narbona *et al.*, 2003, Tiki, 2004, Giordani *et al.*, 2005, Hammami *et al.*, 2005, Smiris *et al.*, 2006, Olmez *et al.*, 2007, Ertekin and Kirdar 2010, Tiki and Guner, 2007). Για το *A. menziesii* (Pacific Madrone) αναφέρεται επίσης η ύπαρξη φυσιολογικού λήθαργου (Roy, 1974). Ο λήθαργος είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο και ο βαθμός του ποικίλει ακόμα και μεταξύ διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους, μεταβάλλεται από περιοχή σε περιοχή αλλά και από χρονιά σε χρονιά (Poulsen,

1996, Wolf and Kamondo, 1993). Δεν υπάρχουν δεδομένα για τους σπόρους του *A. x andracnoides*, για το οποίο γενικότερα η πληροφόρηση είναι ελλιπής.

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης ή μη ληθάργου σε σπόρους των τριών ειδών *Arbutus* και ο καθορισμός των ορίων θερμοκρασίας για βλάστηση του σπόρου τους. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση του χρόνου διατήρησης του σπόρου στην βλαστικότητα.

8.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

8.2.1 Συλλογή-καθαρισμός, αποθήκευση

Για τη λήψη των σπόρων, συλλέγονταν ώριμοι καρποί από τέλος Δεκεμβρίου έως τέλος Ιανουαρίου από 2006 έως το 2009 από τα επιλεγμένα φυτά. Κριτήριο επιλογής των καρπών ήταν το πορτοκαλί – κόκκινο χρώμα (εικ. 1, α), στο στάδιο δηλαδή της πλήρους ωρίμανσης και πριν αποκτήσουν τελείως κόκκινο χρώμα. Στο στάδιο αυτό γίνεται και η συλλογή των καρπών για εδώδιμη ή άλλη χρήση.

Οι σπόροι και των τριών ειδών διαχωρίστηκαν και απομονώθηκαν από το μεσοκάρπιο των καρπών με το χέρι, με μηχανική πίεση, μέσα σε πλαστικά δοχεία που περιείχαν νερό βρύσης. Οι καρποί πιέζονταν και συνθλίβονταν ώστε να αποκαλυφθούν οι σπόροι. Στη συνέχεια έγινε πολύ καλό ξέπλυμα και στέγνωμα των σπόρων ώστε να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα του μεσοκαρπίου για την αποφυγή δευτερογενών προσβολών από μύκητες κατά τη διάρκεια διατήρησης και αποθήκευσης των σπόρων. Οι επιπλέοντες σπόροι που αποτελούσαν ποσοστό περίπου 10% του συνόλου, απορρίπτονταν. Οι σπόροι που επιλέχτηκαν τοποθετήθηκαν για να στεγνώσουν σε διηθητικό χαρτί, στον εργαστηριακό πάγκο, για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου, (Εικ. 68). Οι στεγνοί σπόροι τοποθετήθηκαν σε τρυβλία ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί σε κουτί από φελιζόλ και αποθηκεύτηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών, σε 25 °C, σε σκοτάδι, για όσο χρονικό διάστημα χρειαζόταν πριν τη χρήση τους. Οι σπόροι διατηρήθηκαν μέχρι 27 μήνες.



Εικ. 68. Καρποί *A. andrachne* (α-1), *A. x andrachnoides* (α-2) και *A. unedo* (α-3) στο στάδιο συλλογής τους (πορτοκαλί-κόκκινο χρώμα). Σπόροι *A. unedo* κατά τον καθαρισμό τους (β).

8.2.2 Καλλιέργεια *in vitro*

Πριν την καλλιέργεια των σπόρων έγινε απολύμανση με 20% υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (4,6% w/v sodium hypo-chlorite) που περιείχε 0,1% Tween 20, για 10 min και στη συνέχεια ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό. Η καλλιέργεια των σπόρων έλαβε χώρα, σε τρυβλία Petri, διαμέτρου 9 cm, με στερεό (8 mg l⁻¹ agar) υπόστρωμα αλάτων MS (Muraqshige and Skoog, 1962) μισής δύναμης, με 20 mg l⁻¹ σακχαρόζη εμπορίου. Το pH των υποστρωμάτων ρυθμίστηκε στο 5,6-5,7 πριν την αποστείρωση στους 121 °C για 10 min. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες, 10, 15, 20 ή 25 °C και 16 h φωτοπερίοδο σε 37,5 μmol m⁻² s⁻¹ fluorescent φως (πρώτη μεταχείριση). Σε δύο άλλες μεταχειρίσεις, σπόροι και από τις τρεις συλλογές, πριν την έκθεσή τους στις ανωτέρω συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου, δέχθηκαν επίδραση ψύχους (5 °C), σε σκοτάδι, για 40 ή 60 ημέρες (δεύτερη και τρίτη μεταχείριση αντίστοιχα). Σπόροι του *A. andrachne* στους 15 και στους 25 °C καλλιεργήθηκαν σε 16 h φως ή σκοτάδι.

8.2.3 Εκτίμηση αποτελεσμάτων-Πειραματικό σχέδιο-Στατιστική επεξεργασία

Σε κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 125 σπόροι (5 τρυβλία, 25 σπόροι ανά τρυβλίο, Εικ. 69). Η βλάστηση καταγράφηκε με την εμφάνιση του ριζιδίου μήκους

τουλάχιστον 2 mm (Εικ. 100) (International Seed Testing Association, 1999). Μετρήσεις λαμβάνονταν καθημερινά. Χρησιμοποιήθηκε το εντελώς τυχαιοποιημένο σχέδιο, η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων εκτιμήθηκε με ανάλυση της διασποράς, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση και η σύγκριση των μέσων έγινε με Student's *t* σε $P=0,05$. Έγινε επίσης διπαραγοντική ανάλυση του πειράματος και μελετήθηκε η επίδραση του είδους και της θερμοκρασίας ή της στρωμάτωσης, ανά δύο, στη βλαστικότητα σπόρων.



Εικ. 69. *In vitro* καλλιέργεια σπόρων *A. unedo*, σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS.

8.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σπόροι του τρέχοντος έτους που είχαν αποθηκευτεί για τρεις μήνες, από τα τρία είδη, βλάστησαν σε υψηλό ποσοστό (84-99%) σε σύντομο χρονικό διάστημα (24-30 ημέρες) στους 15 και 10 °C. Σπόροι του *A. unedo* και *A. andrachne* βλάστησαν σε χαμηλό ποσοστό στους 20 °C και πρακτικά δεν βλάστησαν καθόλου στους 25 °C, θερμοκρασία όπου σημειώθηκε βλάστηση 1% (Πίν, 28, Σχ. 38 α, Σχ. 40 α). Οι σπόροι του *A. x andrachnoides* δεν βλάστησαν ούτε στους 20 ούτε στους 25 °C (Πίν, 28, Σχ. 39 α).

Στους 5 °C όλοι σπόροι βλάστησαν σε υψηλό ποσοστό 90-100%, αλλά η βλάστηση καθυστέρησε (περίπου 40 ημέρες στο *A. andrachne* και 60 ημέρες στο *A. unedo* και *A. x andrachnoides*). Τα σπορόφυτα αναπτύχθηκαν περαιτέρω και μετά την

εμφάνιση του ριζιδίου μόνο όταν μεταφέρθηκαν σε υψηλότερη θερμοκρασία για ανάπτυξη (Πίν. 28, Σχ. 38 β, γ, Σχ. 39 β, γ, Σχ. 40 β, γ).

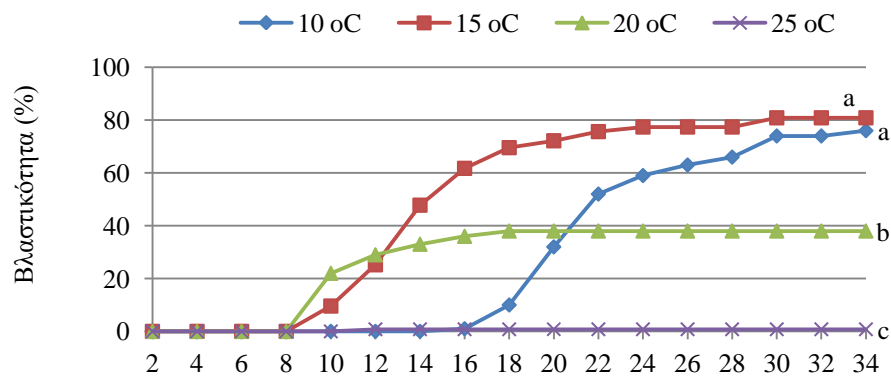
Ύστερα από 11 μήνες αποθήκευση, οι σπόροι βλάστησαν μόνο στους 10 και 15 °C (Πίν. 28, Σχ. 40 α,β,γ, Σχ. 41 α,β,γ, Σχ. 42 α,β,γ) με την εξαίρεση μικρού ποσοστού βλάστησης που σημειώθηκε στο *A. unedo* (2,4-4%) και ακόμα μικρότερο για τους σπόρους του *A. andrachne* (0,8-1,6%) που βλάστησαν επίσης σε υψηλή θερμοκρασία (Πίν. 28). Ύστερα από 27 μήνες κανείς σπόρος δεν βλάστησε (δεν παρουσιάζονται δεδομένα). Οι σπόροι που αποθηκεύτηκαν για 11 μήνες δεν βλάστησαν στους 5 °C, αλλά βλάστησαν όταν μεταφέρθηκαν στους 10 ή 15 °C. Η παρατεταμένη παραμονή τους στους 5 °C (60 ημέρες), οδήγησε σε μείωση του ποσοστού βλάστησης (Πίν. 1). Η αύξηση της περιόδου αποθήκευσης από τρεις σε 11 μήνες περιόρισε το εύρος των κατάλληλων για βλάστηση θερμοκρασιών, χωρίς να επηρεάσει το συνολικό ποσοστό βλαστικότητας με ταυτόχρονη μείωση της ταχύτητας εξέλιξης της βλάστησης των σπόρων. Σπόροι του τρέχοντος έτους (τρεις μήνες αποθήκευση) βλάστησαν γρηγορότερα από σπόρους του προηγούμενου έτους (11 μήνες αποθήκευση) όπως φανερώνουν οι τιμές T_{50} (χρόνος για επίτευξη του 50% της βλαστικότητας) και οι καμπύλες βλαστικότητας (Πίν. 28, Σχ. 38,41, α, Σχ. 39,42, α, Σχ. 40,43, α). Η καθυστέρηση των σπόρων του προηγούμενου έτους μέχρι να βλαστήσουν συνολικά ήταν μεγαλύτερη στο *A. unedo* (24 ημέρες) σε σύγκριση με το *A. x andrachnoides* (10 ημέρες) και *A. andrachne* (6 ημέρες).

Η βλάστηση των σπόρων για όλα τα είδη ολοκληρώθηκε ταχύτερα στις υψηλότερες θερμοκρασίες, σχεδόν το ίδιο σε 20 °C και 15 °C, 10-12 ημέρες αργότερα σε 10 °C και 30-36 ημέρες αργότερα από τους 15 °C σε 5 °C (Σχ. 38,41, α, Σχ. 39,42, α, Σχ. 40,43, α). Οι τιμές του T_{50} (Πίν. 28) και ο χρόνος που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της βλάστησης (Σχ. 38,41, α, Σχ. 39,42, α, Σχ. 40,43, α) επίσης φανερώνουν ταχύτερη βλάστηση καθώς η θερμοκρασία αυξάνει.

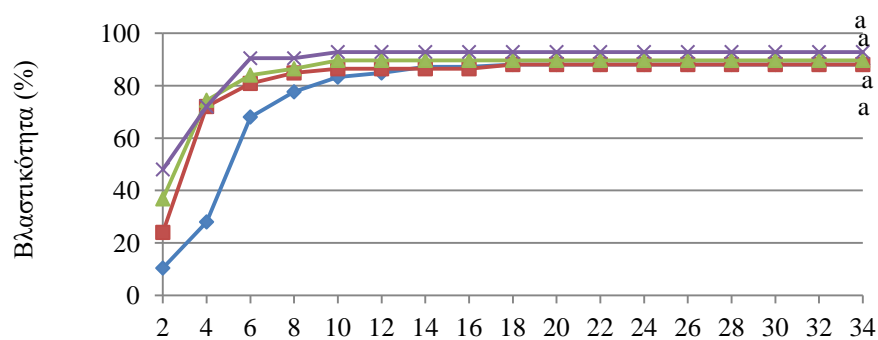
Το φως δεν επηρέασε την βλαστικότητα στο *A. andrachne* που κυμάνθηκε στο 80%, σε θερμοκρασία 15 °C σε 16 h φως ή σκοτάδι.

Πίν. 28. Ποσοστό βλάστησης (G) και χρόνος βλάστησης του 50% της μέγιστης βλαστικότητας G_{max} (T_{50}) σπόρων του *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* και *A. unedo*, όπως επηρεάστηκε από τον χρόνο διατήρησης των σπόρων την ψυχρή στρωμάτωση και την θερμοκρασία βλάστησης. Έχει υπολογιστεί η τυπική απόκλιση, $n=5$.

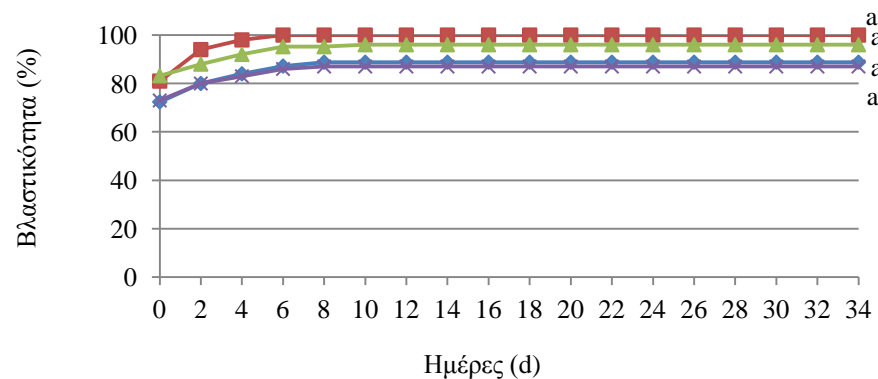
Χρόνος διατήρησης(d)/ Ψυχρής στρωμάτωσης (d)/ G T (°C)	<i>A. andrachne</i>		<i>A. x andrachnoides</i>		<i>A. unedo</i>	
	G (%) ± SD	T_{50} (d)	G (%) ± SD	T_{50} (d)	G (%) ± SD	T_{50} (d)
3/0/10	83,19±10,39	24	95,18±3,37	26	93,00±2,38	26
3/0/15	86,96±9,90	18	89,35±1,39	20	98,75±1,25	18
3/0/20	34,44±9,51	16	0,00±0,00	-	28,75±5,54	16
3/0/25	1,11±2,26	6	0,00±0,00	-	1,25±1,25	10
3/40/10	90,30±10,63	12	92,23±3,14	16	100,00±0,00	18
3/40/15	88,89±10,38	6	95,00±2,04	8	93,80±1,25	10
3/40/20	88,90±8,01	4	75,42±3,15	8	80,00±3,54	10
3/40/25	90,40±7,64	4	30,00±2,04	8	15,00±3,54	8
3/60/10	92,89±11,05	<2	89,50±1,37	<2	90,00±1,24	<2
3/60/15	100,00±0,00	<2	100,00±0,00	<2	100,00±0,00	<2
3/60/20	97,78±6,67	<2	95,63±1,34	<2	95,00±1,02	<2
3/60/25	94,22±11,85	<2	89,61±2,15	<2	90,00±2,04	<2
11/0/10	85,60±4,66	38	87,20±2,33	40	89,60±2,40	44
11/0/15	81,60±8,45	24	88,00±1,79	32	88,00±1,79	38
11/0/20	0,00±0,00	-	0,00±0,00	-	4,00±0,00	-
11/0/25	0,80±0,80	-	0,00±0,00	-	2,40±0,98	-
11/40/10	77,60±5,74	31	77,60±3,92	36	77,60±3,25	38
11/40/15	71,20±5,43	23	80,80±3,88	26	84,80±1,96	26
11/40/20	1,60±1,60	-	0,00±0,00	-	1,60±0,98	-
11/40/25	0,00±0,00	-	0,00±0,00	-	0,80±0,80	-
11/60/10	75,20±7,42	26	72,40±2,79	28	62,40±0,98	34
11/60/15	61,00±7,09	22	68,80±2,94	26	70,80±2,87	26
11/60/20	0,80±0,80	-	0,00±0,00	-	0,80±0,80	-
11/60/25	0,80±0,80	-	0,00±0,00	-	0,80±0,80	-



α

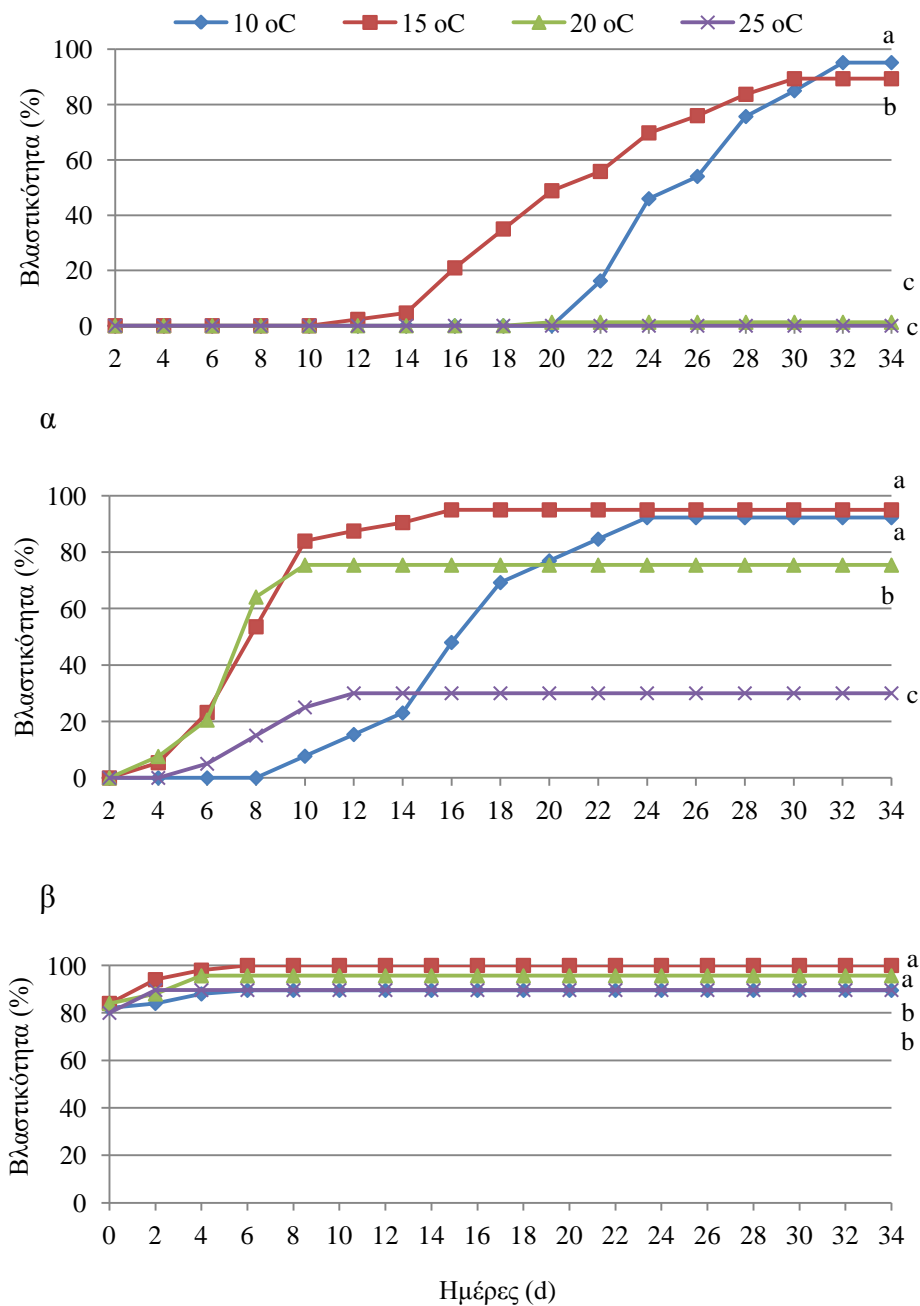


β

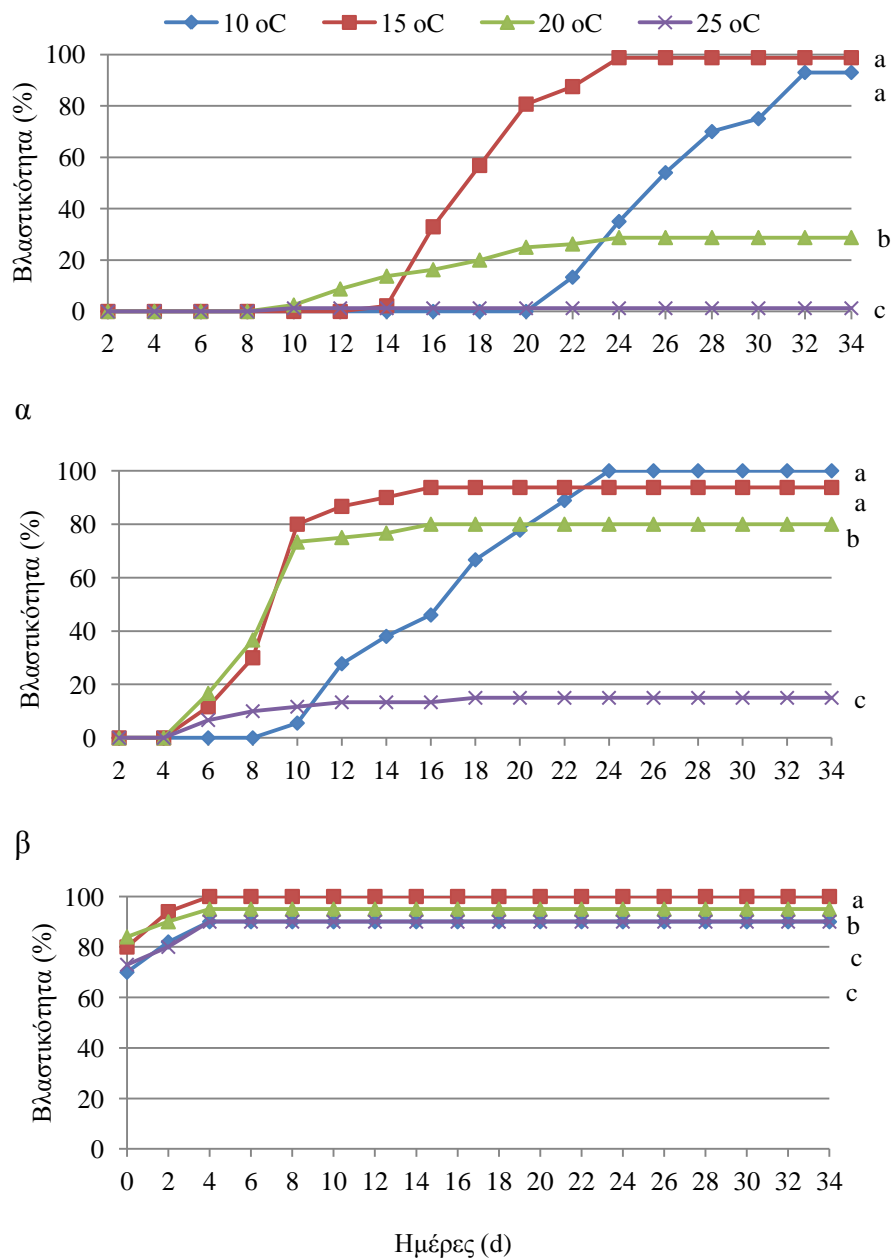


γ

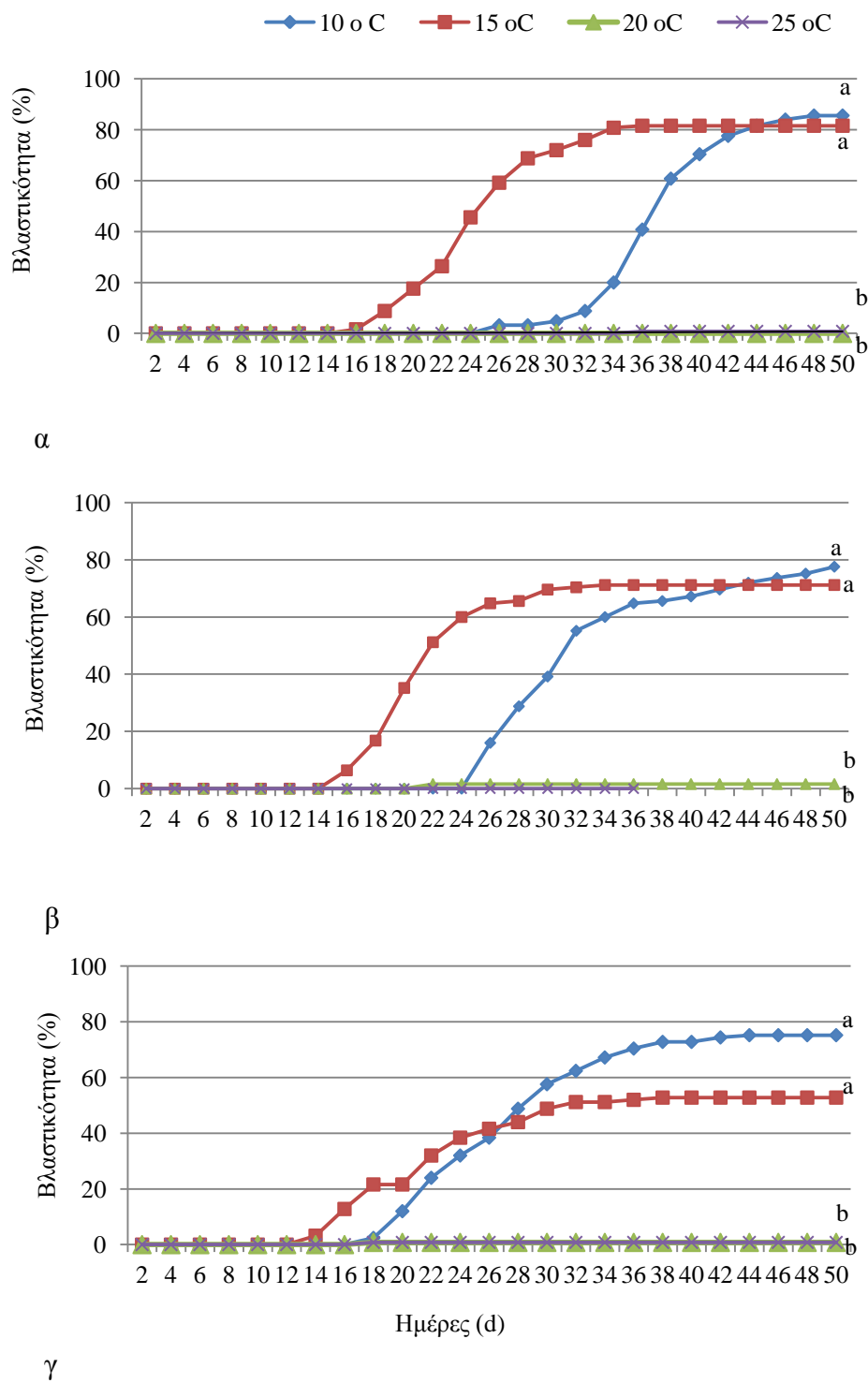
Σχ. 39. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. drachne*, 3 μήνες μετά τη συλλογή, στους 10, 15, 20 ή 25 °C, ύστερα από ψυχρή μεταχείριση στους 5 °C για 0 ημέρες (α), 40 ημέρες (β) ή 60 ημέρες (γ). Διαχωρισμός των μέσων με Student's *t* σε $P=0,05$, $n=5$.



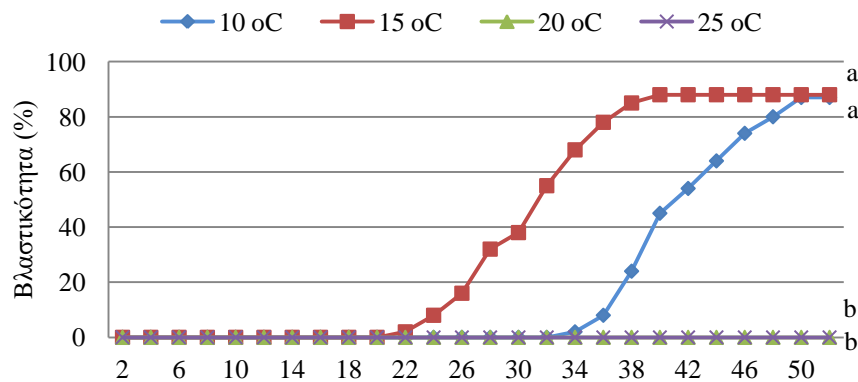
Σχ. 40. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. x andrachnoides*, 3 μήνες μετά τη συλλογή, στους 10, 15, 20 ή 25 °C, ύστερα από ψυχρή μεταχείριση στους 5 °C για 0 ημέρες (α), 40 ημέρες (β) ή 60 ημέρες (γ). Διαχωρισμός των μέσων με Student's *t* σε $P=0,05$, $n=5$



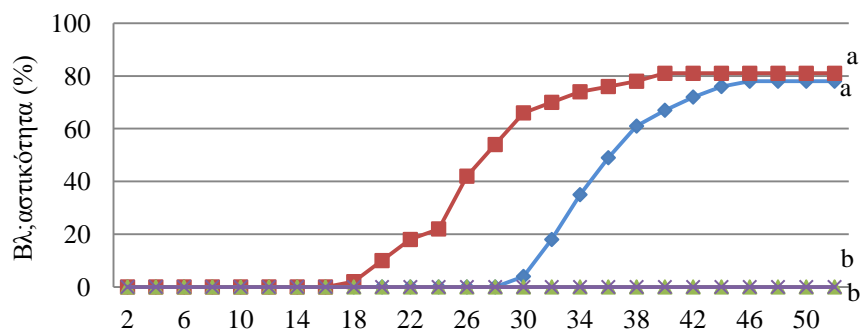
Σχ. 41. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. unedo*, 3 μήνες μετά τη συλλογή, στους 10, 15, 20 ή 25 °C, ύστερα από ψυχρή μεταχείριση στους 5 °C για 0 ημέρες (α), 40 ημέρες (β) ή 60 ημέρες (γ). Διαχωρισμός των μέσων με Student 's *t* σε $P=0,05$, $n=5$.



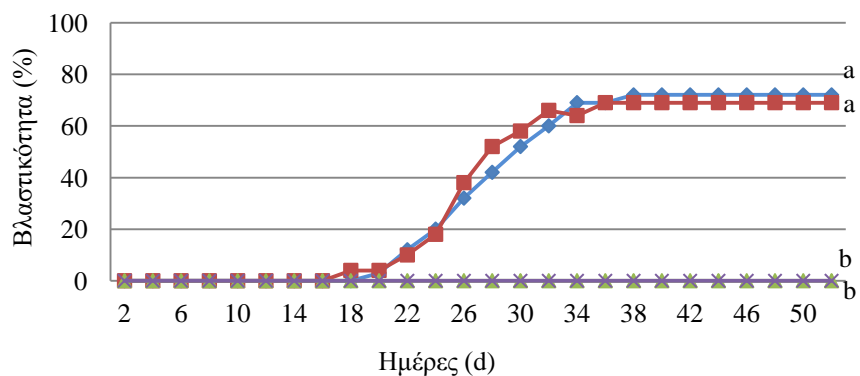
Σχ. 42. *In vitro* βλάστικότητα σπόρων *A. andrachne*, 11 μήνες μετά τη συλλογή, σε 10, 15, 20 or 25 °C, ύστερα από ψυχρή στρωμάτωση σε 5 °C για 0 d (α), 40 d (β) ή 60 d (γ). Διαχωρισμός των μέσων με Student's *t* σε $P=0,05$, $n=5$.



α

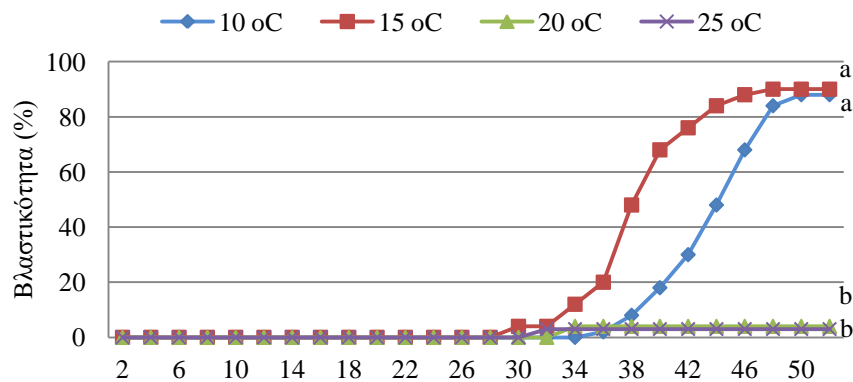


β

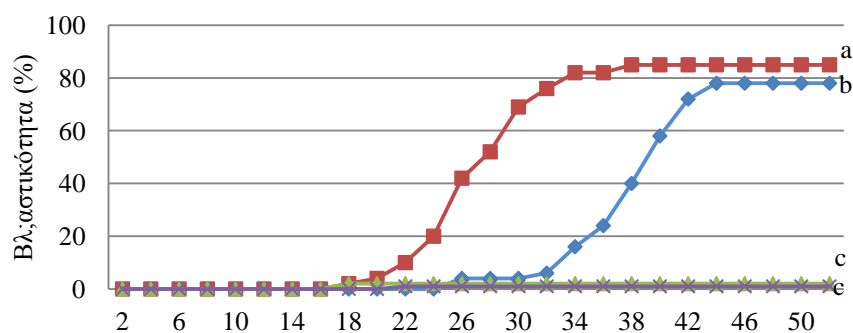


γ

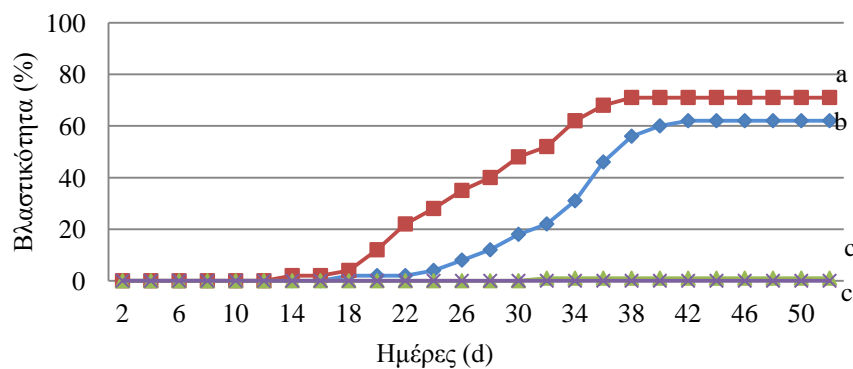
Σχ. 43. *In vitro* βλάστικότητα σπόρων *A. x andrachnoides*, 11 μήνες μετά τη συλλογή, σε 10, 15, 20 or 25 °C, ύστερα από ψυχρή στρωμάτωση σε 5 °C για 0 d (α), 40 d (β) ή 60 d (γ). Διαχωρισμός των μέσων με Student 's *t* σε $P=0,05$, $n=5$.



α



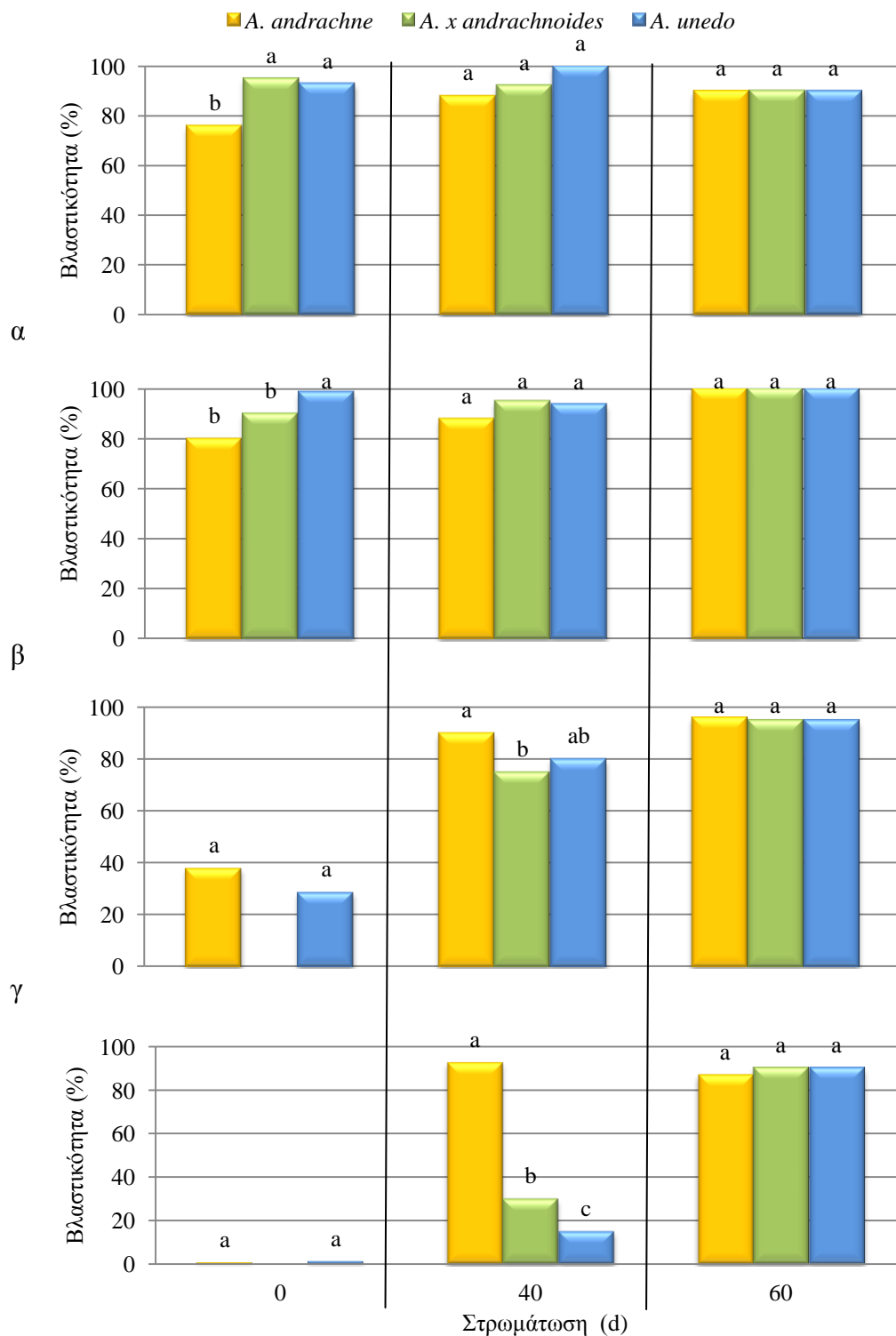
β



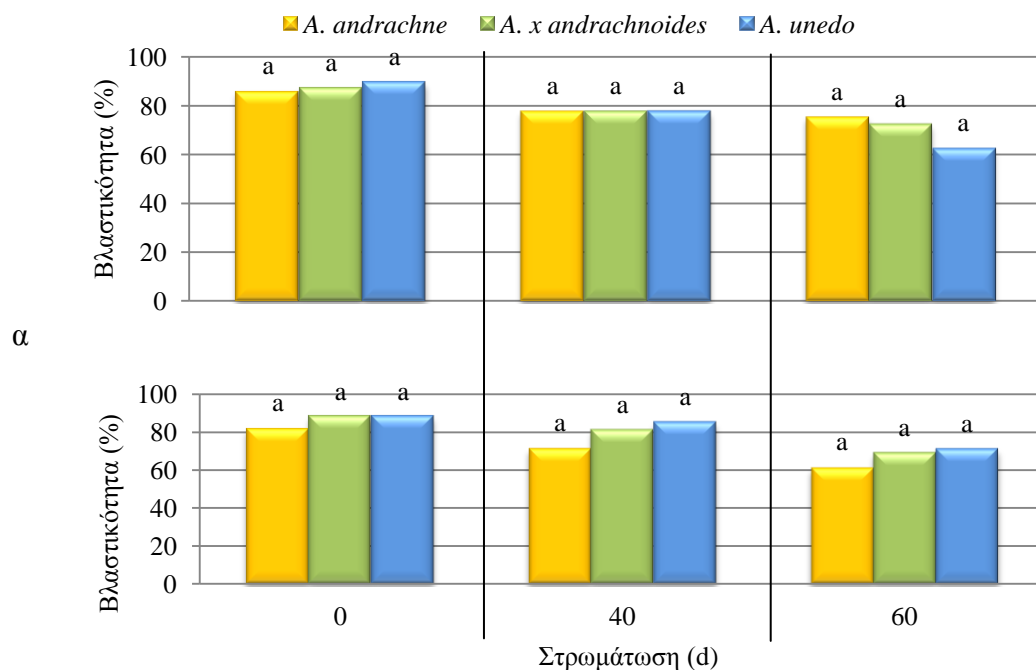
γ

Σχ. 44. *In vitro* βλάστικότητα σπόρων *A. unedo*, 11 μήνες μετά τη συλλογή, σε 10, 15, 20 or 25 °C, ύστερα από ψυχρή στρωμάτωση σε 5 °C για 0 d (α), 40 d (β) ή 60 d (γ). Διαχωρισμός των μέσων με Student 's *t* σε $P=0,05$, $n=5$.

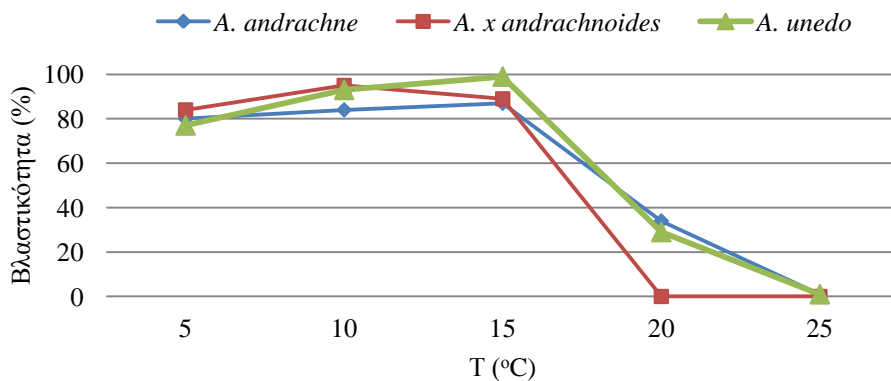
Σπόροι ηλικίας 3 μηνών, από τα τρία είδη, δεν είχαν καμία διαφορά μεταξύ τους στα ποσοστά βλαστικότητας ύστερα από 60 ημέρες στρωμάτωσης, σε καμία από τις 4 θερμοκρασίες που τοποθετήθηκαν για βλάστηση (Σχ. 45 α, β, γ, δ). Ύστερα από 0 ημέρες στρωμάτωσης το *A. x andrachnoides*, στους 10 °C σημείωσε βλαστικότητα χωρίς διαφορά από το *A. unedo*, αλλά με διαφορά από το *A. andrachne* (Σχ. 39 α), στους 15 °C σημείωσε βλαστικότητα χωρίς διαφορά από το *A. andrachne*, αλλά με διαφορά από το *A. unedo* (Σχ. 45 α), στους 20 °C δεν βλάστησε ενώ τα δύο μητρικά είδη βλάστησαν σε χαμηλό ποσοστό χωρίς διαφορά (Σχ. 45 γ). Στους 25 °C το *A. x andrachnoides* δεν βλάστησε ενώ τα άλλα δύο είδη βλάστησαν σε ελάχιστα ποσοστά (Σχ. 45 δ). Η στρωμάτωση για 40 ημέρες επέφερε βλαστικότητα χωρίς διαφορές στα τρία είδη στους 10 και 15 °C (Σχ. 45 α, β). Στους 20 °C η βλαστικότητα του *A. x andrachnoides* ήταν παρόμοια με του *A. unedo* (Σχ. 45 γ), ενώ στους 25 °C η βλαστικότητα στα τρία είδη διέφερε και του *A. x andrachnoides* σημείωσε ενδιάμεσες τιμές (Σχ. 45 δ). Σπόροι ηλικίας 11 μηνών, από τα τρία είδη, δεν είχαν καμία διαφορά μεταξύ τους στο ποσοστό βλαστικότητας ύστερα από στρωμάτωση για 0, 40 ή 60 ημέρες, αλλά βλάστησαν μόνο σε 10 και 15 °C (Σχ. 46). Τα όρια βλάστησης των τριών ειδών ήταν ανάμεσα σε 5 και 25 °C (Σχ. 47).



δ
 Σχ. 45. Σύγκριση της βλαστικότητα μεταξύ των σπόρων (ηλικίας 3 μηνών) των τριών ειδών σε 10, 15, 20, 25 °C (α, β, γ, δ, αντίστοιχα) ξεχωριστά σε κάθε μία από τις 3 μεταχειρίσεις στρωμάτωσης (0, 40 ή 60 ημέρες). Σύγκριση των μέσων με Student 's t σε P=0,05, n=5.



β
 Σχ. 46. Σύγκριση της βλαστικότητας μεταξύ των σπόρων (11 μηνών) των 3 ειδών σε 10 °C (α) και 15 °C (β) ξεχωριστά σε κάθε μία από τις 3 μεταχειρίσεις (στρωμάτωση 0, 40 ή 60 ημέρες). Σύγκριση των μέσων με Student 's t σε $P=0,05$, $n=5$.



Σχ. 47. Όρια βλάστησης των σπόρων των τριών ειδών *Arbutus* που μελετήθηκαν. Σε 5 °C οι σπόροι βλαστάνουν και στα τρία είδη αλλά δεν επιμηκύνονται.

8.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διαβροχή (maceration, pulping) χρησιμοποιείται ως μέθοδος ευρέως σε καρπούς με πολτό και αποσκοπεί στην δημιουργία τελικά ενός μίγματος σπόρων και πολτού το οποίο μπορεί να απολυμανθεί με μυκητοκτόνο, αποθηκεύεται σε ψυγείο (περίπου σε 5 °C) και είναι έτοιμο για σπορά. Η παραμονή των καρπών σε νερό για 2-3 ημέρες διευκολύνει την απομάκρυνση του πολτού, αλλά εγκυμονεί κινδύνους ζύμωσης και καταστροφής του εμβρύου. (Macdonald, 1986). Η χρησιμοποίηση τέτοιου μίγματος σπόρων *A. andrachne* που παραχωρήθηκαν από το Δασαρχείο της Αμυγδαλέζας, σε πειράματα *in vitro* βλαστικότητας είχε ως αποτέλεσμα προσβολή των σπόρων από μύκητες σε ποσοστό 80-90%. Με σκοπό λοιπόν την αντιμετώπιση των μολύνσεων δοκιμάσθηκε η απολύμανση με υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου αυξημένης περιεκτικότητας (50%) σε συνδυασμό με χειρισμούς προβλάστησης των σπόρων για 24 h σε σακχαρόνερο, χωρίς όμως αποτέλεσμα καθώς όλοι οι σπόροι στη συνέχεια μολύνθηκαν. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι έχει μεγάλη σημασία ο καλός διαχωρισμός των σπόρων από το πολτώδες μεσοκάρπιο πριν τη διατήρηση των σπόρων.

Η βλάστηση των σπόρων και των τριών ειδών επηρεάστηκε από τη θερμοκρασία που τοποθετήθηκαν κατά τη βλάστηση και βλάστησαν σε υψηλό ποσοστό (76-99%), αναλόγως του είδους και της θερμοκρασίας στους 10 ή 15 °C, χωρίς να υποστούν ψυχρή στρωμάτωση. Στην παρούσα μελέτη το ποσοστό βλάστησης του *A. unedo* ανήλθε σε πολύ υψηλό ποσοστό (99%) στους 15 °C. Το *A. andrachne* βλάστησε σε μικρότερο ποσοστό συγκρινόμενο με τα άλλα είδη όταν χρησιμοποιήθηκαν σπόροι 3 μηνών, αλλά σε σπόρους 11 μηνών δεν βρέθηκε διαφορά.

Άνοδος της θερμοκρασίας πέραν των 15 °C οδήγησε σε πτώση της βλαστικότητας και στα τρία είδη. Στους 20 °C βλάστησαν μόνο σπόροι *A. andrachne* και *A. unedo* ηλικίας 3 μηνών αλλά σε χαμηλό ποσοστό, ενώ στους 25 °C η βλάστηση ήταν σχεδόν μηδενική. Η στρωμάτωση επέφερε βλάστηση των σπόρων του τρέχοντος έτους (3 μήνες αποθήκευση) και στους 20 και 25 °C. Σε σπόρους όμως του προηγούμενου έτους (11 μηνών) η στρωμάτωση δεν ήταν ικανή στην υποβοήθηση της βλάστησης στις δύο υψηλότερες θερμοκρασίες.

Από τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης διαπιστώθηκε ότι οι σπόροι και των τριών ειδών βλαστάνουν σε υψηλό ποσοστό και σε σύντομο χρονικό διάστημα

στους 10 ή 15 °C, χωρίς να έχει προηγηθεί κάποια μεταχείριση, γεγονός που καταδεικνύει ότι δεν χαρακτηρίζονται από κάποιου τύπου λήθαργο, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι οι σπόροι *A. andrachne* και *A. unedo* χαρακτηρίζονται από φυσιολογικό λήθαργο και εφαρμόζουν στρωμάτωση για 2-4 μήνες σε χαμηλές θερμοκρασίες ή GA₃ για διακοπή του ληθάργου (Köse, 1998, Karam and Al-Salem, 2001, Tilki, 2004, Hammami *et al.*, 2005, Olmez *et al.*, 2007, Tilki and Guner, 2007, Demirsoy *et al.*, 2010, Ertekin and Kirdar, 2010).

Κάποιοι ερευνητές δοκίμασαν και υψηλές θερμοκρασίες για διακοπή του υποτιθέμενου ληθάργου, χωρίς επιτυχία (Karam and Al-Salem, 2001, Olmez *et al.*, 2007, Demirsoy *et al.*, 2010, Ertekin and Kirdar, 2010). Η επέμβαση με στρωμάτωση στην παρούσα εργασία έδειξε βλάστηση των σπόρων (έκπτυξη ριζιδίου) κατά τη διάρκεια της στρωμάτωσης κάτι που παρατήρησαν και οι Olmez *et al.* (2007). Η βλάστηση όμως δεν συνεχιζόταν στη θερμοκρασία της στρωμάτωσης (5 °C). Τοποθέτηση όμως των σπόρων αυτών σε υψηλότερες θερμοκρασίες στη συνέχεια επέφερε ταχύτατη εξέλιξη της βλάστησης. Οι ερευνητές αυτοί έβαλαν τους σπόρους για βλάστηση σε θερμοκρασίες 20-30 °C θεωρώντας ως δεδομένο ότι αυτές είναι οι κατάλληλες θερμοκρασίες για βλάστηση του σπόρου με βάση ίσως αναφορά από Baskin and Baskin (2001), ότι οι σπόροι της σκληρόφυλλης ζώνης βλαστάνουν περί τους 20 °C. Τα ευρήματά μας συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Mesléard and Lepart (1991).

Οι Piotto & Noi, (2001) αναφέρουν παρόμοια για το *A. unedo* ότι η στρωμάτωση των σπόρων για 20-60 ημέρες βοηθά στην πιο ολοκληρωμένη και ταυτόχρονη βλάστηση των σπόρων χωρίς να είναι πάντοτε απαραίτητη προϋπόθεση, κάτι που συμφωνεί με τα παρόντα αποτελέσματα.

Παρομοίως, σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (10-15 °C) αποδείχτηκαν κατάλληλες για τη βλάστηση σπόρων και άλλων ανθεκτικών στη ξηρασία φυτικών ειδών της εύκρατης ζώνης, όπως τα *Lithodora zahni* (Papafotiou and Kalantzis, 2009) και *Dianthus fruticosus* (Papafotiou and Stragas, 2009).

Ως λήθαργος ορίζεται εκείνη η κατάσταση κατά την οποία οι σπόροι δεν βλαστάνουν ακόμη κι αν οι συνθήκες περιβάλλοντος (νερό, θερμοκρασία, αερισμός) είναι κατάλληλες για βλάστηση (Nikolaeva, 1977, Bewley and Black, 1994, Hartmann *et al.*, 1997). Οι σπόροι όμως και των τριών ειδών βλάστησαν σε υψηλό ποσοστό και σε σύντομο χρονικό διάστημα όταν καλλιεργήθηκαν σε χαμηλή σχετικά θερμοκρασία, στους 10 και 15 °C κάτι που δεν υποστηρίζει την ύπαρξη ληθάργου σε

κανένα από τα είδη που μελετήθηκαν. Βέβαια η σαφής διάκριση μεταξύ λήθαργου και καθυστερημένης βλάστησης δεν είναι πάντοτε ευχερής (Bonner and Karrfalt, 2008). Αυτός είναι και ο λόγος που ο Hobson (1981), αναφέρει ότι υπάρχουν τόσοι ορισμοί για τον λήθαργο, όσοι και οι ερευνητές που ασχολούνται με αυτόν. Δεν θα έπρεπε όμως η αδυναμία βλάστησης των σπόρων σε δυσμενείς συνθήκες θερμοκρασίας που εκτίθενται οι σπόροι για βλάστηση να εκλαμβάνονται ως ένδειξη λήθαργου (Thompson and Ooi, 2010).

Η αποθήκευση επηρέασε την βλαστικότητα και τον ρυθμό βλαστικότητας. Οι σπόροι 3 μηνών βλάστησαν πολύ πιο γρήγορα από ότι οι σπόροι 11 μηνών. Σε προηγούμενες μελέτες στην βλαστικότητα *A. andrachne* και *A. unedo* ο χρόνος αποθήκευσης είτε δεν αναφέρεται (Mesléard and Lepart, 1991, Hammami *et al.*, 2005, Demirsoy, 2010), είτε οι σπόροι καλλιεργήθηκαν αμέσως μετά την συγκομιδή τους ή 3-5 μήνες αργότερα (Köse, 1998, Tiliki, 2004, Olmez *et al.*, 2007, Ertekin and Kirdar, 2010).

Οι Olmez *et al.* (2007) και Ertekin and Kirdar (2010) αποθήκευσαν σπόρους του *A. andrachne* and *A. unedo*, στους 4-6 °C αντίστοιχα έως την επόμενη άνοιξη. Οι Olmez *et al.* (2007) είχαν υπερβολικά χαμηλά αποτελέσματα βλαστικότητας *A. andrachne* (maximum 16%) με ή χωρίς στρωμάτωση και οι Ertekin and Kirdar (2010) αναφέρουν 72% βλαστικότητα για το *A. unedo* ύστερα από 60 ημέρες στρωμάτωση σε θερμοκρασία 18-24 °C, σε σύγκριση με το 90-95% στην παρούσα μελέτη. Η χαμηλή θερμοκρασία φαίνεται ότι επηρεάζει αρνητικά την αποθήκευση, αλλά χρειάζεται όμως περισσότερη διερεύνηση.

Η μόνη αναφορά που υπάρχει για τη δυνατότητα αποθήκευσης και διατήρησης φυτών του γένους *Arbutus* αφορά στο *A. menziesii* (Pacific Madrone, ιθαγενές φυτό της Καλιφόρνια που στα φυτώρια πολλαπλασιάζεται με σπόρο) οι σπόροι του οποίου μπορούν να αποθηκευτούν έως 2 χρόνια σε θερμοκρασία δωματίου (Immel, 2006). Οι σπόροι δύο άλλων ευρέως γνωστών ειδών της οικ. Ericaceae του *Kalmia latifolia* L. είναι ζωτικοί για χρόνια αν παραμείνουν σε θερμοκρασία δωματίου ενώ αντίθετα οι σπόροι του γένους *Vaccinium* χάνουν τη ζωτικότητά τους παραμένοντας σε θερμοκρασία δωματίου, (Bonner and Karrfalt, 2008). Στην παρούσα μελέτη σπόροι που διατηρήθηκαν για 27 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου δεν βλάστησαν.

Ο χρόνος ολοκλήρωσης της βλάστησης για το *A. x andrachnoides* ήταν αρκετά μεγαλύτερος από τον χρόνο που χρειαζόταν το *A. andrachne* πλησιάζοντας το

χρόνο που χρειαζόταν το *A. unedo*. Η βλαστικότητα που σημείωσε το υβρίδιο στις διάφορες μεταχειρίσεις ήταν παρόμοια με τη βλαστικότητα των μητρικών ειδών. Διαφοροποίηση σημειώθηκε στους 20 °C, χωρίς στρωμάτωση όπου το υβρίδιο δε βλάστησε καθόλου και στους 25 °C και 40 ημέρες στρωμάτωση όπου το υβρίδιο είχε ενδιάμεση συμπεριφορά και βλάστησε σε ποσοστό 30%, ενώ το *A. andrachne* και το *A. unedo* βλάστησαν σε ποσοστό 93,00 και 15,00% αντίστοιχα.

1. Αποδιότοξη (Denaturation)

primer 1

2. Υβριδίαση (Annealing)

3. Επέκταση (Extension)

primer 2

Φυλογενετική Μελέτη

9 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

9.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένα φυσικό υβρίδιο αναμένεται να έχει ενδιάμεση εμφάνιση μεταξύ των γονέων του και αυτό κατά μεγάλο μέρος συνήθως αληθεύει (Stebbins, 1974). Δεν συμβαίνει όμως πάντοτε να παρατηρείται ενδιάμεσος φαινότυπος, αλλά και όταν αυτό συμβαίνει η ενδιάμεση κατάσταση εκφράζεται με πολλές διαβαθμίσεις και τρόπους. Είναι συχνό επίσης το φαινόμενο, τα υβρίδια να παρουσιάζουν ένα «μωσαϊκό» γονικών και ενδιάμεσων χαρακτηριστικών. Η εκδήλωση όμως της ενδιάμεσης κατάστασης δεν υποδηλώνει αναγκαστικά την ύπαρξη υβριδισμού (Stace, 1989). Συνήθως η ενδιάμεση κατάσταση προσδιορίζεται και αναζητείται με βάση μορφολογικούς χαρακτήρες, καθώς αυτοί καταγράφονται πολύ ευκολότερα (Rieseberg and Ellstrand, 1993).

Σε μερικά φυτά υπάρχουν γενετικοί μηχανισμοί που διασφαλίζουν μεγαλύτερη μορφολογική ομοιότητα του υβριδίου προς το θήλυ γονέα, ένα φαινόμενο γνωστό ως μητροκλινία (matrocliny) (Stace, 1989). Είναι επίσης γνωστές πολλές περιπτώσεις όπου ένα υβρίδιο κατέχει γνωρίσματα που δεν απαντούν σε κανένα γονέα ή στερείται ενός γνωρίσματος, κοινού σε αμφότερους τους γονείς. Οι αρχές και τα προβλήματα αυτά μπορούν εξίσου να εκδηλώνονται σε σχέση με ανατομικούς, χημικούς και χρωμοσωμικούς παράγοντες.

Είναι γνωστά τα υβρίδια της ελάτης μεταξύ της προϋπάρχουσας κεφαλληνιακής και της λευκής ελάτης, η γνωστή υβριδογενής ελάτη, καθώς και η υβριδογενής μοισιακή οξιά, υβρίδιο μεταξύ της ανατολικής και δασικής οξιάς. Στους πληθυσμούς των υβριδίων αυτών συναντά κανείς όλες τις αποκλίσεις και τις ενδιάμεσες μορφές από το ένα ως το άλλο είδος, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και το τοπικό κλίμα. Στη δασική πεύκη και σε μια μικρή σχετικά έκταση, απαντούν όλες οι μορφές, από τις στενόκομες, λεπτόκλαδες αλπικές μέχρι τις ευρύκομες, χονδρόκλαδες των πεδιάδων της Πολωνίας. Το ίδιο ισχύει και για την ερυθρελάτη. Μορφές τις οποίες συναντά κανείς στην Κ. Ευρώπη σε διάφορες περιοχές, τις απαντά και στην Ελλάδα, σε μια σχετικά μικρή έκταση. Η ίδια όμως μεγάλη βιοποικιλότητα των παραπάνω ειδών συναντάται σε όλα σχεδόν τα δασοπονικά είδη της χώρας. Το γεγονός αυτό, μαζί με το μεγάλο πλεονέκτημα διατήρησης της φυσικότητας των οικοσυστημάτων της Ελλάδας, σε ότι αφορά την ποιοτική σύνθεσή τους και παρά την

έντονη υποβάθμισή τους, προσδίδει μια πολύ μεγάλη σημασία στη χώρα ως τράπεζα γονιδίων και γενικότερα γενετικού υλικού, το οποίο πρέπει να ερευνηθεί και να διατηρηθεί (Stace, 1989). Σύμφωνα με τους Walter and Gillett (1998), σχεδόν 34.000 φυτικά είδη, το 12,5% των παγκοσμίων ειδών απειλούνται με εξαφάνιση. Για την χώρα μας το ποσοστό αυτό ανέρχεται σε 11,5%. Το ποσοστό της οικογένειας Ericaceae που απειλούνται σε παγκόσμιο επίπεδο με εξαφάνιση, ανέρχεται στο 14,5%. Η απώλεια ενός τόσο μεγάλου ποσοστού βιοποικιλότητας, θέτει μια μεγάλη πρόκληση: ο τερματισμός της καταστροφής της βιοποικιλότητας είναι μείζονος σημασίας για το παρόν και το μέλλον του ανθρώπινου είδους (Leadley and Jury, 2006).

9.1.1 Μορφολογικοί χαρακτήρες

Οι μορφολογικοί χαρακτήρες βασίζονται στο φαινότυπο του είδους και έχουν πολλές χρήσεις και καταγράφονται με την οπτική παρατήρηση. Οι μορφολογικοί χαρακτήρες διακρίνονται σε ποσοτικούς και ποιοτικούς και αμφότεροι έχουν αξία για τις ανάγκες ταξινόμησης και κατάταξης. Οι ποσοτικοί είναι αυτοί που εύκολα μπορούν να μετρηθούν και να αριθμηθούν (ύψος φυτού, μέγεθος φύλλου κλπ) σε σχέση με τους ποιοτικούς δείκτες όπως το σχήμα του φυτού, το σχήμα ή το χρώμα των ανθέων, των καρπών, των σπόρων κλπ (Jones and Luchsinnger, 1987). Αν και σε γενικές γραμμές οι ποσοτικοί χαρακτήρες καταγράφονται γρήγορα και με απλό τρόπο, με μικρές απαιτήσεις εργαστηριακού εξοπλισμού, υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση τους, γιατί αποκρύπτονται οι αλληλεπιδράσεις κυρίαρχων και υπολειπόμενων χαρακτηριστικών που επηρεάζουν τους συγκεκριμένους μορφολογικούς χαρακτήρες (Bhat *et al.*, 2010). Η χρήση των ποσοτικών χαρακτήρων είναι πιο εύκολη, αλλά οι ποιοτικοί χαρακτήρες αν εκτιμηθούν σωστά δίνουν πλεονέκτημα στους ταξινομους. Ένας καλός χαρακτήρας-δείκτης είναι αυτός που είναι σχετικά σταθερός μέσα στην ταξινομική μονάδα και δεν επηρεάζεται από το περιβάλλον. Δεν υπάρχουν συγκεκριμένοι ή βασικοί χαρακτήρες, οι χαρακτήρες μπορούν να προέρχονται και να αφορούν οιοδήποτε χαρακτηριστικό ενός φυτού. Η σπουδαιότητα και αξία ενός καλού χαρακτήρα-δείκτη αξιολογείται και εξετάζεται εμπειρικά, με την οπτική παρατήρηση. Για παράδειγμα στη φτελιά (*Ulmus*) τα άνθη και οι καρποί δεν έχουν

καμία ταξινομική αξία, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τα φύλλα, όπως και με φυτά του γένους *Quercus* (βελανιδιά) και *Betula* (σύμηδα) (Jones and Luchsinnger, 1987).

Πριν την ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών οι προσεγγίσεις για την εκτίμηση της συγγένειας και της φυλογενετικής σχέσης μεταξύ των διαφόρων ταξινομικών μονάδων πραγματοποιούνταν απαραίτητα με τη σύγκριση των φαινοτυπικών δεδομένων που λαμβάνονταν από μορφολογικά, φυσιολογικά ή άλλα χαρακτηριστικά που ήταν δυνατό να παρατηρηθούν (Avisé, 2004). Λόγω όμως της επίδρασης του περιβάλλοντος στην φαινοτυπική παραλλακτικότητα των ατόμων (Clausen *et al.*, 1940), οι μορφολογικοί χαρακτήρες πλέον χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με μοριακούς για την φυλογενετική διερεύνηση (Wünsch *et al.*, 2002, Culham, 2006, Crane and Pleasants, 2006) και υπάρχουν επιτυχή αποτελέσματα στην μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων σε διάφορα ξυλώδη είδη, όπως το *Chaenomeles* sp. (Bartish, *et al.*, 2000), *Pistaceae x saportae* (Werner *et al.*, 2001), *Quercus petraea* (Bruschi *et al.*, 2003), *Olea europaea* L. (Hagidimitriou *et al.*, 2005), *Vasconcellea* sp. (Kyndt *et al.*, 2005), *Pinus nugo* (Monteleone *et al.*, 2006), *Paramichelia baillonii* (Li *et al.*, 2008), *Punica granatum* L. (Sarkhosh *et al.*, 2009), *Acacia* sp., (Pometti *et al.*, 2010), και *Serapias* sp. (Hrsak *et al.*, 2011).

9.1.2 Μοριακοί δείκτες (Molecular markers)

Οι μοριακοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί εδώ και πολλά χρόνια για την ταξινόμηση των φυτών. Για τα καλλιεργούμενα φυτικά είδη με οικονομικό ενδιαφέρον, όπως το αμπέλι, έχουν αναπτυχθεί αρκετά συστήματα ταξινόμησης τα οποία βασίζονται στην μορφολογία των οργάνων, τους αμπελογραφικούς χαρακτήρες, τα διάφορα φαινολογικά στάδια και την γεωγραφική κατανομή των ποικιλιών (Μπινιάρη, 2000). Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα του φυτικού DNA, που ανιχνεύουν διαφορές στις αλληλουχίες του DNA (Beckmann and Soller, 1983, Darvasi and Soller, 1994) και όχι στα προϊόντα τους (πρωτεΐνες). Με αυτό τον τρόπο απομακρύνεται η επίδραση του περιβάλλοντος που μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα (Wunsch and Hornanza, 2002). Οι μοριακοί δείκτες πλεονεκτούν σε σύγκριση με τους μορφολογικούς δείκτες, διότι δεν επηρεάζονται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος και είναι ανιχνεύσιμοι σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυτού (Mohan *et al.*, 1997).

Η εμφάνιση των μοριακών δεικτών προκάλεσε επανάσταση στην ανίχνευση και στη χρησιμοποίηση του γενετικού πολυμορφισμού για ποικίλους σκοπούς (Pénzez, 2002). Η πρόσφατη δε πρόοδος που έχει σημειωθεί στη Βιοτεχνολογία έχει προσφέρει την υπόσχεση για ταχύτερη και ακριβέστερη βελτίωση των φυτικών ειδών (Varshney *et al.*, 2004). Οι μοριακοί δείκτες, παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των μελετώμενων ατόμων, η ανάδειξη των οποίων χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κληρονομικότητας χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών (Μπινιάρη, 2000). Οι μοριακοί δείκτες έχουν ευρεία εφαρμογή τα τελευταία χρόνια στην Εξελικτική Βιολογία, Οικολογία και στην Βιολογία της Διατήρησης (Nybom, 2004) και είναι οι πιο διαδεδομένοι (Pénzez, 2002). Στον Πίν. 30, παρουσιάζονται όλοι οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται (Mohan *et al.*, 1997).

Πίν. 30. Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στις Βιολογικές Επιστήμες

Συντομογραφία	Αναλυτική ονομασία
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
ALP	Amplicon length polymorphism
AP-PCR	Arbitrarily primed PCR
AS-PCR	Allele-specific PCR
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequences
DAF	DNA amplification fingerprinting
ISA	Inter-SSR amplification
RAPD	Random-amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SAP	Specific amplicon polymorphism
SCAR	Sequence characterized amplified region
SSCP	Single-strand conformation polymorphism
SSLP	Microsatellite simple sequence length polymorphism
SSLP	Minisatellite simple sequence length polymorphism
SSR	Simple sequence repeats
STS	Sequence tagged sites

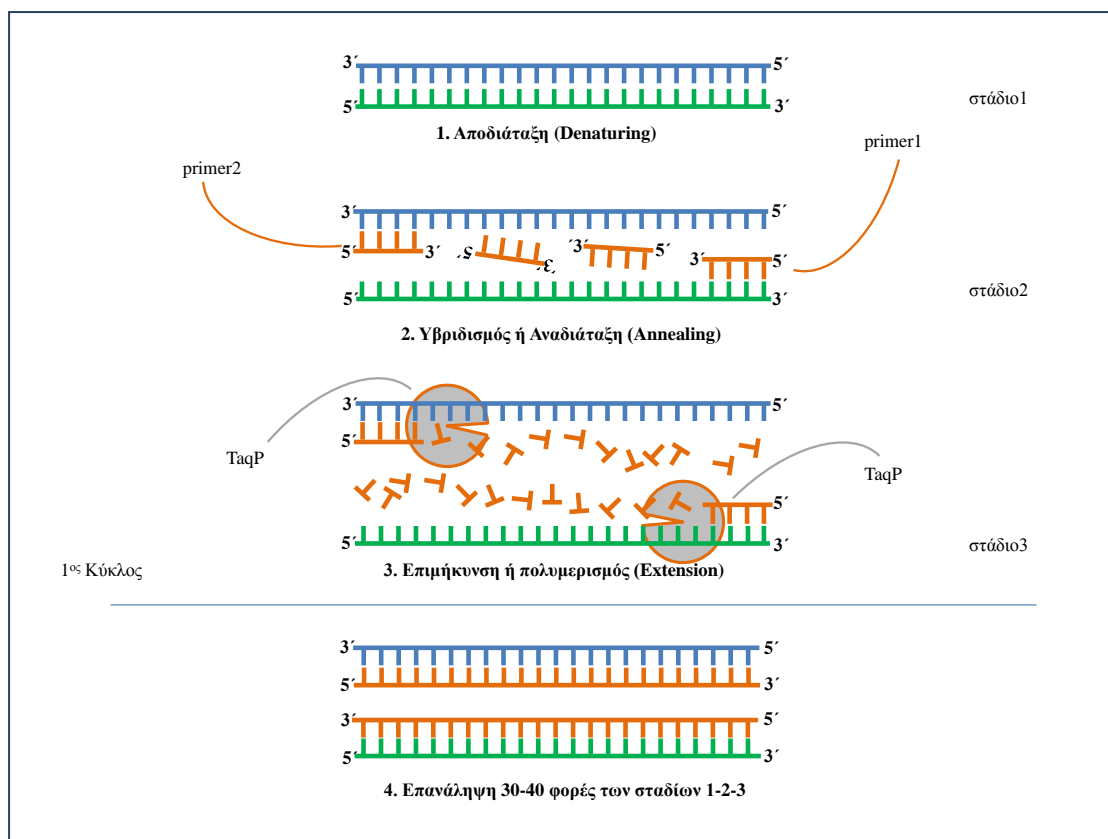
Τα RFLPs (Restriction fragment polymorphisms) ήταν οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στη χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος (Botstein *et al.*, 1980) και αποτέλεσαν την απαρχή για τη μετέπειτα εξέλιξη της μοριακής βελτίωσης των φυτών. Ανιχνεύονται από ένζυμα περιορισμού που κόβουν

το γονιδιωματικό DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και έτσι παράγονται τμήματα ποικίλου μεγέθους.

Οι DNA-markers που βασίζονται στην PCR (Polymerase Chain Reaction) χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς δεν απαιτούν γνώση της αλληλουχίας του DNA του ατόμου που εξετάζεται (RAPDs, DAFs, AFLPs) (Pénzez, 2002). Τα τελευταία 20 χρόνια τα διάφορα συστήματα ανίχνευσης-αποτύπωσης του DNA (DNA fingerprinting systems) όπως τα RAPDs, Inter-SSR και AFLP, έχουν προσδώσει αξιόλογη αξιοπιστία, ειδικά στη διάκριση διαφορετικών γενοτύπων μεταξύ των ειδών (Grayer, 2006). Οι μέθοδοι αυτοί αρμόζουν σε περιπτώσεις που, είτε υπάρχει ελλιπής πληροφόρηση, είτε δεν έχει γίνει καθόλου γενετική μελέτη, κάτι δηλαδή που συνήθως συμβαίνει για την πλειοψηφία των αυτοφύων φυτικών ειδών (Nybom, 2004). Σύμφωνα μάλιστα με τους White *et al.* (2007) τρεις μέθοδοι που χρησιμοποιούν τεχνικές βασιζόμενες στην PCR έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας στα δασικά είδη: 1) Random amplified polymorphic DNA (RAPD), 2) Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) και 3) Simple sequence repeats (SSRs). Τεχνική περιγραφή της PCR δίνεται από τον Innis *et al.* (1990).

9.1.2.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

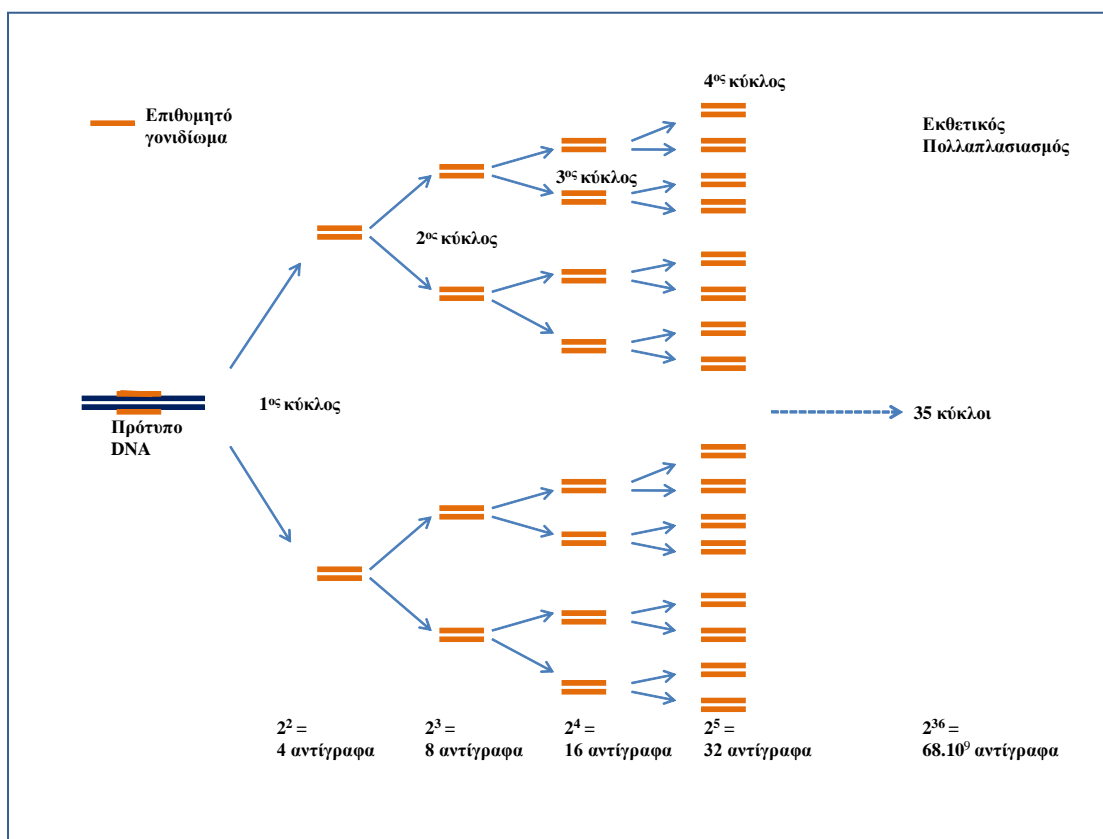
Η μέθοδος ονομάστηκε RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Τυχαία Ενίσχυση Πολυμορφικού DNA), γιατί βασίζεται στην ενίσχυση ενός τυχαίου τμήματος DNA με απλούς εκκινητές (primers), οι οποίοι έχουν τυχαία νουκλεοτιδική αλληλουχία. Με την μέθοδο αυτή που αναπτύχθηκε σε δύο ξεχωριστά εργαστήρια το ίδιο έτος (Williams *et al.* 1990, Welsh και McClelland, 1990), ενισχύεται το DNA-στόχος με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Η μέθοδος στηρίζεται στην ανάλυση του πολυμορφικού DNA. Αν οι θέσεις που έχει υβριδίσει ο εκκινητής, στις αντίθετες αλυσίδες DNA, είναι σε απόσταση 200-2.000 βάσεων περίπου ο ένας από τον άλλο, τότε παράγεται ένα προϊόν DNA. Αυτό το προϊόν ενισχύεται σε κάθε κύκλο PCR (ενίσχυση 2^n φορές, όπου n ο αριθμός των κύκλων) (Εικ. 71, 72). Γενικά 25 έως 35 κύκλοι είναι αρκετοί για να παράγουν 100 ng έως 1 μg DNA από μονόκλωνη ανθρώπινη αλληλουχία.



Εικ. 71. Τα στάδια της PCR: 1. Αποδιάταξη (Denaturing): Διαχωρισμός της δίκλωνης αλυσίδας DNA, στους 95 °C. 2. Υβριδισμός ή Αναδιάταξη (Annealing): Οι εκκινητές (Primers) υβριδίζουν (συγκολλούνται) επί των συμπληρωματικών τους αλληλουχιών. 3. Επιμήκυνση ή πολυμερισμός (Extension): Η πολυμεράση συμπληρώνει τις αντίστοιχες αλληλουχίες και σχηματίζεται νέα αλυσίδα DNA 4. Ενίσχυση του παραγόμενου προϊόντος.

Η κυριότερη ιδιότητα της μεθόδου αυτής είναι η ταυτοποίηση του πολυμορφισμού με την ανίχνευση των διαφορών στο DNA, μεταξύ δύο ατόμων. Ενδιαφέρον στοιχείο του πολυμορφισμού είναι ότι μπορεί να χαρτογραφηθεί ως ένας σταθερός γενετικός χαρακτήρας (σήμανση). Ο πολυμορφισμός μπορεί να ανιχνευτεί επειδή η αλληλουχία του DNA μπορεί να ενισχυθεί σε ένα άτομο αλλά όχι σε ένα άλλο. Είναι, όμως δύσκολο να καθοριστεί αμέσως αν ένα άτομο είναι ομοζυγωτό ή ετεροζυγωτό για ένα συγκεκριμένο τόπο RAPD. Οι δείκτες αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία γενετικού χάρτη σύνδεσης και εντός των χαρτών μπορεί να βρεθεί στενή σύνδεση των μοριακών δεικτών με χαρακτηρισες βελτίωσης και ανάπτυξης των φυτών. Εάν γίνει στενή σύνδεση ενός δείκτη RAPD και ενός

γονιδίου που έχει αγρονομικό ενδιαφέρον, τότε υπάρχει η δυνατότητα η μέθοδος να χρησιμοποιηθεί στην κλωνοποίηση του γονιδίου (Μπινιάρη, 2000)



Εικ. 72. Εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου.

Για τα RAPDs, η αλληλουχία των εκκινητών, που υβριδίζουν με το DNA, είναι τυχαία. Αυτοί μπορούν γρήγορα να συντεθούν, με κατάλληλο εξοπλισμό ή να προμηθευτούν από μια εταιρεία, ενώ υπάρχουν και αρκετά εμπορικά kit με τα απαραίτητα υλικά για την εφαρμογή της μεθόδου. Τα RAPDs είναι μια απλή, γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδος εφαρμόσιμη ακόμη και σε δείγματα χαμηλής καθαρότητας DNA. Οι εκκινητές συντίθενται εύκολα και παράγεται μεγάλος αριθμός ζωνών ανά εκκινητή που τα καθιστούν ιδιαίτερα ελκυστικά (Benter *et al.*, 1995, Karp, 1997, Arif *et al.*, 2010). Αναφέρονται βέβαια περιορισμοί σε σχέση με την επαναληψιμότητά τους αν μεταβληθούν οι συνθήκες, ο εξοπλισμός και το προσωπικό που χρησιμοποιεί την μέθοδο (Karp, 1997). Το ποσό του DNA που χρησιμοποιείται στα RAPDs είναι πολύ λίγο (10-100 ng για κάθε αντίδραση) κάτι επίσης ιδιαίτερα σημαντικό, αφού σημαίνει ότι απαιτείται μικρότερη ποσότητα φυτικού ιστού (Karp, 1997). Η μέθοδος λόγω των πλεονεκτημάτων της βρίσκει εφαρμογή σε πολλά φυτικά

είδη και χρησιμοποιείται ευρύτατα και η εφαρμογή της ενδείκνυται στα αυτοφυή είδη για τα οποία δεν υπάρχει πληροφόρηση για την αλληλουχία των βάσεων DNA (Martin *et al.*, 2008). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ποικιλιακή ταυτοποίηση, τις φυλογενετικές σχέσεις, τον καθορισμό γονέων σε προγράμματα βελτίωσης και σε ιδιαίτερα εξειδικευμένα επίπεδα (Nybom, 2004).

Η μέθοδος εφαρμόστηκε, πρώτα το 1991, για τον διαχωρισμό γενοτύπων F1 απογόνων κωνοφόρων δέντρων (Carlson *et al.*, 1991) και για την εύρεση μοριακών δεικτών στην ντομάτα (*L. esculentum*) (Klein- Lankhorst *et al.*, 1991). Με τη μέθοδο αυτή εκτιμήθηκε η γενετική σχέση μεταξύ 10 ποικιλιών παπάγιας (*Carica papaya* L.) (Stiles *et al.*, 1993), ποικιλιών pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) σε σχέση με άγρια είδη αυτών (Ratnaparkhe *et al.*, 1995), καθώς και 10 γενοτύπων φασολιού (*Phaseolus vulgaris*) (Skroch and Nienhuis, 1995). Οι Chong *et al.* (1995) ταυτοποίησαν 15 κλώνους της ιτιάς (*Salix* L.). Κάποια δασικά είδη δένδρων έχουν το χαρακτηριστικό του κρεμοκλαδούς, το οποίο είναι σπάνιο και ελέγχεται από το γονίδιο *pendula* (κρεμοκλαδές). Οι Lehner *et al.*, (1995) ταυτοποίησαν το γενετικό τόπο (OPH10-720) που είναι συνδεδεμένος με το γονίδιο αυτό και κάνει πιο εύκολη την χαρτογράφηση του γονιδίου. Η μέθοδος βρήκε εφαρμογή και σε ανθοκομικά φυτά όπως είδη *Lilium* και υβρίδια αυτών (Yamagishi, 1995). Η Μπινιάρη (2000) μελέτησε την γενετική ετερογένεια 46 ποικιλιών αμπέλου που καλλιεργούνται στην Ελλάδα.

Τα RAPDs χρησιμοποιούνται ευρέως για την μελέτη της γενετικής πολυμορφίας και για σκοπούς διατήρησης και προστασίας σε πληθυσμούς ξυλωδών φυτών (Renau-Morata *et al.*, 2005, Fournier *et al.*, 2006, Gérard *et al.*, 2006, Heider *et al.*, 2007, Monteleone *et al.*, 2006, Narzary *et al.*, 2009, Sarkhosh *et al.*, 2009). Τα RAPDs έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά για την μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας σε πολλά επαπειλούμενα είδη (Wang *et al.*, 2005, Lu *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2007, Zheng *et al.*, 2008). Οι Martin *et al.*, (2008) μελέτησαν με RAPDs την γενετική πολυμορφία και δομή πληθυσμών του επαπειλούμενου είδους *Betula pendula* subsp. *fontqueri* στην Νότια Ισπανία. Τα RAPDs έχουν χρησιμοποιηθεί εντατικά και επιτυχώς για την ανίχνευση γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ πληθυσμών (Etisham-Ui-Haq *et al.*, 2001, Roman *et al.*, 2003) και υβριδίων ξυλωδών φυτών: Ο Samuel (1999), μελέτησε τα υβρίδια μεταξύ των *Quercus petraea* και *Q. robur*, οι Triest *et al.*, (2000) τα υβρίδια σε είδη *Salix*, οι Delaporte *et al.* (2001) τα υβρίδια σε είδη *Eucalyptus*, οι Werner *et al.* (2001) το *Pistacia x saportae*, οι Rajora and Rahman (2003) τα υβρίδια του *Populus X Canadensis* και οι Krebs *et al.*, (2010)

υβρίδια του γένους *Fallopia*. Με τη χρήση RAPDs προσδιορίστηκαν δύο νέα είδη του γένους *Ulmus* στη Μ. Βρετανία, αλλά αποδείχθηκε ότι το θεωρούμενο ως σπάνιο ενδημικό *U. plotii* είναι στην πραγματικότητα ένας απλός κλώνος (Coleman *et al.*, 2000). Τα RAPDs είναι μία από τις τεχνικές που χρησιμοποίησαν με επιτυχία οι Venkatachalam *et al.* (2007) για την μελέτη γενετικών αλλαγών σε φυτά μπανάνας και οι Cuesta *et al.*, (2010) για την μελέτη της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας σε κλώνους του *Pinus pinea* που παρήχθησαν από *in vitro* πολλαπλασιασμό.

Οι Rosseto *et al.*, (1997), χρησιμοποίησαν τα RAPDs για την μελέτη και τον προσδιορισμό του *Eucalyptus granticola* ως υβριδίου με πιεζόμενο πληθυσμό. Το «μωσαϊκό» των μορφολογικών χαρακτήρων που παρουσιάζουν τα υβρίδια (Rieseberg and Ellstrand, 1993), περιπλέκει γενικά τον προσδιορισμό-ταυτοποίηση των υβριδίων και η διάκρισή τους από μη έμπειρους βοτανολόγους είναι δύσκολη (Werner, *et al.*, 2001). Εν τούτοις, σε αντίθεση με τους μορφολογικούς χαρακτήρες των υβριδίων, η έκφραση των γενετικών χαρακτήρων στα υβρίδια είναι υπολογίσιμη και σαφής (Rieseberg and Ellstrand, 1993).

Η ενδελεχής παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των πληθυσμών του γένους *Arbutus* κατά τη διάρκεια της διατριβής οδήγησαν στον εντοπισμό ενός μικρού αριθμού ατόμων *Arbutus* με ενδιάμεσους μορφολογικούς χαρακτήρες, αρχικά στον Κάλαμο Αττικής. Η ύπαρξη του φυσικού υβριδίου *A. x andrachnoides* αναφέρεται στην βιβλιογραφία καθώς και η ομοιότητά του με το *A. andrachne* σε βαθμό που η σύγχυση μεταξύ των δύο ειδών να είναι συχνή (Bačić, T. *et al.*, 1992, Huxley, 1992, The European Garden Flora, 1997). Ερευνήθηκε λοιπόν μεγαλύτερη έκταση και στον Κάλαμο και στη Βαρυμπόμπη για τον εντοπισμό και άλλων ατόμων με ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Για τα άτομα αυτά έγινε η υπόθεση ότι αποτελούν φυσικές υβριδικές μορφές, άτομα δηλαδή *A. x andrachnoides*.

Τα RAPDs έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη αρκετών ειδών της οικ. Ericaceae, όπως του *Calluna vulgaris* (Borchert *et al.*, 2008), *Leucopogon* sp. (Zawko *et al.*, 2001), *Menziesia* spp. (Maki *et al.*, 2002), *Rhododendron* spp. (Jain *et al.*, 2000, Milne and Abbott, 2008), *Vaccinium* spp. (Levi and Rowland, 1997, Burgher *et al.*, 1998, Vander Kloet and Paterson, 2000, Persson and Gustavsson, 2001, Albert *et al.*, 2003, 2004, Burgher-Maclellan and Mackenzie, 2004, Garkava-Gustavsson *et al.*, 2005, Albert *et al.*, 2003, 2004 and 2005, Giongo *et al.*, 2006, Debnath, 2007). Τα ερευνηθέντα είδη είναι κυρίως του γένους *Vaccinium* που καλλιεργείται ευρέως για

εμπορικούς σκοπούς εδώ και χρόνια. Πρόσφατα οι Takrouni and Boussaid (2010) μελέτησαν πληθυσμούς του *A. unedo* από διαφορετικές περιοχές της Τυνησίας όπως και η Gomes, (2011) που χρησιμοποίησε RAPDs σε συνδυασμό με SSRs για την μελέτη καλλιεργούμενων ποικιλιών *A. unedo* στην Πορτογαλλία.

Προκειμένου λοιπόν να μελετηθούν οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ατόμων με τα ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά με τα *A. andrachne* και το *A. unedo* και να ταυτοποιηθούν τα άτομα με τα ενδιάμεσα χαρακτηριστικά, επιλέχθηκε η χρήση μοριακών δεικτών RAPDs σε συνδυασμό με μια σειρά από μορφολογικούς χαρακτήρες, όπως έχει συμβεί σε σειρά ερευνητικών εργασιών που προαναφέρθηκαν. Ο στόχος ήταν η εξεύρεση των κατάλληλων μορφολογικών χαρακτήρων και μοριακών σημαντών για την διάκριση των τριών ειδών μεταξύ τους.

9.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

9.2.1 Φυτικό Υλικό

Η επιλογή των ατόμων *Arbutus* έγινε ύστερα από τακτικές επισκέψεις στην περιοχή του Κάλαμου (38°16'3 N, 23°51'55 E) και της Βαρυμπόμπης (38°8'19 N, 23°47'44 E) επί σειρά ετών Τα *A. andrachne* και *A. unedo* αποτελούν τα κυρίαρχα είδη της χλωρίδας των δύο οικοσυστημάτων, σχηματίζοντας έναν αρκετά συμπαγή όροφο βλάστησης ύψους 1,5-3,0 m. Αρχικά, ερευνήθηκε μια περιοχή στον Κάλαμο (βλ 3.1, Εικ. 7) όπου εντοπίστηκαν ύστερα από τακτικές επισκέψεις και παρατηρήσεις τρία άτομα με μορφολογικούς χαρακτήρες αρκετά πλησίον των ατόμων του *A. andrachne*. Η ομοιότητα ήταν τόσο μεγάλη, σε βαθμό που εύκολα να θεωρούνται με την αρχική παρατήρηση ως *A. andrachne*. Στην συνέχεια εντοπίστηκε στον Κάλαμο και τέταρτο άτομο με ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά και ακολούθησε εκτεταμένη έρευνα στην Βαρυμπόμπη για τον εντοπισμό ατόμων που έφεραν παρόμοιους χαρακτήρες. Ερευνήθηκε και εκεί μια έκταση συνολικής επιφάνειας 2-3 περίπου τετραγωνικών χιλιομέτρων, όπου τελικά κατέστη δυνατός ο εντοπισμός τεσσάρων ατόμων με ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά.

Ως πειραματικό υλικό για την γενετική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν τα νεαρά κορυφαία φύλλα, γιατί η ηλικία των φύλλων επιδρά σημαντικά στη καθαρότητα και στην ποσότητα του DNA. Έχει διαπιστωθεί ότι φύλλα μεγάλης ηλικίας,

παρουσιάζουν δυσχέρειες τόσο στη διαδικασία απομόνωσης όσο και στον χρόνο διατήρησης του DNA (Lodhi *et al.*, 1994). Τα άτομα αυτά ήταν υγιή, χωρίς εμφανή συμπτώματα εχθρών και ασθενειών, αντιπροσωπευτικά των μελετηθέντων ειδών. Από κάθε άτομο (Πίν. 31) συλλέχθηκαν τυχαία από ολόκληρη την κόμη του, περισσότερα από 3 δείγματα που τοποθετήθηκαν σε αλουμινόχαρτο. Αμέσως μετά την συλλογή τους τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φορητό ψυγείο που περιείχε ξηρό πάγο (-80 °C περίπου) και μεταφέρθηκαν σε ψυγείο βαθειάς κατάψυξης (-80 °C) στο Εργαστήριο Αμπελολογίας του Γ.Π.Α.

Τα μητρικά φυτά ήταν ηλικίας περίπου 20-25 ετών, απείχαν τουλάχιστον 50 m μεταξύ τους, είχαν ύψος περίπου 1,5-3,0 m και διάμετρο 3-4 m. Τα άτομα *A. andrachne* κωδικοποιήθηκαν ως (A), τα *A. unedo* ως (U) και τα άτομα *Arbutus* sp. με ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά που θεωρήθηκαν άτομα του φυσικού υβριδίου, ως (H). Με (K) κωδικοποιήθηκαν τα άτομα από τον Κάλαμο και με (B) τα άτομα από Βαρυμπόμπη (Πίν. 31).

9.2.2 Μορφολογική Ανάλυση

Η καταγραφή των μορφολογικών χαρακτήρων έγινε με παρατηρήσεις πεδίου στα Εργαστήρια Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου και Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γ.Π.Α. Για τη μέτρηση της φυλλικής επιφάνειας χρησιμοποιήθηκε το LI-3100 (Leaf Area Meter, LI-COR Biosciences, Nebraska, USA). Συνολικά, 27 χαρακτήρες χρησιμοποιήθηκαν που παρατίθενται στον Πίνακα 32, όπου επίσης αναφέρονται ερευνητικές εργασίες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι μορφολογικοί χαρακτήρες.

Πίν. 31. Κωδικοί των ατόμων που μελετήθηκαν και περιοχές δειγματοληψίας.

α/α	Κωδικός Ατόμων	Είδος	Περιοχή Δειγματοληψίας
1.	A1 K	<i>A. andrachne</i>	Κάλαμος
2.	A2 K	<i>A. andrachne</i>	Κάλαμος
3.	A3 K	<i>A. andrachne</i>	Κάλαμος
4.	A4 K	<i>A. andrachne</i>	Κάλαμος
5.	A5 K	<i>A. andrachne</i>	Κάλαμος
6.	A1 B	<i>A. andrachne</i>	Βαρυμόμπη
7.	A2 B	<i>A. andrachne</i>	Βαρυμόμπη
8.	A3 B	<i>A. andrachne</i>	Βαρυμόμπη
9.	A4 B	<i>A. andrachne</i>	Βαρυμόμπη
10.	A5 B	<i>A. andrachne</i>	Βαρυμόμπη
11.	U1 K	<i>A. unedo</i>	Κάλαμος
12.	U2 K	<i>A. unedo</i>	Κάλαμος
13.	U3 K	<i>A. unedo</i>	Κάλαμος
14.	U4 K	<i>A. unedo</i>	Κάλαμος
15.	U5 K	<i>A. unedo</i>	Κάλαμος
16.	U1 B	<i>A. unedo</i>	Βαρυμόμπη
17.	U2 B	<i>A. unedo</i>	Βαρυμόμπη
18.	U3 B	<i>A. unedo</i>	Βαρυμόμπη
19.	U4 B	<i>A. unedo</i>	Βαρυμόμπη
20.	U5 B	<i>A. unedo</i>	Βαρυμόμπη
21.	H1 K	Φυσικό υβρίδιο	Κάλαμος
22.	H2 K	Φυσικό υβρίδιο	Κάλαμος
23.	H3 K	Φυσικό υβρίδιο	Κάλαμος
24.	H4 K	Φυσικό υβρίδιο	Κάλαμος
25.	H1 B	Φυσικό υβρίδιο	Βαρυμόμπη
26.	H2 B	Φυσικό υβρίδιο	Βαρυμόμπη
27.	H3 B	Φυσικό υβρίδιο	Βαρυμόμπη
28.	H4 B	Φυσικό υβρίδιο	Βαρυμόμπη

Πίν. 32. Μορφολογικοί χαρακτήρες που μελετήθηκαν, κατηγορίες χαρακτήρων και αναφορά σχετικής βιβλιογραφικής πηγής.

ΚΑ	Χαρακτήρας	Κατηγορία χαρακτήρα			Πηγή
1	Μορφή σκελετικών στοιχείων:	1: Θάμνος	2: Δένδρο		Steiner and Garcia de los Santos, 2001
2	Πυκνότητα βλάστησης:	1: Μέτρια	2: Δυνατή		Steiner and Garcia de los Santos, 2001
3	Ικανότητα αναβλάστηση μετά από κλάδευση:	1: Μεγάλη	2: Μικρή		
4	Πυκνότητα πλευρικών κλάδων στην βάση:	1: Μέτρια	2: Δυνατή	3: Πολύ δυνατή	
5	Επιφάνεια φλοιού:	1: Λείος	2: Τραχύς		
6	Χρώμα φλοιού:	1: Κανελί-ερυθρό	2: Τεφρό		
7	Απολέπιση φλοιού:	1: Μεγάλες επιμήκεις λωρίδες	2: Μικρές επιμήκεις λωρίδες	3: Μικρές "νιφάδες"	
8	Συχνότητα απολέπισης:	1: Κάθε χρόνο	2: Όχι σταθερά		
9	Ένταση απολέπισης:	1: Μεγάλη	2: Μέτρια		
10	Εσωτερικό χρώμα φλοιού:	1: Γκρι-πράσινο	2: Σταχτί		
11	Αειθαλές φύλλωμα	1: Ναι	2: Όχι		Al-Saghir, 2010
12	Υφή επιφάνειας φύλλου:	1: Δερματοειδής-ελαστική	2: Μεμβρανώδης-σκληρή		Kyndt <i>et. al.</i> , 2005
13	Σκαφοειδές φύλλο	1: Ναι	2: Όχι		
14	Σχήμα ελάσματος:	1: Ελλειπτικό/επίμηκες/λογχοειδές	2: Ελλειπτικό/ανεστραμμένο ωοειδές	3: Ενδιάμεσο	Triest, 2001
15	Περιφέρεια φύλλου (περίγραμμα):	1: Λεία	2: Οδοντωτή	3: Ελαφρά οδοντωτή	Kyndt <i>et. al.</i> , 2005
16	Χρώμα κάτω επιφάνειας φύλλου:	1: Πράσινο	2: Πράσινο φωτεινό		Steiner and Garcia de los Santos, 2001
17	Εποχή ανθοφορίας:	1: Οκτώβριος-Ιανουάριος	2: Ιαν/ριος-Απρίλιος		Celikel <i>et al.</i> , 2008
18	Χρώμα ανθέων:	1: Λευκό-υποπράσινο	2: Άλλο		Celikel <i>et al.</i> , 2008
19	Εποχή καρπ/ρίας:	1: Οκτώβριος-Ιανουάριος	2: Άλλο		
20	Σχήμα καρπών:	1: Σφαιρικό	2: Ελλειπτικό		Celikel <i>et al.</i> , 2008
21	Επιφάνεια καρπών:	1: Κοκκώδης	3: Ελαφρά κοκκώδης		
22	Χρώμα καρπών:	1: Κόκκινο-πορτοκαλί	2: Άλλο		Celikel <i>et al.</i> , 2008
23	Γεύση καρπών:	1: Γλυκιά	2: Στυφή		
24	Μήκος/πλάτος φύλλου (cm):	1: 1,32-1,78	2: 1,78-2,24	3: 2,24-2,70	Celikel <i>et al.</i> , 2008
25	Επιφάνεια 10 φύλλων (cm ²):	1: 10,30-15,00	2: 15,10-19,80	3: 19,90-24,60	Ueda <i>et. al.</i> , 2012
26	Μήκος μίσχου (cm):	1: 0-1	2: 1-2	3: 2-3	Celikel <i>et al.</i> , 2008
27	Διάμετρος καρπών (cm):	1: 1,10-1,40	2: 1,40-1,90	3: 1,90-2,90	Celikel <i>et al.</i> , 2008

Οι χαρακτήρες ήταν ποιοτικοί (1-23) και ποσοτικοί (24-27) και περιέγραφαν την βλάστηση συνολικά (1-4), τον φλοιό (5-10), το φύλλωμα (11-16), τα άνθη (17-18), τους καρπούς (19-24) και μορφομετρικά στοιχεία των φύλλων (24-27). Για τη μέτρηση της φυλλικής επιφάνειας, επιλέχθηκαν τα φύλλα (ώριμα) των κόμβων 6-9,

από ημιξυλοποιημένους βλαστούς (1 έτους), μήκους περίπου 15 cm από την A-NA πλευρά των δένδρων. Για την μέτρηση του λόγου μήκους/πλάτους και της φυλλικής επιφάνειας χρησιμοποιήθηκαν 100 φύλλα από κάθε δείγμα (10 επαναλήψεις, 10 φύλλα/επανάληψη). Για την μέτρηση της διαμέτρου του καρπού χρησιμοποιήθηκαν 100 καρποί από κάθε άτομο. Για τους χαρακτήρες 24-27 έγινε παραμετροποίηση των μετρούμενων χαρακτηριστικών με τιμές 1, 2, 3.

9.2.3 Γενετική Ανάλυση

9.2.3.1 Απομόνωση DNA

9.2.3.1.1 Στάδια απομόνωσης

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν 1 g φύλλων από κάθε άτομο. Η απομόνωση έγινε με το kit απομόνωσης της Qiagen:

1. Λειοτρίβηση με υγρό άζωτο και εν συνεχεία τοποθέτηση σε epp
2. Πρόσθεση 400 μ l buffer AP1 και 4 μ l RNaseA και ανάδευση σε vortex ζωηρά.
3. Επώαση μίγματος για 10 min στους 65 °C αφού ανακινηθεί 2-3 φορές κατά τη διάρκεια παραμονής του στους 65 °C. Σε αυτό το βήμα «σπάνε» («κλύνονται») τα κύτταρα.
4. Προσθήκη 130 μ l buffer AP2, ανακίνηση και επώαση για 5 min σε πάγο. Σε αυτό το στάδιο κατακρημνίζονται πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες.
5. Τοποθέτηση μίγματος σε κολώνα Q/Ashredder και φυγοκέντρηση για 2 min στη θέση max.
6. Μεταφορά υπερκείμενου σε καθαρό epp, χωρίς να πειραχτεί το ίζημα.
7. Πρόσθεση 0,5 όγκου buffer AP3 και 1 όγκου αιθανόλης (96-99,99%) με ανάδευση με την πιπέτα.
8. Τοποθέτηση 650 λ μίγματος στην κολώνα DNeasy mini column και φυγοκέντρηση για 1 min σε 8.000 rpm. Απομάκρυνση του υγρού.
9. Επανάληψη του βήματος με το υπόλοιπο δείγμα.
10. Τοποθέτηση της κολώνας σε νέο σωλήνα (2 ml) και πρόσθεση 500 μ l buffer AW στην κολώνα.

11. Φυγοκέντρωση για 1 min σε 8.000 rpm και απομάκρυνση του υγρού του σωλήνα.
12. Πρόσθεση 500 μ l buffer AW στην κολώνα. Φυγοκέντρωση για 2 min στο max για να στεγνώσει η μεμβράνη.
13. Μεταφορά της κολώνας Dneasy σε νέο epp και πρόσθεση κατ' ευθείαν πάνω στη μεμβράνη 100 μ l buffer AE, αφού πρώτα έχει προθερμανθεί στους 65 °C. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά φυγοκέντρωση για 1 min σε 8.000 rpm (για καθάρισμα).
14. Επανάληψη του καθαρισμού όπως παραπάνω (βήμα 12) και συνένωση των δύο εκχυλισμάτων. Προκύπτει τελικός όγκος 200 l.

9.2.3.1.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Μετά την απομόνωση του DNA από τον φυτικούς ιστούς των τριών ειδών *Arbutus*, ακολούθησε η μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA στο διάλυμα σε φασματοφωτόμετρο (HITACHI U-2001) στα 260 nm και 280 nm. Πιο αναλυτικά, 10 μ l δείγματος DNA διαλύθηκαν σε 1 ml dH₂O και η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο C (συγκέντρωση) = Αραίωση x Ένδειξη (260nm) x 50 μ g/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

9.2.3.2 Εκκινητές

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA ήταν τυχαία δεκαμερή ολιγονουκλεοτίδια, που προμηθεύτηκαν από το Ίδρυμα Τεχνολογίας Έρευνας, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (ITE-IMBB) και την Operon Technologies Inc. Alameda CA, USA (OT). Συγκεκριμένα τέσσερις εκκινητές ήταν από το ITE-IMBB, πέντε εκκινητές από το kit F της Operon και έξι εκκινητές από το kit M της Operon. Επιλέχθηκαν 12 εκκινητές, διότι οι υπόλοιποι δεν οδήγησαν σε πολυμορφισμό, η αλληλουχία των οποίων, καθώς και ο αριθμός των ενισχυμένων προϊόντων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 33.

Πίν. 33. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και αλληλουχία των βάσεων.

Κωδικός	Αλληλουχία (5' → 3')
1224	CAGGCCCTTC
1225	AGGTGACCGT
1226	CGCAGGATGG
1227	GTGTGCCCCA
OPF-01	ACGGATCCTG
OPF-02	GAGGATCCCT
OPF-03	CCTGATCACC
OPF-04	GGTGATCAGG
OPF-06	GGGAATTCGG
OPM-11	GTCCACTGTG
OPM-14	AGGGTCGTTC
OPM-18	CACCATCCGT

9.2.3.2 Συνθήκες ενίσχυσης (PCR)

Η ενίσχυση του πολυμορφικού DNA πραγματοποιήθηκε σε 25 μ l που περιείχαν 60 ng γονιδιωματικού DNA, 10 mM TRIS-HCl (pH 8.8), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 200 μ M από κάθε dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 50 ng εκκινητή και 1 μονάδα Taq DNA polymerase Qiagen. Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε κυκλικός εναλλάκτης θερμότητας (Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 9600). Μετά από 5 min στους 94 °C, ακολούθησαν 34 κύκλοι 1 min στους 94 °C, 1 min στους 44 °C, και 2 min στους 72 °C και τέλος 1 κύκλος 10 min στους 72 °C.

Ο χρόνος που χρειαζόταν για να ενισχυθεί το DNA ήταν περίπου 3,5 ώρες. Όταν τελειώνει η διαδικασία τα δείγματα αποθηκεύονταν στο ψυγείο ή γινόταν ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον δύο φορές.

9.2.3.3 Ηλεκτροφόρηση

Ο διαχωρισμός των ενισχυμένων προϊόντων, 25 μ l από κάθε δείγμα, έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, συγκέντρωσης 2 %. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το TAE (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8,00) και η

χρώση του DNA έγινε με βρωμιούχο αιθίδιο, σε συγκέντρωση 0,5 $\mu\text{g/ml}$ στην πηκτή και στο ρυθμιστικό διάλυμα. Η ηλεκτροφόρηση γινόταν στα 120 Volt σταθερά, με διάρκεια 3,5 ώρες. Στο τέλος τα ηλεκτροφορήματα φωτογραφήθηκαν στο Gel Doc 1000 (BioRad) και αποθηκεύτηκαν σαν εικόνες JPEG σε υπολογιστή για να χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Για κάθε εκκινητή δημιουργήθηκε μια μήτρα στην οποία εντοπίστηκαν τα ενισχυμένα προϊόντα του DNA, η παρουσία ή απουσία των οποίων δηλωνόταν με τον συμβολισμό 1 (ένα) ή 0 (μηδέν) αντίστοιχα.

9.3 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων

Η ανάλυση όλων των δεδομένων έγινε με την χρήση του στατιστικού προγράμματος NTSYS-pc version 2.11f (Rohlf, 1992).

Με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά δημιουργήθηκε μια μήτρα στην οποία καταχωρήθηκαν οι τιμές τους. Για τον υπολογισμό της απόστασης των ατόμων μεταξύ τους, με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, χρησιμοποιήθηκε η Μέθοδος UPGMA με τον συντελεστή της Ευκλείδειας Απόστασης (Standardized Average Euclidian Distance) (Greenacre and Underhill, 1982) που χρησιμοποιείται ευρέως για τους μορφολογικούς χαρακτήρες. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του συντελεστή για δύο άτομα, τόσο μεγαλύτερη απόσταση έχουν τα δύο άτομα. Άτομα με τιμή συντελεστή (0) είναι όμοια (ταυτότητα).

Για τον προσδιορισμό της συγγένειας των ατόμων με χρήση μοριακών δεικτών χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές ομοιότητας Simple Matching (SM) και Jaccard (JAC) (Sokal and Sneath, 1963) που χρησιμοποιούνται ευρέως για τους κυρίαρχους δείκτες όπως τα RAPDs (Link *et al.*, 1995) και υπολογίζουν το βαθμό γενετικής ομοιότητας (β.γ.ο) κάθε δυνατού ζεύγους των ατόμων που μελετήθηκαν. Ο κάθε συντελεστής συνυπολογίζει με διαφορετικό τρόπο την παρουσία ή απουσία κοινών ζωνών από τα ηλεκτροφορήματα και έχει τιμή 0-1. Όσο μεγαλύτερη η ομοιότητα των μελετώμενων ατόμων τόσο μεγαλύτερη τιμή έχει ο συντελεστής, ενώ αν ο συντελεστής πάρει την τιμή 1 (ταυτότητα) αυτό σημαίνει ότι τα δύο μελετώμενα άτομα, για τον εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε είναι όμοια, έχουν δηλαδή το ίδιο ηλεκτροφορητικό πρότυπο.

Με βάση τους συντελεστές που χρησιμοποιήθηκαν, κατασκευάστηκε η μήτρα γενετικών αποστάσεων για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και οι δύο μήτρες (μία για κάθε συντελεστή ομοιότητας) για τα γενετικά δεδομένα. Από τις μήτρες αυτές αντλήθηκαν τα δεδομένα για την ανάλυση συστάδων (cluster analysis) με την μέθοδο UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means), και την Ανάλυση των Κυρίων Συντεταγμένων (Principal Coordinate Analysis, PCORDA) (Rohlf, 1992, Sokal and Sneath, 1963).

Η Ανάλυση των Κυρίων Συντεταγμένων είναι μια μέθοδος της Πολυμεταβλητής Ανάλυσης Δεδομένων (Multivariate Data Analysis). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για να απεικονίσει την σχέση των ατόμων σε ένα ή περισσότερους άξονες (Beer *et al.*, 1993). Ο κάθε άξονας περιγράφει κάποιο ποσοστό παραλλακτικότητας. Όσο μεγαλύτερη συγγένεια υπάρχει στο υλικό (δηλ. τα δεδομένα δε διαφέρουν πολύ), τόσο μεγαλύτερο ποσοστό παραλλακτικότητας περιγράφει ο κάθε άξονας και συνεπώς με μικρό αριθμό αξόνων είναι εφικτό να προσδιοριστεί μεγάλο ποσοστό της παραλλακτικότητας. Η προσθήκη κάθε νέου άξονα αυξάνει το ποσοστό της παραλλακτικότητας που περιγράφεται. Στην συγκεκριμένη περίπτωση γίνεται σύγκριση της ομαδοποίησης που προκύπτει από την Ανάλυση των Κυρίων Συντεταγμένων με την ομαδοποίηση που προκύπτει από το δενδρόγραμμα.

Τα δενδρογράμματα που προκύπτουν δείχνουν την ομαδοποίηση των ατόμων, όπως δημιουργήθηκε από τη μέθοδο UPGMA (μέθοδος μη σταθμισμένων ομάδων ανά δύο, χρησιμοποιώντας αριθμητικό μέσο). Η μέθοδος UPGMA είναι αυτή που χρησιμοποιείται πιο συχνά σε μελέτες με μοριακούς δείκτες. Η μέθοδος χρησιμοποιεί απ' ευθείας το συντελεστή ομοιότητας και η ομαδοποίηση αρχίζει από τα δείγματα που είναι πιο κοντά και συνεχίζει στα υπόλοιπα (Saitou and Nei, 1987).

Ο συντελεστής Mantel (1967) χρησιμοποιήθηκε για δύο είδη συγκρίσεων: α. για να συγκριθούν οι μορφολογικοί και μοριακοί δείκτες μεταξύ τους (με την σύγκριση των μητρών ομοιότητας) και β. με την χρήση των συν-φαινολογικών (cophenetic) συντελεστών εξετάστηκε ο βαθμός, που ήταν αντιπροσωπευτική η γραφική απεικόνιση των δεδομένων της μήτρας. Οι συν-φαινολογικοί συντελεστές (Rohlf and Sokal, 1981) δημιουργούν μια συμμετρική μήτρα η οποία στην συνέχεια χρησιμοποιείται (MXCOMP του NTSYS) για τις συγκρίσεις. Ο συντελεστής Mantel έχει τιμή από -1 έως 1 και όσο η τιμή απολύτως πλησιάζει το 1, τόσο πιο πολύ

μοιάζουν δύο συγκρινόμενες μήτρες ή πιο αντιπροσωπευτική είναι η γραφική απεικόνιση ενός δενδρογράμματος.

9.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.3.1 Μορφολογική Ανάλυση

Στον Πίνακα 34 αναγράφονται τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν με τις τιμές τους ανάμεσα στα άτομα που μελετήθηκαν.

Τα άτομα που μελετήθηκαν είχαν όλα θαμνώδη μορφή (χαρακτήρας 1). Η πυκνότητα της βλάστησης (χαρ. 2) ήταν πιο έντονη στα *A. unedo* σε σχέση με τα *A. andrachne*, ενώ στα άτομα με τα ενδιάμεσα χαρακτηριστικά παρατηρήθηκαν και οι δύο μορφές. Η ικανότητα για αναβλάστηση και στα τρία είδη ήταν μεγάλη (χαρ. 3). Η πυκνότητα των πλευρικών κλάδων της βλάστησης στην βάση του φυτού (χαρ. 4) ήταν μέτρια στα *A. andrachne*, πολύ δυνατή στα *A. unedo* και μέτρια ή πολύ δυνατή στα άτομα με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά. Οι χαρακτήρες 5 και 6 (επιφάνεια, χρώμα φλοιού) διαχώρισαν τα άτομα *A. unedo* τα οποία σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες ατόμων δεν είχαν λείο φλοιό. Τα άτομα *A. unedo* είχαν σταχτί φλοιό σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα που είχαν ερυθρό-κανελί φλοιό. Τα άτομα *A. andrachne* απολεπίζονταν σε μεγάλα τμήματα (χαρ. 7), τα άτομα με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά σε μικρότερα τμήματα, ενώ τα άτομα *A. unedo* σε μικρά τμήματα σε νιφάδες. Ο χαρακτήρας αυτός διαχώρισε τα μελετώμενα άτομα σε τρεις ομάδες. Η απολέπιση παρατηρήθηκε κάθε χρόνο με μεγάλη ένταση (χαρ. 8, 9) στα άτομα *A. andrachne* και στα άτομα με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά. Στα άτομα *A. unedo* η απολέπιση δε συνέβαινε σε συγκεκριμένη χρονική περίοδο και χαρακτηριζόταν από μικρότερη ένταση. Το χρώμα του αποκαλυπτόμενου, μετά την απολέπιση, φλοιού, (χαρ. 10) ήταν πράσινο στα άτομα *A. andrachne* και στα άτομα με τα ενδιάμεσα χαρακτηριστικά, ενώ στα άτομα *A. unedo* ήταν τεφρό.

Το φύλλωμα ήταν αιθαλές για όλα τα άτομα (χαρ. 11). Τα φύλλα του *A. unedo* ήταν πιο παχιά, μεμβρανώδη με πιο τραχιά υφή (χαρ. 12) και δεν ήταν σκαφοειδή, σε αντίθεση με τα φύλλα των δύο άλλων ειδών (χαρ. 13). Τα φύλλα του *A. andrachne* (χαρ. 14) ήταν ελλειπτικά-ανεστραμμένα ωοειδή και του *A. unedo* ελλειπτικά, επιμηκυσμένα λογχοειδή, ενώ τα άτομα με τα ενδιάμεσα χαρακτηριστικά

είχαν ενδιάμεσο σχήμα και ο χαρακτήρας ήταν διακριτός στις τρεις ομάδες ατόμων που μελετήθηκαν. Τα φύλλα των ατόμων *A. unedo* έφεραν περιμετρικά οδοντώσεις, των ατόμων *A. andrachne* όχι, ενώ τα ενδιάμεσα άτομα έφεραν επίσης οδοντώσεις το ίδιο ή λιγότερο έντονα από τα άτομα *A. unedo* (χαρ. 15). Το χρώμα της κάτω επιφάνειας του φυλλώματος των φυτών *A. unedo*, ήταν πιο φωτεινό (χαρ. 16). Η εποχή ανθοφορίας άρχιζε κάθε χρόνο περί τα τέλη Οκτωβρίου έως τον Ιανουάριο για τα άτομα *A. unedo*, και από Ιανουάριο έως Απρίλιο για τα *A. andrachne*, ενώ στα άτομα με τα ενδιάμεσα χαρακτηριστικά παρουσιάστηκαν και οι δύο περιπτώσεις (χαρ. 17) (Εικ. 73).

Το χρώμα των ανθέων ήταν σε όλα τα άτομα λευκό-υποπράσινο (χαρ. 18). Η εποχή καρποφορίας (χαρ. 19) ήταν από Οκτώβριο έως Ιανουάριο σε όλα τα άτομα που μελετήθηκαν. Όσον αφορά στους καρπούς αυτοί είχαν σχήμα περισσότερο ελλειψοειδές παρά σφαιρικό, με έντονα αδενώδη επιφάνεια στα άτομα *A. unedo*, ενώ στα άλλα άτομα ήταν σφαιρικοί και ελαφρά αδενώδεις (χαρ. 20, 21). Τα άτομα H1B, H2B και H3B, δεν καρποφορούσαν σταθερά κάθε χρόνο και είχαν μικρότερη ποσότητα καρπών. Το χρώμα των καρπών σε όλα άτομα ήταν πορτοκαλί-κόκκινο (χαρ. 22). Η γεύση ήταν στυφή μόνο για τους καρπούς των *A. andrachne*, ενώ οι καρποί από τα άλλα άτομα είχαν πάντα δροσερή και γλυκιά γεύση (χαρ. 23).

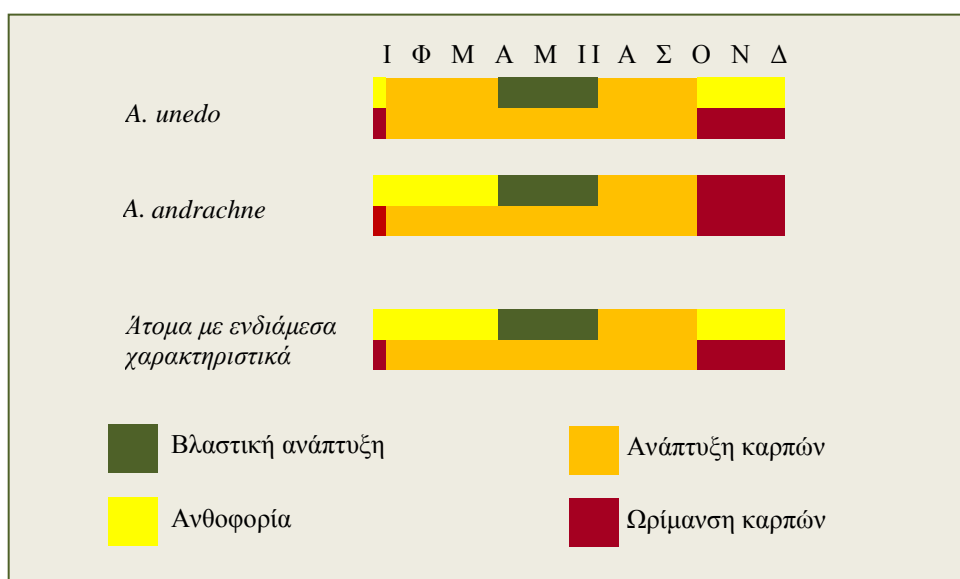
Οι ποσοτικοί χαρακτήρες που μελετήθηκαν, αφού παραμετροποιήθηκαν σε τρεις κατηγορίες τιμών (Πίν. 34) διαπιστώθηκε ότι:

- α) μήκος/πλάτος (χαρ. 24): τα άτομα *A. andrachne* πήραν τιμή 1-2, τα άτομα *A. unedo* και τα άτομα με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά τιμή 2-3.
- β) μέση επιφάνεια (cm², χαρ. 25): τα άτομα *A. andrachne* πήραν τιμή 2-3, τα άτομα *A. unedo* και τα άτομα με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά τιμή 1-2.
- γ) μήκος μίσχου (cm, χαρ. 26): τα άτομα *A. andrachne* πήραν τιμή 3, τα άτομα *A. unedo* τιμή 1 και τα άτομα με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά τιμή 2.
- δ) μέγεθος καρπού (διάμετρος σε cm, χαρ. 27): τα άτομα *A. andrachne* πήραν τιμή 1, τα άτομα *A. unedo* τιμή 3 και τα άτομα με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά τιμή 2.

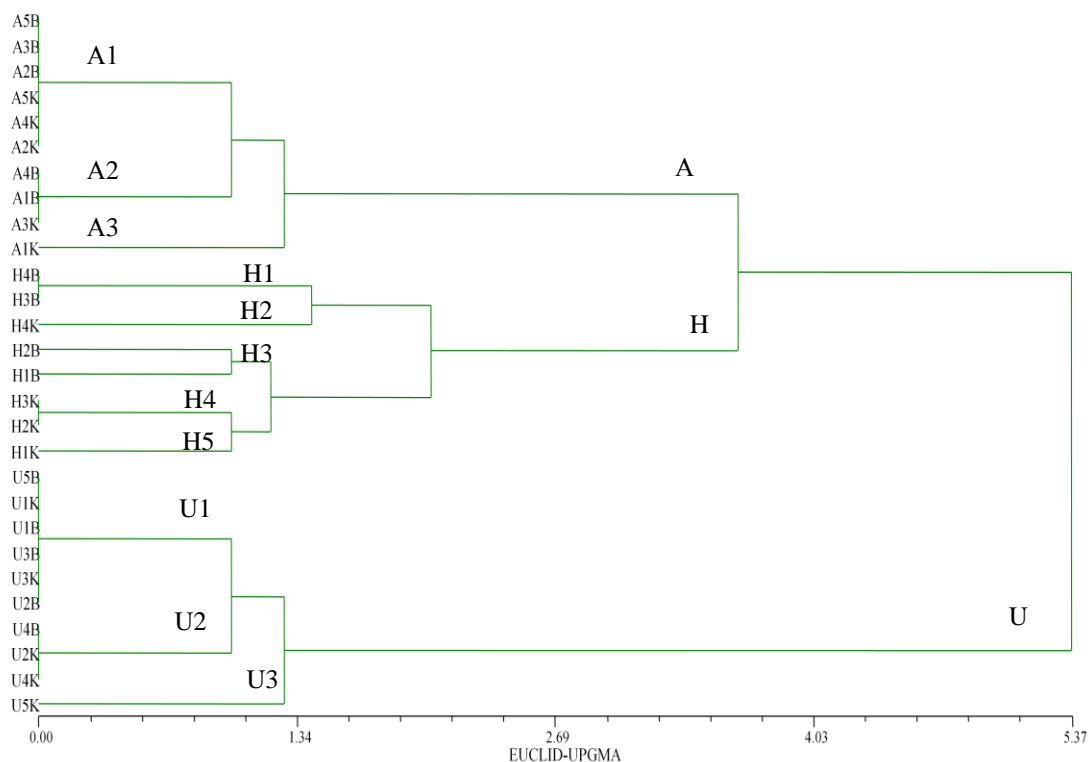
Το δενδρόγραμμα που σχηματίστηκε από τα μορφολογικά δεδομένα (Σχ. 50), ομαδοποίησε τα άτομα σε τρεις κλάδους ευδιάκριτους.

Πίν. 34. Πίνακας μορφολογικών χαρακτήρων που μελετήθηκαν με τις τιμές για κάθε άτομο. Στην πρώτη στήλη του Πίνακα αναγράφεται ο κωδικός του χαρακτήρα (ΚΑ, βλ. Πίν. 32).

ΚΑ	A5B	A4B	A3B	A2B	A1B	A5K	A4K	A3K	A2K	A1K	H4B	H3B	H2B	H1B	H4K	H3K	H2K	H1K	U5B	U4B	U3B	U2B	U1B	U5K	U4K	U3K	U2K	U1K	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	2	3	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
14	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	2	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
21	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
23	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	2	3	3	3	2	2	3	2	3	
25	3	2	3	3	2	3	3	2	3	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	
26	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	



Εικ. 73. Αναπτυξιακός (βλαστικός και αναπαραγωγικός) κύκλος των ειδών του γένους *Arbutus* που απαντούν στην Ελλάδα, στις περιοχές μελέτης (Κάλαμος και Βαρυμπόμπη), από Ιανουάριο έως Δεκέμβριο, όπως καταγράφηκε από τις παρατηρήσεις κατά τα έτη 2005-2010. Τα άτομα με τα ενδιάμεσα χαρακτηριστικά ακολουθούν είτε το *A. andrachne*, είτε το *A. unedo* στην εποχή ανθοφορίας.



Σχ. 50. Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης των 28 ατόμων *Arbutus* με την χρήση μορφολογικών χαρακτήρων, όπως προέκυψε με την μέθοδο UPGMA. Η ομαδοποίηση διαχωρίζει σε τρεις ομάδες τα άτομα (άτομα A, H και U).

Ο κλάδος των ατόμων *A. unedo* διαχωρίστηκε στο 5,37 από τον κλάδο των *A. andrachne* και των ατόμων με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά. Ο κλάδος των *A. andrachne* και ο κλάδος των ατόμων με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά είχαν μεγαλύτερη γενετική σχέση μεταξύ τους και διαχωρίστηκαν σε τιμή <4 στο δενδρόγραμμα. Τα άτομα του *A. andrachne* διαχωρίστηκαν με το δενδρόγραμμα σε δύο βασικούς κλάδους A1 και A2 που περιελάμβαναν ο πρώτος 6 άτομα και ο δεύτερος 3 άτομα. Το A1K άτομο αποτέλεσε μόνο του έναν ξεχωριστό κλάδο A3. Τα άτομα *A. unedo* επίσης διαχωρίστηκαν σε τρεις κλάδους U1, U2 και U3. Ο U1 περιελάμβανε 6 άτομα, ο U2 περιελάμβανε 3 άτομα και ένα μόνο άτομο, το U5K αποτέλεσε ξεχωριστό κλάδο (U3). Τα άτομα των κλάδων A1, A2, U1 και U2 είχαν απόσταση 0 μεταξύ τους (Πίν. 35). Στα άτομα με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά δημιουργήθηκαν πέντε διακλαδώσεις H1-H5 και μόνο οι H1 και H4 περιελάμβαναν από 2 άτομα, με 0 απόσταση (Πίν. 35), ενώ όλοι οι άλλοι περιελάμβαναν από ένα άτομο.

Πίν. 35. Οι τιμές του συντελεστή της Ευκλείδειας απόστασης για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά.

	A5B	A4B	A3B	A2B	A1B	A5K	A4K	A3K	A2K	A1K	H4B	H3B	H2B	H1B	H4K	H3K	H2K	H1K	U5B	U4B	U3B	U2B	U1B	U5K	U4K	U3K	U2K	U1K	
A5B	0,000																												
A4B	1,000	0,000																											
A3B	0,000	1,000	0,000																										
A2B	0,000	1,000	0,000	0,000																									
A1B	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000																								
A5K	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000																							
A4K	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000																						
A3K	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000																					
A2K	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000																				
A1K	1,414	1,000	1,414	1,414	1,000	1,414	1,414	1,000	1,414	0,000																			
H4B	3,606	3,464	3,606	3,606	3,464	3,606	3,606	3,464	3,606	3,317	0,000																		
H3B	3,606	3,464	3,606	3,606	3,464	3,606	3,606	3,464	3,606	3,317	0,000	0,000																	
H2B	4,000	3,606	4,000	4,000	3,606	4,000	4,000	3,606	4,000	3,464	2,236	2,236	0,000																
H1B	3,606	3,464	3,606	3,606	3,464	3,606	3,606	3,464	3,606	3,317	2,000	2,000	1,000	0,000															
H4K	4,359	4,000	4,359	4,359	4,000	4,359	4,359	4,000	4,359	3,606	1,414	1,414	2,236	2,449	0,000														
H3K	3,464	3,317	3,464	3,464	3,317	3,464	3,464	3,317	3,464	3,162	1,732	1,732	1,414	1,000	2,236	0,000													
H2K	3,464	3,317	3,464	3,464	3,317	3,464	3,464	3,317	3,464	3,162	1,732	1,732	1,414	1,000	2,236	0,000	0,000												
H1K	3,873	3,464	3,873	3,873	3,464	3,873	3,873	3,464	3,873	3,317	2,000	2,000	1,000	1,414	2,000	1,000	1,000	0,000											
U5B	6,245	6,000	6,245	6,245	6,000	6,245	6,245	6,000	6,245	5,745	4,472	4,472	4,583	4,690	4,243	4,796	4,796	4,690	0,000										
U4B	6,000	5,745	6,000	6,000	5,745	6,000	6,000	5,745	6,000	5,657	4,359	4,359	4,472	4,583	4,359	4,690	4,690	4,583	1,000	0,000									
U3B	6,245	6,000	6,245	6,245	6,000	6,245	6,245	6,000	6,245	5,745	4,472	4,472	4,583	4,690	4,243	4,796	4,796	4,690	0,000	1,000	0,000								
U2B	6,245	6,000	6,245	6,245	6,000	6,245	6,245	6,000	6,245	5,745	4,472	4,472	4,583	4,690	4,243	4,796	4,796	4,690	0,000	1,000	0,000	0,000							
U1B	6,245	6,000	6,245	6,245	6,000	6,245	6,245	6,000	6,245	5,745	4,472	4,472	4,583	4,690	4,243	4,796	4,796	4,690	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000						
U5K	5,745	5,657	5,745	5,745	5,657	5,745	5,745	5,657	5,745	5,568	4,243	4,243	4,583	4,472	4,472	4,583	4,583	4,690	1,414	1,000	1,414	1,414	1,414	0,000					
U4K	6,000	5,745	6,000	6,000	5,745	6,000	6,000	5,745	6,000	5,657	4,359	4,359	4,472	4,583	4,359	4,690	4,690	4,583	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000				
U3K	6,245	6,000	6,245	6,245	6,000	6,245	6,245	6,000	6,245	5,745	4,472	4,472	4,583	4,690	4,243	4,796	4,796	4,690	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,414	1,000	0,000			
U2K	6,000	5,745	6,000	6,000	5,745	6,000	6,000	5,745	6,000	5,657	4,359	4,359	4,472	4,583	4,359	4,690	4,690	4,583	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000		
U1K	6,245	6,000	6,245	6,245	6,000	6,245	6,245	6,000	6,245	5,745	4,472	4,472	4,583	4,690	4,243	4,796	4,796	4,690	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,414	1,000	0,000	1,000	0,000	

Η απόσταση μεταξύ των πληθυσμών είχε τις παρακάτω τιμές:

Μεταξύ ατόμων A και U: 5,657-6,245

Μεταξύ ατόμων H και U: 4,243-4,796

Μεταξύ ατόμων A και H: 3,162-4,359

Η απόσταση μεταξύ των ατόμων της ίδιας ομάδας είχε τις παρακάτω τιμές:

Μεταξύ ατόμων A: 0-1,414

Μεταξύ ατόμων U: 0-1,414

Μεταξύ ατόμων H: 0-2,449

Η απόσταση μεταξύ των ατόμων της ίδιας ομάδας, από την ίδια περιοχή συλλογής, είχε τις παρακάτω τιμές:

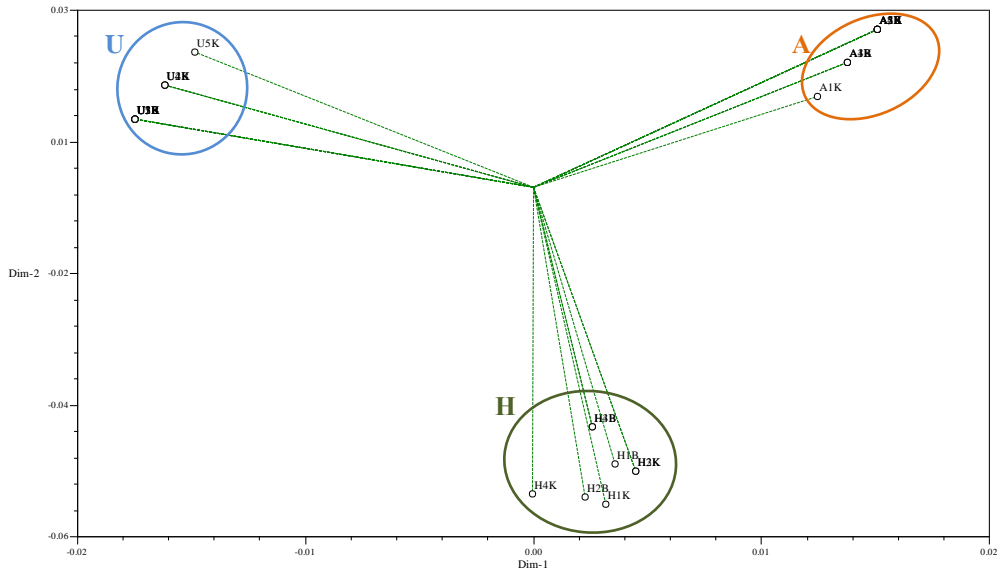
Μεταξύ ατόμων A από Βαρυμπόμπη: 0-1 και από Κάλαμο 0-1,414

Μεταξύ ατόμων U από Βαρυμπόμπη: 0-1 και από Κάλαμο 0-1,414

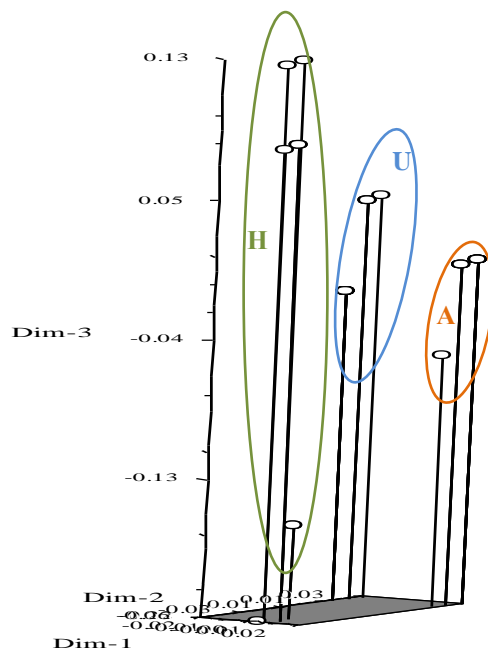
Μεταξύ ατόμων H από Βαρυμπόμπη: 0-2,236 και από Κάλαμο 0-2,236

Ο συντελεστής Mantel με χρήση συν-φαινολογικών συντελεστών για το δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε ήταν πολύ υψηλός: $r=0,96540$, δηλαδή η γραφική απεικόνιση των δεδομένων της μήτρας ήταν αντιπροσωπευτική σε ποσοστό υψηλότερο από 96 %.

Η ανάλυση των δύο πρώτων κύριων συντεταγμένων (Σχ. 51) και των τριών (Σχ. 52) επιβεβαίωσε το δενδρόγραμμα χωρίζοντας τα άτομα που μελετήθηκαν σε ομάδες με την ίδια σύνθεση του δενδρογράμματος.



Σχ. 51. Ανάλυση Κύριων Συντεταγμένων για τις 2 διαστάσεις με τη χρήση μορφολογικών χαρακτηριστικών. Τα άτομα της κάθε ομάδας, A, H και U είναι πολύ κοντά μεταξύ τους.



Σχ. 52. Ανάλυση Κύριων Συντεταγμένων για τις 3 διαστάσεις με τη χρήση μορφολογικών χαρακτηριστικών. Τα άτομα της κάθε ομάδας, A, H και U είναι πολύ κοντά μεταξύ τους.

9.3.2 Μοριακή Ανάλυση

9.3.2.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Η ποσότητα του DNA επηρεάζει σημαντικά την ενίσχυση των προϊόντων σε PCR. Οι συγκεντρώσεις του DNA στα δείγματα ήταν 45-895 ng/μl και αναλογούσε σε 9-179 μg DNA/g φρέσκου ιστού.

Δοκιμάστηκαν διάφορες ποσότητες DNA του ίδιου δείγματος (20 ng, 30 ng, 60 ng) διατηρώντας όλους τους άλλους παράγοντες σταθερούς (50 ng εκκινητή, 200 μM dNTPs, 1 μονάδα πολυμεράση, 1x ρυθμιστικό διάλυμα). Σύμφωνα με αυτές τις συγκεντρώσεις του DNA έγινε αραίωση με dH₂O έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις να κυμαίνονται 30 ng/μl σε DNA. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm δείχνει την καθαρότητα του DNA (Πίν. 36).

Ακολούθως έγιναν δοκιμές υβριδισμού, γιατί η θερμοκρασία υβριδισμού του εκκινητή (annealing) είναι πολύ σημαντικός παράγοντας, διότι έχει καθοριστικό ρόλο στο τελικό πρότυπο και είναι ανάλογη του αριθμού των βάσεων και του είδους αυτών (Sambrook *et al.*, 1989). Ο τύπος για τον υπολογισμό της θερμοκρασίας υβριδισμού είναι: $\Sigma(A+T) \times 2^{\circ}\text{C} + \Sigma(C+G) \times 4^{\circ}\text{C} = T_{\text{υβριδισμού}}$.

Για κάθε A και T χρειάζονται 2 °C και για C και G 4 °C. Έτσι για ένα εκκινητή με 10 βάσεις και αναλογία CG 50% ή 60%, η ενδεικτική θερμοκρασία υβριδισμού κυμαίνεται από 34 °C έως 36 °C. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία όμως, η πιθανότητα μη εξειδικευμένου υβριδισμού του εκκινητή μειώνεται. Έτσι δημιουργείται σχεδόν τέλειος υβριδισμός μεταξύ του εκκινητή και της μήτρας (γονιδιωματικό DNA) και υπάρχει επανάληψη στα προϊόντα που ενισχύονται. Επιλέχθηκε λοιπόν η θερμοκρασία των 44 °C, όπου προέκυψε το καλύτερο πρότυπο με μεγάλο αριθμό ζωνών, με καλύτερο διαχωρισμό και επαναληψιμότητα, όπως εμφανίστηκε στα ηλεκτροφορήματα των προϊόντων της αντίδρασης, όπως αναφέρει και η Μπινιάρη (2000).

Οι συνθήκες ενίσχυσης ήταν 5 min στους 94 °C, στη συνέχεια και για 35 κύκλους 1 min στους 94 °C, 1,30 min στους 44 °C, 3,00 min στους 72 °C για 35 κύκλους και τέλος 10,00 min στους 72 °C. Όταν υπάρχει μεγάλη ποσότητα DNA στην αντίδραση, ο εκκινητής παρεμποδίζεται και δεν υβριδίζει, γι' αυτό όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι σε τέτοιες συγκεντρώσεις που να μην παρεμποδίζει το ένα το άλλο. Το ηλεκτροφορητικό πρότυπο που παράχθηκε με την χρησιμοποίηση 60

ng DNA ήταν το καλύτερο και καθαρότερο για τις συνθήκες του πειράματος. Για την διάκριση και ταυτοποίηση των 28 ατόμων χρησιμοποιήθηκαν 15 εκκινητές και από αυτούς οι 12 εμφάνισαν δύο τουλάχιστον πολυμορφικές ζώνες. Στο Παράρτημα φαίνεται η παρουσία (1) ή η απουσία (0) των ηλεκτροφορητικών ζωνών ανά εκκινητή και άτομο. Στον Πίνακα 36 παρουσιάζονται οι εκκινητές και ο αριθμός των ενισχυμένων προϊόντων (ηλεκτροφορητικές ζώνες), ο αριθμός πολυμορφικών ζωνών και το ποσοστό πολυμορφισμού.

Πίν. 36. Απορρόφηση DNA για τα 28 άτομα, συγκέντρωση και καθαρότητα DNA.

Άτομο	260 nm	280 nm	Καθαρότητα A260/A280	Ποσότητα DNA (ng/μl)
A1 K	0,022	0,014	1,57	110
A2 K	0,134	0,127	1,06	670
A3 K	0,013	0,010	1,30	65
A4 K	0,026	0,016	1,60	130
A5 K	0,023	0,020	1,15	115
A1 B	0,179	0,122	1,47	895
A2 B	0,009	0,008	1,13	45
A3 B	0,071	0,055	1,29	355
A4 B	0,020	0,015	1,33	100
A5 B	0,019	0,015	1,27	95
U1 K	0,010	0,008	1,25	50
U2 K	0,021	0,014	1,50	105
U3 K	0,024	0,018	1,33	120
U4 K	0,097	0,088	1,10	485
U5 K	0,028	0,027	1,04	140
U1 B	0,065	0,052	1,25	325
U2 B	0,042	0,030	1,40	210
U3 B	0,016	0,012	1,33	80
U4 B	0,023	0,015	1,15	115
U5 B	0,038	0,030	1,27	190
H1 K	0,018	0,016	1,13	90
H2 K	0,047	0,032	1,47	235
H3 K	0,029	0,021	1,38	145
H4 K	0,030	0,022	1,36	150
H1 B	0,030	0,021	1,43	150
H2 B	0,019	0,013	1,46	95
H3 B	0,017	0,013	1,31	85
H4 B	0,029	0,022	1,32	145

9.3.2.2 Πολυμορφισμός εκκινητών

Το ποσοστό πολυμορφισμού ήταν γενικά υψηλό, μεγαλύτερο από 50 % εκτός του εκκινητή 1227 (36,36%). Οι εκκινητές μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον πολυμορφισμό που εμφάνισαν:

α) *Με υψηλό πολυμορφισμό:* Εκκινητές που εμφάνισαν πάνω από 15 ηλεκτροφορητικές ζώνες. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι εκκινητές 1224, OPF-01, OPF-02, OPF-03, OPF-04, OPM-18 (Πίν. 37). Οι εκκινητές OPF-01, OPF-02 και OPM-18 (Εικ. 71, 72) είναι κατάλληλοι για να διαχωρίσουν τα άτομα *A. unedo*. Οι εκκινητές OPM-18 και OPF-01 έδωσαν τον μεγαλύτερο αριθμό ενισχυμένων ζωνών DNA, σχηματίζοντας 21 ηλεκτροφορητικές ζώνες από τις οποίες πολυμορφικές ήταν οι 16 και 12 αντίστοιχα (Εικ. 71, 72). Ο εκκινητής OPF-04 (Εικ. 72) σχημάτισε 25 διαφορετικά ηλεκτροφορητικά πρότυπα και μόνο τα άτομα H4K-H2K, U4B-U2B και U5K-U1K σχημάτισαν ανά δύο κοινά ηλεκτροφορητικά πρότυπα. Ο εκκινητής OPF-03 (Εικ. 72) έδωσε 18 ηλεκτροφορητικά πρότυπα και ήταν κατάλληλος για τον διαχωρισμό των *A. andrachne* καθώς και τη διάκριση των A1B, A5B, A5K, A4K, A3K, A3B, A2B, A4B, U1B, U3B, U4K, H1B, H3B. Ο OPF-02 (Εικ. 71) ήταν κατάλληλος για τον διαχωρισμό των τριών ειδών, έδωσε 9 ηλεκτροφορητικά πρότυπα και μπόρεσε να ξεχωρίσει τα άτομα A5B, H1B, H2B και U4B. Ο OPF-01 (Εικ. 71) έδωσε 9 ηλεκτροφορητικά πρότυπα και ήταν κατάλληλος για τον διαχωρισμό των τριών ειδών και τον προσδιορισμό των ατόμων A1K, H2B, H4B και U2K.

β) *Με μέτριο πολυμορφισμό:* Εκκινητές που εμφάνισαν 10-15 ηλεκτροφορητικές ζώνες. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι εκκινητές 1227, OPF-06, OPM-11 (Εικ. 73, Πίν. 37). Ο εκκινητής 1227 σχημάτισε μόνο 3 ηλεκτροφορητικά πρότυπα, ένα για κάθε είδος και ήταν κατάλληλος για τον διαχωρισμό των ατόμων *Arbutus* στα τρία είδη. Ο OPF-06 ήταν κατάλληλος για να διαχωρίσει τα άτομα *A. andrachne* παρουσιάζοντας 19 ηλεκτροφορητικά πρότυπα. Ο OPM-11 έδωσε 10 ηλεκτροφορητικά πρότυπα και ήταν κατάλληλος για τον προσδιορισμό των ατόμων A2B, A5B, A4K, U2B, U2K και U4K.

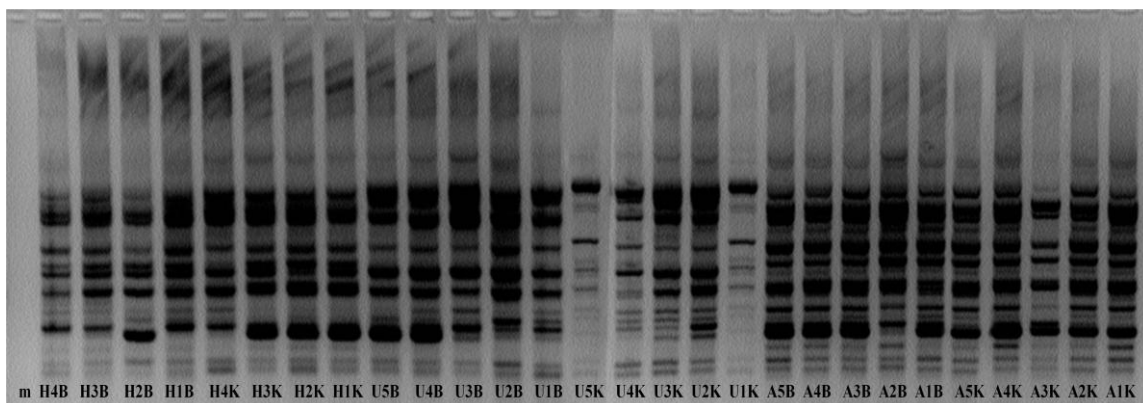
γ) *Με χαμηλό πολυμορφισμό:* Εκκινητές που σχημάτισαν έως 10 ηλεκτροφορητικές ζώνες. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι εκκινητές 1225, 1226 και OPM-14 (Εικ. 74, Πίν. 37). Ο εκκινητής OPM-14 έδωσε τον μικρότερο αριθμό ενισχυμένων ζωνών (7 ζώνες), αλλά ήταν κατάλληλος για να διαχωρίσει τα άτομα *A. unedo*, όπως και ο εκκινητής 1225 που έδωσε 9 ηλεκτροφορητικά πρότυπα. Ο εκκινητής 1226 έδωσε 6

ηλεκτροφορητικά πρότυπα, διαχώρισε τα άτομα *A. andrachne* και ήταν κατάλληλος να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του U2K.

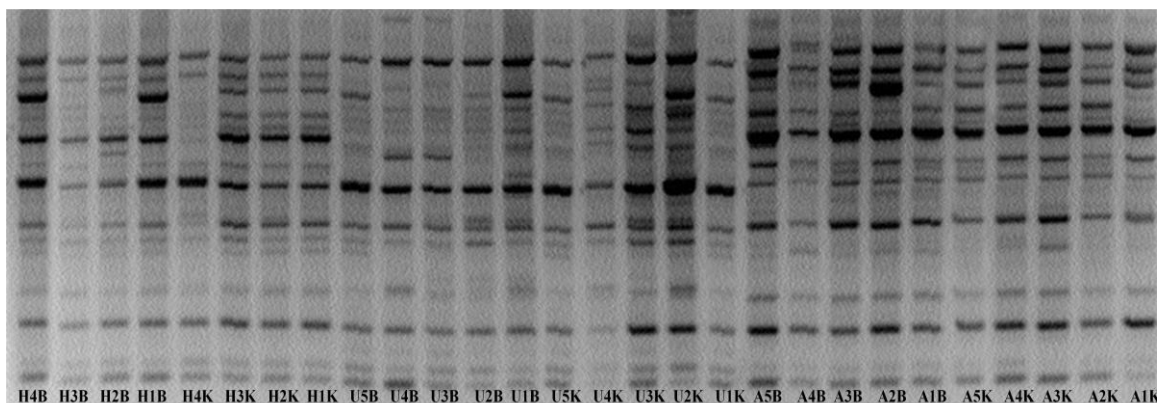
Στο σύνολο των 166 ζωνών, οι 105 είναι πολυμορφικές που σημαίνει ότι το ποσοστό πολυμορφισμού είναι 63,25%. Το υψηλότερο ποσοστό πολυμορφισμού παρουσίασαν οι εκκινητές OPM-18 και OPM-14 (ποσοστό πολυμορφισμού 76,19% και 71,43%). Ο αριθμός των ενισχυμένων ζωνών DNA που αντιστοιχεί σε κάθε εκκινητή κυμάνθηκε από 7 έως 21 και στις πολυμορφικές ζώνες από 4 έως 16. Σε κάθε εκκινητή αντιστοίχησαν, κατά μέσο όρο, 13,83 ενισχυμένες ζώνες DNA εκ των οποίων 8,75 πολυμορφικές.

Πίν. 37. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, αλληλουχία των βάσεων, αριθμός των ενισχυμένων προϊόντων, αριθμός πολυμορφικών ζωνών και ποσοστό πολυμορφισμού (%).

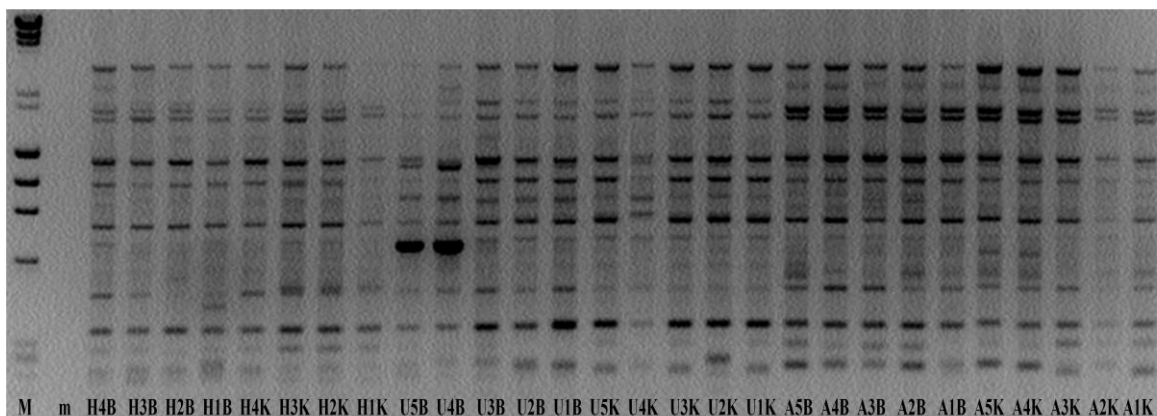
Κωδικός	Αλληλουχία 5' → 3'	Αριθμός Ενισχυμένων Προϊόντων	Αριθμός Πολυμορφικών Ζωνών	Ποσοστό Πολυμορφισμού (%)
1224	CAGGCCCTTC	15	10	66,67
1225	AGGTGACCGT	9	6	66,67
1226	CGCAGGATGG	8	4	50,00
1227	GTGTGCCCCA	11	4	36,36
OPF-01	ACGGATCCTG	21	12	57,14
OPF-02	GAGGATCCCT	17	12	70,58
OPF-03	CCTGATCACC	16	10	62,50
OPF-04	GGTGATCAGG	16	11	68,75
OPF-06	GGGAATTCGG	13	9	69,23
OPM-11	GTCCACTGTG	12	6	50,00
OPM-14	AGGGTCGTTC	7	5	71,43
OPM-18	CACCATCCGT	21	16	76,19
Σύνολο:		166	105	63,25



1224

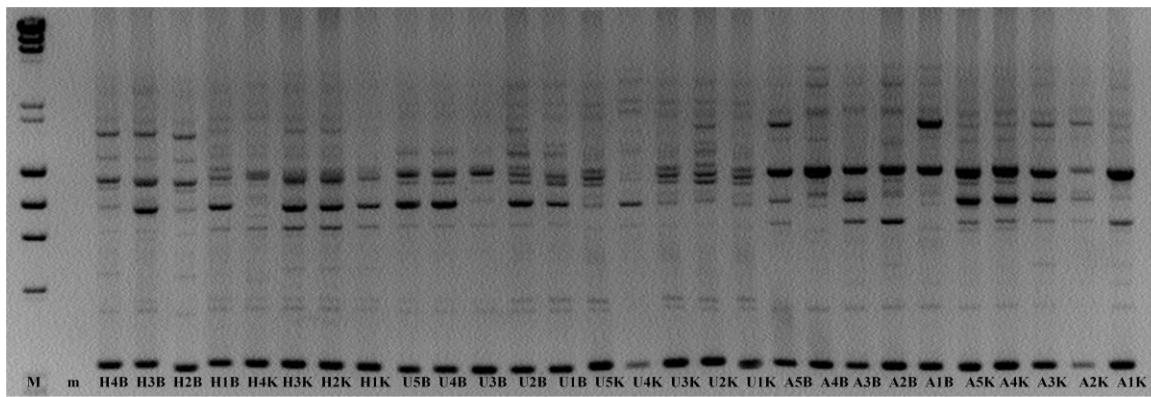


OPF-01

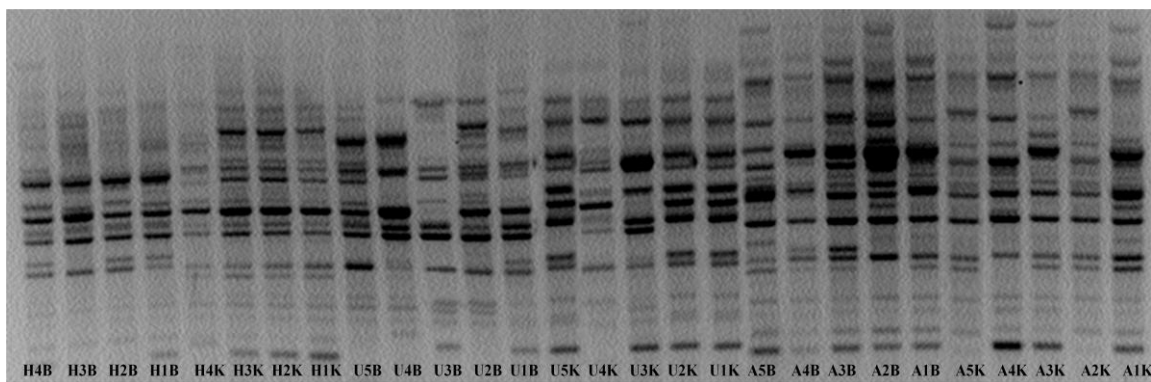


OPF-02

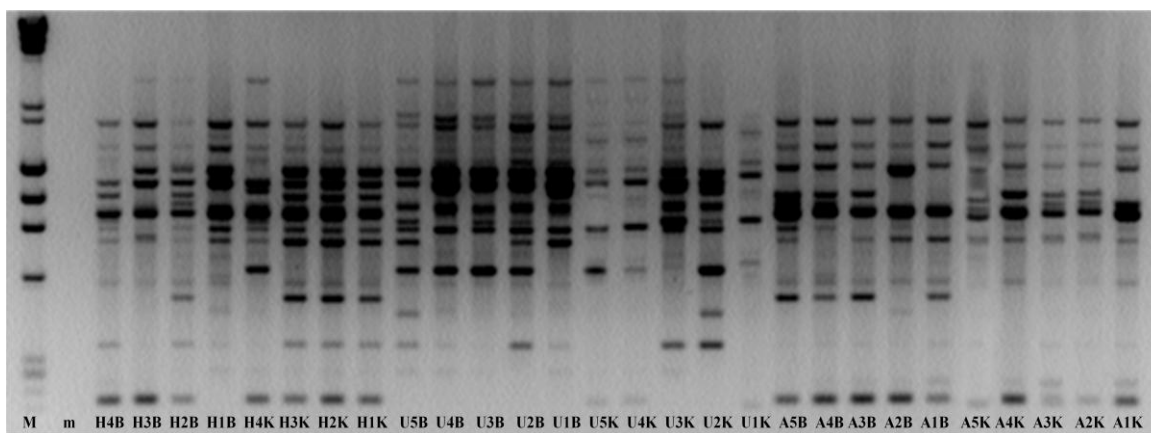
Εικ. 71. Πηκτή αγαρόζης των 28 δειγμάτων *Arbutus* μετά την ενίσχυση με τους εκκινητές υψηλού πολυμορφισμού: 1224, OPF-01, OPF-02.



OPF-03

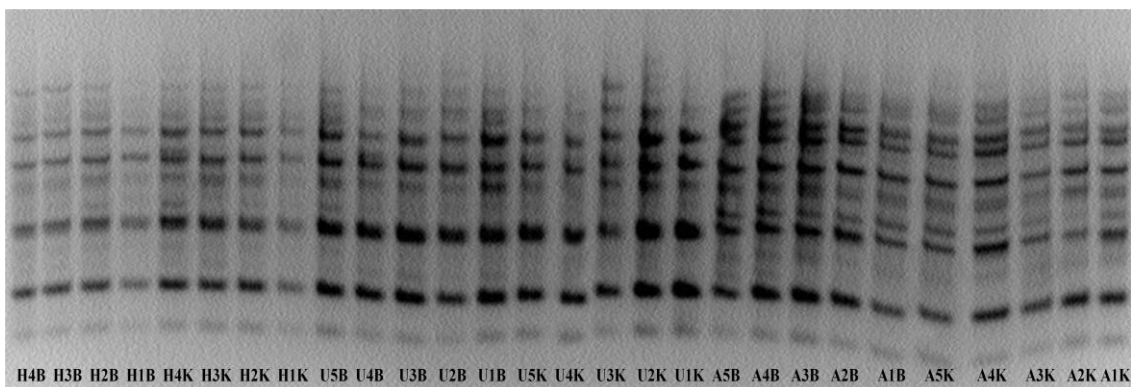


OPF-04

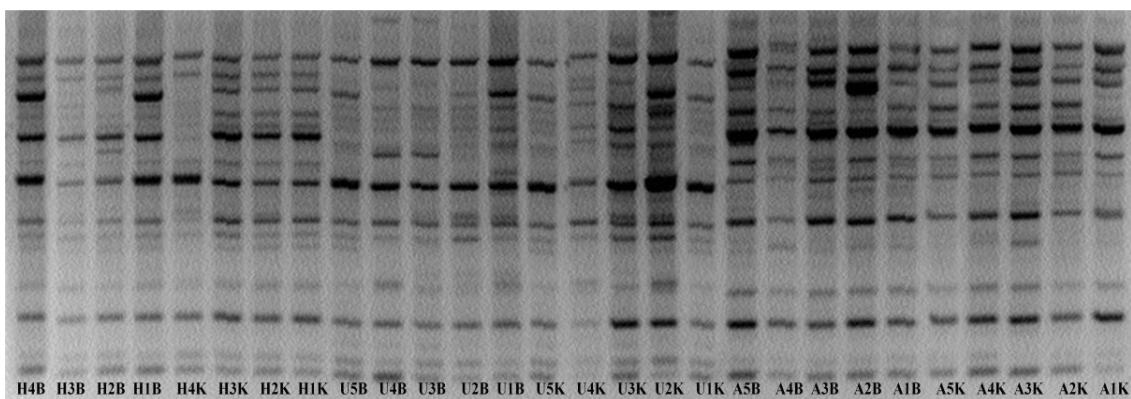


OPM-18

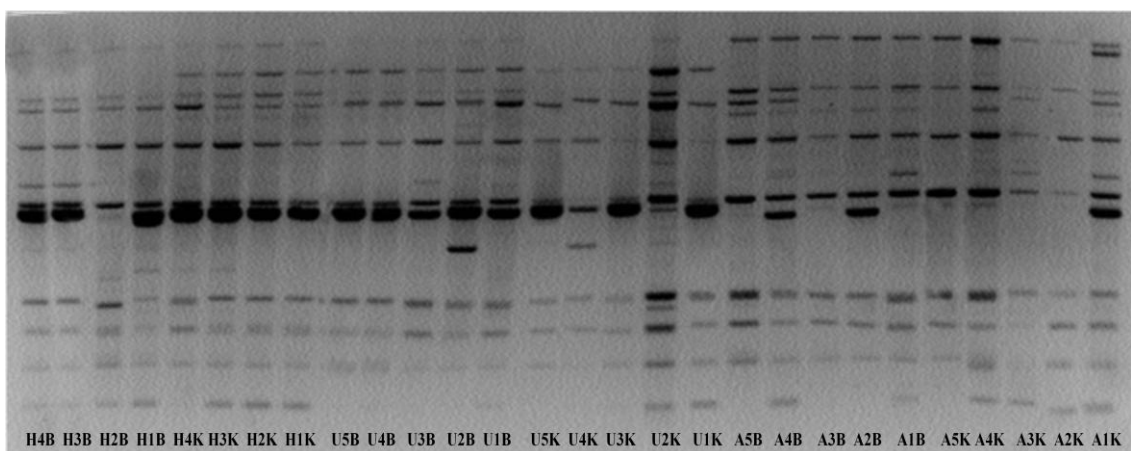
Εικ. 72. Πηκτή αγαρόζης των 28 δειγμάτων *Arbutus* μετά την ενίσχυση με τους εκκινητές υψηλού πολυμορφισμού: OPF-03, OPF-04, OPM-18.



1227

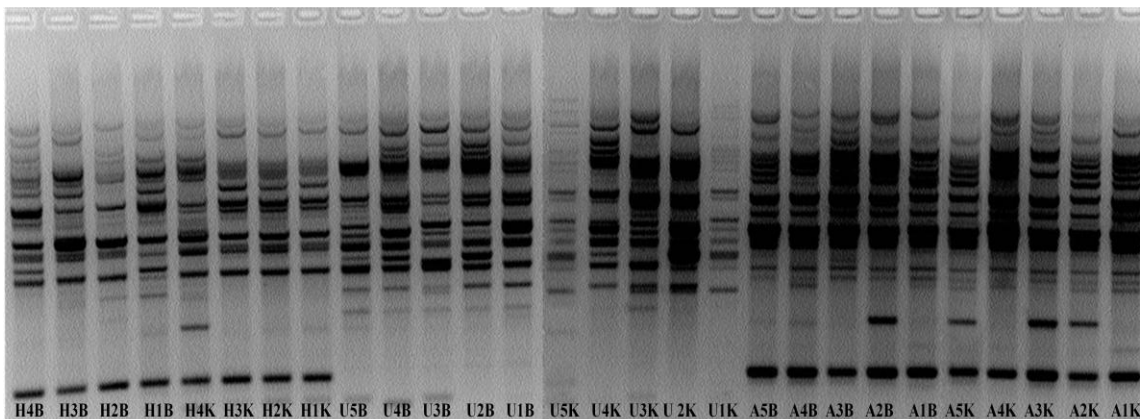


OPF-06

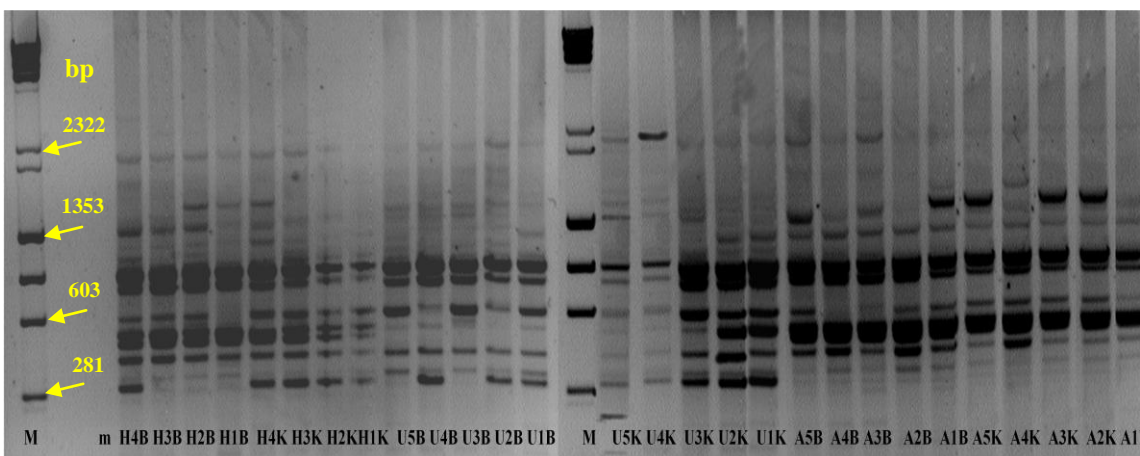


OPM-11

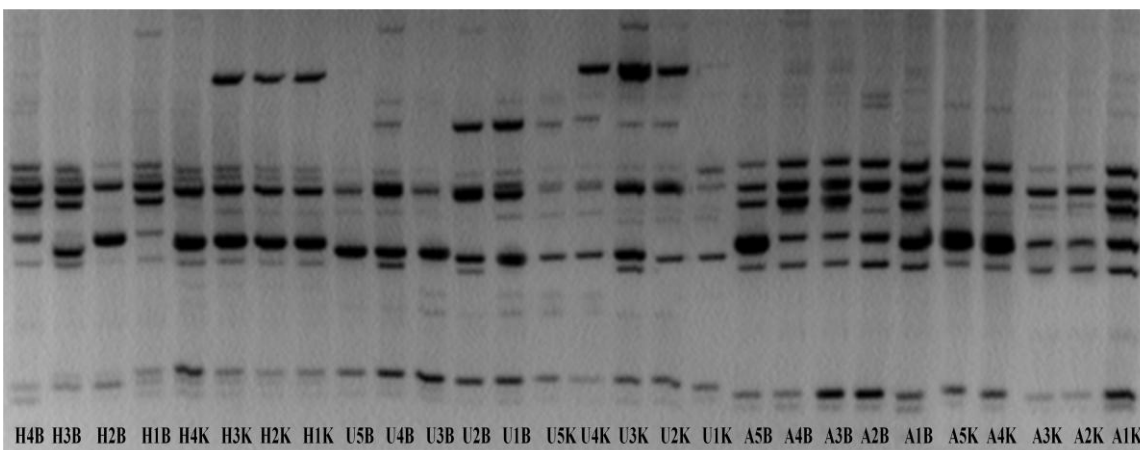
Εικ. 73. Πηκτή αγαρόζης των 28 δειγμάτων *Arbutus* μετά την ενίσχυση με τους εκκινητές μέτρου πολυμορφισμού 1227, OPF-06, OPM-11.



1225



1226



OPM-14

Εικ. 74. Πηκτή αγαρόζης των 28 δειγμάτων *Arbutus* μετά την ενίσχυση με τους εκκινητές χαμηλού πολυμορφισμού 1225, 1226, OPM-14.

Ο συντελεστής ομοιότητας του Simple Matching (SM), κυμάνθηκε από 0,542-1,000 και του Jaccard (JAC) 0,486-1,000. Ο συντελεστής ομοιότητας (SM) μεταξύ ατόμων *A. andrachne* (A) ήταν 0,861-0,976, μεταξύ ατόμων *A. unedo* (U) 0,831-0,958 και μεταξύ ατόμων με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά (H) 0,855-1,000. Ο συντελεστής ομοιότητας (SM) μεταξύ ατόμων (A) και ατόμων (H) ήταν 0,729-0,813, μεταξύ ατόμων (A) και (U) 0,542-0,639 και μεταξύ ατόμων (U) και (H) 0,645-0,729 (Πίν. 36). Ο συντελεστής ομοιότητας (SM) μεταξύ ατόμων (A) και ατόμων (H) ήταν 0,679-0,763, μεταξύ ατόμων (A) και (U) 0,486-0,574 και μεταξύ ατόμων (U) και (H) 0,582-0,676. Ο συντελεστής ομοιότητας (JAC) μεταξύ ατόμων (A) ήταν 0,820-0,927, μεταξύ ατόμων (U) 0,774-0,931 και μεταξύ ατόμων (H) 0,815-1,000 (Πίν. 37).

Ο μεγαλύτερος βαθμός γενετικής ομοιότητας ($I=1$, ταυτότητα) παρατηρήθηκε ανάμεσα στα άτομα H2K και H3K. Τα άτομα (U) και (A) εμφάνισαν τον μικρότερο βαθμό γενετικής ομοιότητας μεταξύ τους, ενώ τον μεγαλύτερο βαθμό γενετικής ομοιότητας εμφάνισαν άτομα (A) και άτομα (H) και με τους δύο δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν.

Ο συντελεστής ομοιότητας SM (Πίν. 38) μεταξύ των ατόμων της ίδιας ομάδας, από την ίδια περιοχή συλλογής, είχε τις παρακάτω τιμές: Μεταξύ ατόμων A από Βαρυμπόμπη: 0,880-0,922 και από Κάλαμο 0,916-0,976. Μεταξύ ατόμων U από Βαρυμπόμπη: 0,886-0,934 και από Κάλαμο 0,843-0,985. Μεταξύ ατόμων H από Βαρυμπόμπη: 0,873-0,910 και από Κάλαμο 0,898-1,000.

Ο συντελεστής ομοιότητας JAC (Πίν. 39) μεταξύ των ατόμων της ίδιας ομάδας, από την ίδια περιοχή συλλογής, είχε τις παρακάτω τιμές: Μεταξύ ατόμων A από Βαρυμπόμπη: 0,843-0,893 και από Κάλαμο 0,863-0,927. Μεταξύ ατόμων U από Βαρυμπόμπη: 0,840-0,904 και από Κάλαμο 0,785-0,931. Μεταξύ ατόμων H από Βαρυμπόμπη: 0,835-0,880 και από Κάλαμο 0,869-1,000. Στα δένδρογράμματα που έγιναν με τους δύο συντελεστές ομοιότητας SM και JAC (Σχ. 53, 54) παρουσιάζεται διαχωρισμός των ατόμων σε τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα άτομα του *A. andrachne*. Η επόμενη ομάδα, η οποία συνδέεται με την πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα άτομα με ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά και η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τα άτομα *A. unedo*. Ο συντελεστής του Mantel για την αντιπροσωπευτικότητα των δένδρογραμμάτων των SM και JAC έδωσε συντελεστή συσχέτισης $r=0,95461$ και $r=0,96041$, αντίστοιχα.

Τα διαγράμματα των δύο (Σχ. 55, 56) και τριών διαστάσεων (Σχ. 57, 58) επιβεβαιώνουν τα δένδρογράμματα και με τους δύο συντελεστές που

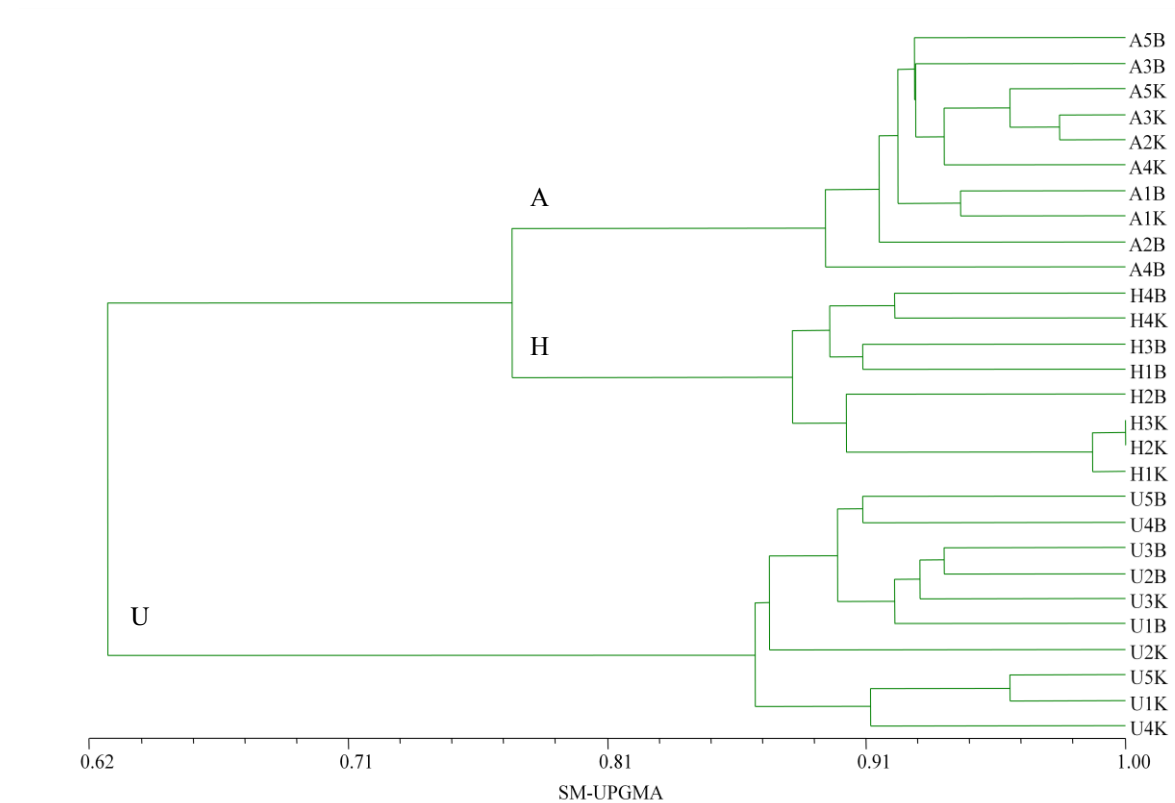
χρησιμοποιήθηκαν, χωρίζοντας τα άτομα σε τρεις ομάδες με την ίδια ακριβώς σύνθεση που είχαν και στα δενδρογράμματα. Η σύγκριση των δενδρογραμμάτων των μορφολογικών χαρακτηριστικών και των RAPDs με τον συντελεστή Mantel, έδωσε τιμή συντελεστή συχέτισης $r=-0,95750$ και $r=-0,95174$ με τα δενδρογράμματα των συντελεστών SM και JAC αντίστοιχα (Εικ. 59, Εικ. 60).

Πίν. 38. Οι τιμές του συντελεστή ομοιότητας του Simple Matching.

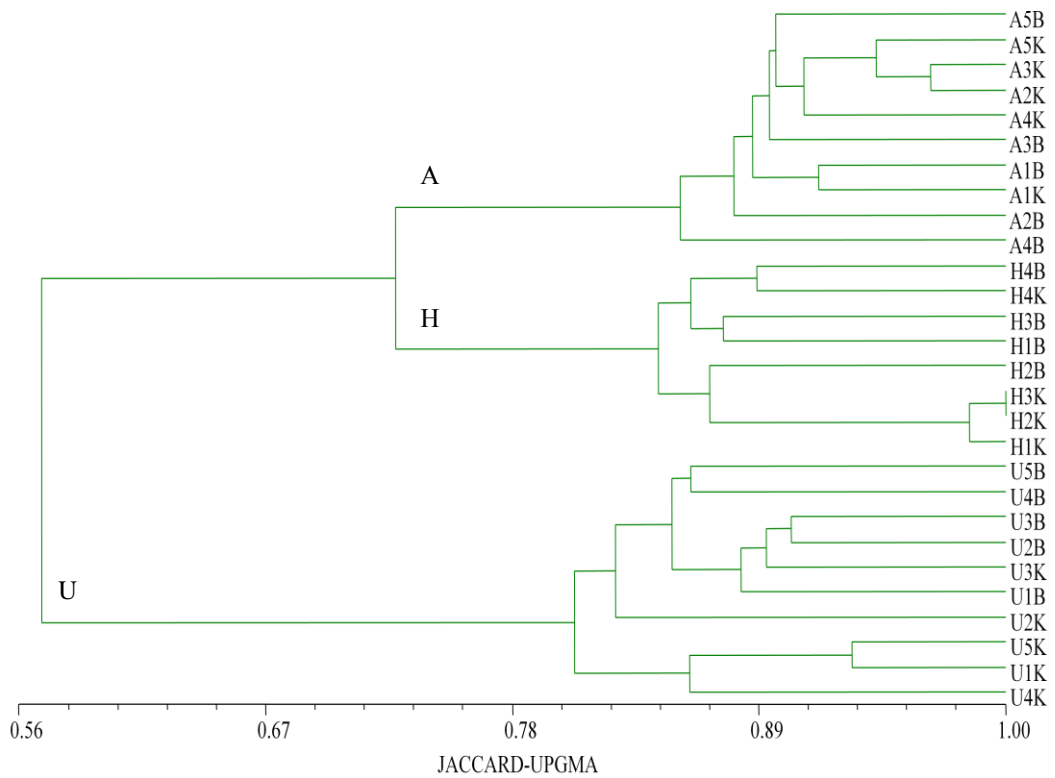
	A5B	A4B	A3B	A2B	A1B	A5K	A4K	A3K	A2K	A1K	H4B	H3B	H2B	H1B	H4K	H3K	H2K	H1K	U5B	U4B	U3B	U2B	U1B	U5K	U4K	U3K	U2K	U1K	
A5B	1,000																												
A4B	0,892	1,000																											
A3B	0,922	0,922	1,000																										
A2B	0,880	0,892	0,910	1,000																									
A1B	0,916	0,904	0,922	0,904	1,000																								
A5K	0,898	0,861	0,904	0,934	0,898	1,000																							
A4K	0,928	0,880	0,922	0,916	0,916	0,934	1,000																						
A3K	0,940	0,892	0,934	0,916	0,928	0,946	0,928	1,000																					
A2K	0,928	0,880	0,934	0,904	0,916	0,970	0,940	0,976	1,000																				
A1K	0,904	0,892	0,898	0,916	0,940	0,922	0,916	0,940	0,928	1,000																			
H4B	0,807	0,783	0,813	0,807	0,771	0,789	0,807	0,795	0,783	0,795	1,000																		
H3B	0,789	0,753	0,771	0,789	0,789	0,783	0,789	0,777	0,777	0,801	0,910	1,000																	
H2B	0,783	0,759	0,777	0,747	0,735	0,777	0,771	0,759	0,771	0,759	0,880	0,873	1,000																
H1B	0,765	0,765	0,771	0,789	0,729	0,795	0,765	0,765	0,765	0,765	0,910	0,904	0,873	1,000															
H4K	0,783	0,747	0,753	0,771	0,735	0,753	0,759	0,759	0,747	0,759	0,916	0,886	0,855	0,861	1,000														
H3K	0,789	0,777	0,783	0,765	0,765	0,771	0,789	0,777	0,777	0,789	0,886	0,880	0,898	0,855	0,898	1,000													
H2K	0,789	0,777	0,783	0,765	0,765	0,771	0,789	0,777	0,777	0,789	0,886	0,880	0,898	0,855	0,898	1,000	1,000												
H1K	0,789	0,777	0,783	0,765	0,777	0,771	0,789	0,777	0,777	0,801	0,886	0,892	0,898	0,855	0,898	0,988	0,988	1,000											
U5B	0,590	0,590	0,596	0,639	0,566	0,620	0,602	0,590	0,590	0,627	0,675	0,669	0,687	0,657	0,711	0,693	0,693	0,693	1,000										
U4B	0,566	0,602	0,596	0,602	0,566	0,596	0,590	0,578	0,578	0,627	0,675	0,669	0,699	0,657	0,687	0,681	0,681	0,693	0,904	1,000									
U3B	0,578	0,590	0,572	0,590	0,542	0,572	0,566	0,566	0,554	0,590	0,675	0,669	0,687	0,669	0,699	0,657	0,657	0,657	0,916	0,916	1,000								
U2B	0,596	0,572	0,578	0,596	0,560	0,590	0,584	0,584	0,572	0,608	0,693	0,687	0,717	0,687	0,729	0,699	0,699	0,699	0,910	0,898	0,934	1,000							
U1B	0,584	0,608	0,590	0,620	0,572	0,590	0,572	0,584	0,572	0,620	0,693	0,687	0,705	0,687	0,705	0,699	0,699	0,699	0,886	0,886	0,910	0,916	1,000						
U5K	0,560	0,572	0,590	0,584	0,572	0,590	0,584	0,560	0,572	0,596	0,681	0,675	0,705	0,651	0,669	0,663	0,663	0,675	0,861	0,873	0,861	0,855	0,855	1,000					
U4K	0,554	0,590	0,596	0,627	0,578	0,584	0,590	0,578	0,566	0,602	0,675	0,669	0,663	0,645	0,675	0,645	0,645	0,645	0,843	0,867	0,904	0,886	0,873	0,898	1,000				
U3K	0,590	0,602	0,584	0,590	0,542	0,584	0,578	0,566	0,566	0,590	0,699	0,681	0,711	0,705	0,699	0,681	0,681	0,681	0,855	0,892	0,928	0,922	0,922	0,861	0,867	1,000			
U2K	0,566	0,566	0,560	0,590	0,542	0,584	0,566	0,554	0,554	0,578	0,663	0,657	0,663	0,681	0,699	0,669	0,669	0,669	0,843	0,831	0,880	0,873	0,886	0,849	0,867	0,904	1,000		
U1K	0,578	0,578	0,596	0,602	0,578	0,584	0,578	0,566	0,566	0,590	0,711	0,705	0,711	0,681	0,699	0,645	0,645	0,657	0,843	0,855	0,880	0,861	0,873	0,958	0,916	0,867	0,843	1,000	

Πίν. 39. Οι τιμές του συντελεστή ομοιότητας του Jaccard.

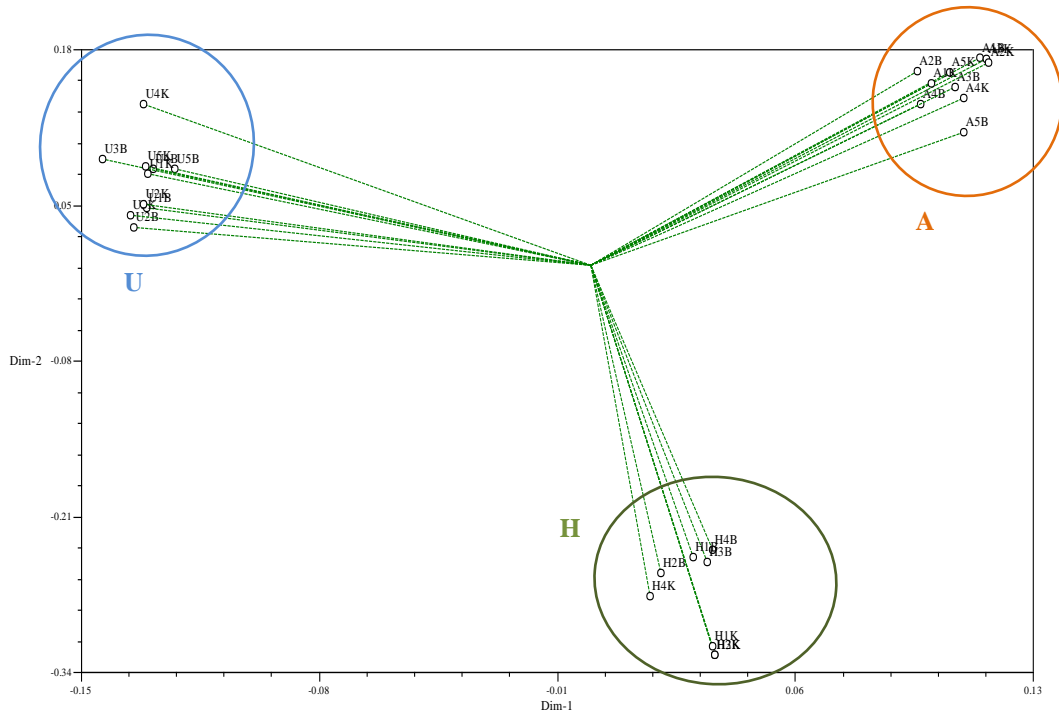
	A5B	A4B	A3B	A2B	A1B	A5K	A4K	A3K	A2K	A1K	H4B	H3B	H2B	H1B	H4K	H3K	H2K	H1K	U5B	U4B	U3B	U2B	U1B	U5K	U4K	U3K	U2K	U1K	
A5B	1,000																												
A4B	0,857	1,000																											
A3B	0,893	0,893	1,000																										
A2B	0,843	0,856	0,877	1,000																									
A1B	0,886	0,870	0,892	0,870	1,000																								
A5K	0,865	0,820	0,870	0,910	0,863	1,000																							
A4K	0,902	0,841	0,893	0,886	0,885	0,910	1,000																						
A3K	0,919	0,858	0,910	0,888	0,902	0,927	0,903	1,000																					
A1K	0,872	0,856	0,862	0,886	0,917	0,894	0,886	0,919	0,902	1,000																			
H4B	0,761	0,733	0,763	0,759	0,719	0,741	0,759	0,750	0,733	0,746	1,000																		
H3B	0,741	0,701	0,716	0,739	0,737	0,733	0,739	0,730	0,726	0,752	0,880	1,000																	
H2B	0,733	0,706	0,722	0,693	0,679	0,726	0,719	0,710	0,719	0,706	0,843	0,835	1,000																
H1B	0,719	0,717	0,721	0,743	0,679	0,750	0,717	0,721	0,717	0,717	0,882	0,874	0,837	1,000															
H4K	0,737	0,698	0,701	0,723	0,683	0,705	0,710	0,714	0,698	0,710	0,889	0,852	0,815	0,826	1,000														
H3K	0,748	0,734	0,737	0,721	0,719	0,729	0,746	0,738	0,734	0,746	0,855	0,847	0,868	0,822	0,870	1,000													
H2K	0,748	0,734	0,737	0,721	0,719	0,729	0,746	0,738	0,734	0,746	0,855	0,847	0,868	0,822	0,870	1,000	1,000												
H1K	0,746	0,732	0,735	0,719	0,730	0,727	0,745	0,736	0,732	0,757	0,854	0,860	0,867	0,821	0,869	0,984	0,984	1,000											
U5B	0,534	0,531	0,531	0,574	0,507	0,559	0,542	0,537	0,531	0,563	0,612	0,604	0,620	0,599	0,650	0,638	0,638	0,636	1,000										
U4B	0,514	0,542	0,531	0,542	0,507	0,538	0,531	0,527	0,521	0,563	0,612	0,604	0,632	0,599	0,626	0,627	0,627	0,636	0,860	1,000									
U3B	0,524	0,531	0,510	0,531	0,486	0,517	0,510	0,517	0,500	0,531	0,612	0,604	0,620	0,610	0,638	0,604	0,604	0,601	0,876	0,876	1,000								
U2B	0,550	0,527	0,527	0,547	0,513	0,544	0,537	0,543	0,527	0,558	0,638	0,631	0,659	0,636	0,676	0,653	0,653	0,650	0,872	0,856	0,904	1,000							
U1B	0,540	0,558	0,537	0,568	0,523	0,544	0,527	0,543	0,527	0,568	0,638	0,631	0,647	0,636	0,652	0,653	0,653	0,650	0,840	0,840	0,872	0,883	1,000						
U5K	0,497	0,503	0,514	0,514	0,500	0,521	0,514	0,500	0,503	0,525	0,607	0,600	0,629	0,583	0,599	0,600	0,600	0,609	0,798	0,814	0,798	0,797	0,797	1,000					
U4K	0,503	0,531	0,531	0,563	0,517	0,527	0,531	0,527	0,510	0,542	0,612	0,604	0,597	0,587	0,614	0,593	0,593	0,590	0,782	0,812	0,860	0,840	0,825	0,847	1,000				
U3K	0,544	0,551	0,531	0,541	0,497	0,537	0,530	0,526	0,520	0,541	0,643	0,624	0,652	0,652	0,645	0,634	0,634	0,632	0,802	0,847	0,896	0,891	0,891	0,803	0,817	1,000			
U2K	0,532	0,529	0,520	0,550	0,506	0,546	0,529	0,526	0,519	0,539	0,616	0,610	0,614	0,637	0,653	0,631	0,631	0,628	0,792	0,778	0,836	0,833	0,848	0,793	0,821	0,870	1,000		
U1K	0,510	0,507	0,518	0,529	0,504	0,514	0,507	0,503	0,497	0,518	0,636	0,629	0,634	0,610	0,627	0,582	0,582	0,590	0,774	0,789	0,821	0,803	0,819	0,931	0,872	0,810	0,785	1,000	



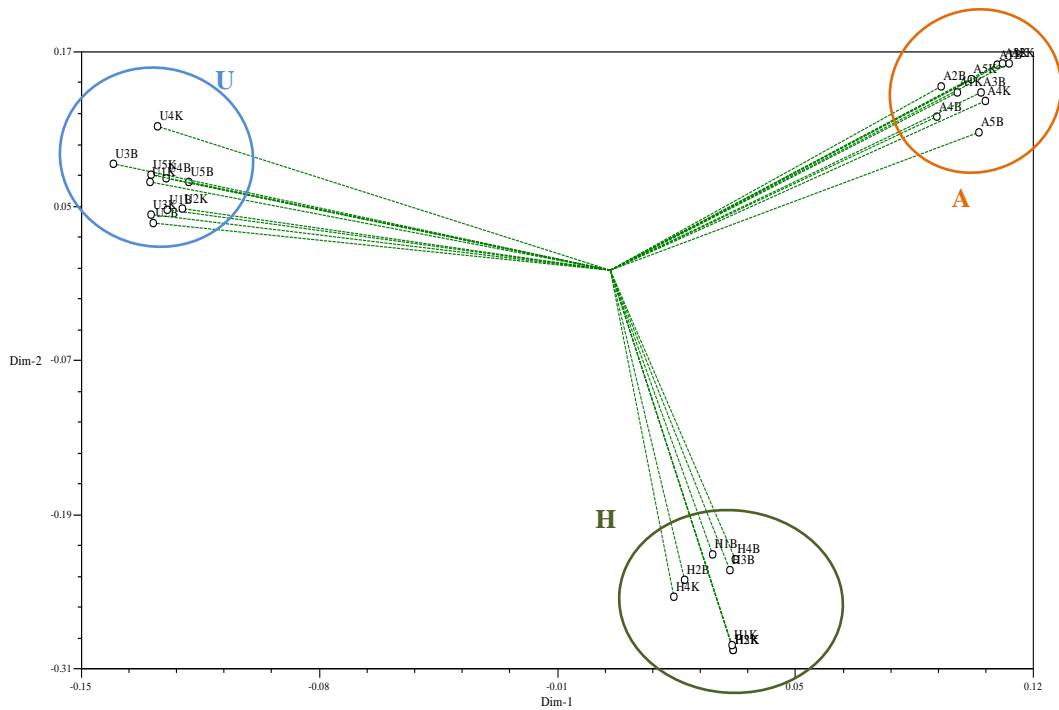
Σχ. 53. Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης των 28 ατόμων *Arbutus* με τη χρήση των RAPDs δεικτών, όπως προέκυψε με την χρήση της μεθόδου UPGMA για τον συντελεστή SM.



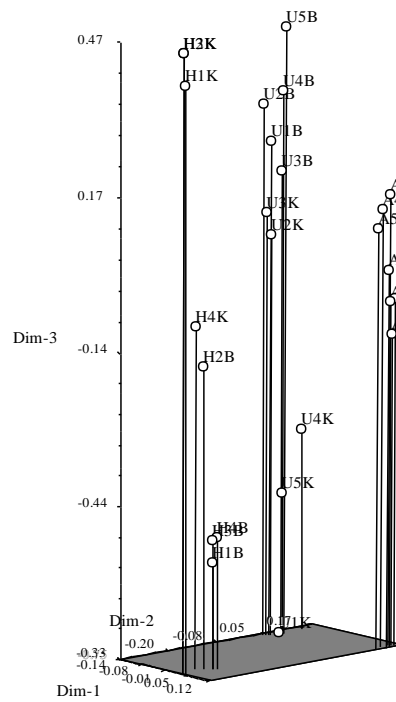
Σχ. 54. Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης των 28 ατόμων *Arbutus* με τη χρήση των RAPDs δεικτών, όπως προέκυψε με την χρήση της μεθόδου UPGMA για τον συντελεστή JACCARD.



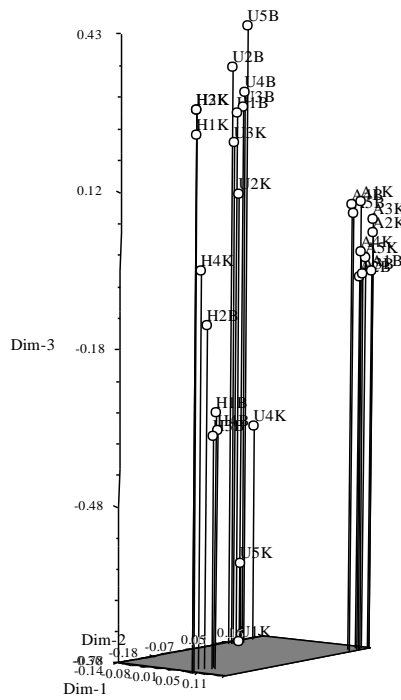
Σχ. 55. Ανάλυση Κύριων Συντεταγμένων για τις 2 διαστάσεις με την χρήση RAPDs (συντελεστής SM). Τα άτομα A, H και U είναι πολύ κοντά μεταξύ τους.



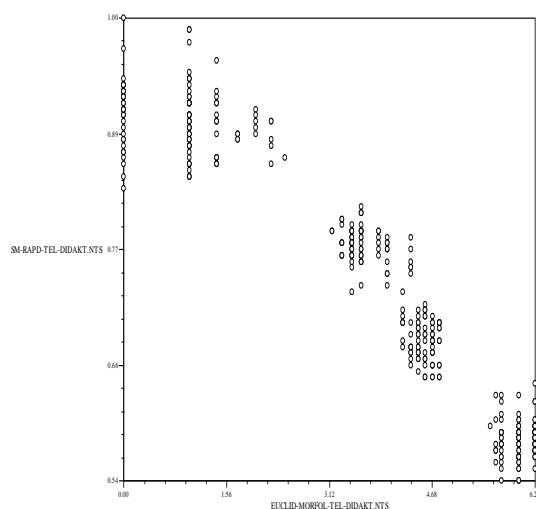
Σχ. 56. Ανάλυση Κύριων Συντεταγμένων για τις 2 διαστάσεις με την χρήση RAPDs (συντελεστής JACCARD). Τα άτομα A, H και U είναι πολύ κοντά μεταξύ τους.



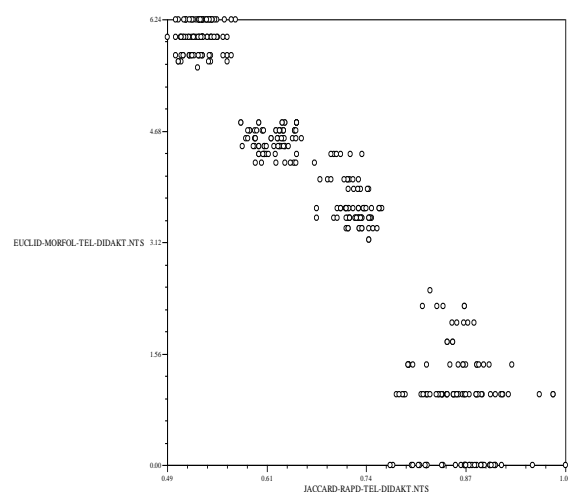
Σχ. 57. Ανάλυση Κύριων Συντεταγμένων για τις 3 διαστάσεις με την χρήση RAPDs (συντελεστής SM). Τα άτομα A, H και U είναι πολύ κοντά μεταξύ τους.



Σχ. 58. Ανάλυση Κύριων Συντ/νων για τις 3 διαστάσεις με την χρήση RAPDs (συντελεστής JACCARD). Τα άτομα A, H και U είναι πολύ κοντά μεταξύ τους.



Σχ. 59. Σύγκριση δενδρογραμμάτων μορφολογικών χαρακτήρων και RAPDs με την μέθοδο SM. Συντελεστής συσχέτισης $r = -0,95750$.



Σχ. 60. Σύγκριση δενδρογραμμάτων μορφολογικών χαρακτήρων και RAPDs με την μέθοδο JACCARD. Συντελεστής συσχέτισης $r = -0,95174$.

9.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα *A. andrachne* και *A. unedo* είναι φυτά με μεγάλη καλλωπιστική αξία, έχουν σπουδαίες φαρμακευτικές ιδιότητες, ενώ επιπρόσθετα αναβλαστάνουν εύκολα και προστατεύουν τα εδάφη από την ερημοποίηση (Piotto *et al.*, 2001). Η έντονη ανθρώπινη δραστηριότητα, πιέζει τους πληθυσμούς τους στην περιοχή της

Μεσογείου. Στις φυτοκοινωνίες που σχηματίζουν απαντά και το φυσικό διαειδικό υβρίδιο, *A. x andrachnoides* το οποίο είναι δύσκολο να αναγνωριστεί και να προσδιοριστεί με σαφήνεια, λόγω της ομοιότητάς του με το *A. andrachne*. Τα άτομα *Arbutus* που εντοπίστηκαν στις δύο περιοχές συλλογής με τα ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά, διαπιστώθηκε ότι τα παρουσίαζαν σταθερά στο χρόνο και με δεδομένη την ύπαρξη μεγάλων πληθυσμών ατόμων *A. unedo* και *A. andrachne*, οδήγησαν στην υπόθεση ότι πρόκειται για το φυσικό υβρίδιο, υπόθεση που θα μπορούσε να έχει μεγάλη πιθανότητα ισχύος (Stace, 1989).

Με την έρευνα που έγινε επιλέχθηκαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως χαρακτήρες-δείκτες για την διάκριση των ατόμων που ανήκουν στα τρία είδη και τον προσδιορισμό του φυσικού υβριδίου. Οι χαρακτήρες που επιλέχθηκαν διαπιστώθηκε ότι είχαν σταθερότητα στην διάρκεια των ετών, δεν μεταβάλλονταν ανά έτος, και συνεπώς αποδείχθηκε η καταλληλότητά τους, σύμφωνα με τον (Tata McGraw, 1984) που αναφέρει ότι ένας χαρακτήρας είναι κατάλληλος ως δείκτης όταν είναι σταθερός. Τα άτομα που εντοπίστηκαν αρχικά με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά στον Κάλαμο, διακρίθηκαν, με βάση μόνο ορισμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά (φλοιός, σχήμα φύλλων, εποχή ανθοφορίας και καρποφορίας, μέγεθος καρπού). Ακολούθως και αφού εντοπίστηκαν και άλλα άτομα στον Κάλαμο και στην Βαρυμπόμπη, επιλέχθηκαν περισσότερα χαρακτηριστικά που αφορούσαν βλαστικούς και αναπαραγωγικούς χαρακτήρες των φυτών. Από τους 27 χαρακτήρες που χρησιμοποιήθηκαν 23 ήταν ποιοτικοί και 4 ποσοτικοί.

Το δένδρογραμμα των 28 ατόμων που προέκυψε με τον συντελεστή Ευκλείδειας απόστασης (Σχ. 50), παρουσιάζει την ομαδοποίηση των ατόμων που μελετήθηκαν σε τρεις μεγάλες ομάδες. Η ομάδα Α περιέχει τα άτομα *A. andrachne*, και έχει μικρότερη απόσταση με την ομάδα Η στην οποία εντάχθηκαν όλα τα άτομα με ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Με τις δύο αυτές ομάδες συνδέεται εξωτερικά η ομάδα Υ που περιλαμβάνει τα άτομα *A. unedo*. Μεγαλύτερη απόσταση βρέθηκε μεταξύ ατόμων *A. unedo* και *A. andrachne* και ο συντελεστής Mantel που αξιολογεί την αντιπροσωπευτικότητα του δένδρογράμματος είναι πολύ υψηλός ($r=0,96540$). Η μέθοδος UPGMA και ο συντελεστής Ευκλείδειας απόστασης έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της απόστασης σε πληθυσμούς *A. unedo* (Lopez *et al.*, 2010) για την διάκριση με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως μήκος φύλλου, πλάτος φύλλου, λόγος πλάτους/μήκους, μήκος μίσχου, που χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα έρευνα.

Το διάγραμμα των δύο διαστάσεων της Ανάλυσης Κύριων Συντεταγμένων για τα 28 άτομα (Σχ. 51) επιβεβαιώνει το διάγραμμα των 28 ατόμων χωρίζοντας τα άτομα σε τρεις διακριτές ομάδες, με την ίδια ακριβώς σύνθεση που είχαν στο δενδρόγραμμα. Το διάγραμμα των τριών διαστάσεων της Ανάλυσης Κύριων Συντεταγμένων για τα 28 άτομα (Σχ. 52) δεν δίνει κάποια νέα πληροφορία σε σχέση με το προηγούμενο διάγραμμα, η τρίτη δηλαδή διάσταση δεν διαφοροποιεί κάποιο άτομο από την ομαδοποίηση της ανάλυσης των δύο διαστάσεων.

Οι χαρακτήρες που χρησιμοποιήθηκαν, διέκριναν τα άτομα με τα ενδιάμεσα χαρακτηριστικά σε μια ξεχωριστή ομάδα, περισσότερο συγγενή, γιατί είχε μικρότερη απόσταση, με τα άτομα *A. andrache*. Η απόσταση μεταξύ των ατόμων με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά, κυμάνθηκε σε μεγαλύτερο εύρος από ότι συνέβη με τα άλλα τα άτομα των άλλων δύο ειδών. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά διέκριναν υποομάδες ατόμων εντός κάθε ομάδας, και τα άτομα A1K, H1K, H4K, H1B, H2B και U5K διακρίθηκαν αποτελώντας το καθένα έναν ξεχωριστό κλάδο. Το A1K διαχωρίστηκε σε ξεχωριστό κλάδο, διότι είχε μεγαλύτερη τιμή μήκους/πλάτους φύλλου σε σχέση με τα άλλα άτομα A. Το U5K διαχωρίστηκε σε ξεχωριστό κλάδο, διότι είχε μεγαλύτερη επιφάνεια φύλλων σε σχέση με τα άλλα άτομα U. Στο δενδρόγραμμα εμφανίζονται κλάδοι μέσα σε κάθε ομάδα που έχουν απόσταση 0, δηλαδή πρόκειται για ταυτότητα. Τα άτομα της ομάδας A και U (*A. andrachne* και *A. unedo* αντίστοιχα), διακλαδίζονται σε τρεις μικρότερους κλάδους ενώ τα άτομα της ομάδας H (ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά), διαχωρίζονται σε πέντε κλάδους. Διαπιστώθηκε λοιπόν μεγαλύτερη παραλλακτικότητα στα άτομα της ομάδας αυτής.

Από τη μελέτη της μήτρας των μορφολογικών χαρακτήρων (Πίν. 35), προκύπτει ότι η διαφοροποίηση μέσα σε κάθε μία από τις ομάδες των ατόμων προήλθε από τις τιμές που πήραν οι ποσοτικοί μορφολογικοί χαρακτήρες (κωδ. 24-27). Στην ομάδα των ατόμων με τους ενδιάμεσους μορφολογικούς χαρακτήρες η ύπαρξη μεγαλύτερου αριθμού κλάδων οφείλεται στις διαφορετικές τιμές που σημείωσαν άτομα της ομάδας και σε ποιοτικούς χαρακτήρες (κωδ. 2, 4, 15 και 17). Η μεγαλύτερη ανομοιομορφία των μορφολογικών χαρακτήρων για τα άτομα με ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά, παρατηρήθηκε στα άτομα και από τις δύο περιοχές δειγματοληψίας, ενώ το εύρος της απόστασης των ατόμων *A. andrachne* και *A. unedo* κυμάνθηκε στα ίδια ακριβώς όρια σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας. Η μεγαλύτερη απόσταση παρατηρήθηκε ανάμεσα στις ομάδες των *A. andrachne* και *A.*

unedo και η μικρότερη μεταξύ των ατόμων *A. andrachne* και των ατόμων με τα ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά.

Η εποχή καρποφορίας για τα άτομα *A. unedo* ξεκινούσε από τον Οκτώβριο, παρατήρηση που συμφωνεί με τους Celikel *et al.*, (2008). Σε πρόγραμμα επιλογής μεταξύ 51 γονοτύπων *A. unedo* της Τουρκίας, με στόχο την αξιοποίηση των διακριθέντων για την ποιότητα και τα χαρακτηριστικά των καρπών τους, ώστε να αξιοποιηθούν εμπορικά, διαπίστωσαν ότι η έναρξη της καρποφορίας των γονοτύπων που επέλεξαν ήταν από το 2ο 15ήμερο του Οκτωβρίου και αργότερα. Οι προαναφερθέντες ερευνητές επέλεξαν τελικά 5 γονοτύπους για περαιτέρω μορφομετρική ανάλυση, για τους οποίους το πλάτος των καρπών (μεγαλύτερο από 1,9 cm), τα ελλειπτικά-επιμηκυμένα φύλλα που κατέγραψαν (εκτός από έναν γονότυπο), το μήκος του μίσχου (μικρότερο ή οριακά 1 cm) και ο λόγος μήκος/πλάτος φύλλου (2,19-2,80) αποτέλεσαν ευρήματα που συμφωνούν με την παρούσα έρευνα.

Τα ευρεθέντα άτομα με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά για τα οποία έγινε η υπόθεση ότι ανήκουν στο φυσικό υβρίδιο, ήταν λίγα σε αριθμό και στις δύο περιοχές έρευνας, κάτι ανάλογο που παρατηρήθηκε και στο *Arbutus x androsterilis* (Salas Pascual *et al.*, 1993). Οι ερευνητές εντόπισαν στις Κανάριες Νήσους μικρό πληθυσμό 20 ατόμων, ανάμεσα σε πληθυσμό *A. unedo* με ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά, παρόμοια με το *A. canariensis*. Τα άτομα αυτά τα προσδιόρισαν στην μελέτη τους ως φυσικό διαειδικό υβρίδιο μεταξύ των *A. canariensis* και *A. unedo*.

Οι μορφολογικές παρατηρήσεις είναι γνωστό όμως ότι δεν συνάδουν πάντοτε με τα γενετικά δεδομένα, εξ αιτίας της επίδρασης του περιβάλλοντος (Dawson *et al.* 1996, Rieseberg and Brunsfeld, 1992, Nason *et al.*, 1992). Η αναζήτηση στη βιβλιογραφία ανέδειξε την πολύ ενδιαφέρουσα πληροφορία για τις ειδικές προσπάθειες, υψηλού κόστους που κατεβλήθησαν για την διάσωση του *Grevillea williamsonii* από τον Βασιλικό Βοτανικό Κήπο της Μελβούρνης, οι οποίες όμως αποδείχθηκαν μεταγενέστερα ως περιττές, διότι ύστερα από ταξινομική έρευνα διαπιστώθηκε ότι το *Grevillea williamsonii* ήταν στην πραγματικότητα μια σπάνια ποικιλία του *G. aquifolium* (James, 2004). Αυτός είναι και ο λόγος που η διατήρηση μιας συλλογής προσδιορισμένων και γνωστών φυτικών ειδών αποτελεί θεμελιώδη προϋπόθεση για την διατήρηση της βιοποικιλότητας (UNEP, 2002).

Προκειμένου λοιπόν να επιβεβαιωθούν και να ενισχυθούν τα ευρήματα των μορφολογικών χαρακτηριστικών, χρησιμοποιήθηκαν οι μοριακοί δείκτες RAPDs που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ξυλώδη φυτά και άλλα είδη της οικογένειας Ericaceae.

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 15 εκκινητές και επιλέχθηκαν τελικά 12, αριθμός ικανοποιητικός δεδομένου ότι οι Takrouni and Boussaid (2010) στο *A. unedo* δοκίμασαν 18 εκκινητές για να χρησιμοποιήσουν τελικά 9 εκκινητές και η Gomez (2011) ξεκινώντας από 20 αρχικά εκκινητές χρησιμοποίησε τους 16.

Στην παρούσα μελέτη ο αριθμός των ενισχυμένων προϊόντων των εκκινητών κυμάνθηκε από 7-21, αριθμός υψηλότερος από τον αριθμό στη μελέτη των Takrouni and Boussaid (2010) που κυμάνθηκε από 8-13 και της Gomez (2011) που κυμάνθηκε από 4-13. Ο συνολικός αριθμός επίσης των ενισχυμένων προϊόντων της παρούσας μελέτης (166 ηλεκτροφορητικές ζώνες, από 12 εκκινητές), ήταν υψηλότερος από τον αριθμό που αναφέρουν οι Takrouni and Boussaid (2010) οι οποίοι πήραν 88 ζώνες από 9 εκκινητές και η Gomez (2011) που πήρε 118 ζώνες από 16 εκκινητές. Ο αριθμός των ηλεκτροφορητικών ζωνών ήταν μικρότερος από τον αριθμό ζωνών της παρούσας μελέτης, αν και οι προηγούμενοι ερευνητές χρησιμοποίησαν την θερμοκρασία των 35 °C στην PCR στη φάση υβριδισμού, χαμηλότερη δηλαδή θερμοκρασία από τους 44 °C που χρησιμοποιήσαμε στη φάση του υβριδισμού.

Το ποσοστό πολυμορφισμού (63,25 %) για τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν υψηλό, ανάμεσα στις τιμές (73,86% και 57,3%) που αναφέρουν οι Takrouni and Boussaid (2010) και η Gomez (2011) αντίστοιχα. Στην παρούσα μελέτη ο βαθμός πολυμορφισμού για κάθε εκκινητή κυμάνθηκε από 36,36 έως 76,19%, σε σχέση με το ποσοστό (50-90,91%) που αναφέρουν οι Takrouni and Boussaid (2010) και το ποσοστό (33,3-92,3 %) που αναφέρει η Gomez (2011).

Το δενδρόγραμμα των 28 ατόμων όπως προέκυψε με τους συντελεστές SM και JAC (Σχ. 53, 54) παρουσιάζει την ομαδοποίηση των ατόμων σε τρεις μεγάλες ομάδες. Η μία ομάδα U περιλαμβάνει τα άτομα *A. unedo* και έχει μικρότερο β.γ.ο. με τις άλλες δύο ομάδες A και H, που περιλαμβάνει η μία τα άτομα *A. andrachne* και η άλλη τα άτομα με τα ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Οι ομάδες αυτές (A και H) έχουν υψηλότερο βαθμό γενετικής ομοιότητας μεταξύ τους και διαχωρίζονται μεταξύ τους μετά την τιμή 0,70 και στα δύο δενδρογράμματα.

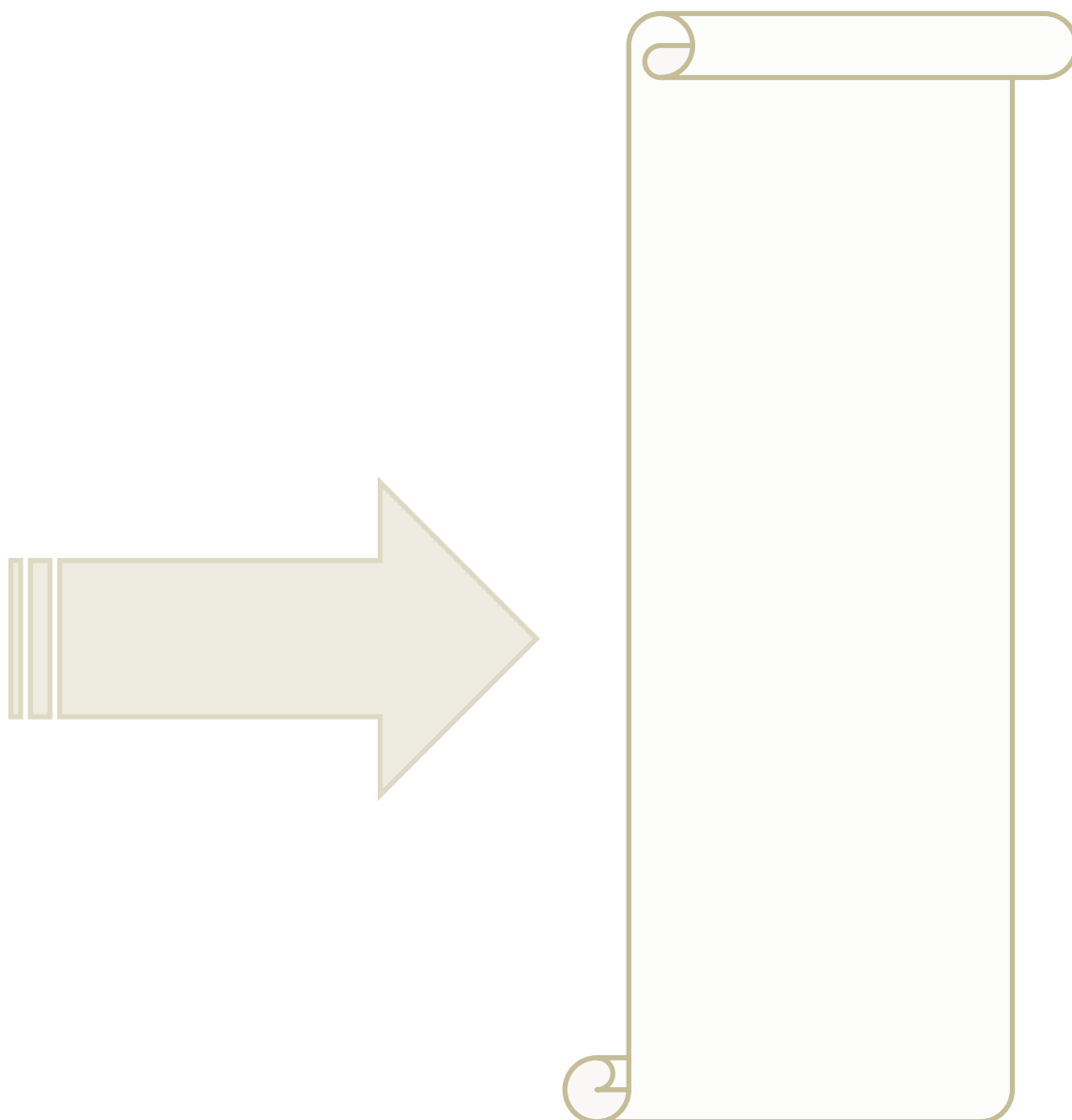
Ο συντελεστής του Mantel που αξιολογεί την αντιπροσωπευτικότητα των δενδρογραμμάτων είναι πολύ υψηλός και για τους δύο συντελεστές (0,954 για τον SM και 0,960 για τον JAC), ενώ ο συντελεστής συσχέτισης Mantel, δεν σημείωσε υψηλή τιμή ($r=0,64$) στην μελέτη της Gomez (2011). Τα διαγράμματα των δύο διαστάσεων της Ανάλυσης Κύριων Συντεταγμένων (Σχ. 55, 56) για τα 28 άτομα επιβεβαιώνουν τα δενδρογράμματα χωρίζοντας τα άτομα σε τρεις ομάδες, με την ίδια ακριβώς σύνθεση που είχαν και στα δενδρογράμματα. Η μία ομάδα είναι η ομάδα με τα άτομα *A. andrachne*, η άλλη με τα άτομα *A. unedo* και η τρίτη με τα άτομα που έχουν ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Τα διαγράμματα των τριών διαστάσεων της Ανάλυσης Κύριων Συντεταγμένων (Σχ. 56, 59) δεν δίνουν κάποιες νέες πληροφορίες σε σχέση με τα προηγούμενα διαγράμματα.

Τα άτομα H2K και H3K δεν διαχωρίστηκαν με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, όπως και με τους μορφολογικούς χαρακτήρες. Για να διαπιστωθεί λοιπόν με ακρίβεια η γενετική σχέση των ατόμων αυτών πρέπει να χρησιμοποιηθούν και άλλοι εκκινητές λαμβάνοντας υπ όψιν ότι η Gomez (2011), κάνει λόγο για χαμηλή παραλλακτικότητα μεταξύ ατόμων *A. unedo* που προέρχονταν από διαφορετική γεωγραφική θέση. Η χρήση επίσης και άλλων μορφολογικών δεικτών θα μπορούσε να βοηθήσει στην κατεύθυνση αυτή.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει ότι η χρησιμοποίηση των επιλεγθέντων μορφολογικών χαρακτήρων σε συνδυασμό με τους μοριακούς δείκτες που επιλέχτηκαν, ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική για τον προσδιορισμό μιας ομάδας ατόμων με διακριτά, ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Αυτή η ομάδα των ατόμων είχε μεγαλύτερη φαινοτυπική ομοιότητα και γενετική συγγένεια με τα άτομα *A. andrachne*, παρά με τα άτομα του *A. unedo* και από ότι διαπιστώθηκε τα χαρακτηριστικά της ομάδας δεν οφείλονταν στο περιβάλλον, αλλά είχαν γενετικό υπόβαθρο. Πιθανά πρόκειται για το φυσικό υβρίδιο που περιγράφεται βιβλιογραφικά ως *A. x andrachnoides*. Το συμπέρασμα ενισχύεται λόγω της υψηλής τιμής συσχέτισης (συντελεστής Mantel) των δενδρογραμμάτων των μορφολογικών χαρακτήρων και των RAPDs με τη μέθοδο SM ή JACCARD. Οι συνθήκες ενίσχυσης του γονιδιωματικού DNA με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως αποτέλεσμα ευκρινή και σταθερά ηλεκτροφορητικά πρότυπα, έτσι ώστε να είναι ευχερής τόσο η διάκριση του υβριδίου από τα άλλα δύο είδη, όσο και η διάκριση εντός του κάθε είδους. Είναι δυνατή η χρησιμοποίηση ενός ή δύο εκκινητών για την διάκριση των τριών ειδών και αρκετά άτομα παρουσίασαν μοναδικό

ηλεκτροφορητικό πρότυπο. Η χαμηλή παραλλακτικότητα των ατόμων *A. unedo* της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε και από τους Takrouni and Boussaid (2010) σε γονότυπους *A. unedo* στην Τυνησία. Η Gomez (2011) αναφέρει επίσης ότι ο βαθμός γενετικής ομοιότητας ήταν υψηλότερος από 0,83 μεταξύ των γονοτύπων απο διαφορετικές περιοχές μελέτης, ενώ κάποιοι γονότυποι είχαν κοινές πάνω από 95 % των ζωνών, χωρίς αυτό να δικαιολογείται από την γεωγραφική τους θέση αφού ήταν απομακρυσμένοι και ως εκ τούτου οι γονότυποι που ελέγχθηκαν δεν στάθηκε δυνατό να ομαδοποιηθούν σε σχέση με την γεωγραφική τους προέλευση.

Για την διάκριση και τον ακριβή προσδιορισμό του φυσικού υβριδίου είναι απαραίτητη η χρήση και άλλων μορφολογικών χαρακτήρων. Η χρήση και άλλων ποσοτικών μορφολογικών χαρακτηριστικών, θα μπορούσε να βοηθήσει ώστε να προκύψει ένα πρότυπο για κάθε άτομο που μελετάται. Τέτοια χαρακτηριστικά, θα μπορούσε να ήταν το νωπό και ξηρό βάρος των φύλλων, πάχος καρπών, αριθμός ανθέων, ανατομικά χαρακτηριστικά του φύλλου κ.α. Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν υψηλό αριθμό ηλεκτροφορητικών προϊόντων και έδωσαν για τα περισσότερα άτομα μοναδικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στην παρούσα έρευνα θέτει την βάση για την ταυτοποίηση ατόμων *Arbutus* από διαφορετικές περιοχές και τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ τους. Οι αυτοφυείς πληθυσμοί *Arbutus* αποτελούν μια τεράστια δεξαμενή γενετικού υλικού, από την οποία θα μπορούσαν να επιλεγούν κατάλληλοι γονότυποι, με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Οι γονότυποι αυτοί μπορούν να αποτελέσουν τα μητρικά φυτά για την εγκατάσταση μιας καλλιέργειας, με συγκεκριμένα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά. Από τα άτομα αυτά είναι δυνατόν η *in vitro* παραγωγή κλώνων με πανομοιότυπα χαρακτηριστικά, για την αξιοποίηση των φυτών αυτών. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη και για τον έλεγχο των πληθυσμών με τα ενδιάμεσα χαρακτηριστικά, του θεωρούμενου με βάση τα αποτελέσματα φυσικού υβριδίου, *A. x andrachnoides*, ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει η πιθανότητα να τελεί υπό εξαφάνιση, με δεδομένη τη μικρή του εξάπλωση στις περιοχές μελέτης



Γενικά Συμπεράσματα και Συζήτηση

10. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όταν ξεκίνησε η παρούσα μελέτη, δεν υπήρχε καμιά αναφορά για *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. andrachne* και *A. x andrachnoides*. Πρόσφατα μόνο, δημοσιεύτηκε εργασία που αφορά στον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. andrachne* με έκφυτα από κόμβους σποροφύτων (Mostafa *et al.*, 2010). Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μια πλήρης μέθοδος για τον μικροπολλαπλασιασμό των *A. andrachne* και *A. x andrachnoides* ξεκινώντας από ενήλικα φυτά και σπορόφυτα, και παρουσιάζεται μια ολοκληρωμένη πρόταση πολλαπλασιασμού και των τριών ειδών με χρήση τόσο ενήλικου όσο και νεανικού φυτικού υλικού.

Όσον αφορά στην εγκατάσταση καλλιέργειας *A. andrachne* με έκφυτα προερχόμενα από ενήλικα φυτά, παρουσιάστηκαν αρχικά πολλές δυσκολίες. Η χρήση διαφόρων φυτορρυθμιστικών ουσιών, αν και οδηγούσε σε βλαστογένεση, οι σχηματιζόμενοι βλαστοί δεν επιμηκύνονταν με συνέπεια να είναι σχεδόν αδύνατος ο πολλαπλασιασμός της καλλιέργειας. Έχει λοιπόν ιδιαίτερη σημασία ότι η χρήση της ZEAT καθώς και του 2IP επέτρεψε τελικά την επιτυχή επιμήκυνση των μικροβλαστών του *A. andrachne*, καθώς και των άλλων δύο ειδών.

Καλύτερη εποχή για την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών *in vitro* αποδείχθηκε η άνοιξη, με την καλλιέργεια εκφύτων κόμβων βλαστών τρέχουσας βλάστησης σε WPM με βιταμίνες Mullin και 2,5 mg l⁻¹ ZEAT και για τα τρία είδη *Arbutus* που μελετήθηκαν. Για περαιτέρω πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών προτείνεται η χρήση 2,5 mg l⁻¹ ZEAT, που εμφάνισε μεγάλη αποτελεσματικότητα σε ότι αφορά στην παραγωγή βλαστών και στα τρία είδη, είτε σε WPM με βιταμίνες Mullin, είτε σε MS. Τα παραπάνω υποστρώματα ήταν κατάλληλα επίσης για τον μικροπολλαπλασιασμό και των τριών ειδών, με χρήση μητρικού υλικού από νεανικούς ιστούς (κόμβους σποροφύτων). Η αποτελεσματικότητα της ZEAT έναντι άλλων κυτοκινινών αναφέρεται και σε άλλα είδη της οικ. Ericaceae (Debnath and McRae, 2001, Jaakola *et al.*, 2001). Δεδομένης της υψηλής τιμής της ZEAT, θα μπορούσε, κατά την αρχική εγκατάσταση των καλλιεργειών *in vitro*, να χρησιμοποιείται η μικρότερου κόστους BA, δεδομένου ότι υπάρχουν πολλές απώλειες εκφύτων στη φάση αυτή λόγω μολύνσεων, και να χρησιμοποιείται η ZEAT στην επόμενη φάση του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών. Η υποκαλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα με 2,5 mg l⁻¹ ZEAT μπορεί να επαναληφθεί για μεγάλο αριθμό

κύκλων (περισσότεροι από 14 δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη τουλάχιστον στο *A. andrachne*) με μεγάλη επιτυχία και για τα τρία είδη, δίνοντας μεγάλο αριθμό καλοσχηματισμένων και ομοιόμορφων βλαστών.

Ιδιαίτερη σημασία είχε η αντιμετώπιση των μολύνσεων κατά την αρχική καλλιέργεια, ενός παράγοντα περιοριστικού για την επιτυχή εγκατάσταση σε πολλά ξυλώδη είδη (Nejad, 2005). Το επιμελές και σχολαστικό πλύσιμο των εκφύτων σε τρεχούμενο νερό βρύσης, ακολουθούμενο με βύθιση σε αιθανόλη 90% για 10 sec και ακολούθως ανάδευση σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 30% για 10 min, είχε ως αποτέλεσμα την επιτυχή απολύμανση των εκφύτων, εξισορροπώντας με επιτυχία μεταξύ της δράσης του απολυμαντικού μέσου και της αποτυχίας εγκατάστασης της καλλιέργειας.

Η ριζοβολία των μικροβλαστών έγινε σε πολύ υψηλά ποσοστά που άγγιζαν το 100% σε WPM με 1 mg l^{-1} IBA και για τα τρία είδη, ανεξάρτητα από την προέλευση των μικροβλαστών (ενήλικα φυτά ή σπορόφυτα). Ο εγκλιματισμός των φυταρίων σε *ex vitro* συνθήκες επίσης έγινε χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα και επιβίωσε πολύ υψηλό ποσοστό φυτών (90-100%) διατηρώντας τα χαρακτηριστικά των μητρικών φυτών.

Το ενδιαφέρον για τη μελέτη της οικοφυσιολογίας του σπόρου ήταν μεγάλο και το έλκυσε η ύπαρξη αντικρουόμενων πληροφοριών στη βιβλιογραφία για τα *A. andrachne* και *A. unedo* περί της ύπαρξης ή μη ληθάργου. Οι σπόροι των ξυλωδών φυτών της εύκρατης ζώνης χαρακτηρίζονται συχνά από φυσιολογικό λήθαργο και το σύνολο σχεδόν των δημοσιευμένων μελετών (Köse, 1998, Karam and Al-Salem, 2001, Narbona *et al.*, 2003, Tiki, 2004, Giordani *et al.*, 2005, Hammami *et al.*, 2005, Smiris *et al.*, 2006, Olmez *et al.*, 2007, Ertekin and Kirdar 2010, Tiki and Guner, 2007), πλην μιας για το *A. unedo* (Mesléard and Lepart, 1991), ανέφεραν ότι υπάρχει φυσιολογικός λήθαργος στους σπόρους των *A. andrachne* και *A. unedo*, και πρότειναν προμεταχειρίσεις με στρωμάτωση σε χαμηλή θερμοκρασία ή εμβάπτιση σε GA_3 για διακοπή του ληθάργου. Η πολυπλοκότητα του φαινομένου του ληθάργου είναι βέβαια τέτοια που δεν επιτρέπει τον ευχερή καθορισμό και τη διάκριση μεταξύ των ορίων του ληθάργου και των συνθηκών που είναι απαραίτητες για την βλάστηση των σπόρων. Ως εκ τούτου κατά τη διερεύνησή του και τον προσδιορισμό των κατάλληλων συνθηκών βλάστησης, πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν οι συνθήκες που επικρατούν στο φυσικό περιβάλλον του σπόρου το χρονικό διάστημα μετά την ωρίμανσή του. Ιδιαίτερη σημασία έχει επίσης το στάδιο συλλογής των σπόρων και οι

μετασυλλεκτικοί χειρισμοί στους σπόρους που θα πρέπει με ακρίβεια να αναφέρονται, γιατί είναι πιθανό να επηρεάσουν και την βλαστική ικανότητα ή να επιφέρουν ή και να απαγάγουν το λήθαργο στους σπόρους. Διερευνήθηκαν λοιπόν για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη και προσδιορίστηκαν οι κριτικές τιμές της θερμοκρασίας για τη βλάστηση σπόρου των *A. andrachne*, *A. unedo* και *A. x andrachnoides*.

Οι ερευνητές που υπέθεσαν ότι η αδυναμία βλάστησης των σπόρων των *A. andrachne* και *A. unedo* στους 20 °C συνδέεται με λήθαργο, δε χρησιμοποίησαν χαμηλότερες θερμοκρασίες για να ελέγξουν τη βλαστικότητα, αντιθέτως πειραματίστηκαν κάποιοι εξ αυτών σε ακόμη υψηλότερες θερμοκρασίες, 24, 26 ή 30 °C και επίσης υπέδειξαν ύπαρξη ληθάργου λόγω αποτυχίας βλάστησης (Karam and Al-Salem, 2001, Olmez *et al.*, 2007, Demirsoy *et al.*, 2010, Ertekin and Kirdar, 2010). Στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε ότι η βλάστηση των σπόρων και των τριών ειδών *Arbutus* συνδέεται με την κατάλληλη θερμοκρασία βλάστησης και όχι με την ύπαρξη ληθάργου, αφού βλάστησαν σε πολύ υψηλά ποσοστά (83-100%) και σε σύντομο χρονικό διάστημα όταν η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 10-15 °C. Οι 10 °C είναι κοντά στο κατώτατο όριο για βλάστηση των σπόρων και των τριών ειδών, αφού στους 5 °C οι σπόροι βλάστησαν (εμφάνισαν ριζίδιο) αλλά δεν υπήρξε ανάπτυξη βλαστιδίου. Τα ανώτερα όρια θερμοκρασίας για βλάστηση των σπόρων διαφοροποιήθηκαν στα τρία είδη, για τα *A. andrachne* και *A. unedo* κυμάνθηκαν από 20-25 °C, ενώ για το φυσικό υβρίδιο *A. x andrachnoides* ήταν 15-20 °C. Η άριστη θερμοκρασία για την βλάστηση των σπόρων και των τριών ειδών είναι 15 °C. Οι σπόροι, σύμφωνα και με βιβλιογραφικές αναφορές, βλάστησαν εξ ίσου καλά σε φως ή σκοτάδι. Η βλαστικότητα και των τριών ειδών ήταν υψηλή, σε παρόμοια επίπεδα, αλλά ο χρόνος ολοκλήρωσης της βλάστησης ήταν μια παράμετρος που ανέδειξε την ομοιότητα του υβριδίου και τη σύμπλευση της βλαστικότητάς του με το *A. unedo* σε ότι αφορά σε αυτό το χαρακτηριστικό.

Όσον αφορά στην διατήρηση του σπόρου, δείχθηκε ότι ύστερα από 11 μήνες αποθήκευση σε 25 °C η βλαστικότητα των τριών ειδών διατηρήθηκε και για τα τρία είδη σε υψηλά επίπεδα, αλλά το εύρος της θερμοκρασίας όπου κυμάνθηκε η βλάστηση περιορίστηκε μεταξύ 10 και 15 °C. Αποθήκευση για 27 μήνες στην ίδια θερμοκρασία είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία βλάστησης των σπόρων και των τριών ειδών.

Αφού απαντήθηκε το ερώτημα σχετικά με την ύπαρξη ληθάργου στους σπόρους των τριών ειδών *Arbutus* που απαντώνται στη χώρα μας, υπεισέρχεται ένα νέο ερώτημα για τις κατάλληλες συνθήκες διατήρησης των σπόρων αυτών, που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν ειδικές αναφορές σε αυτές. Με δεδομένο όμως ότι σπόροι που είχαν ληφθεί από το Δασαρχείο Πάρνηθας, οι οποίοι είχαν διατηρηθεί σε χαμηλή θερμοκρασία (4-6 °C), δεν στάθηκε δυνατόν να βλαστήσουν, διαφαίνεται ότι οι επωφελείς συνθήκες για τη διατήρηση των σπόρων των τριών ειδών, είναι οι ξηροθερμικές, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, αλλά και για Αμερικανικό είδος του γένους *A. menziesii* (Immel, 2006).

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται προβλήματα διάκρισης και σύγχυσης μεταξύ του *A. andrachne* και *A. x andrachnoides* (Bačić *et al.*, 1992), ωστόσο δεν έχει γίνει προσπάθεια για την ανάπτυξη κάποιας ικανής μεθόδου διάκρισης μεταξύ των ειδών. Οι υπάρχουσες αναφορές για τη σύγχυση αυτή μεταξύ των δύο ειδών οδήγησε στη διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων των ειδών *Arbutus*. Πρόσφατα μόνο αναφέρονται μέθοδοι διάκρισης και επιλογής γονοτύπων μόνο του *A. unedo*, είτε με μοριακές μεθόδους (Takrouni and Boussaid, 2010, Gomes, 2011) είτε με βάση μορφολογικούς χαρακτήρες του ίδιου είδους (Celikel *et al.*, 2008, Lopez *et al.*, 2010).

Η μελέτη αποκάλυψε και τεκμηρίωσε τη μεγαλύτερη γενετική σχέση μεταξύ ατόμων *A. andrachne* και ατόμων με ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά, που συνάδει με την μεγαλύτερη φαινοτυπική ομοιότητα που παρουσιάζουν τα άτομα αυτά σε βαθμό συγγύσεως. Για τη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν αρχικά μια σειρά από μορφολογικούς χαρακτήρες και στη συνέχεια ελέγχθηκε και συγκρίθηκε η αποτελεσματικότητά τους με μοριακούς δείκτες RAPDs. Η πολύ υψηλή τιμή του συντελεστή συσχέτισης Mantel όπως και τα υπόλοιπα αποτελέσματα, θεμελιώνουν την υπόθεση ότι τα άτομα με τα ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά αποτελούν φυσικές υβριδικές μορφές *A. x andrachnoides*. Αυτή η ομάδα των ατόμων είχε μεγαλύτερη φαινοτυπική ομοιότητα και γενετική συγγένεια με τα άτομα *A. andrachne*, παρά με τα άτομα του *A. unedo* και από ότι διαπιστώθηκε τα χαρακτηριστικά της ομάδας δεν οφείλονταν στο περιβάλλον και είχαν γενετικό υπόβαθρο. Το συμπέρασμα ενισχύεται επίσης λόγω του μεγάλου βαθμού πολυμορφισμού που έδωσαν οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν. Ένα άλλο εύρημα ήταν ότι η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών όλων των ειδών, από τις δύο περιοχές συλλογής (Βαρυμπόμπη και Κάλαμος Αττικής), ήταν μικρή και

πράγματι το ίδιο υποδεικνύουν και οι μορφολογικές παρατηρήσεις. Η αποτελεσματικότητα της χρήσης λοιπών των συγκεκριμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών επιβεβαιώθηκε από τους μοριακούς δείκτες RAPDs που χρησιμοποιήθηκαν.

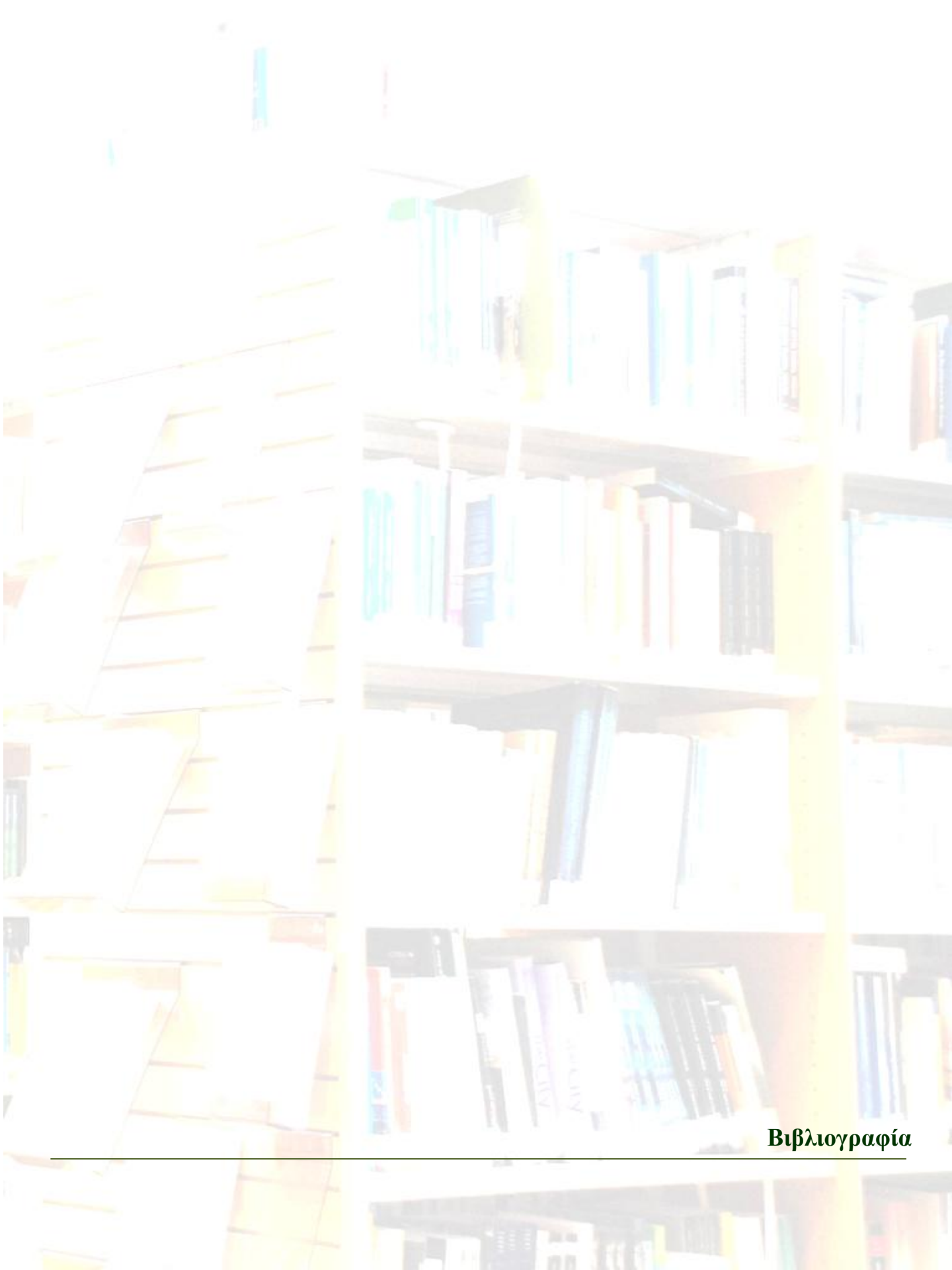
Το συμπέρασμα βέβαια αυτό ενισχύεται και από τα αποτελέσματα του *in vitro* πολλαπλασιασμού και της οικοφυσιολογίας του σπόρου. Εδώ παρουσιάζει ενδιαφέρον ότι το *A. x andrachnoides*, αν και φαινοτυπικά συγγέεται με το *A. andrachne*, το μορφογενετικό του δυναμικό και η συμπεριφορά κινήθηκε πλησιέστερα με αυτήν του *A. unedo*, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη ανταπόκριση στον *in vitro* πολλαπλασιασμό από ότι το *A. andrachne*.

Ο σπόρος του υβριδίου εμφάνισε στενότερα όρια κατάλληλων για βλάστηση θερμοκρασιών, κάτι που θα μπορούσε να εξηγήσει το μικρό αριθμό ατόμων *A. x andrachnoides* που απαντούν στις περιοχές που ερευνήθηκαν σε σχέση με τα μητρικά είδη. Παρόμοια ένας πολύ μικρός πληθυσμός μόνο 20 δένδρων είχε εντοπιστεί και προσδιοριστεί ως το φυσικό διαειδικό υβρίδιο *Arbutus x androsterilis* (Salas Pascual *et al.*, 1993) μεταξύ των *A. canariensis* και *A. unedo* στις Κανάριες Νήσους.

Η παρούσα έρευνα ανέδειξε λοιπόν τα κατάλληλα μορφολογικά (ποσοτικά και ποιοτικά) χαρακτηριστικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χαρακτήρες-δείκτες για τη διάκριση των ατόμων που ανήκουν στα τρία είδη και τον προσδιορισμό του φυσικού υβριδίου, κάτι ιδιαίτερα σημαντικό στην έρευνα προκειμένου να αποφεύγονται συγχύσεις. Για τη διάκριση και τον ακριβή προσδιορισμό του φυσικού υβριδίου η χρήση και άλλων ποσοτικών μορφολογικών χαρακτήρων θα μπορούσε να βοηθήσει ώστε να προκύψει ένα πρότυπο για κάθε άτομο που μελετάται. Τέτοια χαρακτηριστικά, θα μπορούσε να ήταν το νωπό και ξηρό βάρος των φύλλων, πάχος καρπών, αριθμός ανθέων, ανατομικά χαρακτηριστικά του φύλλου κ.α.

Η παρούσα διατριβή εν κατακλείδι ανέδειξε κατάλληλες μεθοδολογίες για *in vitro* πολλαπλασιασμό των τριών ειδών *Arbutus* της Ελληνικής χλωρίδας, τόσο από ενήλικα φυτά όσο και από νεαρά σπορόφυτα, διευκολύνοντας την αξιοποίηση των ειδών αυτών ως καλλωπιστικών στο αστικό και περιαστικό τοπίο, σε αναδασασώσεις, αλλά και στην βιομηχανία φαρμακευτικών ουσιών, συμβάλλοντας παράλληλα στη διατήρηση της βιοποικιλότητας της μεσογειακής μακκίας. Παράλληλα διαφώτισε παραμέτρους της οικοφυσιολογίας του σπόρου των ειδών αυτών και επέφερε την ανάπτυξη των κατάλληλων μορφολογικών χαρακτήρων αλλά και μοριακών δεικτών

RAPDs για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών *Arbutus*. Αποτελεί μια έρευνα που μπορεί να επιτρέψει και να διευκολύνει την ευχερή αξιοποίηση της τεράστιας δεξαμενής γενετικού υλικού των αυτοφυών πληθυσμών *Arbutus*, ώστε να επιλεγούν κατάλληλοι γονότυποι, με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Οι γονότυποι αυτοί θα μπορούσαν να αποτελέσουν τα μητρικά φυτά για την εγκατάσταση καλλιέργειας, με συγκεκριμένα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά. Από τα άτομα αυτά είναι δυνατή η *in vitro* παραγωγή επιθυμητών κλώνων για την εμπορική τους αξιοποίηση. Αποτελεί επίσης το εφαλτήριο για τη διεξαγωγή περαιτέρω έρευνας, ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσον υπάρχει η πιθανότητα το *A. x andrachnoides*, να τελεί υπό εξαφάνιση, με δεδομένη την μικρή του εξάπλωση στις περιοχές μελέτης.



Βιβλιογραφία

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aburjai, T., Amro, B.I., Al-Khalil, S. and Alkofahi, A., 1999. Bioactive Triterpenes from *Arbutus andrachne*. *Alex. J. Pharm. Sci.* 13: 115–118.
- Adams, J.E., 1940. A systematic study of the genus *Arctostaphylos* Adans. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society* 56: 1-62.
- Alarcoe-E-Silva M.L.C.M.M., Leitao A.E.B., Azinheira H.G., Leitao M.C.A., 2001. The *Arbutus* berry: Studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analyses*, 14: 27–35.
- Albert, T., Raspe, O., Jacquemart, A.L., 2003. Clonal structure in *Vaccinium myrtillus* L. revealed by RAPD and AFLP markers. *Int. J. Plant Sci.* 164, 649-655.
- Albert, T., Raspe, O., Jacquemart, A.L., 2004. Clonal diversity and genetic structure in *Vaccinium myrtillus* populations from different habitats. *Belgian J. Bot.* 137, 155-162.
- Albert, T., Raspe, O., Jacquemart, A.L., 2005. Diversity and spatial structure of clones in *Vaccinium uliginosum* populations. *Can. J. Bot.* 83, 211-218.
- Al-Khalil, S., 1995. A survey of plants used in Jordanian traditional medicine. *Int. J. Pharmacognosy* 33: 317– 323.
- Al-Saghir, M.G., 2010. Phylogenetic Analysis of the Genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae) Based on Morphological Data. *As. J. Plant Science*: 1-8.
- 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.
- Amritphale, D., Iyengar, S., and Sharma R.K., 1989. Effect of light and storage temperature on seed germination in *Hygrophila auriculata* (Schumach.) Haines. *J. Seed Technol.* 13: 39-43.
- Anderson, W.C., 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 343–347.
- Anthony, J.M., Senaratna, T., Dixon, K.W. and Sivasithamparam, K., 2004. Somatic Embryogenesis for Mass Propagation of Ericaceae-A Case Study with *Leucopogon verticillatus*. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.* 76: 137-146.
- Aplada, E., Georgiadis, T., Tiniakou, A. and Theochatopoulos, M., 2007. Phytogeography and Ecological of Five Dominant Plant Species in Maquis and Phrygana Ecosystems in Greece. *Phyton* 25(1): 77-85.
- Arianoutsou, M. and Margaritis, N., 1981. Early stages of regeneration after fire in a phryganic ecosystems (East Mediterranean) I. Regeneration by seed germination. *Biol. Ecol. Medit.* 8: 119-128 (1981).
- Arianoutsou, M., 2001. Landscape changes in Mediterranean ecosystems of Greece: implications for fire and biodiversity issues. *Journal of Mediterranean Ecology* 2: 165-178.

- Arif, I.A., Bakir, M.A., Khan, H.A., Farhan, A.H.Al., Homaidan, AliA.Al., Bahkali, Ali.,H., Sadoon, M.Al, and Shobrak, M., 2010. A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. *Int. J. Mol. Sci.* 11(5): 2079-2096.
- Arora, R. and Bhojwani, S.S., 1989. *In vitro* propagation and low temperature storage of *Saussurea lappa* C. B. Clarke-an endangered medicinal plant. *Plant Cell. Rep.* 8: 44-47.
- Arora, K., Sharma, M., Srivatava, J., Ranade, S.A. and Sharma, A.K., 2010. Rapid *in vitro* cloning of a 40-year-old tree of *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem) employing nodal stem segments. *Agroforest Syst.* 78: 53-63.
- Arrillaga, I., Marzo, T. and Segura, J., 1991. Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: 341-348.
- Awise, J.C., 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, 2nd Edition. Sinauer Ass. Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Bačić, T., Lawrence, T.J. and Cutler, D.F., 1992. Leaf anatomy of an *Arbutus* taxon from Yugoslavia. *Kew Bulletin* 47(3): 535-543.
- Bairu, M.W., Aremu, A.O. and VanStaden, J., 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methodw. *Plant Growth Regul.* 63: 147-173.
- Banko, T.J and Stefani, M.A., 1989. *In vitro* propagation of *Oxydendrum arboretum* from mature trees. *HortScience* 24(4): 683-685.
- Barbour, M.G. and Billings, W.D. (eds), 1988. "North American Terrestrial Vegetation". Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Bartish, I.V., Rumpunen, K. and Nybom, H., 2000. Compined analyses of RAPDs, cp DNA and morphology demonstrate spontaneous hybridization in the plant genus *Chaenomeles*. *Heredity* 85: 383-392.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M., 2001. *Seeds*. Academic Press, San Diego.
- Baytop, T., 1984. In: *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)* 3255, Publications of the Istanbul University, Istanbul , pp 520.
- Beckmann, J.S. and Soller, M., 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: Methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67: 35-43.
- Beer, S.C., Goffreda, J., Phillips, T.D., Murphy, J.P. and Sorrells, M.E., 1993. Assessment of genetic variation in *Avena sterilis* using morphological traits isozymes and RFLPs. *Crop Science* 33: 1386-1393.
- Beland, J.D., Krakowski, J., Ritland ,C.E., Ritland, K. and El-Kassably, Y.A., 2005. Genetic structure and mating system of northern *Arbutus menziesii* (Ericaceae) populations. *Can. J. Bot.*, 83(12): 1581-1589.
- Bennett, I.J., McComb, J.A., Tonkin, C.M. and Mcdavid, D.A.J., 1994. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. *Ann. Bot.* 74: 53-58.
- Bennett, L.K. and Davies, F.T., 1986. *In vitro* propagation of *Quercus shumardii* seedlings. *Hortscience* 21(4): 1045-1047.
- Benter, T., Papadopoulos, S., Pape, M., Manns, M. and Poliwoda, H., 1995. Optimization and reproducibility of random amplified polymorphic DNA in human. *Anal. Biochem.* 230(3): 92-100.

- Bewley, J.D. and Black, M., 1994. Seeds. Physiology of Development and Germination. Second Edition. New York, Plenum Press.
- Bhat, S.R., Chandel, K.P.S. and Malik, S.R., 1995. Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper* species. *Plant Cell Rep.* 14: 395–402.
- Bhat, Z.A., Dhillon, W.S., Rashid, R., Bhat, J.A., Dar, W.A. and Ganaie, M.Y., 2010. The role of Molecular Markers in Improvement of Fruit Crops *Not., Sci., Biol.*, 2(2) : 2-30.
- Bhatia, P., Bhatia, N.P. and Ashwath, N., 2002. *In vitro* propagation of *Stackhousia tryonii* Bailey (Stackhousiaceae): a rare and serpentine-endemic species of central Queensland, Australia. *Biodiversity and Conservation* 11: 1469-1477.
- Bhatt, I.D. and Dhar, U., 2004. Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch.-Ham. ex D. Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya. *Afr. J. Biotechnol* 3: 534–540.
- Bhojwani, S.S and Razdan, M.K. (eds), 1996. Plant Tissue Culture Theory and Practice, a Revised Edition, Volume 5.
- Bird, R., 1989. Flowering Trees and Shrubs. Quatro Publishing plc. London.
- Blamey, M. and Wilson, C.W., 1993. Mediterranean Wild Flowers, p. 165-166. Pre-Press, London.
- Böhmer, P., Meyer, B. and Jacobsen, H.J., 1995. Thidiazuron-induced high frequency of shoot induction and plant regeneration in protoplast derived pea callus. *Plant Cell Reports* 15: 26-29.
- Bonner, F.T. and Karrfalt, R.P. (eds), 2008. The Woody Plant Seed Manual. USDA, Forest Service.
- Bonnier, G., 1934. Flore complete illustrée en couleurs de France, Suisse et Belgique, Vol 7. Paris: E. Orlhac.
- Boratynski, A., Browicz, K. and Zielinski, J., 1992. Chronology of trees and shrubs in Greece. Polish Academy of Sciences. Institute of Dendrology.
- Borchert, T., and Gawenda, I., 2010. Development and application of high-throughput amplified fragment length polymorphism technique in *Calluna vulgaris* (Ericaceae). *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. March 15, 2010, vol. 13, no.2. <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol13/issue2/full/3/index.html>.
- Borchert, T., Krueger, J., Hohe, A., 2008. Implementation of a model for identifying essentially derived varieties in vegetatively propagated *Calluna vulgaris* varieties. *BioMed. Central Genetics* doi:10.1186/1471-2156-9-56 9.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314–331.
- Bradshaw, R.H., 2004. Past anthropogenic influence on European forests and some possible genetic consequences. *Forest Ecology and Management* 197(1/3): 203 – 212.
- Branco, M., Branco, C., Merouani, H. and Almeida, M.H., 2002. Germination success, survival and seedling vigour of *Quercus suber* acorns in relation to insect damage. *Forest Ecology and Management* 166: 159-164.

- Briggs, B.A., McCulloch, S.M. and Edick, L.A., 1988. Micropropagation of azaleas using thidiazuron. *Acta Hort. (ISHS)*(ISHS) 227: 330-333.
- Bunn, E., 2005. Development of *in vitro* methods for *ex situ* conservation of *Eucalyptus impensa*, an endangered mallee from southwest Western Australia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 97–102.
- Burgher-Maclellan, K., Mackenzie, K., 2004. An overview of RAPD analysis to estimate genetic relationships in Lowbush blueberry. *Small Fruits Rev.* 3, 295-305.
- Burgher, K., Jamieson, A., Lu, X., McRae, K., 1998. Genetic relationship of 26 wild blueberry clones (*Vaccinium angustifolium*), as determined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Proc. Atlantic. Plant Tissue Culture Assoc. Ann. Mtg.*, New Brunswick, p. *Abst.* 7.
- Bruschi, P., Vendramin, A.G., Bussotti, F. and Grossoni, P., 2003. Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Annals of Botany* 91: 707-716.
- 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, and López-Soria, L., 1998. Lignotuber reserves support regrowth following clipping of two Mediterranean shrubs. *Functional Ecology* 12(1): 31–38.
- Canadell, J., Lloret, F. and Lopez-Soria L., 1991. Resprouting vigour of two Mediterranean shrub species after experimental fire treatments. *Vegetatio* 95: 119-126.
- Cao, X. and Hammerschlag, F.A., 2000. Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry. *HortScience* 35: 945–947.
- Cao, X. and Hammerschlag, F.A., 2002. A two-step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv. Bluecrop. *HortScience* 37: 819–821.
- Cao, X., Fordahm, I., Douglas, L., Hammerschlag, F.A., 2003. Sucrose levels influences micropropagation and gene delivery into leaves from *in vitro* propagated highbush blueberry shoots. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 75, 255-259.
- Carcache-Blanco, E.J, Cuendet, M., Park, E.J., Su, B.N., Rivero-Cruz, J.F., Farnsworth, N.R., Pezzuto, J.M., Douglas Kinghorn, A., 2006. Potential cancer chemopreventive agents from *Arbutus unedo*. *Natural Product Research* 20(4): 327-334.
- Carlson, J.E, Tulsieram, L.K, Glaubitz, J.C, Luk, V.W.K, Kauffeldt, C., and Rutledge, R., 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theor. Appl.Genet.* 83: 194-200.
- Carmen, M., Parra, T., Clemente-Muñoz, M. and Hernandez-Bermejo, E., 2008. Genetic diversity and structure of the endangered *Betula pendula* subsp. *fontqueri* populations in the south of Spain. *Silva Fennica* 42(4) : 487-498.
- Celikel, G., Demirsoy, L. and Demirsoy, H. 2008. The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae* 118: 115-119.
- Chalupa, V., 1981. Clonal propagation of broad-leaved forest trees *in vitro*. *Commun. Inst. Forest. Chechosl.* 12: 255-271.

- Chalupa, V., 1984. *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). *Biologia Plantarum* 26: 374-377.
- Chalupa, V., 1988. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biologia Plantarum* 30(6): 414-421.
- Chandler, C.K. and Draper, A.D., 1986. Effect of zeatin and 2iP on shoot proliferation of three highbush blueberry clones *in vitro*. *HortScience* 21:1065-1066.
- Chaturvedi, R, Razdan, M.K. and Bhojwani, S.S., 2004. *In vitro* clonal propagation of an adult tree of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) by forced axillary branching. *Plant Sci* 166:501–506.
- 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.
- Chessa, I. and Nieddu, G., 2009. Description of the Strawberry tree. <http://www1.it/ueresgen29/ds9htm>
- Chiarucci, A., Pacini, E. and Loppi, S., 1993. Influence of temperature and rainfall on fruit and seed production of *Arbutus unedo* L. *Botanical Journal of the Linnean Society* 111: 71 – 82.
- Chitra, V.D.S. and Padmaja, G., 2002. Seasonal influence on axillary bud sprouting and micropropagation of elite cultivars of mulberry. *Scientia Horticulturae* 92: 55-68.
- Chong, D.K.X, Yeh, F.C, Aravanopoulos, F.A and Zsuffa, L., 1995. DNA fingerprinting Willows (*Salix* L.) using Polymerase Chain Reaction with the M13 universal primer. *Scand. J.For. Res.* 10: 27-31.
- Cid, L.P.B., Machado, A.C.M.G., Carvalheira S.B.R.C and Brasileiro, A.C.M., 1999. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 56: 17-23.
- Clausen, J, Keck DD, and Hiesey W, 1940. Experimental studies on the nature of species. I. Effects of varied environments on western North American plants. *Carnegie Inst. Wash. Publ.* 520.
- Cline, M.G., 1994. The role of hormones in apical dominance: New approaches to an old problem. *Physiologia Plantarum* 90: 230–237.
- Coleman M., Hollingsworth, M. and Hollingsworth, P.M., 2000. Application of RAPDs to the critical taxonomy of the English endemic elm *Ulmus plotii* Druce. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133(3): 241–262.
- Coleman, G.D. and Ernst, S.G., 1989. *In vitro* shoot regeneration of *Populus deltoides*: effect of cytokinin and genotype. *Plant Cell Reports* 8: 459-462.
- Coleman, G.D., and Ernst, S.G., 1990. Axillary shoot proliferation and growth of *Populus deltoides* shoot cultures. *Plant Cell Reports* 9: 165-167.
- Corchete, M.P., Diez J.J. and Valle, T., 1993. Micropropagation of *Ulmus pumila* L. from mature trees. *Plant Cell Reports* 12: 534-536.
- Cowling, R.M., Rundel, P.W., Lamont, B.B., Arroyo, M.K. and Arianoutsou, M, 1996. Plant diversity in Mediterranean climate regions, *Trends in ecology and evolution*, 11: 362-366.

- Cox, H.T., 1948. Studies in the comparative anatomy of the Ericales II. Ericaceae-subfamily Arbutoideae. *American Midland Naturalist* 40: 493-516.
- Crane, P.R. and Pleasants, L.J., 2006. Taxonomy and the future of plant diversity. In: Leadley, E. and Jury, S. (eds), *Taxonomy and Plant Conservation*, 1st edn. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Crawley, M.J., Long, C.R., 1995. Alternate bearing, predator satiation and seedling recruitment in *Quercus robur* L. *J. Ecol.* 83: 683–696.
- Cronquist, A., 1981. An intergrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Cuenca, B., Ballester, A. and Vieitez, A.M., 2000. *In vitro* adventitious bud regeneration from internode segments of beech. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 213-220.
- Cuesta, C., Ordas, R.J., Rodriguez, A. and Fernandez, B., 2010. PCR-based molecular markers for assessment of somaclonal variation in *Pinus pinea* clones micropropagated *in vitro*. *Biol Plant* 54(3): 435-442.
- Culham, A., 2006. Taxonomy and the future of plant diversity. In: Leadley, E. and Jury, S. (eds), *Taxonomy and Plant Conservation*, 1st edn. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Dafis, S., Papastergiadou, E., Georgiou, K., Mpampalonas, D., Georgiadis, T., Papageorgiou, M., Lazaridou, T. and Tsiaousi, V., 1997. Directive 92/43/EEC. The Greek “Habitat” Project Natura 2000: An Overview. Commission of the European Communities DG XCI, The Goulandris Natural History Museum-Greek biotope/Wetland Centre.
- Dallman, P.R., 1998. *Plant life in the world's Mediterranean climates*, University of California Press, Berkeley.
- Darvasi, A., Soller, M., 1994. Optimum spacing of genetic markers for determining linkage between marker vloci and quantitative trait loci. *Theor. Appl. Genet.* 89: 351–357.
- Dawkins, R.M., 1936. The Semantics of Greek Names for Plants. *The Journal of Hellenic Studies* 56(1): 1-11.
- Dawson, I., Simons, A., Waugh, R. and Powell, W., 1996. Detection and pattern of interspecific hybridization between *Gliricidia sepium* and *G. maculate* in Meso-Meso-America revealed by PCR-based assays. *Mol. Ecol.* 5: 89-98.
- De Fossard, R. A., Nitsch, C., Cresswell, R. J. and Lee, H. C. M., 1974. Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. *N. Z. J. For. Sci.* 4: 267–278.
- De Klerk, G.J., 1990. How to measure somaclonal variation. *Acta Bot. Neerl.* 39(2): 129-144.
- Debnath, S.C and McRae, K.B., 2001. *In Vitro* Culture of Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.): The influence of cytokinins and media types on propagation. *Small Fruits Review*, 1(3): 3-19.
- Debnath, S.C. and McRae, K.B., 2001 (α). An efficient *in vitro* shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* ait.) by axillary bud proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37(2): 243-249.

- Debnath, S.C., 2004. Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through *in vitro* axillary shoot proliferation. *Plant Growth Regulation* 43: 179–186.
- 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.
- Debnath, S.C., 2005 (α). A Two-step Procedure for Adventitious Shoot Regeneration from *in vitro*-derived Lingonberry Leaves: Shoot Induction with TDZ and Shoot Elongation Using Zeatin. *HortScience*, 40(1): 189-192.
- Debnath, S.C., 2007. An assessment of the genetic diversity within a collection of wild cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) clones with RAPD-PCR. *Genet. Resour. Crop Ev.*, 54: 509-517.
- Debnath, S.C., 2008. Zeatin-induced one-step *in vitro* cloning affects the vegetative growth of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) micropropagules over stem cuttings. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 93: 231-240.
- 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.
- Delaporte, K.L., Collins, G.G., Conran, J.G. and Sedgley, M., 2001. Molecular analysis of an interspecific hybrid ornamental eucalypt for parental identification. *Euphytica* 122: 165-170.
- 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.
- Dhar, U., Upreti, J. and Bhatt, I.D., 2000. Micropropagation of *Pittosporum napaulensis* (DC.) Rehder and Wilson-a rare, endemic Himalayan medicinal tree. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 63: 231-235.
- Di Castri, F., 1981. Mediterranean-type shrublands of the world. *In* “Ecosystems of the World” (F. di Castri, DW Goodall, and RL Spech, eds), Vol. 11: 1-52. Elsevier, Amsterdam.
- Diba, M.A., Paolini, J., Bendahou, M., Varesi, L., Allali, H., Desjobert, J.M., Tabti, B., Costa, J., 2010. Chemical composition of fatty acid and unsaponifiable fractions of leaves, stems and roots of *Arbutus unedo* and *in vitro* antimicrobial activity of unsaponifiable extracts. *Nat Prod Commun.* 5(7): 1085-90.
- Diggs, G.M. and Breckon, G.J., 1981. Generic circumscription in the Arbuteae (Ericaceae). 5–88 in, G. M. Diggs Jr. Systematic studies in the Arbuteae (Ericaceae, Vaccinioideae) including a revision of the genus *Comarostaphylis*. The University of Wisconsin-Madison, Ph.D. Dissertation.
- Driver, J.A. and Kuniyuki, P., 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut root stock. *HortSci.* 19: 507-509.
- Dunemann, F., Kahnau, R. and Stange, I. 1999. Analysis of complex leaf and flower characters in *Rhododendron* using a molecular linkage map. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 1146-1155.

- Earle, E.D. and Langhans, R.W., 1974. Propagation of *Chrysanthemum in vitro*. I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. J Am Soc Hort Sci 99:128–132.
- Eccher, T. and Noe, N., 1989. Comparison between 2iP and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) Acta Hort. (ISHS) 441: 185-190.
- Economou, A.S and Read, P.E., 1984. *In vitro* shoot proliferation of Minnesota deciduous azaleas. HortScience (19)1: 60-61.
- Economou, A.S. and Maloupa E., 1994. Regeneration of *Elaeagnus angustifolia* from leaf segments of *in vitro*-derived shoots. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 40: 285-288.
- Einset, J.W. and Alexander, J.H., 1985. Multiplication of *Syringa* species and cultivars in tissue culture. Comp. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 34: 628-636.
- El Omari, B., Fleck, I., Aranda, X., Abadia, A., Cano, A. and Arnao, M., 2003. Total antioxidant activity in *Quercus ilex* resprouts after fire. Plant Physiol. Biochem. 41: 41–47.
- Elliott, M., Edmonds, R.L. and Mayer, S., 2002. Role of fungal diseases in decline of Pacific madrone. Northwest Science, 76(2): 293-303.
- El-Morsy, A.A. and Millet, B., 1996. Rhythmic Growth and Optimization of Micropropagation: The Effect of Excision Time and Position of Axillary Buds on *in vitro* Culture of *Citrus aurantium* L. Annals of Botany 78: 197-202.
- El-Sayed El-Mahrouk, M. Hassan Dewir, Y. and Mikael Kalifa Omar, A., 2010. *In vitro* propagation of adult strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) through adventitious shoots and somatic embryogenesis, Propagation of Ornamental Plants 10(2): 93-98.
- Ertekin, M. and Kirdar, E., 2010. Breaking seed dormancy of strawberry tree (*Arbutus unedo*). International Journal of Agriculture & Biology 12(1): 57 – 60.
- Etisham-Ul-Haq, M., Allnutt, T.R., Smith-Ramírez, C., Gardner, M.F., Armesto J.J. and Newton, A.C., 2001. Patterns of Genetic Variation in *in* and *ex situ* Populations of the Threatened Chilean Vine *Berberidopsis corallina*, Detected Using RAPD Markers. Annals of Botany 87: 813-821.
- Evers, P.W., 1987. Correlations within the tree. In: Cell and Tissue Culture in Forestry. J.M. Bonga and D.J. Durzan, eds. Nijhoff, Dordrecht, pp 738-764.
- Faisal, M., Ahmad, N. and Anis, M., 2005. Shoot multiplication in *Rauvolfia tetraphylla* L. using thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 187–190.
- Farmer, R.E., Charrette, P., Searle, I.E., and Tarjan, D.P., 1984. Interaction of light, temperature, and chilling in the germination of black spruce. Can. J. For. Res. 14: 131-133.
- Favre, J.M. and Juncker, B., 1987. *In vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 8: 49-60.
- Fournier, N., Rigling A., Dobbertin M. and Gugerli F., 2006 Faible différenciation génétique, à partir d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD), entre les

- types de pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) d'altitude et de plaine dans les Alpes à climat continental, Ann. For. Sci. 63: 431-439.
- 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.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soyabean root cells. Exp. Cell. Res. 50: 151-158.
- Gamborg, O.L. and Phillips, G.C. (eds), 1995. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Garkava-Gustavsson L., Persson, H.A., Nybom, H., Rumpunen, K., Gustavsson, B.A. and Bartish I.V., 2005. RAPD-based analysis of genetic diversity and selection of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) material for *ex situ* conservation. Genet. Resour. Crop Ev. 52: 723-735.
- Garzuglia, M., 2006. Threatened, Endangered and Vulnerable Tree Species: A Comparison between FRA 2005 and the IUCN Red List. Rome. Working Paper 108/E.
- George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. (eds), 2008. Plant Propagation by tissue culture, 3rd Edition. Springer.
- George, E.F., 1993. Plant Propagation by Tissue Culture (Part I: The Technology), Exegetics LTD, UK.
- George, E.F. and Sherrington, P.D., 1984. Plant Propagation by tissue Culture. Exegetics Ltd., Reading, England.
- Gérard, P.R., Fernandez-M. J.F, Bertolino, P., Dufour, J. and Raquin, C., 2006. Frascaria-Lacoste N., New insights in the recognition of the European ash species *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl as useful tools for forest management, Ann. For. Sci. 63: 733-738.
- Gilman, E.F. and Watson, D. G., 1993. http://hort.ufl.edu/database/documents/pdf/tree_fact_sheets/arbunea.pdf. Fast Sheet ST-85, Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Giongo, A., Vendramin, E., Quarta, R., Dettori, M.T., Verde, I. and Bergamini, A., 2006. Use of RAPD Analysis to Characterize *Vaccinium* Accessions. Acta Hort. (ISHS) 715: 153-156.
- Giordani, E., Benelli, C., Perria, R. and Bellini, E., 2005. *In vitro* germination of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) genotypes: establishment, proliferation, rooting and callus induction. Adv. Hort. Sci. 19(4): 219 – 220.
- 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). New Biotechnology 27(6): 882-892.

- Gomes, F. and Canhoto J., 2009. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 45: 72–82.
- Gomes, F., Lopes, M.L., Santos, T. and Canhoto, J.M., 2009. Micropropagation of selected trees of *Arbutus unedo* L. through axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis. *Acta Hort. (ISHS)(ISHS)* 839:111-116.
- Gomez, M.P. and Segura, J., 1995. Axillary shoot proliferation in cultures of explants from mature *Juniperus oxycedrus* trees. *Tree Physiology* 15: 625-628.
- Gonçalves, J.C. and Roseiro, R.J. 1994. Establishment and in vitro multiplication of *Arbutus unedo* L. seedlings. VIII International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Abst 20 Firenze, Italy.
- González-Benito, M.E. and Martin, C., 2011. *In vitro* preservation of Spanish Biodiversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol.:* (47): 46 – 54.
- Goudelis, G., Ganatsas, P.P., Spanos, I. and Karpi, A., 2007. Effect of repeated fire on plant community recovery in Penteli, central Greece. Stokes *et al.*, (eds), *Eco- and Ground Bio-Engineering: the Use of Vegetation to Improve Slope Stability*, 337-343.
- Gratani, L. and Amadori, M., 1991. Post-fire resprouting of shrubby species in Mediterranean maquis. *Vegetatio* 96: 137-143.
- Gratani, L. and Crescente, M.F., 1997. Phenology and leaf adaptive strategies of Mediterranean maquis plants. *Ecol. Medit.* 23: 11-19.
- Gray, D.J. and Benton, C.M., 1991. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 27: 7 – 14.
- Grayer, R.J., 2006. Chemosystematics, diversity of plant compounds and plant conservation. *In: Leadley, E. and Jury, S. (eds), Taxonomy and Plant Conservation*, 1st edn. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Greenacre, M.J. and Underhill, L.G., 1982. Scaling a data matrix in a low-dimensional Euclidean space. In Hawkins, D.M. (ed). *Topics in applied multivariate analysis*. Cambridge Univ. press. New York. pp. 183-268. Applied Biostatistics, Inc.
- Gresshoff, P.M. and Doy, C.H., 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta*: 107: 161-70.
- Grieve, M., 1967. *A Modern Herbal*, Vol 1. Hafner Publishing Co.: New York and Kondon, 53.
- Grigoriadou, K., Vasilakakis, M. and Eleftheriou, E., 2002. *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar "Chondrolia Chalikidikis". *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 71: 47-54.
- Hammami, I., Jellali, M., Ksontini, M. and Rejeb, M.N., 2005. Propagation of the strawberry tree through seed (*Arbutus unedo*). *International Journal of Agriculture & Biology* 7(3): 457-459.
- Hagidimitriou, M., Katsiotis, A., Menexes, G., Pontikis, C. and Loukas, M., 2005. Genetic diversity of major Greek olive cultivars using molecular (AFLPs and RAPDs) markers and morphological traits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130(2): 211-217.

- 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.
- Haywood, J.D., 1994. Seed viability of selected tree, shrub, and vine species stored in the field. *New Forests* 8: 143-154.
- Hazarika, B.N., 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Curr. Sci.* 85: 1704-1712.
- Heide, O.M., 1969. Non-reversibility of gibberellin-induced inhibition of regulation in *Begonia* leaves. *Physiol Plant* 22:671-679.
- Heider, B., Andersson, M.S. and Schultze-Kraft, R., 2007. RAPD variation among North Vietnamese *Flemingia macrophylla* (Willd.) Kuntze ex Merr. accessions, *Biodivers. Conserv.* 16: 1617-1631.
- Herrmann, S. and Buscot, F., 2007. Cross talks at the morphogenetic, physiological and gene regulation levels between the mycobiont *Piloderma croceum* and oak microcuttings (*Quercus robur*) during formation of ectomycorrhizas. *Phytochemistry* 68: 52-67.
- Herrera, C.M., 1987. Vertebrate –dispersed plants of the Iberian peninsula: a study of fruit characteristics. *Ecological Monographs* 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 Arbutioideae (Ericaceae): Implications for the Madrean-Tethyan Hypothesis. *Systematic Botany* 26(1): 131-143.
- Hillier, H., 1993. *The Hillier manual of trees and shrubs*. David and Charles, London.
- Hobson, G.E., 1981. Changes in mitochondrial composition and behavior in relation to dormancy. *Annals of Applied Biology*, 98: 541-544.
- Hogon, S., 2008. *Trees for all Seasons*, 41. TimberPress, Inc. Oregon, Portland
- Hosier, M.A., Flatebo, G and Read, P.E., 1985. *In vitro* propagation of lingonberry. *HortScience* 20: 384-385.
- Hrsak, V., Brana, S., Sedlar, Z. and Pejic, I., 2011. Morphometric and molecular (RAPD) analysis of six *Serapias* taxa from Croatia. *Biologia* 66(1): 55-63.
- Huetteman, C.A. and Preece, J.E., 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 33: 105-119.
- Hume, L., 1984. The effect of seed maturity, storage on the soil surface, and burial on seeds of *Thlaspi arvense* L. *Can. J. Plant Sci.* 64: 961-969.
- Huxley, A., 1992. *The New RHS Dictionary of Gardening*.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., 1990. *PCR protocols-a guide to methods and applications*. Academic Press, London.
- International Seed Testing Association., 1999. *International rules for seed testing*. *Seed Sci. Technol.* 27, Suppl.
- Issa, R.A., Afifi, F.U. and Amro, B.I., 2008. Studying the anti-tyrosinase effect of *Arbutus andrachne* L. extracts. *International Journal of Cosmetic Science* 30: 271-276.

- 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.
- Izhaki, I., Korine, C. and Arad, Z., 1995. The effect of bat (*Rousettus aegyptiacus*) dispersal on seed germination in eastern Mediterranean habitats. *Oecologia* 101: 335-342.
- Jaakola, L., Tolvanen, A., Laine, K. and Hohtola, A. 2001. Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation *in vitro* and rooting of bilberry and lingonberry microshoots Laura Jaakola. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 73–77.
- Jain, A., Pandit, M.K., Elahi, S., Bhaskar, A. and Kumar, V., 2000. Reproductive behaviour and genetic variability in geographically isolated populations of *Rhododendron arboreum* (Ericaceae). *Curr. Sci.* 79: 1377-1381.
- James, S., 1984. Lignotubers and burls - their structure, function and ecological significance in mediterranean ecosystems. *Bot. Rev.* 50: 225-266.
- James, E.A., 2004. Conserving *Grevillea williamsonii*: the importance of taxonomic research for appropriate action *BGJournal*, 1(1): 17-19.
- Jasbemski, W.F., Meyer, F.G. and Ricciardi, M., 2002. Catalog of Plants. In the: The natural history of Pompeii. W.F. Jashemski and F.G. Meyer. Cambridge University Press, UK.
- Javed Iqbal, M., Paden, D.W. and Rayburn, A.L., 1995. Assessment of genetic relationships among *Rhododendron* species, varieties and hybrids by RAPD analysis. *Scient. Hort.*, 63: 215-223.
- Jones, J.B. and Murashige, T., 1974. Tissue culture propagation of *Aechmea fasciata* and other bromeliads. *Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society* 24: 117-126.
- Jones, S.B. and Luchsinger, A.E., 1987. *Plant systematics*. McGraw-Hill International editions, Singapore.
- Juncker, B. and Favre, J.M., 1989. Clonal effects in propagating oak trees via *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 267-276.
- Kacharava, V., Ketskhoveli, N., Kurashvili, B. and Maruashvili, L., 1982. *Red Data Book of the Georgian SSR*. Tbilisi: Sabchota Sakartvelo (in Georgian).
- 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.
- Karikas, G.A. and Giannitsaros, A., 1990. Phenolic glucosides of *Arbutus unedo* leaves, *Plantes Medicinales et Phytotherapie* 24(1): 27–30.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. and Hodgkin, T., 1997. *Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation: A Guide to the Technologies*. IPGRI Technical Bulletin No 2. International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy.
- Kartsonas, E. and Papafotiou, M., 2007. Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 90: 111–116.

- Kartsonas, E.D. and Papafotiou, M., 2009. Micropropagation of *Quercus euboica* Pap., a rare endemic oak species in Greece. *Acta Hort. (ISHS)* 813: 485-490.
- Kartsonas, E. and Papafotiou, M., 2010. Effect of culture vessels size and covering material on leaf morphological and anatomical characteristics of *Quercus euboica* *in vitro* plantlets. *Acta Hort. (ISHS)* 885: 191-196.
- Kaveriappa, K.M., Phillips, L., Trigiano, R.N. 1997. Micropropagation of flowering dogwood (*Cornus florida*) from seedlings. *Plant Cell Rep.* 16: 485-489.
- Kim, M.K., Sommer, H.E., Bongarten, B.C. and Merkle, S.A. 1997. High frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidamber styraciflua* L. by thidiazuron. *Plant Cell. Rep.* 16: 536-540.
- Klein-Lankhorst, R.M, Vermunt, A., Weide, R., Liharska, T. and Zabel, P., 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83: 108-114.
- Knuth, P., 1909. Handbook flower pollination, III. Clarendon Press. Oxford.
- Köse, H., 1998. Studies on the germination of some woody ornamental plants in the Turkish flora *Arbutus unedo* L. and *Arbutus andrachne* L. *Anadolu* 2: 55 – 65.
- Koubouris, G. and Vasilakakis, M., 2006. Improvement of *in vitro* propagation of apricot cultivar “Bebecou”. *Plant Cell Tiss. and Organ Cultur.* 85: 173-180.
- Koukoura, Z.S. and Nastis, A.S., 1994. Tannin content of selected fodder trees and shrubs and their effect on *in vitro* digestibility. *Cahiers Mediterraneenes* 4: 1022-1379.
- Krebs, C., Mahy, G., Matthies, D., Schaffner, U., Tiebre, M-S and Bizoux, J-P., 2010. Taxa distribution and RAPD markers indicate different origin and regional differentiation of hybrids in the invasive *Fallopia complex* in central-western Europe. *Plant Biology* 12: 215-223.
- Kukreja, A.K. and Mathur, A.K., 1985. Tissue culture studies in *Duboisia myoporoides*. I. Plant regeneration and clonal propagation by stem node cultures. *Planta Med* 2: 93-96.
- Kyndt, T., Romeijn-Peeters, E., Van Droogenbroeck, B., Romero-Motochi, J.P., Gheysen, G. and Goetghebeur, P., 2005. Species relationships in the genus *Vasconcellea* (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence. *American Journal of Botany* 92: 1033-1044.
- Lacey, C.J., 1983. Development of large plate-like lignotubers in *Eucalyptus botryoides* Sin. in relation to environmental factors. *Aust. J. Bot.* 31: 105-118.
- Lakshmanan, P., Lee, C.L and Goh, C.-J., 1997. An efficient *in vitro* method for mass propagation of a woody ornamental *Ixora coccinea* L. *Plant Cell Reports* 16: 572-577.
- Lall, S., Mandegaran, Z. and Roberts, A.V., 2005. Shoot multiplication in cultures of mature *Alnus glutinosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 347-350.
- Le-Houerou, H.N., 1981. Impact of man and his animals on Mediterranean vegetation. In: di Castri F, Goodall DW, Specht RL, eds. *Mediterranean-type Shrublands. Ecosystems of the World* 11, Elsevier Scientific. Publ., Amsterdam: 479-521.

- Le-Houerou, H.N., 1987. Vegetation wildfires in the Mediterranean Basin: evolution and trends. *Ecologia Mediterranea*, 13: 13-24.
- Leadley, E. and Jury, S. (eds), 2006. Taxonomy and the future of plant diversity. In: *Taxonomy and Plant Conservation*, 1st edn. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Lehner, A., Campbell, M.A, Wheeler, N.C, Poykko, T., Glossl, J., Kreike, J. and Neale, D.M., 1995. Identification of a RAPD marker linked to the pendula gene in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst. f. pendula). *Theor. Appl. Genet.* 91: 1092-1094.
- Leifert, C., Pryce, S., Lumsden, P.J. and Waites, W.M, 1992. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 171-179.
- Leiva, M.J. and Fernandez-Ales, R., 2005. Holm-oak (*Quercus ilex* subsp. Ballota) acorns infestation by insects in Mediterranean dehesas and shrublands. Its effect on acorn germination and seedling emergence. *Forest Ecology and Management* 212: 221–229.
- Levi, A. and Rowland, L.J., 1997. Identifying blueberry cultivar and evaluating their genetic relationships using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR)-anchored primers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122, 74–78.
- Li, F., Gan, S., Weng, Q., Zhao, X., Huang, S., Li, M., *et al.*, 2008. RAPD and morphological diversity among four populations of the tropical tree species *Paramichelia baillonii* (Pierre) Hu in China. *Forest Ecol Manag* 255: 1793-801.
- Lilis, M. and Fontanella, A., 1992. Comparative phenology and growth in different species of the Mediterranean maquis of central Italy. *Vegetatio* 99-100: 83-96.
- 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 Disease* 94(7): 919.
- Link, H.F., 1821. *Enumeratio plantarum regii botanici berolinensis altera*. Second enumeration of plants from Berlin Royal Botanic Garden. Berlin, Reiner.
- Link, W.,C., Dixkens, M., Singh, M.,Schwall, M. and Melchinger, A.E., 1995. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm reveal by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90: 27-32.
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100-127.
- Litwinczuk, W., Szczerba,G. and Wrona, D., 2005. Field performance of highbush blueberries (*Vaccinium x corymposum* L.) cv. “Herbert” propagated by cuttings and tissue culture. *Sciencia Hort.* 106: 162-169.
- Liu, P., Yang, Y.S., Hao, C.Y. and Guo, W.D., 2007. Ecological risk assessment using RAPD and distribution pattern of a rare and endangered species. *Chemosphere*, 68: 1497–1505.
- Lloret, F., and Vilà, M., 1997. Clearing of vegetation in Mediterranean garigue: response after a wildfire. *Forest Ecol. Manage.* 93: 227–234.

- Lloyd, G.B. and B.H. McCown., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 30: 421–427.
- Lodhi, M.A, Ye, G.N, Weeden, N.F and Reisch, B.I., 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Molecular Biology Reporter 12(1): 6-13.
- Lopes, L., Sá, O., Baltasar, J.L., Pereira, J.A. and Baptista, P., 2010. Analysis of molecular and morphological diversity of *Arbutus unedo* in the interior North and Center of Portugal. In XXXV Jornadas Portuguesas de Genética. Braga.
- Lu ,H.P., Cai, Y.W, Chen, X.Y., Zhang, X., Gu,Y.J. and Zhang, G.F., 2006. High RAPD but no cpDNA sequence variation in the endemic and endangered plant, *Heptacodium miconioides* Rehd. (Caprifoliaceae) *Genetica*, 128: 409–417.
- Lyrene, P.M., 1978. Blueberry callus and shoot-tip culture. Proc. Fla. State Hort. Soc. 91: 171–172.
- Lyrene, P.M., 1980. Micropropagation of rabbiteye blueberries. HortScience 15: 80–81.
- Mabberley, D.J. and Placito, P.J., 1993. Algarve Plants and Landscape, Oxford Univ. Press.
- Macdonald, B., 1986. Practical Woody Plant Propagation for Nursery Growers Bruce, Vol I, Timber Press, Portland, Oregon.
- Mackay, W.A., 1996. Micropropagation of Texas madrone, *Arbutus xalapensis*. Hortscience 31(6): 1028-1029.
- Mackay, W.A., Tipton, J.L. and Thompson, G.A., 1995. Micropropagation of Mexican redbud, *Cercis canadensis* var. mexicana. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43: 295-299.
- Majada, J.P., Sánchez-Tamés, R., Revilla, M.A. and Casares, A., 2000. Micropropagation of *Ilex aquifolium* L. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 36: 521-526.
- Maki, M., Horie, S. and Yokoyama, J., 2002. Comparison of genetic diversity between narrowly endemic shrub *Menziesia goyozanensis* and its wide soread congener *M. pentandra* (Ericaceae). Conservation Genetics 3: 421-425.
- Mantel, N.A., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27: 209-220.
- Malanson, G.P. and Trabaud, L., 1987. Ordination analysis of components of resilience of *Quercus coccifera* garrigue. Ecology 68: 463–472.
- 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.
- Manzanera, J.A. and Pardos, J.A., 1990. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus ruber* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21: 1-8.
- Marcotrigiano, M., McGlew, S.P., 1991. A two-stage micropropagation system for cranberries. J. Am. Soc. Hort. Sci. 116: 911-916.
- Marcotrigiano, M., McGlew, S.P., Hackett, G. and Chawla, B., 1996. Shoot regeneration from tissue-cultured leaves of the american cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 44:195–199.

- Margaris, N.S., 1981. Adaptive strategies in plants dominating Mediterranean-type ecosystems. In: di Castri F, Goodall DW, Specht RL, eds. Mediterranean-type Shrublands. Ecosystems of the World 11. Elsevier Scientific Publ., Amsterdam: 309-315.
- Mariotto, S., Ciampa, A.R., de Prati, A.C., Darra, E., Vincenzi, S., Segal, M., Cavalieri, E., Shoji, K. and Suzuki, H. 2008. Aqueous Extract of *Arbutus unedo* Inhibits STAT1 Activation in Human Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231 and Human Fibroblasts Through SHP2 Activation. Medicinal Chemistry 4(10): 219-228.
- Martin, J.H., Mifsud, D. and Rapisarda, C., 2000. The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean Basin. Bulletin of Entomological Research 90: 407–448.
- Martins, A., Barroso, J. and Pais, M.S., 1996. Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill. Mycorrhiza 6: 265–270.
- Martin, C., Para, T., Clemente-Munoz, M and Hernandez-Bermejo, E., 2008. Genetic diversity and structure of the endangered *Betula pendula* subsp. *Fontqueri* populations in the South of Spain. Silva Fennica, 42(4): 487-498.
- Martini, A.N. and Papafotiou, M., 2011. Effect of Thidiazuron on shoot regeneration and subsequent rhizogenesis of *Malosorbus florentina* ZUCC. Acta Hort. (ISHS) 923: 169-176.
- Martínez, T., 2008. Role of Various Woody Species in Spanish Mediterranean Forest and Scrubland as Food Resources for Spanish Ibex (*Capra pyrenaica* Schinz) and Red Deer (*Cervus elaphus* L.). Advances in Agroforestry, vol. 6. Springer Netherlands. 233-253.
- McClelland, M.T., Smith, M.A.L. and Carothers, Z.B., 1990. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 23:115-123.
- McCown, B.H. and Lloyd, G., 1981. Woody plant medium (WPM)- a revised mineral formulation for micro-culture of woody plant species. HortScience 16: 453.
- Meier, K. and Reuther, G., 1994. Factors controlling micropropagation of mature *Fagus sylvatica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39: 231-238.
- Meiners, J, Schwab, M. and Szankowski, I., 2007. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 89: 169-176.
- Mekhfi, H., Haouari, M.El, Legssyer, A., Bnouham, M., Aziz, M., Atmani, F.A. and Ziyat, A., 2004. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 94(2-3): 317-322.
- Mereti, M., Grigoriadou, K. and Nanos, G.D., 2002. Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. Sci. Hortic. 93: 143-148.
- Mereti, M., Grigoriadou, K., Levantakis, N. and Nanos, G.D., 2003. *In vitro* rooting of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in medium solidified by peat-perlite mixture in combination with agar. Acta Hort. (ISHS) 616: 207-210.
- Mesléard, F. and Lepart, J., 1991. Germination and seedling dynamics of *Arbutus unedo* and *Erica arborea* on Corsica. Journal of Vegetation Science (2): 155 – 164.

- Metaxas, D.J., Syros, T.D., Yupsanis, T. and Economou, A.E., 2004. Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus boccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. *Plant Growth Regul.* 44: 257-266.
- Miller, R.A and Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Milne, R.I., Abbott, R.J., 2008. Reproductive isolation among two interfertile *Rhododendron* species: low frequency of post-F-1 hybrid genotypes in alpine hybrid zones. *Mol. Ecol.* 17, 1108-1121.
- Miñano, H.S., González-Benito, M.E. and Martín, C., 2009. Molecular characterization and analysis of somaclonal variation in *chrysanthemum* cultivars using RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 122(17): 238–243.
- Mitchell, A., 1992. Collins Field Guide. Trees of Britain and Northern Europe, Collins, London.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Yano, M., Bhatia, C.R. and Sasaki, T., 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87–103.
- Mok, M.C., Mok, D.W.S., Armstrong, D.J., Shudo, K., Sogai, Y. and Okamoto, T., 1982. Cytokinin activity of N Phenyl-N'-1,2,3-Thidiazol-5-yl-urea (Thidiazuron). *Phytochemistry* 21: 1509-1512.
- Molina, M. Pardo-de-Santayana, M., Aceituno, L., Morales, R. and Tardío, J., 2011. Fruit production of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in two Spanish forests. *Forestry* 84(4): 419-429.
- Monteleone, I., Ferrazzini, D. and Belletti, P., 2006. Effectiveness of neutral RAPD markers to detect genetic divergence between the subspecies *uncinata* and *mugo* of *Pinus mugo* Turra. *Silva Fennica* 40(3): 391–406.
- Mooney, H.A. and Hobbs, R.J., 1986. Resilience at the individual plant level. In: Dell, D., Hopkins, A.J.M. and Lamont, B.B. (eds), *Resilience in Mediterranean-type Ecosystems*, 65-82. Dr W. Junk, The Hague.
- Moralejo E., Belbahri L., Calmin G., García-Muñoz J.A., Lefort F. and Descals E., 2008. Strawberry Tree Blight in Spain, a New Disease Caused by various *Phytophthora* Species. *Journal of Phytopathology*, 156(10): 577-587.
- Moreno, J.M. and Oechel, W.C., 1994. Fire intensity as a determinant factor of postfire plant recovery in southern California chaparral. In: Moreno, J.M. and Oechel, W.C. (Eds.), *The Role of Fire in Mediterranean-Type Ecosystems*. Springer-Verlag, New York, 26–45.
- Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J.M., Carpena-Ruiz, R.O. and Esteban, E., 2008. Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere* 71: 466-473.
- Morini, S. and Fiaschi, G., 2000. *In vitro* propagation of strawberry tree. *Agricoltura Mediterranea* Vol. 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(1): 111-121.

- Mullin, R.H., Smith, S.H., Frazier, N.W., Schlegel, D.E. and McCall, S.R., 1974. Meristem cultures free Strawberries of mild yellow edge, Pallidosis and Mottle Diseases. *Phytopathology* 64: 1425-1429.
- Muradoglu, F., Balta, F. and Battal, P., 2010. Endogenous hormone levels in bearing and non-bearing shoots of walnut (*Juglans regia* L.) and their mutual relationships. *Acta Physiol. Plant* 32: 53-57.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantar.* 15: 473-497.
- Murashige, T., 1977. Current status of plant cell and organ cultures. *HortScience* 12: 127-130.
- Murashige, T., 1977(β). Clonal crops through tissue culture. In: Barz, W., Reihard, E., Zenk, M.H. (eds). *Plant tissue culture and its biotechnological application*. Berlin: Springer-Verlag, pp 392-403.
- Murthy, B.N.S., Murch, S.J. and Saxena, P.K., 1998. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 34: 267-275.
- Murthy, B.N.S., Victor, J., Singh, R.P.S., Fletcher, R.A. and Saxena, P.K., 1996. *In vitro* regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.) stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by thidiazuron. *Plant Growth Regulation* 19: 233–240.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G. and Da Fonseca G.A.B., 2000. Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853 – 858.
- Mylona, P. and Dolan, L., 2002. The root meristem. In: McManus M. T.; Weit B.E. (eds) *Meristematic tissues in plant growth and development*. Sheffield Academic, Sheffield, pp 279–292.
- Narbona, E., Arista, M. and Ortiz, P.L., 2003. Seed germination of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Botanica Malacitana* 28: 73-78.
- Narzary, D., Mahar, K.S., Rana, T.S. and Ranade, S.A., 2009. Analysis of genetic diversity among wild pomegranates in Western Himalayas using PCR methods. *Scientia Horticulturae* 121: 237-242.
- Nason, J., Ellstrand, N. and Arnold, M., 1992. Patterns of hybridization and introgression in populations of oaks, manzanitas and irises. *Amer. J. Bot.*: 101-111.
- Naveh, Z., 1975. The evolutionary significance of fire in the Mediterranean Region. *Vegetatio* 29(3): 199-208.
- Naveh, Z., 1988. Multifunctional reconstruction of semiarid Mediterranean landscapes for multipurpose land uses. In: Allen EB, ed. *The Reconstruction of Disturbed Arid Lands, an Ecological Approach*. AAAS. Selected Symposium, Westview Press, Inc.: 234-256.
- Nejad, P., 2005. Pathogenic and ice-nucleation active (INA) bacteria causing dieback of willows in a short rotation forestry. Doctor's dissertation Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Nikolaeva, M.G., 1969. Physiology of deep dormancy in seeds. Izdatel'stvo "Nauka", Leningrad [Translated from Russian by Z. Shapiro, National Science Foundation, Washington, DC]

- Nikolaeva M.G., 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern. In: KHAN A.A. (ed.), Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. Amsterdam, North Holland Publishing Co., Academic Press: 51–74.
- Nikolić, R., Mitić, N., Miletić, R. and Nesković, M. 2006. Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. J Plant Growth Regul 25: 187–194.
- Nitsch, C. and Nitsch, J.P., 1967. The induction of flowering *in vitro* in stem segments of *Plumbago indica* L. 1. The production of vegetative buds. Planta 72: 355–370.
- Nobre, J., Santos, C. and Romano, A., 2000. Micropropagation of the Mediterranean species *Viburnum tinus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 75–78.
- Norton, M.E. and Norton, C.R., 1985. *In vitro* propagation of Ericaceae: a comparison of the activity of the cytokinins N6-benzyladenine and N6-isopentenyladenine in shoot proliferation. Scientia Hort. 27: 355–340.
- Norton, M.E. and Norton, C.R., 1986. Change in shoot proliferation with repeated *in vitro* subculture of shoots of woody species of Rosaceae. Plant Cell Tissue and Organ Culture 5: 187-197.
- Nybohm, H., 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Molecular Ecology, 13: 1143-1155.
- Official Journal of EEC, 1989. No L. 160, 12/6/1989.
- Official Journal of EEC, 1990. No L. 105, 25/4/1990.
- 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.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. and Simons, A., 2009. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>).
- Osborne, D.J. and McManus, M.T., 2005. Hormones, signals and target cells in plant development. Cambridge University Press, Cambridge.
- 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.
- Ostrolucká, M.G., Libiaková, G., Ondrušková, E. and Gajdošová, A., 2004. *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. Acta Universitatis Latviensis, Biology, 676: 207–212.
- Overview of Forest Pests, 2008. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Forestry Department, Forest Health & Biosecurity Working Papers. Cyprus.
- Panicucci, A., Nali, C. and Lorenzini, G. 1998. Differential photosynthetic response of two mediterranean species (*Arbutus unedo* and *Viburnum thymus*) to sulphur dioxide. Chemosphere 36: 703 – 708.
- Paoletti, E., 2005. Ozone slows stomatal response to light and leaf wounding in a Mediterranean evergreen broadleaf, *Arbutus unedo*. Environmental Pollution 134: 439-445.

- Papafotiou M., Balotis, G.N., Louka P. T. and Chronopoulos J., 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65(2), 163-16.
- Papafotiou, M. and A. Kalantzis, A., 2009. Studies on *in vitro* propagation of *Lithodora zahni*. *Acta Horticulturae (ISHS)* 813: 465-470.
- Papafotiou, M. and Martini, A.N. 2009. Effect of growth medium on *in vitro* regeneration of *Malosorbus florentina* Zucc. *Acta Hort. (ISHS)* 813: 497-502.
- Papafotiou, M. and Martini, A.N., 2009 (α). Effect of season and sterilization method on response of *Malosorbus florentina* (Zucc.) Browicz (Rosaceae) buds to *in vitro* culture. *Acta Hort. (ISHS)* 813: 503-508.
- Papafotiou, M. and Stragas, J., 2009. Seed germination and *in vitro* propagation of *Dianthus fruticosus* L. *Acta Horticulturae (ISHS)*: 813: 481-484.
- Papanastasis V.P., 1977. Fire ecology and management of phrygana communities in Greece. *In: Mooney HA, and Conrad C.E., coors. Proc. Symp. Environmental Consequences of Fire and Fuel Management in Mediterranean Ecosystems. USDA Forest Service, General Technical Report WO-3: 476-482.*
- Papanastasis, V.P., 2004. Traditional vs contemporary management of Mediterranean vegetation: the case of the island of Greece. *Journal of Biological Research* 1: 39-46.
- Papanikolaou, G.D. and Sarlis, G.P., 1991. Physiological studies in the Tatoi district (Attica, Greece). *Vegetatio* 93: 81-90.
- Pattnaik, S.K. and Chand, P.K., 1996. *In vitro* propagation of the medicinal herbs *Ocimum americanum* L. Syn, *O. canum* Sims (hoary basil) and *Ocimum sanctum* L. (holy basil). *Plant Cell Rep.* 15: 846–850.
- Pattnaik, S.K. and Chand, P.K., 1997. Rapid clonal propagation of three mulberries, *Morus cathayana* Hemsl., *M. Ihou* Koiz. and *M. serrata* Roxb., through *in vitro* culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees. *Plant Cell Reports* 16: 503-508.
- 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(26): 10234-10238.
- Pénzez, Z., Csanádi, G., Kovács, G.M. and Beer. Z., 2002. Molecular Markers in Ecology. *Tiscia* 33: 9-30.
- Pereira, A.M.S., Moro, J.R., Cerdeira R.M.M., and Franca S.C., 1995. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on the micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 42: 295-297.
- 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.
- Persson, H.A. and Gustavsson B.A., 2001. The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf-shape analysis. *Molecular Ecology* 10: 1385-1397.

- Piotto, B. and Noi, A.D., 2001. ANPA Handbook “Propagation of Mediterranean trees and shrubs from seed” (Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea), IGER, Roma.
- Pirone P.P., 1978. Diseases and Pests of Ornamental. 5th edition, Wiley Interscience , USA.
- 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 Disease 85(7): 803.
- Polunin, O., 1980. Flowers of Greece and the Balkans: a field guide, p. 354-355. Oxford, Oxford University Press.
- Poole, D.K. and Miller, P.C., 1975. Water relations of selected species of chaparral and coastal sage communities, Ecology 56: 1118–1128.
- Pometti, C.L., Vilardi, J.C., Cialdella, A.M. and Saidman, B.O., 2010. Genetic diversity among the six varieties of *Acacia caven* (Leguminosae, Mimosoideae) evaluated at molecular and phenotypic levels. Plant Syst. Evol. 284:187–199
- Porter, C.L., 1967. Taxonomy of Flowering Plants. 2nd Edition. W. H. Freeman and Company, San Francisco and London.
- Poulsen, K., 1996. Case study: Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seed research. In: Proceeding of an international workshop on improved methods for handling and storage of intermedia/recalcitrant tropical forest tree seeds (ed: A.S. Ouedraogos). June 8-10, Humlebak, Denmark, pp. 14-22.
- Prahan, C., Kar, S., Pattnaik, S. and Chand, P.K. Propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb through *in vitro* shoot proliferation from cotyledonary nodes. Plant Cell. Rep. 18: 122-126.
- Preece, J.E. and Sutter, E., 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (Eds.), Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic Pub., Dordrecht, pp. 71-79.
- Preston, R.J. and Braham, R.R., 2002. North American Trees, 5th ed. Blackwell State Press, p 219.
- Pruski, K., Astatkie, T. and Nowak, J. 2005. Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking cherry (*Prunus tomentosa*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82: 207-211.
- Puddephat, I.J., Alderson, P.G. and Wright, N.A., 1997. Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*. Journal of Experimental Botany 48(309): 951-962.
- Purohit, V.K., Tamta, S., Chandra, S., Vyas, P., Palni, L.M.S. and Nandi, K.S., 2002. *In vitro* multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Q. glauca*: Important Himalayan oaks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 121-133.
- Qu., L., Polashock, J. and Vorsa, N., 2000. A highly efficient *in vitro* cranberry regeneration system using leaf explants. HortScience 35: 948–952.
- Quoirin, M. and Lepoivre, P., 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* Spp. Acta Hort. 78, 437-442.

- Rajora, P. and Rahman, H., 2003. Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus x canadensis*) cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 470–477.
- Reader's Digest Encyclopedia of Garden Plants and Flowers, 1988. p. 54. Ed by the Reader's Digest Association, London.
- Reddy, M.S. and Satyanarayana, T., 1998. Inoculation of micropropagated plantlets of *Eucalyptus tereticornis* with ectomycorrhizal fungi. *New Forests* 16: 273–279.
- Reed, B.M. and A. Abdelnour-Esquivel., 1991. The use of zeatin to initiate in vitro cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience* 26:1320-1322.
- Renau-Morata B., Nebauer S.G., Sales E., Allainguillaume J., Caligari P., Segura J., Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA, *Am. J. Bot.* 92 (2005): 875-884.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P. M. and Pridhamm, J.B., 1995. The relative antioxidants activities derived of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.* 22, 375-383.
- Rieseberg, L., 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol. Ecol.* 5: 99-105.
- Rieseberg, L.H. and Brunsfeld, S.J., 1992. Molecular evidence and plant introgression. in: *Molecular Systematics of Plants*, Soltis, P.S., Soltis, D.E. and Doyle, J.J (eds), Chapman and Hall, New York.
- Rieseberg, L.H. and Ellstrand., 1993. What can molecular and morphological markers tell us about hybridization? *Critical Review in Plant Science*, 12(3): 213-241.
- Rikli, M. 1943. *Das Pflanzenkleid der Mittelmeerländer*, v1, 225, Ber.
- 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(6).
- Rohlf, F.J., 1992. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Release 2.11f. Setauket, NY: Exeter Software.
- Rolph, F.J. and Sokal, R.R., 1981. Comparing numerical taxonomic studies. *Systematic Zool.* 30: 459-490.
- Roman, B., Alfaro, C., Torres, A.M., Moreno, M.T., Satovic, Z., Pujadas, A. and Rubiales, D., 2003. Genetic relationships among *Orobanchae* species as revealed by RAPD analysis. *Annals of Botany* 91: 637–642.
- Romano, A., 1992. Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. *Annals of botany* 70(6): 531-536.
- Romano, A., Barros, S. and Martins-Loucao, M., 2002. Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 35-41.
- Rosseto, M., Lucarotti, F., Hopper, S.D. and Dixon, K.W., 1997. DNA fingerprinting of *Eucalyptus granticola*: a critically endangered relict species or a rare hybrid? *Heredity*, 79: 310-318.

- Roy, D.F., 1974. *Arbutus menziesii* Pursh, Pacific madrone. p. 226-227 in: C. S. Schopmeyer (Ed.), Seeds of woody plants in the United States. Agriculture Handbook 450. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC.
- Rugini, E., 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root ability, and medium development using analytical data from developing shoot and embryos. *Scientia Horticulturae*, 24: 123-134.
- Rugini, E., Pellegrinesehi, A., Mencuecini, M. and Mariotti, D., 1991. Increase of rooting ability in the woody species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) by transformation with *Agrobacterium rhizogenes* rol genes. *Plant Cell Reports*, 10:291-295.
- Ruiz-Rodríguez, B.-M., *et al.*, 2010. Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data, *Food Research International*, 11: 015 – 16..
- Rundel, P.W., 2007. Mediterranean-Climate Ecosystems. *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier.
- Saez, F., Sanchez, P. and Piqueras, A., 1994. Micropropagation of *Thymus piperella*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39: 269-272.
- Saitou, N., and Nei, M., 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425.
- Sahoo, Y. and Chand, P.K., 1998. Micropropagation of *Vitex negundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation. *Plant Cell Reports* 18: 301–307.
- Sahoo, Y., Pattnaik, S.K. and Chand, P.K., 1997. *In vitro* clonal propagation of a medicinal plant *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33: 293–296.
- Said, O., Khalil, K., Fulder, S. and Azaizeh, H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *J. Ethnopharmacol.* 83: 251–265.
- Sakar, M.K., Berkman, M.Z., Cals, I. and Ruedó, P., 1991. Constituents of *Arbutus andrachne*. *Fitoterapia*, 62: 176–177.
- Salas Pascual, M., Acebes Ginovez, J.R. and Arco Aguilar, M. del., 1993. *Arbutus androsterilis*, a new interspecific hybrid between *A. canariensis* and *A. unedo* from the Canary Islands. *Taxon* 42: 789-792.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Samuel, R., 1999. Identification of hybrids between *Quercus petraea* and *Q. robur* (Fagaceae): results obtained with RAPD markers confirm allozyme studies based on the *Got-2* locus. *Pl. Syst. Evol.* 217: 137-146.
- Santos, C.V., Brito, G., Pinto, G. and Fonseca H.M.A.C., 2003. *In vitro* plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *Maderensis*. *Scientia horticulturae* 97: 83-87.
- Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R. and Ranjbar, H., 2009. Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit characteristics and RAPD markers. *Sci Hortic* 121: 313–319.

- Šatović, Z., 2002. Legal protection, conservation and cultivation of medicinal and aromatic plants in Croatia. In: Report of Working Group on Medicinal and Aromatic Plants, 1st Meeting, 12-14 September 2002, Gozd martuljek, Slovenia.
- Schoene, G. and Yeager, T., 2005. Micropropagation of sweet viburnum (*Viburnum odoratissimum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 271-277.
- Sedlak, J. and Paprstein, F., 2009. *In vitro* multiplication of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. Acta Hort. (ISHS) 810: 575-580
- Seidemann, J., 1995. Zur Kenntnis von wenig bekannten exotischen Früchten. 5. (Mitt.): Baumerdbeere (*Arbutus unedo* L.). Deutsche Lebensmittel-Rundschau 91, 110-113.
- Serres, R.A, Pan, S, MacCown, B.A. and Stang, E.J., 1994. Micropropagation of several lingonberrycultivars. Fruit Var. J. 48: 7-14.
- Sharma, S.K. and Ramamurthy, V., 2000. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. Plant Cell Reports 19 :511–518.
- Sharma, M., Sood, A., Nagar, P.K., Prakash, O. and Ahuja, P.S., 1999. Direct rooting and hardening of tea microshoots in the field. Plant Cell Tis. Org. Cult. 58: 111-118.
- Shen, X., Castle, W.S. and Gmitter, F.G.Jr., 2009. Micropropagation of a *Casuarina* hybrid (*Casuarina equisetifolia* L. x *Casuarina glauca* Sieber ex Sieber) following facilitated seed germination. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 97: 103-108.
- Sims, J., 1819. Curtis's Botanical Magazine. Vol XLVI, W. & S Couchman. London.
- Siril, E.A. and Dhar, U., 1997. Micropropagation of mature Chinese Tallow tree (*Sapium sebiferum*). Plant Cell Reports 16: 637–640.
- Siscart, D., Diego, V. and Lloret, F., 1999. Acorn ecology. In: Roda', F., Gracia, C., Retana, J., Bellot, J. (Eds.), The Ecology of Mediterranean Evergreen Oak Forests. Springer-Verlag, Berlin, pp 89–103.
- Skroch, P.W. and Nienhuis, J., 1995. Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. Theor. Appl. Genet. 91: 1078-1085.
- Small, J.K., 1914. Ericaceae. Noerth American Flora 29: 33-102.
- Smiris, P., Pipinis, E., Aslanidou, M., Mavrokordopoulou, O., Milios, E. and Kouridakis, A., 2006. Germination study on *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) and *Podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. (Fabaceae). Journal of Biological Research 5: 85 – 91.
- Sokal, R.R and Sneath, P.H., 1963. Principles of Numerical Taxonomy. Freeman W.H and Company, San Francisco and London.
- Sorensen, P.D., 1995. *Arbutus* Linnaeus. Pp. 194–221 *In* Ericaceae Part II: the superior-ovaryed genera, *Flora Neotropica*, Monograph 66, ed. J. L. Luteyn. New York: New York Botanical Garden.
- Soro, A. and Paxton, R.J., 1999. The strawberry tree: a significant source of nectar around the Mediterranean basin. Bee World: 80(3): 140 – 144.
- Soufleros, E.H., Mygdalia Ageliki S. and Natskoulis P., 2005. Production process and Characterization of the traditional Greek fruit distillate “Koumaro” by aromatic and mineral composition. Journal of Food Composition and Analysis 18: 699-716.

- Spanos, I., Raftoyannis, Y., Goudelis, G., Xanthopoulou, E., Samara, T. and Tsiontsis, A., 2005. Effects of postfire logging on soil and vegetation recovery in a *Pinus halepensis* Mill. forest of Greece. *Plant and Soil* 278: 171-179.
- Specht, R.L. and Rundel, P.W., 1990. Sclerophylly and foliar nutrient status of mediterranean-climate plant communities in southern Australia, *Aust. J. Bot.* 38: 459-474.
- Stace, C.A., 1989. *Plant Taxonomy and Biosystematics*. Ed. Arnold E. Ελληνική Έκδοση, εκδόσεις Αει, 2003. Ταξινόμική των φυτών και Βιοσυστηματική.
- Stebbins, G.L., 1974. *Flowering Plants: Evolution Above the Species Level*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Steiner, J.J. and Garcia de los Santos, G., 2001. Adaptive Ecology of *Lotus corniculatus* L. Genotypes: I. Plant Morphology and RAPD Marker Characterizations. *Crop Science* 41: 552-563.
- Stevens, P.E., 1971. A classification of the Ericaceae: subfamilies and tribes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 64: 1-53.
- Stiles, J.I., Lemme, C., Sondur, S., Morshidi, M.B. and Manshardt, R., 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 85: 697-701.
- Strid, A. and Tan K., 1992. *Flora Hellenica and the threatened plants of Greece*. *Opera Bot.* 113: 55-67.
- Synge, P.M., 1981. *Dictionary of Gardening*. Vol 1, 163-164. Oxford University Press.
- Takrouni, M.M., and Boussaid, M., 2010. Genetic diversity and population's structure in Tunisian strawberry tree (*Arbutus unedo* L.). *Scientia Horticulturae* 126: 330-337.
- Tata McGraw, 1984. *Taxonomy of Angiosperms*. Hill Publishing Company Limited, New Delhi.
- Tetsumura, T., 1997, Effect of types of cytokinin used for in vitro shoot proliferation of Japanese persimmon on the subsequent rooting of shoots. *Acta Hort. (ISHS)* 436: 143-148.
- Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., Sugimoto, Y., and Kunitake, H., 2008. "Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars.". *Scientia Horticulturae*. 119: 72-74.
- The European Garden Flora, 1997. Volume V, p.485-486, Cambridge University Press.
- The Miller Manual of Trees and Shrubs, 2007. p.26. Ed by David and Charles Limited. Cincinnati.
- Thompson, K. and Ooi, M.K.J., 2010. To germinate or not to germinate: more than just a question of dormancy. *Seed Science Research* 20: 209 – 211.
- Thorpe, T.A. and Murashige, T., 1970. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. *Can J Bot* 48: 277–285.

- Tiki, F. and Guner, S., 2007. Seed germination of three provenances of *Arbutus andrachne* L. in response to different pretreatments, temperature and light. *Propagation of ornamental plants* 7(4): 175 – 179.
- Tiki, F., 2004. Improvement in seed germination of *Arbutus unedo* L. *Pakistan journal of Biological Sciences* 7(10): 1640 – 1642.
- Tilki, F. and Alptekin, C.U., 2006. Germination and seedling growth of *Quercus vulcanica*: effects of stratification, desiccation, radicle pruning, and season of sowing. *New Forests* 32: 243–251.
- Tomaselli, R., 1977. Degradation of the Mediterranean maquis. In: *Mediterranean Forests and Maquis: Ecology, Conservation and Management*. MAB Technical notes 2, UNESCO, Paris: 32-72.
- Toole, E.H., and Toole, V.K., 1941. Progress of germination of seed of *Digitaria* as influenced by germination temperature and other factors. *J. Agric. Res.* 63: 65-90.
- Torres, J.A., Valle, F., Pinto, C., García-Fuentes, A., Salazar, C. and Cano, E., 2002. *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. *Plant Ecology*, 160: 207-223.
- 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 Disease* 87(10): 1263.
- Traubaud, L., Grosman, J. and Walter, T., 1985. Recovery of burnt *Pinus halepensis* Mill. Forests. I. Understorey and litter phytomass development after wildfire. *Forest Ecology and Management*, 12: 269-277.
- Triest, L. 2001. Hybridization in staminate and pistillate *Salix alba* and *S. fragilis* (Salicaceae): morphology versus RAPDs.
- Triest, L., De Greef, B., De Bondt, R. and Van Lycken, J., 2000. RAPD of controlled crosses and clones from the field suggests that hybrids are rare in the *Salix alba* – *Salix fragilis* complex. *Heredity* 84: 555–563.
- Tsahouridou. P.C. and Thanassoulopoulos, C.C., 2000. First Report of *Hendersonula toruloidea* as a Foliar Pathogen of Strawberry-tree (*Arbutus unedo*) in Europe. *84(4): 487.*
- Turner, I.M., 1994. Sclerophylly: primarily protective? *Functional ecology*, 8: 669-675.
- Tutin, T.G. *et al.* (eds), 1972. *Flora Europaea*, V.3, 11. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ueda, R., Minamiya, Y., Hirata, A., Hayakawa, H., Muramatsu, Y., Saito, M. and Fukuda, T. 2012. Morphological and anatomical analyses of rheophytic *Rhododendron ripense* Makino (Ericaceae). *Plant Species Biology* doi: 10.1111/j.1442-1984.2011.00345.x.
- UNEP (2002). *Global Strategy for Plant Conservation: follow-up on SBSTTA. Recommendation VII/8 paragraph 2 on the refinement of the 16 draft targets included in the proposed strategy.* UNEP/CBD/GSPC/1/2. Montreal, Canada: CBD Secretariat.
- Upreti, J. and Dhar, U., 1996. Micropropagation of *Bauhinia valii* Wight & Arnott – a leguminous liana. *Plant Cell Rep* 16: 250–254.

- Vander Kloet, S.P. and Paterson, I.G., 2000. RAPD assessment of novelties resulting in a new species of *Vaccinium* L. from Vietnam. Bot. J. Linn. Soc. 134: 575-586.
- Vankova, R., Gaudinova, A., Kaminek, M. and Eder, J., 1992. The effect of ointeraction of synthetic cytokinin and auxin on production of natural cytokinins by immobilized tobacco cells pp. 47-51 in Kaminek, M. Mok, D.W.S. and Zazimalova, E., (eds). Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands.
- Varshney, A., Mohapatra, T. and Sharma, R.P., 2004. Molecular Mapping and Marker Assisted Selection of Traits for Crop Improvement . *in* Plant Biotechnology and Molecular Markers. P.S. Srivastava, Alka Narula and Sheela Srivastava (Editors) Anamaya Publishers, New Delhi, India.
- Venkatachalam, L., Sreedhar, R.V. and Bhagyalakshmi, N., 2007. Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. Plant Growth Regul 51: 193-205.
- Vieitez, A.M., Pintos, F., San-Jose, M.C. and Ballester, A., 1993. *In vitro* shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. Tree Physiology 12: 107-117.
- Vieitez, A.M., Sanchez, M.C., Amo-Marco, J.B. and Ballester, A., 1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37: 287-295.
- Vieitez, A.M., San-Jose, M.C. and Vieitez, E., 1985. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. Journal of Horticultural Science 60: 99-106.
- Villar, L., 1993. *Arbutus* L. In: S. Castroviejo, C. Aedo, C. Gómez-Campo, M. Laínz, P. Montserrat, R. Morales, F. Muñoz-Garmendia, G. Nieto-Feliner, E. Rico, S. Talavera and L. Villar, Editors, *Flora iberica* IV, CSIC, Madrid, 514-516.
- Visser, C., Qureshi, J.A., Gill, R. and Praveen K. Saxena, P.K., 1992. Morphoregulatory Role of Thidiazuron: Substitution of Auxin and Cytokinin Requirement for the Induction of Somatic Embryogenesis in Geranium Hypocotyl Cultures. Plant Physiol. 99: 1704-1707.
- Volkaert, H., Schoofs, J., Pieters, A. and De Langhe, E., 1990. Influence of explant source on *in vitro* axillary shoot formation in oak seedlings. Tree Physiology 6: 87-93.
- Wada, S and Reed, B.M., 2011. Standardizing germination protocols for diverse raspberry and blackberry species. Scientia Horticulturae 132: 42-49.
- Walter, H., 1979. Vegetation of the Earth and Ecological Systems of the Geobiosphere, 2nd Ed. Translated from the third, revised German edition by Joy Wieser. Springer-Verlag, Berlin.
- Walter, K.S. and Gillett, H.J. [eds], 1998. 1997 IUCN Red List of Threatened Plants. Compiled by the World Conservation Monitoring Centre. IUCN - The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

- Wang, Z.S., An, S.Q., Liu, H., Leng, X., Zheng, J.W., Liu, Y.H., 2005. Genetic structure of the endangered plant *Neolitsea sericea* (Lauraceae) from the Zhoushan archipelago using RAPD markers. *Ann. Bot.*, 95: 305-313.
- Welsh, J. and McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nuc.Acids.Res.* 18: 7213-7218.
- Werner, O., Sánchez-Gómez, P., Guerra, J. and Martínez, J.F., 2001. Identification of *Pistacia x saportae* Burnat (Anacardiaceae) by RAPD analysis and morphological characters. *Scient. Hort.*, 91: 179-186.
- White, T.L., Adams, W.T., Neale, D.B., 2007. *Forest Genetics*. CAB Internacional Oxfordshire.
- Williams, J.G.K, Kubelik, A.R, Livak, K.J, Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22): 6531-6535.
- Wolf, H. and Kamondo, B., 1993. Seed presowing treatment. *In: Tree seeds handbook of Kenya* (ed J. Albrecht), Kenya Forestry Research Institute, Nairobi, pp. 55-62.
- Wolfe, D.E., Eck, P. and Chin., C., 1983. Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry. *HortScience* 18: 703-705.
- Wünsch, A. and Hormaza, J.I., 2002. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125: 59-67.
- Yamagishi, M., 1995. Detection of section- specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. *Theor. Appl.Genet.* 91: 830-835.
- Yan-qin Jiang, Hong Yu, De-qiao Zhang, Shan-an He, and Chuan-yong Wang, 2009. Influences of media and cytokinins on shoot proliferation of 'brightwell' and 'choice' blueberries *in vitro*. *Acta Hort. (ISHS)* 810: 581-586.
- Young, J.A. and Young, C.G., 1992. *Seeds of woody plants in North America*. Dioscorides Press, Portland, Oregon. Pp.248-266.
- Yusnita, S., Geneve, R.L. and Kester, S.T., 1990. Micropropagation of white flowering eastern redbud (*Cercis canadensis* var. *alba* L.). *J. Environ. Hort.* 8: 177-179.
- Zammit, C.A., 1988. Dynamics of resprouting in the lignotuberous shrub *Banksia oblongifolia* (Proteaceae). *Aust. J. Ecol.* 13, 311–320.
- Zawko, G., Krauss, S.L., Dixon, K.W., Sivasithamparam, K., 2001. Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). *Mol. Ecol.* 10, 2389 - 2396.
- Zheng, W., Wang, L., Meng, L., Liu, J., 2008. Genetic variation in the endangered *Anisodus tanguticus* (Solanaceae), an alpine perennial endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau. *Genetica*, 132: 123–129.
- Zheng, X, Zhang, H. and Xi, Y., 2004. Effects of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner on biocontrol of postharvest decay of arbutus berries. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 55-60.
- Zimmerman, R.H. and Broome, O.C., 1980. Blueberry micropropagation. *USDA-SEA Agric. Res. Results ARRNE*: 44-47.

- 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 (pp 187-196) Butterworth, London.
- Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M. and Benjelloun, W., 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology* 58(2), 45-54.
- Zomlefer, W.B., 1994. Guide to Flowering Plant Families. The University of North Carolina Press, Chapel Hill and London.
- Άπαντα Αριστοφάνους, 1961. Αρχαίοι Έλληνες Κλασσικοί, Εκδόσεις Χρήσιμα βιβλία, Αθήνα, σελ 27.
- Αραμπατζής Θεόδωρος, 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, σ. 164-168.
- Βολιώτης, Γ. και Αθανασιάδης, Ν., 1990. Δένδρα και Θάμνοι. Εφημερίδα της Κυβερνήσεως, 2001. Νόμος 2969/2001. Νο 281, 18/12/2001.
- Ι.Μ.Δ.Ο.Τ.Δ.Π., 2007. Αποκατάσταση του Αρχαιολογικού και Ευρύτερου Τοπίου της Ολυμπίας, ΕΘΙΑΓΕ, Αθήνα.
- Καββάδας, Σ. Δ. 1956. Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν. Αθήνα, τόμ. Β., σελ. 532-533.
- Καϊλίδης Δ.Σ. 1990. Ασθένειες δένδρων των δασών και πάρκων. Εκδόσεις Χριστοδουλίδη, 3^η έκδοση. Θεσσαλονίκη.
- Καϊλίδης Δ.Σ. 1996. Εχθροί των καλλωπιστικών δένδρων και θάμνων. Εκδόσεις Χριστοδουλίδη. Θεσσαλονίκη, σελ. 154-155.
- Καρέτσος, Γ.Κ. 2002. Μελέτη της οικολογίας και της βλάστησης του όρους Οίτη. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα.
- Κάρτσωνας, Δ.Ε., 2008. Διερεύνηση της επίδρασης της φυσιολογίας του εκφύτου, του υποστρώματος και των συνθηκών περιβάλλοντος στην οργανογένεση και τον εγκλιματισμό του *Quercus euboica*. Διδακτορική διατριβή, Γ.Π.Α., Αθήνα.
- Λιμνιάτης, Π., 2000. Μελέτη του *in vitro* πολλαπλασιασμού του *A. unedo* L. *in vitro*. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γ.Π.Α., Αθήνα.
- Λιμνιάτης, Π., Παπαφωτίου, Μ. και Χρονόπουλος, Ι., 2001. Μελέτη του πολλαπλασιασμού του *Arbutus unedo* L. *in vitro*. Πρακτικά 19ου Συνεδρίου ΕΕΕΟ, 9: 453-456.
- Μεταξάς Δ.Ι., 2004. Διερεύνηση των φυσιολογικών παραγόντων που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των αυτοφυών καλλωπιστικών φυτών τάξου (*Taxus baccata* L.) και κουμαριάς (*Arbutus unedo* L.). Διδακτορική Διατριβή. Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.
- Μότσιας, Χ., 1982. Τι έτρωγαν οι αρχαίοι Έλληνες. Εκδόσεις Κάκτος. Αθήνα.
- Μπαμπαλώνας Δ. και Κοκκίνη Σ., 2004. Συστηματική Βοτανική. Εκδόσεις Αιβατζή, Θεσσαλονίκη.
- Μπινιάρη, Κ., 2000. Ταυτοποίηση και έλεγχος γνησιότητας των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου με την χρήση μοριακών μεθόδων (PCR). Διδακτορική Διατριβή. Αθήνα.

- Στεφανάκη-Νικηφοράκη, Μ., 1999. Συστηματική Βοτανική, Τόμος Α΄. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Χριστόπουλος, Γ.Α., 2006. Φυτολογία. Εκδοτική Αθηνών. Αθήνα.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

- <http://elmadridmedieval.jmcastellanos.com> (ημ/νία πρόσβασης 28/9/2011)
- <http://filotis.itia.ntua.gr/species/d/2524/> (ημ/νία πρόσβασης 28/9/2011)
- <http://filotis.itia.ntua.gr/species/d/2525/> (ημ/νία πρόσβασης 28/9/2011)
- <http://www.bpi.gr/photos/home/files/Phytophthora%20ramorum.pdf>
(ημ/νία πρόσβασης 20/9/2011)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίν. Ι. Θερμοκρασία στο χώρο του υαλόφρακτου θερμοκηπίου του Εργαστηρίου
Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου (min, max).

Πίν.ΙΙ. Πρωτογενές υλικό-Πίνακας ηλεκτροφορητικών ζωνών

Πίν. Ι. Θερμοκρασία στο χώρο του υαλόφρακτου θερμοκηπίου του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου (min, max).

	2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010	
	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max
ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ	13,53	37,06	12,81	24,07	11,83	28,08	14,00	37,30	13,09	33,70	15,14	29,23	13,90	32,30
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ	13,41	38,64	13,07	25,77	13,58	33,95	14,83	36,37	12,52	40,20	13,67	30,67	14,03	32,40
ΜΑΡΤΙΟΣ	13,13	41,43	13,39	29,71	13,82	38,53	14,19	41,60	13,25	41,53	14,85	37,20	16,11	32,05
ΑΠΡΙΛΙΟΣ	12,33	41,25	14,07	30,42	13,80	40,70	13,93	41,52	14,58	42,09	15,76	38,58	15,29	32,60
ΜΑΙΟΣ	15,28	42,36	16,88	33,11	17,05	42,85	17,78	42,49	18,35	44,07	19,11	41,20	17,42	30,72
ΙΟΥΝΙΟΣ	20,61	42,81	19,52	38,66	20,58	43,66	23,02	46,30	22,78	45,07	22,47	45,46	21,16	33,12
ΙΟΥΛΙΟΣ	21,22	37,20	22,92	42,07	22,36	42,64	25,75	49,29	24,60	44,80	23,69	43,50	23,95	37,12
ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ	21,19	37,16	23,46	42,60	23,55	42,38	24,00	46,00	24,00	44,63	23,08	43,36	24,82	38,42
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ	18,86	34,58	19,98	38,60	19,15	39,05	20,13	43,40	21,44	45,66	19,52	42,43	20,86	33,59
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ	16,15	29,68	14,26	32,82	16,63	36,84	16,78	42,21	15,56	37,11	16,65	38,50	16,54	28,55
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ	13,27	24,87	12,61	27,54	14,64	36,00	14,25	34,15	13,80	31,58	14,34	39,05	15,54	29,72
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ	13,33	23,55	14,00	30,43	13,73	33,06	15,17	31,69	12,85	34,60	15,12	34,15	15,14	25,64

Πίν.ΙΙ. Πρωτογενές υλικό - Πίνακας ηλεκτροφορητικών ζωνών

	A5 B	A4 B	A3 B	A2 B	A1 B	A5 K	A4 K	A3 K	A2 K	A1 K	H4 B	H3 B	H2 B	H1 B	H4 K	H3 K	H2 K	H1 K	U5 B	U4 B	U3 B	U2 B	U1 B	U5 K	U4 K	U3 K	U2 K	U1 K	
1224	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1225	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	
	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

OPFO 4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
OPFO 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
OPM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	

18	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 1 0 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1 1 1 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 1 1 0
OPM 11	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 1 1 1 1 1 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1

OPFO 6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	
	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0
1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
OPFO 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
OPM 14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0		
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		

1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1