



ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

In vitro βλάστηση σπόρων και η επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών στη δημιουργία κάλου του κάκτου *Mammillaria boottii*



Σπουδάστρια : Πέτροβα Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής : Επαμεινώνδας Κάρτσωνας, Γεωπόνος MSc

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

In vitro βλάστηση σπόρων και η επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών στη δημιουργία κάλου του κάκτου *Mammillaria boottii*



Σπουδάστρια : Πέτροβα Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής : Επαμεινώνδας Κάρτσωνας, Γεωπόνος MSc

Πτυχιακή εργασία με θέμα την:

***In vitro* βλάστηση σπόρων και η επίδραση φυτορυθμιστικών
ουσιών στη δημιουργία κάλου του κάκτου *Mammillaria boottii***

*της Πέτροβας Μαρίας, σπουδάστριας του Τμήματος Θερμοκηπιακών
Καλλιεργειών και Ανθοκομίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση
πτυχίου*

Καλαμάτα, Μάρτιος 2006

Ευχαριστίες

Τελειώνοντας ουσιαστικά με τούτη την εργασία τη φοίτηση μου στο Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω ανθρώπους που με στήριξαν οικονομικά, υλικά και πάνω από όλα συναισθηματικά στις όποιες δυσκολίες και απογοητεύσεις πολλές φορές υπήρξαν.

Για το λόγο αυτό, πρώτα από όλους πρέπει να ευχαριστήσω τους γονείς μου οι οποίοι από την πρώτη στιγμή υποστήριξαν κάθε μου βήμα και προσπάθεια.

Κατά δεύτερον θα ήταν παράλειψη αν ξεχνούσα τους λίγους αλλά καλούς φίλους που απέκτησα αυτά τα τέσσερα χρόνια περίπου, οι οποίοι έδωσαν αξία σε αναμνήσεις που θα με συνοδεύουν για πάντα.

Βεβαίως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου και επιβλέποντα στην παρούσα εργασία Επαμεινώνδα Κάρτσωνα για την πολύτιμη βοήθεια και τη στήριξη που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας. Επίσης να ευχαριστήσω το Γεώργιο Μπαλωτή, Γεωπόνο MSc, του Ινστιτούτου Γεωπονικών Επιστημών στο Κτήμα Συγγρού για τη βοήθεια που μου προσέφερε για την πραγματοποίηση του πειράματος στους χώρους του εργαστηρίου και τέλος όλους τους καθηγητές που είχα αυτά τα τέσσερα χρόνια με των οποίων τη διδασκαλία, κατάφερα να διευρύνω σε σημαντικό βαθμό τις γνώσεις μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντομογραφίες	1
Περίληψη	2
1. Εισαγωγή	3
1.1 Παχύφυτα	3
1.2 Χαρακτηριστικά παχυφύτων	3
1.3 Βοτανικά χαρακτηριστικά του είδους <i>Mammillaria boottii</i>	6
1.4 Πολλαπλασιασμός παχυφύτων	8
1.4.1 Πολλαπλασιασμός με σπόρο (εγγενής πολλαπλασιασμός)	8
1.4.2 Αγενής πολλαπλασιασμός	10
1.4.2.1 Πολλαπλασιασμός με παραφυάδες	10
1.4.2.2 Πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα	11
1.4.2.3 Πολλαπλασιασμός με εμβολιασμό	13
1.4.2.4 Πολλαπλασιασμός παχυφύτων <i>in vitro</i>	15
1.4.2.4.1 Βιβλιογραφική ανασκόπηση του <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμού της οικογένειας Cactaceae	17
2. Υλικά και μέθοδοι	25
2.1 Υλικά	25
2.1.1 Φυτικό υλικό	25
2.1.2 Υλικά απολύμανσης σπόρων	26
2.1.3 Υλικά θρεπτικού υποστρώματος	26
2.1.4 Βάζα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	26
2.1.5 Υπόστρωμα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	27
2.2 Μέθοδοι	28

2.2.1 Παρασκευή “stock” διαλυμάτων φυτορρυθμιστιών ουσιών	28
2.2.2 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων	29
2.2.3 Αποστείρωση υλικών – Κοπή εκφύτων – Επώαση	30
2.2.4 Μέθοδος μέτρησης βλαστικότητας σπόρου της <i>M. boolii</i>	33
2.2.5 Εκτίμηση αποτελεσμάτων	33
3. Αποτελέσματα	34
3.1 Μέτρηση βλαστικότητας σπόρων της <i>M. boolii</i> (07.07.2005) με απολύμανση 20% υδατικού διαλύματος χλωρίνης	34
3.2 Μέτρηση βλαστικότητας σπόρων της <i>M. boolii</i> (28.07.2005) με απολύμανση 10% υδατικού διαλύματος χλωρίνης	37
3.3 Επίδραση της απολύμανσης στη βλάστηση σπόρων της <i>M. boolii</i>	41
3.4 Μέτρηση του μήκους των βλαστών της <i>M. boolii</i>	42
3.4.1 Μέτρηση του μήκους των βλαστών της <i>M. boolii</i> μετά από 2 και 3 μήνες <i>in vitro</i> καλλιέργειας σε MS	42
3.4.2 Μέτρηση μήκους κάλου της <i>M. boolii</i>	44
3.4.3 Μέτρηση βάρους κάλου της <i>M. boolii</i>	46
3.4.4 Μέτρηση αναγεννημένων βλαστών της <i>M. boolii</i>	48
4. Συζήτηση	50
4.1 <i>In vitro</i> βλάστηση σπόρου της <i>M. boolii</i>	50
4.2 Μέτρηση του μήκους των βλαστών της <i>M. boolii</i>	50
4.3 Μέτρηση του μήκους και του βάρους της <i>M. boolii</i>	50
4.4 Παραγωγή βλαστών	51
4.5 Επίλογος	51
5. Βιβλιογραφία	52

Συντομογραφίες

BA	Βενζυλαμινοπουρίνη
BAP	6-βενζυλαμινοπουρίνη
IAA	Ινδολυλ-3-οξικό οξύ
IBA	Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ
Kinetin	6-φουρφοφυρυλ-αμινο-πουρίνη
MS	Υπόστρωμα των Murashige & Skoog (1962)
NAA	Ναφθαλινοξικό οξύ
2ip	6-διμεθυλαλκυλαμινο-πουρίνη
2,4-D	2,4 Δίχλωρο-φενόξυ οξύ

Περίληψη

Η *Mammillaria boolii* είναι ένας μικρός κάκτος (3,5 – 4cm) αρχικά σφαιρικός και μετά κοντός κυλινδρικός, γκριζοπράσινου χρωματισμού που φέρει περίπου 20 άσπρα αγκάθια καθώς και ένα σκουρόχρωμο κεντρικό αγκιστρωτό αγκάθι. Τα άνθη του είναι μεγάλα (σε σχέση με το μέγεθος του φυτού) και εντυπωσιακού ροζ χρωματισμού.

Μελετήθηκε η *in vitro* βλάστηση σπόρων του παχυφύτου *Mammillaria boolii* και η εύρεση του κατάλληλου υποστρώματος για *in vitro* παραγωγή κάλου. Ως έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν βλαστημένα φυτάρια.

Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα με βάση το MS με 0,2 mg/l NAA και 2,5 ή 5 mg/l BA. Το καλύτερο υπόστρωμα για την παραγωγή ικανοποιητικής ποσότητας κάλου ήταν αυτό που περιείχε 0,2 mg/l NAA και 2,5 mg/l BA. Με την πάροδο 5 μηνών βρέθηκαν κάλοι που παρήγαγαν βλαστούς και στα δύο υποστρώματα. Τα αποτελέσματα όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικά.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Παχύφυτα

Η λέξη παχύφυτα είναι ένας γενικός όρος που καλύπτει ένα μεγάλο αριθμό ειδών φυτών με χαρακτηριστικά διογκωμένα βλαστικά τμήματα (παχιά σαρκώδη φυτικά όργανα). Ακριβέστερος όρος είναι “χυμόφυτα” (succulents, από την λατινική λέξη succus που σημαίνει χυμός) (Rowley, 1978).

Τα παχύφυτα εμφανίζουν πολλές διαφορές όσο αφορά το σχήμα, τα άνθη ή τους καρπούς τους, έχουν όμως ένα κοινό χαρακτηριστικό τη δυνατότητα να αποθηκεύουν στους διαμορφωμένους ιστούς τους νερό. Ανάλογα με τον ιστό που αποθηκεύεται το νερό έχουμε παχύφυτα ρίζας, βλαστών και φύλλων.

Οι κάκτοι αποτελούν μέρος των παχύφυτων (παχύφυτα βλαστού), καθώς και όλα τα παχύφυτα δεν είναι κάκτοι. Η λέξη κάκτος είναι αρχαία ελληνική, την ανέφερε πρώτη φορά ο Θεόφραστος στο βιβλίο του Περί Φυτών και εννοούσε το φυτό αγκινάρα (φυτό με αιχμηρές ακίδες).

Οι κάκτοι ανήκουν στην οικογένεια Cactaceae που είναι η οικογένεια που περιλαμβάνει τα περισσότερα είδη παχύφυτων που υπάρχουν στον κόσμο. Για μερικούς (Pizzetti, 1985) είναι 2.100 και ανήκουν σε 120 γένη και για άλλους (Gunter, 1984) 2.700 και ανήκουν σε 230 γένη.

1.2 Χαρακτηριστικά παχύφυτων

Οι φυσικές περιοχές όπου αυτοφύονται τα παχύφυτα χαρακτηρίζονται από ξηρές περιόδους με διαφορετική διάρκεια. Αποτέλεσμα αυτού είναι η κατά περιόδους αύξηση τους, ενώ η προσαρμογή τους σε αυτές τις συνθήκες είναι το χαρακτηριστικό των φυτών αυτών.

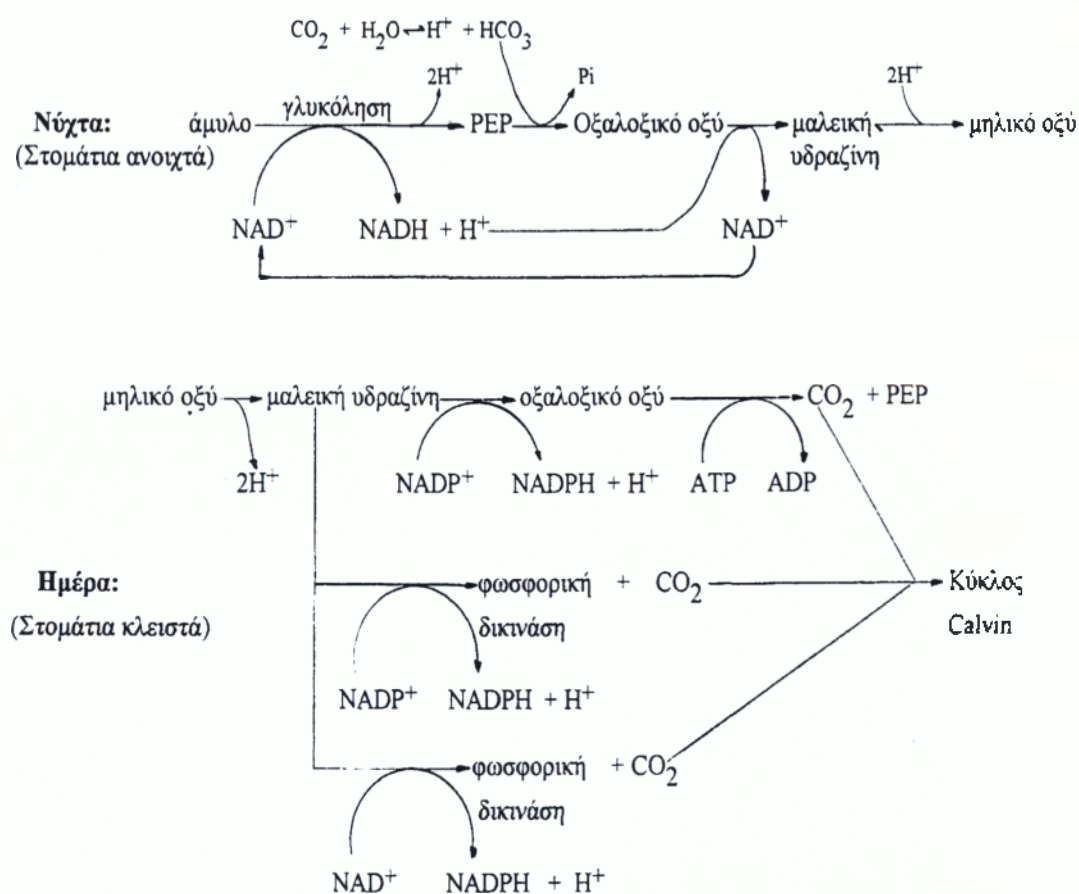
Το διαθέσιμο νερό σ’ αυτές τις περιοχές από βροχοπτώσεις είναι συγκεντρωμένο μέσα σε μια περίοδο του χρόνου, γι’ αυτό τα φυτά αυτά

προσπαθούν με διάφορους τρόπους να εξοικονομήσουν νερό ή να μειώνουν στο ελάχιστο τις απώλειες τους. Το πετυχαίνουν με το να ανοίγουν τα στομάτια τους τη νύχτα, με το να βρίσκονται τα στομάτια τους βυθισμένα μέσα στην επιδερμίδα, ή με το να καλύπτονται με τρίχες ή χνούδι. Τα άνθη που είναι πηγή εξόδου μεγάλων ποσοτήτων νερού, ανοίγουν τη νύχτα ή ανοίγουν για μικρό χρονικό διάστημα. Το νερό αποθηκεύεται στα σαρκώδη τμήματα των παχύφυτων σε ειδικά διαμορφωμένους ιστούς που αποτελούνται από μεγάλα υδαρή κύτταρα με παχιά τοιχώματα και μεγάλους χώρους χωρίς χλωροπλάστες. Ο χυμός των κυττάρων είναι λεπτόρρευστος και έχει πικρή γεύση. Η θερμοκρασία του χυμού είναι χαμηλότερη από την θερμοκρασία του γύρο περιβάλλοντος με αποτέλεσμα τα παχύφυτα να αντέχουν σε θερμοκρασίες 15-20 ° C υψηλότερες από εκείνες που θα άντεχαν άλλα φυτά. Τα κύτταρα των ιστών αυτών έχουν την ικανότητα να συρρικνώνονται ή να διογκώνονται χωρίς να σπάσουν όταν έχουν έλλειψη ή περίσσεια νερού αντίστοιχα (Gunter, 1984).

Μια θεμελιώδης διαφορά των παχύφυτων από τα' άλλα, που σχετίζεται με την οικονομία του νερού έγκειται στο κύκλο της αναπνοής. Τα φυτά με τη βοήθεια της ηλιακής ενέργειας και της χλωροφύλλης φωτοσυνθέτουν, παράγοντας από διοξείδιο του άνθρακα και νερό, υδατάνθρακες και οξυγόνο. Το οξυγόνο φεύγει στην ατμόσφαιρα ενώ οι υδατάνθρακες διασπώνται παράγοντας χημική ενέργεια. Η είσοδος του διοξειδίου του άνθρακα γίνεται από τα στομάτια, όπου στα μεσόφυτα τα στομάτια είναι ανοιχτά τη μέρα και κλειστά τη νύχτα ενώ στα παχύφυτα ισχύει το αντίθετο. Μ' αυτό πετυχαίνετε η μείωση της απώλειας του νερού από το φυτό μια και τα στομάτια ανοίγουν όταν οι θερμοκρασίες είναι χαμηλές, σε σχέση με την ημέρα, και υπάρχει αυξημένη υγρασία στο περιβάλλον και όχι ηλιακή ακτινοβολία.

Κατά την διάρκεια της νύχτας (στομάτια ανοιχτά), τα παχύφυτα απορροφούν διοξείδιο του άνθρακα από την ατμόσφαιρα και με την βοήθεια της PEP (phosphoenolpyruvate) καρβοξυλάσης παράγουν οργανικά οξέα (μηλικό οξύ κυρίως) με αποτέλεσμα την απότομη αύξηση της οξύτητας του κυτταρικού χυμού (pH=4 κατά την νύχτα). Κατά τη διάρκεια της ημέρας τα

το μηλικό οξύ που παράχθηκε τη νύχτα διασπάται, με έναν από τους 3 μηχανισμούς (Σχήμα 1), σε CO₂ που εισέρχεται στο κύκλο του Calvin. Έτσι γίνεται μείωση της οξύτητας του κυτταρικού χυμού. Αυτή η διαδικασία παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε κάποιο είδος *Kalanchoe* της οικογένειας Crassulaceae και γι' αυτό ονομάστηκε οξικός μεταβολισμός των Κρασουλασών (Crassulacean acid metabolism, CAM), (Salisbury & Ross, 1991).



Σχήμα 1 : Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης του CO₂ από τα CAM φυτά (Salisbury & Ross, 1991).

1.3 Βοτανικά χαρακτηριστικά του είδους *Mammillaria boolii*

Κλάση	: Δικοτυλήδονα
Magnoliata	
Υποκλάση	: Caryophyllidae
Τάξη	: Caryophyllales
Οικογένεια	: Cactaceae
Υποοικογένεια	: Cactoideae
Ομάδα	: Cactaeae
Υποομάδα	: Echinocactinae
Γένος	: <i>Mammillaria</i>
Σειρά	: Ancistracanthae



Εικόνα 1 : Φυτό της *Mammillaria boolii*.

Πηγή : Internet www.google.com

Η ονομασία του γένους *Mammillaria* προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Adrian Hardy Haworth το 1812 στο βιβλίο του *Synopsis Plantarum Succulentarum* με την περιγραφή του φυτού *Mammillaria simplex*. Το ίδιο φυτό είχε προηγουμένως περιγραφεί από τον Linnaeus το 1753 στο βιβλίο του *Species Plantarum* ως *Cactus mammillaris* (Pilbeam, 1999).

Το γένος *Mammillaria* περιλαμβάνει γύρω στα 350 είδη που τα περισσότερα είναι ιθαγενή του Μεξικού, δύο προέρχονται από τις Δ. Ινδίες και μερικά από τη Κ. Αμερική, αλλά κανένα από τη Βολιβία ή την Παραγουάη όπως μερικές φορές αναφέρεται. Γύρω στα 20 είδη κατάγονται από τα νησιά που βρίσκονται στον Κόλπο της Καλιφόρνιας. Η σειρά Ancistracanthae περιλαμβάνει 24 είδη που περιέχουν χυμό υδατώδη. Το συγκεκριμένο είδος κατάγεται από το Κόλπο της Καλιφόρνιας στο Isla de Ventana in Bahia de Los Angeles και στο εσωτερικό της Baja της Καλιφόρνιας (Pilbeam, 1999).

Το είδος *M. boolii* πρωτοπεριγράφηκε από τον Lindsay το 1953 (Anderson, 2001), και πρόκειται για ένα είδος σφαιρικό, φέροντα έναν βλαστό (σπανιότερα σχηματίζει αποικίες), με κοντό κυλινδρικό ή βαρελοειδή σχήμα στο κατώτερο τμήμα του φυτού, με απαλό γκριζο πράσινο χρωματισμό, γυμνές

μασχάλες, 3,5 – 4 cm ύψος και 3 cm διάμετρο. Τα περιμετρικά αγκάθια είναι γύρω στα 20 σε αριθμό, άσπρα με μήκος 15 mm και λεπτά (σαν μικρή καρφίτσα) (Εικ. 1). Το κεντρικό αγκάθι είναι κυλινδρικό, αγκιστρωτό στην κορυφή, κίτρινο ή κιτρινοκαφέ χρωματισμού, με σκουρότερη την κορυφή και 15 –20 mm μήκους. Τα λουλούδια είναι μακριά χωνοειδή, μεγάλα, μήκους 25 mm (αναφέρεται ότι το μήκος τους ποικίλει από 2 – 5 cm) ροζ ή μοβ ροζ με ανοιχτότερα περιθώρια. Το στίγμα είναι ανοιχτό πράσινο και οι καρποί είναι πορτοκαλί (Εικ. 2) με σπόρους μαύρους (Pilbeam, 1999).

Το συγκεκριμένο είδος (Εικ. 3) δεν είναι εύκολο στην καλλιέργεια του. Μεγαλώνει αργά ως σπορόφυτο και ανθίζει όταν φτάσει τα 3 cm ύψος (φυτά ηλικίας 3 ή 4 χρόνων), αλλά από εκεί και μετά η καλλιέργεια του είναι δύσκολη. Η ετήσια ανάπτυξη του αρχίζει το μήνα Μάρτιο και σταματάει το Νοέμβριο όπου και πέφτει σε λήθαργο. Κατά την περίοδο ανάπτυξης το πότισμα πρέπει να γίνεται με προσοχή και θα πρέπει να στεγνώνει το χώμα μεταξύ δύο διαδοχικών ποτισμάτων. Το εδαφικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του πρέπει να αποστραγγίζει πολύ καλά ενώ το pH μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ του 5 – 6,5 (Pilbeam, 1999).



Εικόνα 2 :Καρποί της *Mammillaria bootii*.

Πηγή : Internet www.google.com



Εικόνα 3 :Φυτό της *Mammillaria bootii* στη φύση.

1.4 Πολλαπλασιασμός παχύφυτων

Τα παχύφυτα γενικά πολλαπλασιάζονται εύκολα, αλλά υπάρχουν και είδη που παρουσιάζουν δυσκολίες. Ο πολλαπλασιασμός τους μπορεί να γίνει είτε εγγενώς με σπόρο, είτε αγενώς με διαίρεση, μοσχεύματα, εμβολιασμό και ιστοκαλλιέργεια.

1.4.1 Πολλαπλασιασμός με σπόρο (εγγενής πολλαπλασιασμός)

Είναι μια τεχνική παραγωγής μεγάλου αριθμού φυτών από ένα συγκεκριμένο είδος. Καμιά από τις άλλες μεθόδους δεν δίνει τόσο μεγάλο αριθμό φυτών σε μικρό χρονικό διάστημα.

Για μια επιτυχή προσπάθεια πολλαπλασιασμού με σπόρο θα πρέπει να προσεχθεί η ζωτικότητα του σπόρου η οποία καθορίζεται από την ηλικία του. Επίσης, ο λήθαργος του σπόρου, που είναι μέρος της προσαρμογής του φυτού στο φυσικό περιβάλλον με σκοπό τη γεφύρωση εποχών ακατάλληλων για βλάστηση. Ο λήθαργος μπορεί να ξεπεραστεί με την επίδραση ψύχους π.χ. υπάρχουν είδη που θέλουν 8 ημέρες με θερμοκρασίες -5 έως -8 °C, ή την επίδραση ουσιών όπως το γιββερυλλικό οξύ (Rowley, 1978).

Ο καλύτερος χρόνος σποράς είναι στην αρχή της βλαστικής περιόδου με κατάλληλους μήνες τους Μάρτιο, Απρίλιο και Μάιο. Παχύφυτα και κάκτοι του νοτίου ημισφαιρίου αναπτύσσονται καλύτερα στο βόρειο ημισφαίριο αν σπαρθούν αργά το καλοκαίρι ή νωρίς το φθινόπωρο, σύμφωνα με τις εποχές στις περιοχές φυσικής διαβίωσης τους (Gunter, 1984).

Ο χρόνος φυτρώματος διαφέρει από είδος σε είδος. Μερικά φυτρώνουν ταχύτατα όπως 2 ημέρες (*Stapelia*) ή 6 ημέρες (*M. elongata*) (Μπαλωτής, 1997) και άλλα κάνουν από μερικές βδομάδες έως μερικούς μήνες. Η φυτρωτική ικανότητα εξαρτάται από το είδος και κυμαίνεται από 50% έως 100% (σε ιδανικές συνθήκες). Η θερμοκρασία που απαιτείται για το φύτεμα του σπόρου διαφέρει από είδος σε είδος. Οι πιο κατάλληλες θερμοκρασίες,

υποστρώματος και περιβάλλοντος χώρου είναι 25 έως 30 ° C. Μείωση της θερμοκρασίας στους 20 ή 15 ° C τη νύχτα είναι επιθυμητά για όλα σχεδόν τα είδη (κυρίως τα ορεινής καταγωγής). Οι Pizzetti (1985) και Gunter (1984) αναφέρουν ότι για να διατηρηθεί η υγρασία στο σπορείο χρειάζεται κάλυψη των σποροκιβωτίων με γυαλί ή κομμάτι διαφανούς πλαστικού. Σε τακτά χρονικά διαστήματα θα πρέπει να ανασηκώνεται το γυαλί (ή το πλαστικό) για καλύτερο αερισμό.

Η μέθοδος σποράς των παχύφυτων δε διαφέρει από εκείνη των άλλων φυτών. Μέσα σε ρηχό δοχείο τοποθετείται μίγμα χώματος, άμμος : κοσκινισμένο φυλλόχωμα : τύρφη σε αναλογία 1 : 1 : 1 φροντίζοντας το pH να είναι 5,5 – 6 (Rowley, 1978). Σκορπίζεται ο σπόρος στην υγρή επιφάνεια και σκεπάζεται με λεπτή άμμο. Μετά το κατάλληλο χρονικό διάστημα, που εξαρτάται από το είδος του σπόρου, γίνεται έκπτυξη των σπορόφυτων. Η εμφάνιση των φυταρίων δείχνει πόσο φως χρειάζονται. Κιτρινωπά φυτά θέλουν περισσότερο φως, ενώ φυτά με μπρούτζινο χρώμα χρειάζονται σκιά.

Σοβαρός κίνδυνος για τα φυτάρια στο σπορείο είναι η σήψη τους λόγω προσβολής από μύκητες. Ειδικά, αν το μίγμα χώματος έχει αλκαλική αντίδραση, τα φυτάρια χάνουν τις ρίζες τους, αδυνατίζουν και προσβάλλονται εύκολα από μύκητες. Μπορεί να ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό με τη χρήση κάποιου μυκητοκτόνου (Captan, Chinosol κτλ.). Καλό θα ήταν να αποφεύγεται η χρήση του Benomyl γιατί προκαλεί ανάσχεση της βλάστησης που με τον καιρό όμως ξεπερνιέται (Gunter, 1984).

1.4.2 Αγενής πολλαπλασιασμός

Είναι ένας εύκολος και γρήγορος τρόπος πολλαπλασιασμού με τη μόνη διαφορά ότι δεν υπάρχει αρκετό πολλαπλασιαστικό υλικό για την παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών. Είναι δυνατόν να γίνει διαχωρισμός του τρόπου αυτού πολλαπλασιασμού μεταξύ αναπαραγωγής που γίνεται με τη βοήθεια οργάνων ειδικά φτιαγμένων για το σκοπό αυτό π.χ. παραφυάδες, βολβοί κτλ. και αναπαραγωγής με μέρη του φυτού που δεν είναι από την φύση τους φτιαγμένα για το σκοπό αυτό π.χ. μοσχεύματα βλαστού, φύλλων κτλ. . Αυτός ο τρόπος πολλαπλασιασμού χρησιμοποιείται για τη διατήρηση των ειδικών χαρακτηριστικών των υβριδίων. Η δημιουργία φυτών από μοσχεύματα είναι ταχύτερη από τη δημιουργία με σπόρο.

1.4.2.1 Πολλαπλασιασμός με παραφυάδες

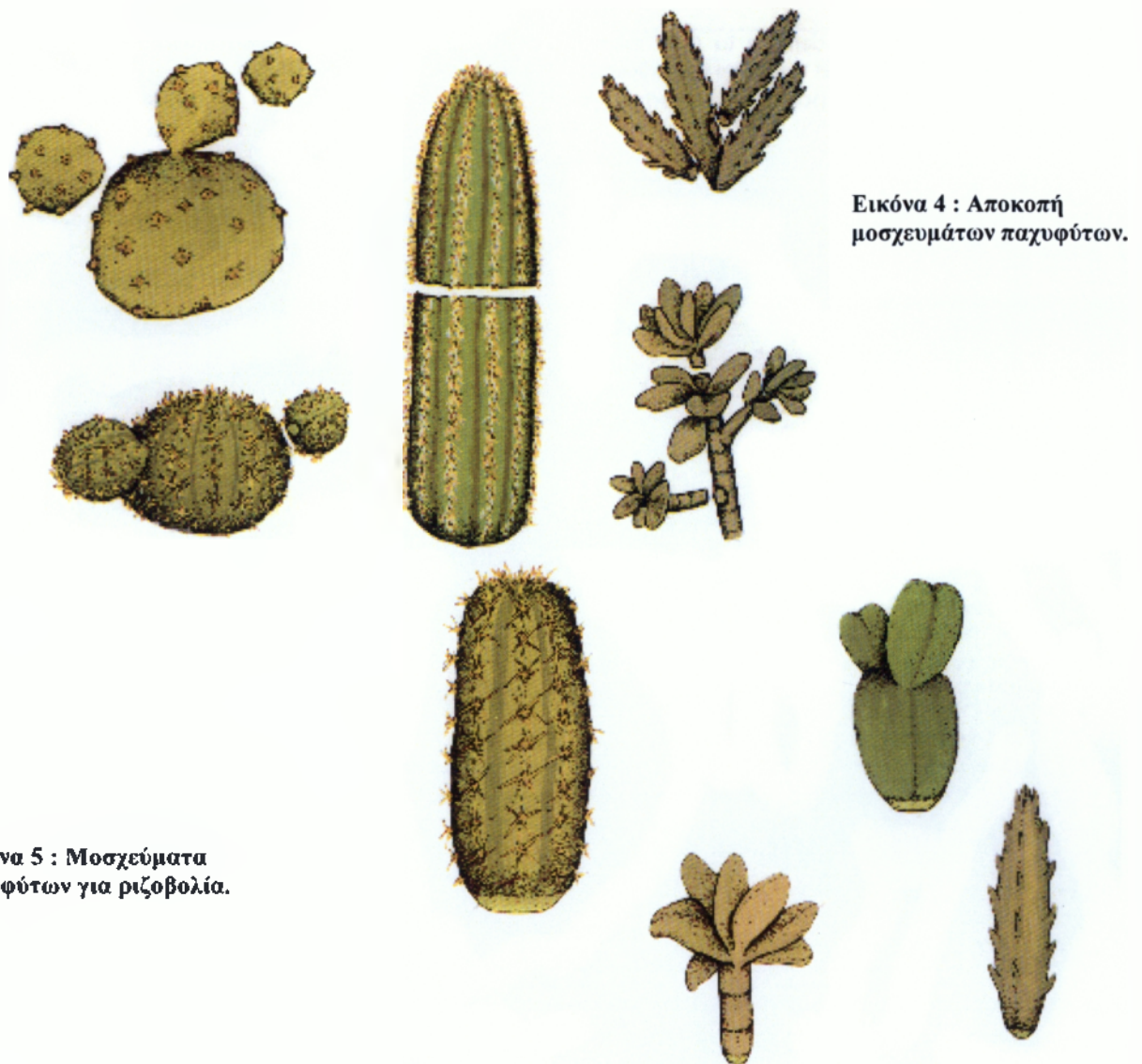
Οι παραφυάδες είναι μικρά φυτάρια που φύονται πλάγια στο μητρικό φυτό, σε άλλα είδη κοντά στη βάση του φυτού ενώ σε άλλα σε πιο ψηλό σημείο. Πολλοί είναι οι κάκτοι και τα παχύφυτα που παράγουν έντονα παραφυάδες. Αυτές με ευκολία αποχωρίζονται από το μητρικό φυτό με τη βοήθεια ενός κοφτερού μαχαιριού. Ένα παράδειγμα πολλαπλασιασμού με τον τρόπο αυτό είναι ο πολλαπλασιασμός της *Haworthia fasciata* που κάθε χρόνο παράγει ένα μεγάλο αριθμό παραφυάδων με μικρές ρίζες κοντά στη βάση του φυτού (Rowley, 1978).

Όλα τα αναβλαστήματα της βάσης πριν φυτευτούν διατηρούνται για μια εβδομάδα ως και κάποιους μήνες, ανάλογα με το μέγεθος του βλαστού, σε σκιερό μέρος για να στεγνώσει και να επουλωθεί η πληγή.

1.4.2 Πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα

Σύμφωνα με τον Gunter (1984) αυτός ο τρόπος πολλαπλασιασμού χρησιμοποιείται για έναν μεγάλο αριθμό παχύφυτων. Τα μοσχεύματα είναι τμήματα βλαστών (Εικ. 4, 5) ή φύλλων (Εικ. 7, 8) τα οποία παίρνονται από το φυτό και αφού αφεθούν για κάποιο χρονικό διάστημα να ξεραθεί η τομή τοποθετούνται σε υπόστρωμα για ριζοβολία.

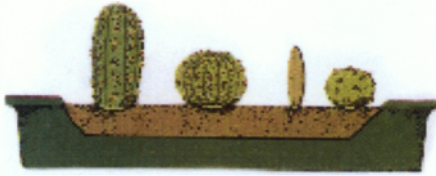
Προσοχή πρέπει να δίνεται στο πως τοποθετούνται τα μοσχεύματα στο υπόστρωμα, έτσι ώστε η κάτω επιφάνεια τομής να τοποθετείται πάνω στο υπόστρωμα (Εικ. 6).



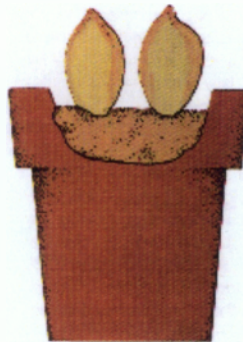
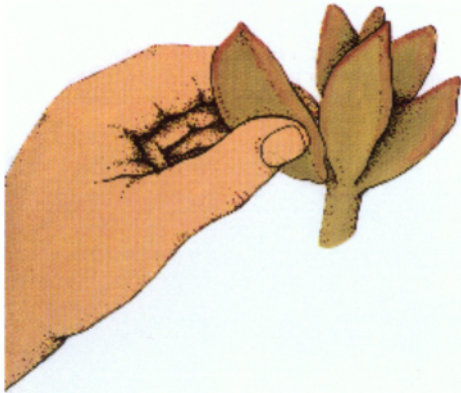
Εικόνα 4 : Αποκοπή μοσχευμάτων παχύφυτων.

Εικόνα 5 : Μοσχεύματα παχύφυτων για ριζοβολία.

Πηγή : Keen, 1990



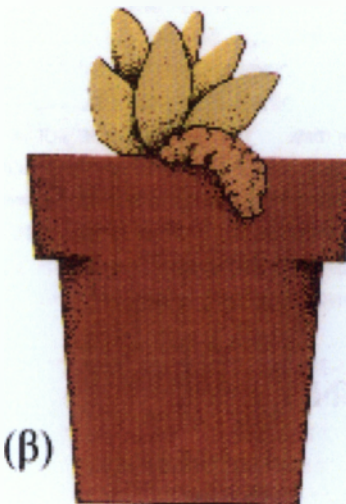
Εικόνα 6 : Μοσχεύματα παχυφύτων που έχουν τοποθετηθεί στο υπόστρωμα για ριζοβολία.



Εικόνα 7 : Μοσχεύματα φύλλου εχεβέριας.



(α)



(β)

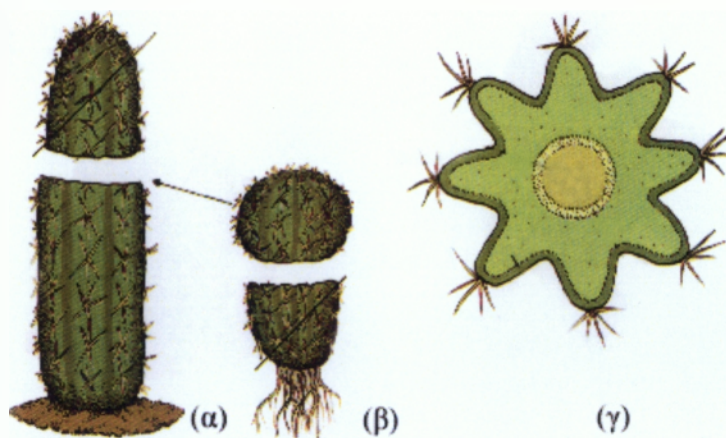
Εικόνα 8 : α) Μικρό φυτάριο στη βάση φύλλου εχεβέριας β) Το παλιό φύλλο αποξηράθηκε ενώ το έρριζο φυτάριο αναπτύχθηκε σε κανονικό φυτό.

1.4.2.3 Πολλαπλασιασμός με εμβολιασμό

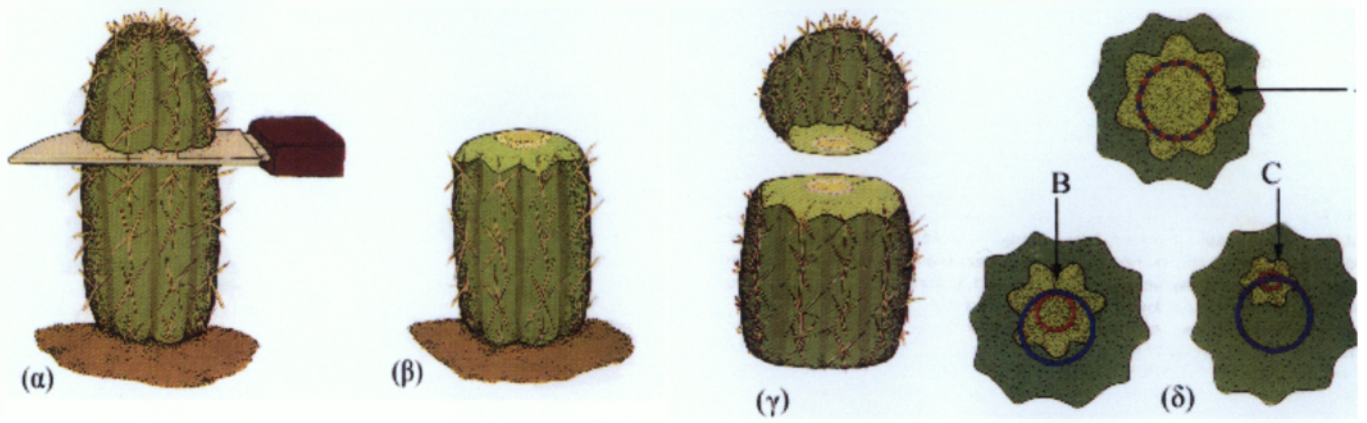
Εμβολιασμός είναι η τεχνική ένωση τμημάτων ειδών που έχουν στενή συγγένεια και ανήκουν στην ίδια οικογένεια. Σκοπός του εμβολιασμού είναι η δημιουργία όμορφων και εντυπωσιακών φυτών, η παραγωγή φυτών προς πώληση σε μικρό χρονικό διάστημα, κυρίως για φυτά με αργή ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός σπάνιων φυτών ή εκείνων των κάκτων που δεν μπορούν να φωτοσυνθέσουν λόγω του ότι τους λείπει η χλωροφύλλη π.χ. το *Gymnocalicium mihanovichii* var “Hibotan” (κόκκινο εμβόλιο).

Ως υποκείμενα (Εικ. 9) μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα *Trichocereus bridgesii*, *T. macrogonus*, *Cereus peruvianus*, *Myrtillocactus geometricans*, *Eriocereus jusbertii*, *Hylocereus undatus*. Ανθεκτικά υποκείμενα είναι τα *M. geometricans*, *E. jusbertii* (Pizzetti, 1985). Το πιο συνηθισμένο υποκείμενο για τον εμβολιασμό είναι το *H. undatus*, που έχει όμως μικρή διάρκεια ζωής (κάθε 2 χρόνια πρέπει να χρησιμοποιείται νέο υποκείμενο).

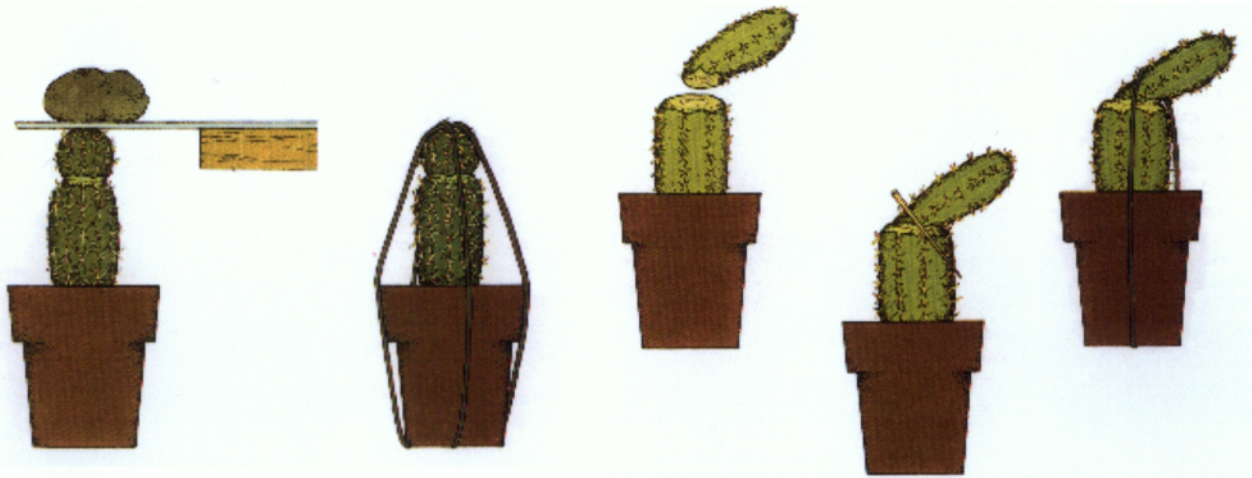
Τα εμβολιασμένα φυτά αυξάνονται ταχύτερα και συνήθως έχουν διαφορετική εμφάνιση από τα αυτόρριζα, δύσμορφα σχήματα, αλλά διατηρούν τους βοτανικούς τους χαρακτήρες (Gunter, 1984). Στις Εικ.10, 11, 12 δίνεται παραστατικά η μέθοδος του εμβολιασμού.



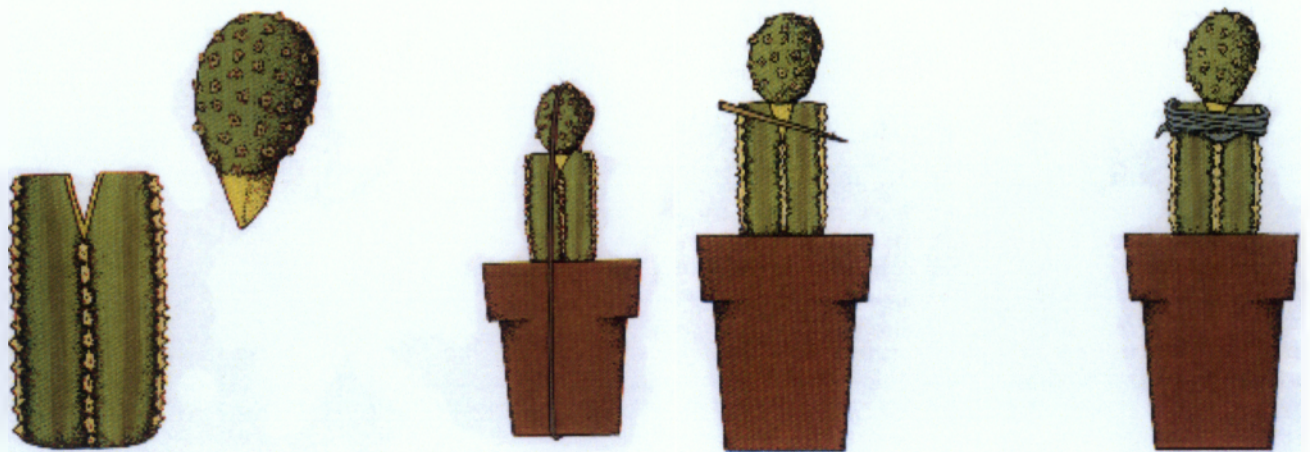
Εικόνα 9 : Εμβολιασμός.
α) Υποκείμενο
β) Εμβόλιο
γ) Εγκάρσια τομή



Εικόνα : 10 α) Εγκάρσια τομή στο υποκείμενο με τη βοήθεια μαχαιριού και λείανση των άκρων
β) Υποκείμενο έτοιμο για εμφολιασμό
γ) Ένωση υποκειμένου με το εμφύλιο
δ) Α. σωστή ένωση Β, C. λάθος ένωση.



Εικόνα 11 : Διάφοροι τρόποι στήριξης του εμφυλίου.



Εικόνα 12 : Εμφολιασμός με σφήνα.

Πηγή : Keen, 1990

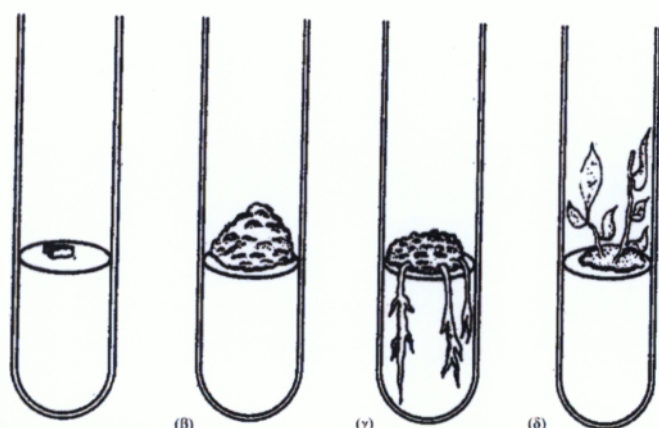
1.4.2.4 Πολλαπλασιασμός *in vitro* παχύφυτων

Με τον όρο *in vitro* καλλιέργεια εννοούμε τη μέθοδο καλλιέργειας φυτικών ιστών ή φυτικών κυττάρων ή και πρωτοπλαστών, σε ειδικά υποστρώματα (Εικ. 13), με σκοπό την παραγωγή νέων φυτών για εμπορική χρήση ή και για άλλους σκοπούς (βελτίωση ειδών, διάσωση ειδών). Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η παραγωγή (Εικ. 14) σε μικρό χρονικό διάστημα μεγάλου αριθμού φυτών απαλλαγμένων παθογόνων μικροοργανισμών.

Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός είναι μια μέθοδος παραγωγής φυτών τα τελευταία 30 χρόνια και είναι η κύρια μέθοδος πολλαπλασιασμού για ένα μεγάλο αριθμό ειδών όπως ορχιδέες, πολλά φυτά εσωτερικού χώρου (διεφενμπάχια, συγκόνιο κτλ.), ροδόδενδρο (Chu, 1986 ; Evans, 1990 ; Jones & Tisserat 1990) κ.α .

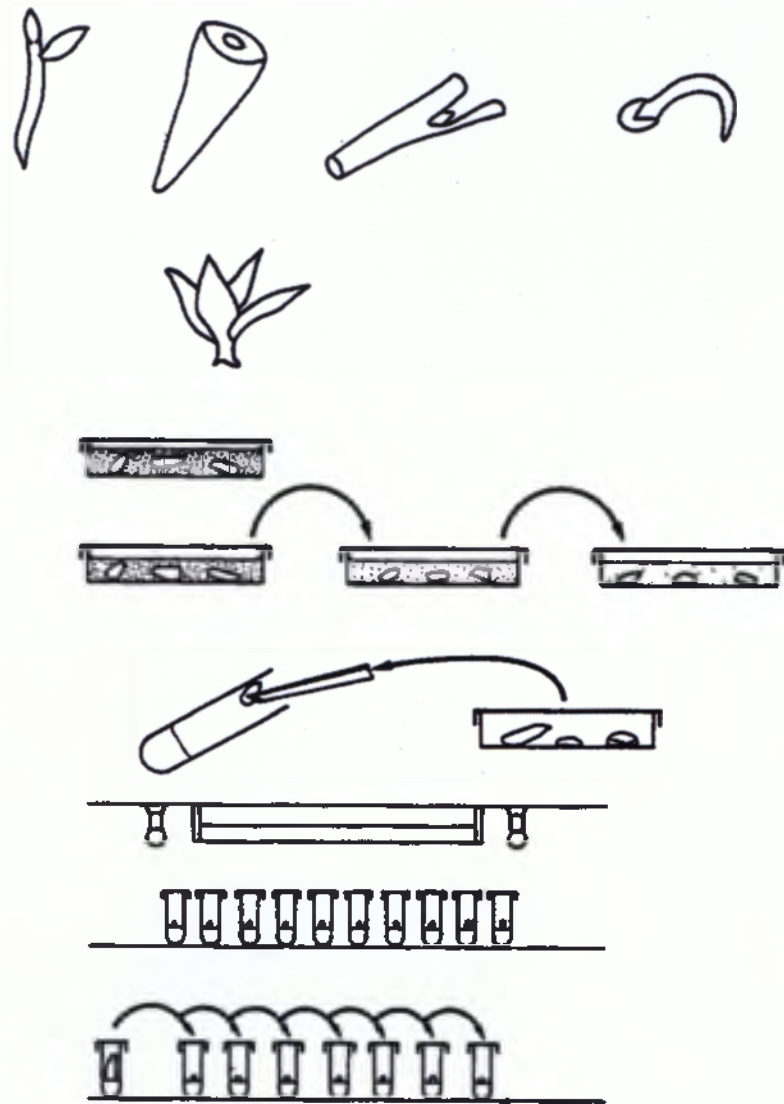
Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες πολλαπλασιασμού *in vitro* και στα παχύφυτα. Αν και οι έρευνες μέχρι σήμερα είχαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, δεν έχει ακόμα καθιερωθεί ως κύριος τρόπος πολλαπλασιασμού στα παχύφυτα.

Στην Ολλανδία σήμερα υπάρχει εξειδικευμένο εργαστήριο, το οποίο αναπαράγει σπάνιες ποικιλίες με τον τρόπο αυτό. Πρόκειται για ποικιλίες παχύφυτων που με τον εγγενή τρόπο πολλαπλασιασμού δεν θα μεταδίδονταν πλήρως τα χαρακτηριστικά των μητρικών φυτών στους απογόνους. (Διαδίκτυο 1) .



Εικόνα 13 : Σχηματική απεικόνιση του *in vitro* πολλαπλασιασμού.
 α) Έκφυτο σε θρεπτικό υπόστρωμα
 β) Αυξίνη > κυτοκίνινης
 γ) Αυξίνη
 δ) Αυξίνη < κυτοκίνινης

Πηγή : Mantell *et al.*, 1985



Εικόνα 14 : Σχηματική απεικόνιση του *in vitro* πολλαπλασιασμού για την παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών.

Πηγή : Mantell *et al.*, 1985

1.4.2.4.1 Βιβλιογραφική ανασκόπηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού της οικογένειας Cactaceae.

Απ' όλες τις οικογένειες των παχύφυτων η μεγαλύτερη προσοχή έχει δοθεί στην οικογένεια Cactaceae. Από το 1957 παραγωγή κάλου είχε αναφερθεί σε μερικά είδη (King, 1957) και οι Sachar & Iyer (1959) ερεύνησαν τα αποτελέσματα των αυξινών, κυτοκινίνων αλλά και του γιββεριλλικού οξέος πάνω στη διαφοροποίηση του κάλλου από τους ιστούς του εμβρύου της *Opuntia dillenii*. Ο Steinhart (1962) χρησιμοποίησε καλλιέργεια κάλου του *Trichocereus spachianus* για να μελετήσει τη βιοσύνθεση αλκαλοειδών, ενώ ο Colomas (1971) πολλαπλασίασε τον *Pachycereus pringlei* από κομμάτια βλαστού και οι Minocha & Mehra (1974) ανακάλυψαν ότι η επαγωγή κάλου από ιστούς του *Mammillaria prolifera* εξαρτάται από την παρουσία της ορμόνης 2,4-D στο υπόστρωμα.

Οι Mauseth & Halperin (1975) πειραματίστηκαν με πλάγιους οφθαλμούς και βλαστούς της *Opuntia polyacantha* και παρατήρησαν ότι οι κυτοκινίνες προκαλούν δραστηριοποίηση του κοιμώμενου μεριστώματος, οδηγώντας στη παραγωγή φύλλων πάνω στον επικείμενο άξονα. Ενώ το γιββεριλλικό οξύ προτρέπει το σχηματισμό των αγκαθιών και οι αυξίνες προτρέπουν το σχηματισμό ριζών στους παρακείμενους ιστούς. Ο Mauseth (1977) παρήγαγε γόνιμο κάλο σε 11 είδη κάκτου, και αναφέρει ότι η ιστοκαλλιέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μια μέθοδο πολλαπλασιασμού για τα ανώτερα είδη.

Η πρώτη αναφορά πολλαπλασιασμού με ιστοκαλλιέργεια ήταν στην *Mammillaria woodsii* (Kolar et al. 1976). Κάλος παρήχθηκε μετά από καλλιέργεια εκφύτων εντεριώνης σε υπόστρωμα Murashige and Skoog (1962) το οποίο περιείχε 2 mg/l IAA και Kinetin. Βλαστοί που παρήχθησαν από την ανωτέρω καλλιέργεια ριζοβόλησαν *ex vitro* σε περλίτη μετά από επίδραση σκόνης ριζοβολίας εμπορίου. Αναφέρεται ότι με αυτή τη μέθοδο επιταχύνεται ο πολλαπλασιασμός κατά ένα χρόνο σε σχέση με το συνήθη τρόπο πολλαπλασιασμού του είδους που είναι με σπόρο.

Οι Johnson & Emino (1977a & b) ανέφεραν επιτυχή πολλαπλασιασμό της *Mammillaria elongata* από φυμάτια, σε υπόστρωμα ανόργανα με άλατα του MS εμπλουτισμένο με τις οργανικές ενώσεις των Sepra & Jones (Skoog & Miller, 1957). Πήραν βλαστούς μέσου κάλλου και τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν το υπόστρωμα περιείχε 10 mg/l 2iP και 1 mg/l IBA. Οι βλαστοί που παράχθηκαν μεταφέρθηκαν *in vivo* για ριζοβολία.

Ο Mauseth (1979) αναφέρει για πρώτη φορά επιτυχή *in vitro* πολλαπλασιασμό χωρίς τη φάση του κάλλου. Βλαστοί παρήχθησαν από κοιμώμενους πλάγιους οφθαλμούς σε 10 είδη παχύφυτων με χρήση BAP από 1–10 mg/l. Ριζοβολία βλαστών έγινε τόσο *ex vitro* όσο και *in vitro* σε υπόστρωμα που περιείχε 10 mg/l NAA. Το *Hatiora salicornioides* έδωσε βλαστούς σε υπόστρωμα MS χωρίς κυτοκινίνες. Βλαστοί από τα *H. salicornioides* και *Eriophyllum sp.* επιβίωσαν μετά την μεταφορά τους σε εδαφικό μίγμα.

Πολλαπλασιασμός σπάνιων ειδών κάκτων έχει αναφερθεί από πολλούς συγγραφείς. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα είδη *Cephalocereus senilis* (Nava-Esparza & Yanes L. 1984), *Mammillaria sanangelensis* (Martinez-Vasquez & Rublio, 1989) και *M. huiquilopochtli* (Rubluo et al., 1990). Οι Fay & Muir (1990) αναφέρουν τον επιτυχή πολλαπλασιασμό της *Opuntia echios* var *gigantea* από τον Gratton στο Kew. Οι Clayton *et al.* (1990) ύστερα από πειράματα πάνω στην καλλιέργεια 11 σπάνιων ειδών βρήκαν ότι το MS ή το υπόστρωμα των Phillips & Collins (1979) ήταν κατάλληλα υποστρώματα για μια σειρά από είδη, καθώς και ότι η ζεατίνη αποτελεί την πιο αποτελεσματική κυτοκινίνη για παραγωγή βλαστών στα γένη *Pediocactus*, *Sclerocactus* και *Toumeyia*. Ο Simerda (1990) αναφέρει μεθόδους πολλαπλασιασμού για σπάνια είδη κάκτων, περιλαμβάνοντας βλάστηση σπόρων *in vitro* καθώς και μικροπολλαπλασιασμού από μέρη σπορόφυτων.

Οι Dabekausen *et al.* (1991), μελετώντας την επίδραση παραγόντων που προκαλούν δραστηριοποίηση της αρεόλης στη *Sulcorebutia alba*, συμπέραναν ότι το MS με μακροστοιχεία σε 1,5 κανονικής δύναμης και 0,25–1 mg/l BAP, έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα.

Ο Poccock (Fay & Gratton, 1992) επιτυχώς πολλαπλασίασε είδη από τα γένη *Opuntia*, *Pediocactus*, *Rebutia*, *Uebelmannia* και *Utahia*.

Η ιστοκαλλιέργεια είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για πολλαπλασιασμό, αλλά και για να εξαλείψει τις ασθένειες σε σπάνια είδη κάκτων στο Βασιλικό Βοτανικό Κήπο στο Kew (Gratton & Fay, 1990). Με επιτυχία εφαρμόστηκε σε φυτά τα οποία είχαν προσβληθεί από μύκητες και βακτήρια στις ρίζες ή υπέφεραν από ζημιές εντόμων. Ως έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν ιστοί βλαστών με έναν οφθαλμό, σε όλες τις περιπτώσεις. Εκτός της *Mammillaria gracilis* που παρατηρήθηκε παραγωγή βλαστών από καλλιέργεια φυματίου σε MS με 2 mg/l BAP.

Βασικά η υπερβολική παραγωγή κάλου και η υαλώδης μορφή του μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα για μερικούς κάκτους. Πρόβλημα αποτελεί και η παρουσία πολλών ξυλωδών αγκαθιών στην αποτελεσματική απολύμανση. Γι' αυτό και πρέπει να αφαιρούνται τα αγκάθια πριν την απολύμανση προσέχοντας όμως τον ιστό που βρίσκεται από κάτω (Gratton & Fay, 1990).

Σπόροι από ένα μεγάλο αριθμό κάκτων βλάστησαν *in vitro* δίνοντας υψηλό ποσοστό βλαστικότητας και επιβίωσαν περισσότερο από τις άλλες μεθόδους ιστοκαλλιέργειας των Bowling και Redwood (Fay & Gratton, 1992). Σε μερικές περιπτώσεις βλαστοί από τα σπορόφυτα αυτά με χρήση κυτοκινίνων έδωσαν μεγάλο αριθμό φυτών (Fay & Gratton, 1992).

Οι Stuppy & Nagl (1992) ανέφεραν σωματική εμβρυογένεση από κάλο που προέρχονταν από σπορόφυτα του *Ariocarpus retusus*. Οι Comeanu *et al.*, (1990), ανέφεραν σωμακλωνική παραλλακτικότητα σε φυτά αναγεννημένα από καλλιέργεια κάλου από μη γονιμοποιημένα ωάρια του *Mammillaria sp.*

Ιστοκαλλιέργεια κάκτων χρησιμοποιείται και για άλλους σκοπούς εκτός από τον πολλαπλασιασμό. Οι Seení & Gnannam (1980) χρησιμοποίησαν καλλιέργειες του *Chamaecereus silvestrii* για να μελετήσουν τη φωτοσύνθεση στον CAM μεταβολισμό των φυτών. Ο Mauseth (1984) μελέτησε *in vitro* το κορυφαίο μερίστωμα των βλαστών της *Opuntia polyacantha* και οι Pare *et al.*,

(1991), χρησιμοποίησαν καλλιέργεια κυττάρων για να ερευνήσουν την παραγωγή φυτοαλεξίνων στο *Cephalocereus senilis*.

Ο W. Lossocinski (1985) εξέτασε διάφορα υποστρώματα καλλιέργειας *in vitro* για το φυτό *G. michanovichii* var “Hibotan”. Το καλύτερο υπόστρωμα βρέθηκε των Savage *et al.* (1979) εμπλουτισμένο με 0,5 mg/l L-μηλικό οξύ. Παραγωγή βλαστών, με έκφυτα φυμάτια, επιτεύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 0,1 mg/l NAA και BA.

Οι Havel & Kolar (1983) ανέπτυξαν μια τεχνική παραλαβής ιστών από κάκτους χωρίς να προκαλείται σημαντική ζημιά στα φυτά, χρησιμοποιώντας μια σύριγγα. Αυτή η τεχνική μπορεί να είναι χρήσιμη για την παραγωγή κάλου για μελέτες φυσιολογίας και βιοχημείας.

Οι Giusti *et al.*, (2002), πολλαπλασίασαν επιτυχώς *in vitro* τα απειλούμενα είδη *Escobaria minima* Hunt, *Mammillaria pectinifera* Weber, και *Pelecypora aselliformius* σε στερεό υπόστρωμα MS με διάφορους συνδυασμούς NAA και BA, Kinetin ή TDZ.

Οι Figuera *et al.*, (2005), προσπάθησαν να πολλαπλασιάσουν *in vitro* με έκφυτα που προέρχονται από αρεόλες σποροφύτων, 8 είδη του γένους *Turbinicarpus* (Πίνακας 1). Για όλα τα είδη χρησιμοποιήθηκε στερεό υπόστρωμα MS (10 g l⁻¹ άγαρ), με 3% σακχαρόζη και διάφορες συγκεντρώσεις της φυτορρυθμιστικής ουσίας (BAP). Η ριζοβολία επιτεύχθηκε σε MS υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες. Ενώ 91,6 % κατά μέσο όρο βλαστοί όλων των παραπάνω ειδών του γένους *Turbinicarpus* μεταφέρθηκαν *ex vitro* σε χώμα με επιτυχία. Στους πίνακες 1 και 2 φαίνονται τα είδη κάκτων που έχουν πολλαπλασιαστεί *in vitro*.

Παρατηρήθηκε επίσης, σωματική εμβρυογέννηση του *Aztekium ritteri* από τους Rodriguez-Garay and Rubluo (1992), σε MS με την προσθήκη 3mg l⁻¹ 2, 4 D και 2mg l⁻¹ NAA και 2mg l⁻¹ Kinetin. Άλλα είδη κάκτων που επιτεύχθηκε σωματική εμβρυογέννηση φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 1 : Κάκτοι που έχουν πολλαπλασιαστεί *in vitro* βάση των Fay & Gratton (1992).

Είδος	Έκφυτα	Ερευνητές
<i>Ariocarpus retusus</i>	σπόρος	Stuppy & Nagl, 1992
<i>A. trigonus</i>	σπόρος	Starling & Hutson, 1984
<i>Astrophytum</i>	πλ. οφθαλμός	Vyskot & Jara, 1984
<i>Cephalocereus senilis</i>	ιστοί σποροφύτων	Esparza & Yanez, 1984
<i>Echinocactus grusonii</i>	ιστοί σποροφύτων	Delgadillo-Reynoso, 1990
<i>Echinocereus dasyacanthus</i>	ιστοί σποροφύτων	Ault & Blackmon, 1985
<i>Echinopsis chamaecereus</i> (<i>Chamaecereus silvestrii</i>)	πλ. οφθαλμός	Mauseth, 1979
<i>E. spachianus</i> (<i>Trichocereus spachianus</i>)	πλ. οφθαλμός	Vyskot & Jara, 1984
<i>Epiphyllum crysocardium</i>	κομ. βλαστός	Gaiser, 1981 & Lazarte, 1981
<i>E. hybrid</i>	πλ. οφθαλμός	Mauseth, 1979
<i>Epithelantha micromeris</i>	σπόρος	Ronse (Fay & Gratton)
<i>Escobaria missouriensis</i>	ιστοί σποροφύτων	Clayton <i>et al</i> , 1990
<i>E. minima</i>	σπορόφυτα	Giusti <i>et al</i> , 2002
<i>E. robbinsorum</i>	ιστοί σποροφύτων	Clayton <i>et al</i> , 1990
<i>Ferocactus cylindraceus</i>	ιστοί σποροφύτων	Ault & Blackmon, 1987
<i>F. covillei</i> , <i>F. wislizeni</i>	ιστοί σποροφύτων	Ault & Blackmon, 1987
<i>Hattiora salicornioides</i>	πλ. οφθαλμός	Mauseth, 1979
<i>Hylocereus calcaratus</i>	πλ. οφθαλμός	Johnson & Emينو, 1979b
<i>Leuchtenbergia principis</i>	ιστοί σποροφύτων	Starling & Hutson, 1984
<i>Lobivia binghamiana</i>	πλ. οφθαλμός	Mauseth, 1979
<i>Mammillaria carmenae</i>	πλ. οφθαλμός	Vyskot & Jara, 1984
<i>M. duwei</i>	ιστοί σποροφύτων	Delgadillo-Reynoso, 1990
<i>M. elongata</i>	πλ. οφθαλμός	Johnson & Emينو, 1979a
<i>M. goldii</i> , <i>M. hernandezii</i>	πλ. οφθαλμός	Pocock, Fay & Gratton, 1992
<i>M. humboldtii</i>	πλ. οφθαλμός	
<i>M. huitzilopochtli</i>	ιστοί σποροφύτων	Rubluo <i>et al</i> , 1990
<i>M. prolifera</i>	πλ. οφθαλμός	Vyskot & Jara, 1984
<i>M. pectinifera</i>	σπορόφυτα	Giusti <i>et al</i> , 2002
<i>M. san-angelensis</i>	ιστοί σποροφύτων	Martinez & Rub, 1989
<i>M. woodsii</i>	εντεριώνη	Kolar <i>et al</i> , 1976
<i>M. wrightii</i>	κορυφές βλαστών	Mauseth, 1979
<i>M. sp</i>	ωάρια	Cormeaneu <i>et al</i> , 1990
<i>M. spp. (21 spp.)</i>	ιστοί σποροφύτων	Damiano <i>et al</i> , 1986
<i>Opuntia amyclaea</i>	πλ. οφθαλμός	Escobar <i>et al</i> , 1986
<i>O. basilaris</i>	πλ. οφθαλμός	Mauseth, 1979
<i>O. echios</i> var. <i>gigantea</i>	πλ. οφθαλμός	Fay & Muir, 1990
<i>O. polyacantha</i>	πλ. οφθαλμός	Johnson & Emينو, 1979
<i>Opuntia sp.</i> ("Tephrocactus chilensis")	σπόρος	Krulik, 1980
<i>Pachycereus pringlei</i>	πλ. οφθαλμός	Mauseth, 1979
<i>Pediocactus bradyi</i>	κορυφές βλαστών	Clayton <i>et al</i> , 1990
<i>P. despainii</i>	κορυφές βλαστών	Clayton <i>et al</i> , 1990

<i>P. knowltonii</i>	ιστοί σποροφύτων κορυφές βλαστών	Simerda, 1990 Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>P. paradinei</i>	κορυφές βλαστών	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>P. peeblesiana</i> var. "fickeisenii"	ιστοί σποροφύτων	Simerda, 1990
<i>P. winkleri</i>	κορυφές βλαστών	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>Pereskia aculeata</i>	πλ. οφθαλμός	Mauseth, 1979
<i>Pelecyphora aselliformis</i>	σπορόφυτα	Giusti <i>et al.</i> , 2002
<i>Rebutia canigueralii</i> (<i>Sulcorebutia alba</i>)	πλ. οφθαλμός	Dabekaussen <i>et al.</i> , 1991
<i>Rhipsalis teres</i>	πλ. οφθαλμός	Johnson & Emimo, 1979
<i>Selenicereus grandiflorus</i>	πλ. οφθαλμός	Mauseth, 1979
<i>Sclerocactus mesae-verdae</i>	κορυφές βλαστών	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>S. papyracanthus</i>	ιστοί σποροφύτων	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>S. spinosior</i>	ιστοί σποροφύτων	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>Turbinicarpus lophophoroides</i>	σπόρος	Ronse (Fay & Gratton, 1992)
<i>T. laui</i>	σπορόφυτα	Figuera <i>et al.</i> , 2005
<i>T. lophophoroides</i>	σπορόφυτα	Figuera <i>et al.</i> , 2005
<i>T. pseudopectinatus</i>	σπορόφυτα	Figuera <i>et al.</i> , 2005
<i>T. schmiedickeanus</i> <i>subsp. flaviflorus</i>	σπορόφυτα	Figuera <i>et al.</i> , 2005
<i>T. schmiedickeanus</i> <i>subsp. klinkerianus</i>	σπορόφυτα	Figuera <i>et al.</i> , 2005
<i>T. schmiedickeanus</i> <i>subsp. schmiedickeanus</i>	σπορόφυτα	Figuera <i>et al.</i> , 2005
<i>T. subterraneus</i>	σπορόφυτα	Figuera <i>et al.</i> , 2005
<i>T. valdezius</i>	σπορόφυτα	Figuera <i>et al.</i> , 2005

Πίνακας 2 : Κάκτοι που πολλαπλασιάστηκαν *in vitro* στο Kew (Fay & Gratton, 1992).

Είδος	Έκφυτα
<i>Acanthocalyclium spiniflorum</i>	πλ. οφθαλμός
<i>Astrophytum myriostigma</i>	σπόρος
<i>Aztekium ritteri</i>	σπόρος
<i>Cumarinia odorata</i>	πλ. οφθαλμός
<i>Disocactus alatus</i>	σπόρος
<i>Echinocactus grusonii</i>	σπόρος
<i>Echinocereus rigidissimus</i>	σπόρος
<i>Escobaria emskoetteriana</i>	πλ. οφθαλμός
<i>Epithelantha micromeris</i>	σπόρος
<i>Ferocactus latispinus</i>	σπόρος
<i>Gymnocalycium mesopotamicum</i>	σπόρος
<i>Hatiora herminiae</i>	σπόρος
<i>Hylocereus antiguensis</i>	σπόρος
<i>Maihuenia poeppigii</i>	σπόρος
<i>Mammillaria albilianata</i>	πλ. οφθαλμός
<i>M. gracillis</i>	πλ. οφθαλμός
<i>M. lasiacantha</i>	πλ. οφθαλμός
<i>M. mammillaris</i>	σπόρος
<i>M. nana</i>	πλ. οφθαλμός
<i>M. parkinsonii</i>	σπόρος
<i>M. solisioides</i>	σπόρος
<i>M. spp.</i>	πλ. οφθαλμός
<i>M. theresae</i>	πλ. οφθαλμός
<i>M. viperina</i>	πλ. οφθαλμός
<i>Melocactus broadwayi</i>	σπόρος
<i>Obregonia denegrii</i>	σπόρος
<i>Opuntia brasiliensis</i>	πλ. οφθαλμός
<i>O. echios</i> var <i>gigantea</i>	πλ. οφθαλμός
<i>O. nigrispina</i>	πλ. οφθαλμός
<i>O. taylori</i>	πλ. οφθαλμός
<i>Parodia leninghausii</i>	πλ. οφθαλμός
<i>Stenocactus albatius</i>	πλ. οφθαλμός
<i>Turbinicarpus pseudomacrolele</i>	πλ. οφθαλμός

Πίνακας 3 : Κάκτοι που επιτεύχθηκε σωματική εμβρυογέννηση.

Είδος	Ερευνητές
<i>Aztekium ritter</i>	Rodriquez-Garay & Rubluo, 1992
<i>Mammillaria san-angelensis</i>	Marin-Hernandez <i>et al.</i> , 1998
<i>Opuntia aurantiaca</i>	Tisserat <i>et al.</i> , 1979
<i>O. dilleni</i>	Tisserat <i>et al.</i> , 1979
<i>O. rafinesquii</i>	Tisserat <i>et al.</i> , 1979
<i>O. torstipina</i>	Tisserat <i>et al.</i> , 1979
<i>O. ficus-indica</i>	Tisserat <i>et al.</i> , 1979

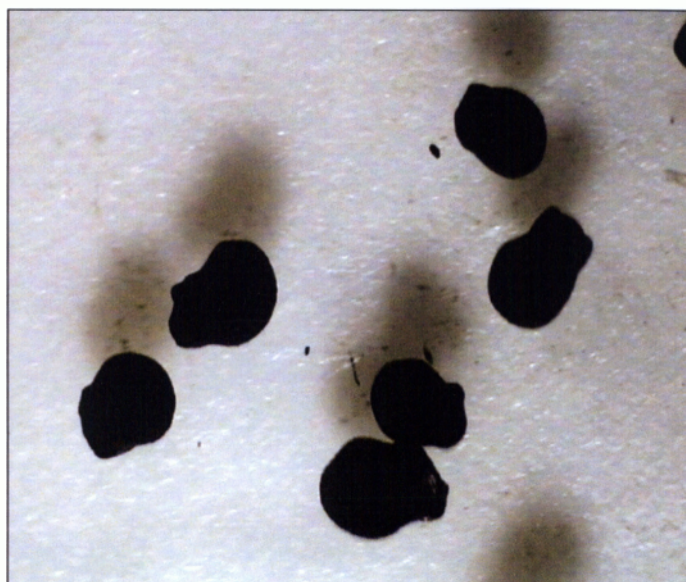
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

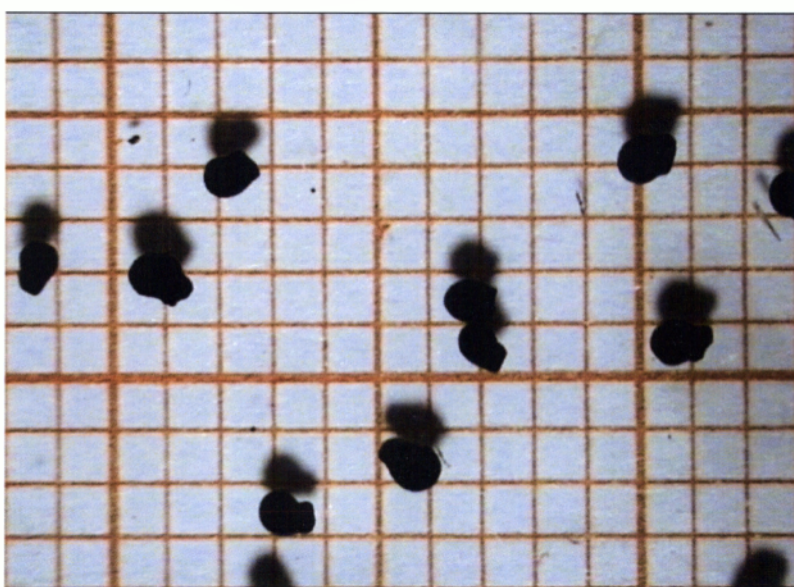
2.1.1 Φυτικό υλικό

Ο σπόρος της *M. boollii* (Εικ. 15, 16) που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα *in vitro* καλλιέργειας ήταν συλλογής του Ιουνίου 2005.

Οι κάψες επιλέχθηκαν από υγιή φυτά που διατηρούνταν σε θερμοκήπιο, με ελαφριά σκίαση το καλοκαίρι. Ιδιαίτερη προσοχή δινόταν στην άρδευση, ώστε να περιοριστεί η μόλυνση των φυτών από παθογόνα εδάφους.



Εικόνα 15 : Σπόροι της *M. boollii* (10x).



Εικόνα 16 : Σπόροι της *M. boollii* (10x).

2.1.2 Υλικά απολύμανσης σπόρων

Πριν την τοποθέτηση *in vitro* των σπόρων προηγείται απολύμανση όπου χρησιμοποιούνται τα εξής υλικά :

- α) Χλωρίνη εμπορίου, που περιέχει 4,5 % NaOCl
- β) Προσκολλητική ουσία Tween-20 (Polyxyethylenesorbitan Monolaurate) της εταιρίας MERCK

2.1.3 Υλικά θρεπτικού υποστρώματος *in vitro* καλλιέργειας

- α) Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) σε σκόνη χωρίς IAA, Kinetin της εταιρίας ICN BIOMEDICALS.
- β) Σακχαρόζη εμπορίου
- γ) Αυξίνες : Ναφθαλινοξικό οξύ (NAA), MB = 186,2 της εταιρίας SIGMA
- δ) Κυτοκινίνες : N-6-Βενζυλαδενίνη (BA), MB = 225,25 της εταιρίας SIGMA
- ε) Άγαρ της εταιρίας Ρουμπουλάκης Α.Ε.

2.1.4 Βάζα *in vitro* καλλιέργειας

Σ' όλα τα στάδια της *in vitro* καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν βάζα όγκου 80 ml, από διαφανές γυαλί, χωρίς καπάκι. Για καπάκι χρησιμοποιήθηκε διαφανής μεμβράνη της εταιρίας SANITAS σχήματος κυκλικού δίσκου διαμέτρου 4 cm μεγαλύτερης από τη διάμετρο του βάζου που σταθεροποιείτο με τη βοήθεια Parafilm.

2.1.5 Υπόστρωμα *in vitro* καλλιέργειας

Για την *in vitro* βλάστηση σπόρων χρησιμοποιήθηκαν δύο κατηγορίες υποστρωμάτων με βάση το MS. Χρησιμοποιήθηκε MS πλήρες και μισής συγκέντρωσης των στοιχείων του (Murashige & Skoog, 1962).

Στον Πίνακα 4 φαίνονται τα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος.

Πίνακας 4 : Συστατικά (μακροστοιχεία - ιχνοστοιχεία) των υποστρωμάτων MS και ½ MS (Mourashige & Skoog, 1962) .

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

Για την *in vitro* καλλιέργεια εκφύτων χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MS που περιείχε τις φυτορρυθμιστικές ουσίες NAA και BA σε διάφορες αναλογίες. Στον Πίνακα 5 φαίνονται οι συνδυασμοί των φυτορρυθμιστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 5 : Συγκέντρωση φυτορρυθμιστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για καλλιέργεια της *M. booli*.

Φυτορ. Ουσίες	BA	NAA
Συγκέντρωση		
A	2,5 mg/l	0,2 mg/l
B	5 mg/l	0,2 mg/l

Όλα τα υποστρώματα σταθεροποιήθηκαν με 8 g l^{-1} άγαρ. Το pH όλων των υποστρωμάτων ρυθμιζόταν με αραιό HCl 1N ή αραιό NaOH 1N στην τιμή 5,6 πριν την τοποθέτηση του άγαρος και την αποστείρωση.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Παρασκευή πυκνών διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών

Τα διαλύματα των φυτορρυθμιστικών ουσιών περιέχουν την φυτορρυθμιστική ουσία σε τέτοια αναλογία ώστε να είναι μετρήσιμη η απαραίτητη ποσότητα τουλάχιστον από πιπέτα του 1 ml.

1) Παρασκευή πυκνού διαλύματος NAA.

Σε δοχείο ζέσεως 100 ml τοποθετούνται 10 mg NAA, τα οποία διαλύονται σε 4–5 σταγόνες καθαρής αιθυλικής αλκοόλης. Στη συνέχεια προσθέτουμε 100 ml απεσταγμένου νερού.

2) Παρασκευή πυκνού διαλύματος BA.

Σε δοχείο ζέσεως 100 ml τοποθετούνται 10 mg BA, τα οποία διαλύονται σε 4 – 5 σταγόνες καυστικού νατρίου NaOH 1N. Στη συνέχεια προσθέτουμε 100 ml απεσταγμένου νερού.

Όλα τα πυκνά διαλύματα των ορμονών αποθηκεύονται σε ψυγείο στους 5° C περίπου μέχρι 30 ημέρες.

2.2.2 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων

Σε απεσταγμένο νερό όγκου λιγότερου του τελικού προσθέτονται οι ακριβείς ποσότητες (αναλόγως του όγκου του υπό παρασκευή υποστρώματος) MS, σακχαρόζης και ορμονών από τα πυκνά διαλύματα και αναδεύονται με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα (Εικ. 17) μέχρι να διαλυθούν. Ακολουθούσε η ογκομέτρηση (προσθήκη απεσταγμένου νερού ως τον επιθυμητό όγκο) και στη συνέχεια ρύθμιση του pH στην τιμή 5,6 της κλίμακας. Στη συνέχεια προσθέτονταν το άγαρ και ακολουθούσε θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το άγαρ. Στη συνέχεια μοιράζονταν το διάλυμα ανά 15 ml σε κάθε βάζο.



Εικόνα 17 : Μαγνητικός αναδευτήρας.

2.2.3 Αποστείρωση υλικών – Κοπή εκφύτων – Επώαση

Η αποστείρωση γινόταν σε χύτρα υγρής αποστείρωσης για 20 min σε θερμοκρασία 121° C και πίεση 1.1 Atm (Εικ. 18).

Όλα τα βάζα (Εικ. 19) με τα υποστρώματα καλύπτονταν με φύλλο αλουμινίου καθώς και τα εργαλεία που χρησιμοποιούνταν στις εμφυτεύσεις ή απολυμάνσεις όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκι πάνω στο οποίο γίνονταν οι κοπές εκφύτων (Εικ. 20), κωνικές φιάλες και δοχεία με απιονισμένο νερό.

Προσοχή, βιδωτά καπάκια σε δοχεία τοποθετούνταν κατά την αποστείρωση χαλαρά μέσα στην χύτρα.



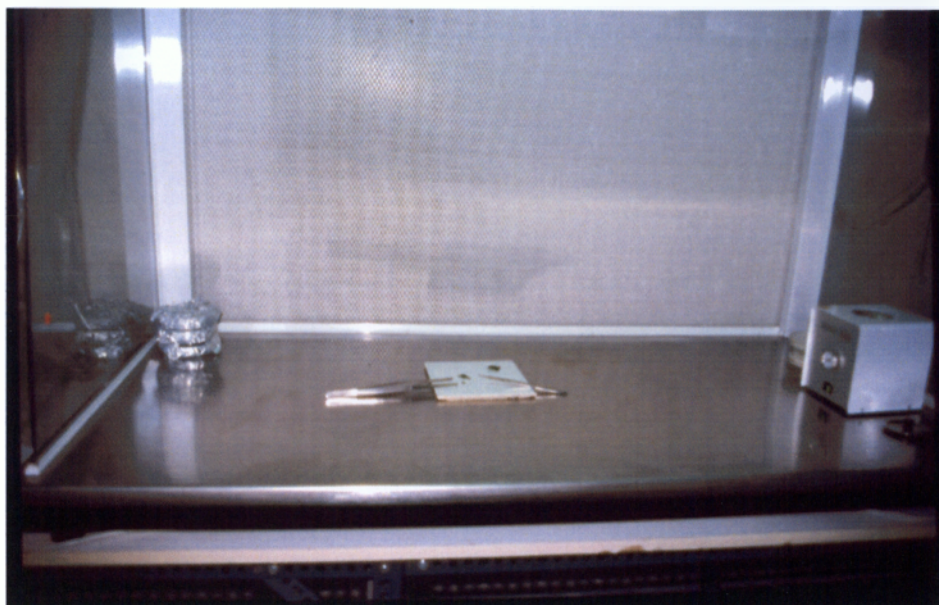
Εικόνα 18 : Χύτρα υγρής αποστείρωσης σε λειτουργία



Εικόνα 19 : Βάζα μέσα στην χύτρα αποστειρωμένα.



Εικόνα 20 : Αποστειρωμένα εργαλεία τυλιγμένα σε αλουμινόχαρτο.



Εικόνα 21 : Κοπή εκφύτων μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής.



Εικόνα 22: Βάζα *in vitro* καλλιέργειας μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής.



Εικόνα 23 : Βάζα *in vitro* καλλιέργειας μέσα σε θάλαμο σταθερών συνθηκών.

Η απολύμανση των σπόρων γινόταν μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής (Εικ. 21, 22). Η απαιτούμενη ποσότητα σπόρων τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο δοχείο που περιείχε 4,5 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και 0,5 ml χλωρίνη εμπορίου με 1 σταγόνα της προσκολλητικής ουσίας Tween-20. Αναδεύονταν για 10 min και μετά έγιναν 3 ξεπλύματα των 3 min με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.

Η κοπή των εκφύτων και η μέτρηση του βάρους του κάλου έγινε στη τράπεζα νηματικής ροής και τα έκφυτα τοποθετήθηκαν στα βάζα καλλιέργειας όπου επώαστηκαν στους $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ με 16h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent συνεχές φως (Εικ. 23).

2.2.4 Μέθοδος μέτρησης βλαστικότητας σπόρου της *M. boarii*

Οι παρατηρήσεις της βλάστησης πραγματοποιούνταν σε καθημερινή βάση με έναρξη την ημέρα εγκατάστασης τους στο υπόστρωμα. Ως έναρξη βλάστησης των σπόρων θεωρήθηκε η έκπτυξη του ριζιδίου.

2.2.5 Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα στα πειράματα βλάστησης λαμβάνονταν σε ημερήσια βάση μετά την εμφύτευση των σπόρων *in vitro*. Στα πειράματα *in vitro* που έγιναν για την παραγωγή κάλου και βλαστών χρησιμοποιήθηκαν τα υποστρώματα της παραγράφου 2.5.

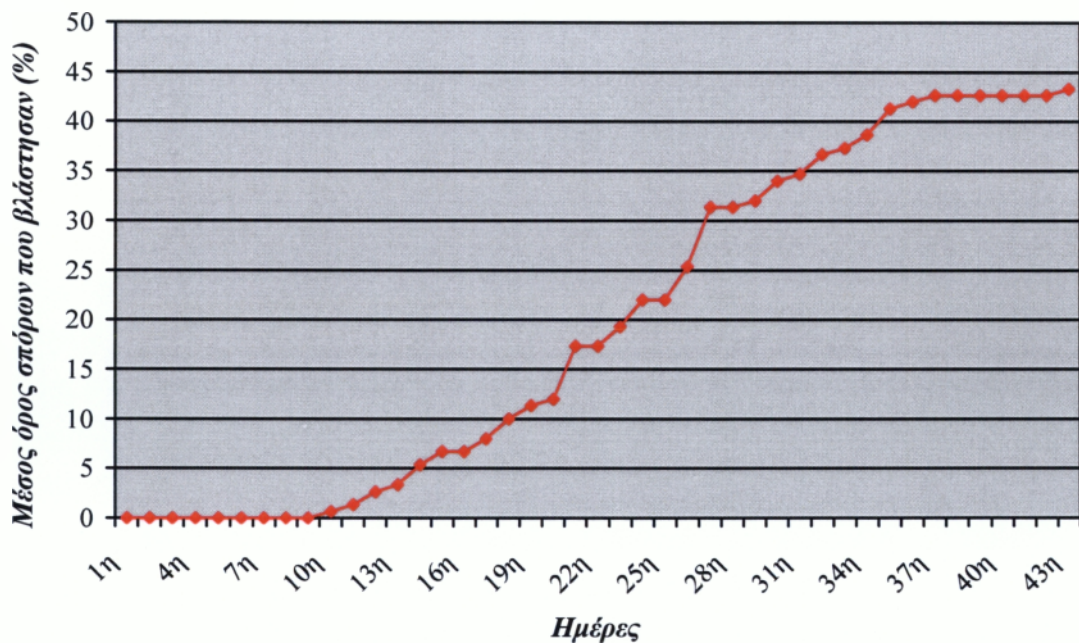
Οι μετρήσεις στα πειράματα μέτρησης του βάρους και του μήκους του κάλου έγιναν μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Για τη μέτρηση του βάρους τοποθετήθηκε ηλεκτρονική ζυγαριά μέσα στην τράπεζα και απολυμάνθηκε με αλκοόλη. Επάνω τοποθετήθηκε αποστειρωμένο τρυβλίο, αφαιρέθηκε το απόβαρο και έγινε η ζύγιση ενώ στη συνέχεια η μέτρηση του μήκους του κάλου γινόταν με υποδεκάμετρο.

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (Ε.Τ.Σ.) και η τοποθέτηση των εκφύτων έγινε τυχαία στα διάφορα βάζα καλλιέργειας όσο και στο θάλαμο επώασης. Για τη καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων δημιουργήθηκε ένας πίνακας για κάθε πείραμα που περιέχει τον μέσο όρο βλαστών ανά επέμβαση. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την χρήση του στατιστικού προγράμματος Jump και η σύγκριση των μέσων με τη δοκιμασία του *t test*. Μέσοι που ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα του λατινικού αλφαβήτου, παρουσιάζουν σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας $P=0,05$. Στα πειράματα που παρατηρήθηκε στατιστική σημαντική διαφορά παρουσιάζεται και ο πίνακας της Ανάλυσης Διασποράς.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μέτρηση βλαστικότητας σπόρων της *M. booli* (7.07.2005) με απολύμανση 20% υδατικού διαλύματος χλωρίνης.

Σπόροι της *M. booli* που φυτεύτηκαν στις 07.07.2005 σε ημιστερεό υπόστρωμα MS (Εικ. 24) (§ 2.5). Ο μέσος όρος των σπόρων που βλάστησαν φαίνεται στο Σχήμα 2. Αναλυτικότερα για το κάθε βάζο καλλιέργειας, φαίνεται στον Πίνακα 6.



Σχήμα 2 : Σπόροι της *M. booli* που βλάστησαν *in vitro* (Φύτευση στις 07.07.2005) με απολύμανση 20% υδατικού διαλύματος χλωρίνης.

Αποτελέσματα

Πίνακας 6 : Σπόροι της *M. boollii* που βλάστησαν *in vitro* σε ½ MS στερεό υπόστρωμα και απολυμάνθηκαν με 20% υδατικό διάλυμα χλωρίνης. Κάθε βάζο καλλιέργειας περιείχε 30 σπόρους.

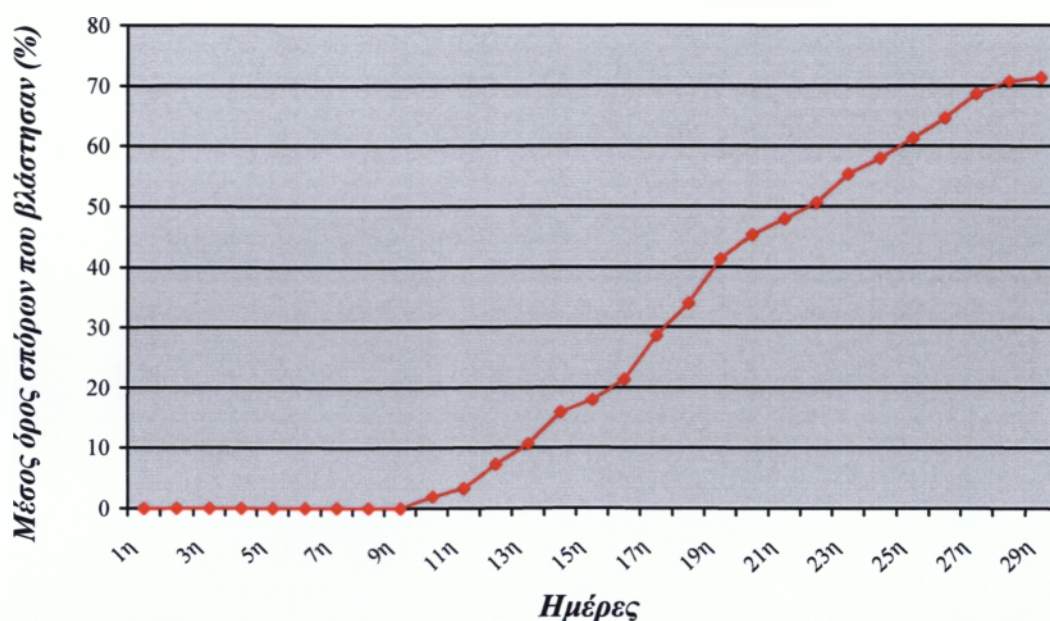
<i>Mammillaria boollii</i> Φύτευση στις 7/7/2005								
Ημερομηνία	Ημέρες	ΒΑΖΑΚΙΑ					Μ.Ο.	Μ.Ο.(%)
		1B	2B	3B	4B	5B		
7/7/2005	1η	0	0	0	0	0	0	0
8/7/2005	2η	0	0	0	0	0	0	0
9-10/7/2005	3η	0	0	0	0	0	0	0
11/7/2005	4η	0	0	0	0	0	0	0
12/7/2005	5η	0	0	0	0	0	0	0
13/7/2005	6η	0	0	0	0	0	0	0
14/7/2005	7η	0	0	0	0	0	0	0
15/7/2005	8η	0	0	0	0	0	0	0
16-17/7/2005	9η	0	0	0	0	0	0	0
18/7/2005	10η	0	0	0	1	0	0,2	0,67
19/7/2005	11η	0	0	0	2	0	0,4	1,33
20/7/2005	12η	0	0	1	2	1	0,8	2,67
21/7/2005	13η	0	0	1	2	2	1	3,33
22/7/2005	14η	0	0	1	3	4	1,6	5,33
23-24/7/2005	15η	0	0	1	3	6	2	6,67
25/7/2005	16η	0	0	1	3	6	2	6,67
26/7/2005	17η	0	1	1	3	7	2,4	8
27/7/2005	18η	2	1	1	4	7	3	10
28/7/2005	19η	2	1	2	4	8	3,4	11,33
29/7/2005	20η	2	1	2	4	9	3,6	12
30-31/7/2005	21η	2	4	4	6	10	5,2	17,33
1/8/2005	22η	2	4	4	6	10	5,2	17,33
2/8/2005	23η	2	6	4	6	11	5,8	19,33
3/8/2005	24η	3	6	4	8	12	6,6	22
4/8/2005	25η	3	6	4	8	12	6,6	22
5/8/2005	26η	3	7	4	9	15	7,6	25,33
6-7/8/2005	27η	5	11	6	10	15	9,4	31,33
8/8/2005	28η	5	11	6	10	15	9,4	31,33
9/8/2005	29η	5	11	7	10	15	9,6	32

Αποτελέσματα

10/8/2005	30η	5	11	8	11	16	10,2	34
11/8/2005	31η	5	11	8	11	17	10,4	34,67
12/8/2005	32η	5	11	8	12	19	11	36,67
13-14/8/2005	33η	5	12	8	12	19	11,2	37,33
15/8/2005	34η	5	13	8	13	19	11,6	38,67
16/8/2005	35η	5	13	9	15	20	12,4	41,33
17/8/2005	36η	5	13	9	15	21	12,6	42
18/8/2005	37η	5	13	10	15	21	12,8	42,67
19/8/2005	38η	5	13	10	15	21	12,8	42,67
20-21/8/2005	39η	5	13	10	15	21	12,8	42,67
22/8/2005	40η	5	13	10	15	21	12,8	42,67
23/8/2005	41η	5	13	10	15	21	12,8	42,67
24/8/2005	42η	5	13	10	15	21	12,8	42,67
25/8/2005	43η	5	14	10	15	21	13	43,33
	Σύνολο	5	14	10	15	21	13	
	Τελικό ποσοστό %							43,33
	Σύνολο σπόρων που βλάστησαν		65					

3.2 Μέτρηση βλαστικότητας σπόρων της *M. booli* (28.07.2005) με απολύμανση 10% υδατικού διαλύματος χλωρίνης

Σπόροι της *M. booli* που φυτεύτηκαν στις 28.07.2005 σε ημιστερεό υπόστρωμα MS (Εικ. 25) (§ 2.5). Ο μέσος όρος των σπόρων που βλάστησαν φαίνεται στο Σχήμα 3. Αναλυτικότερα για το κάθε βάζο καλλιέργειας φαίνονται στον Πίνακα 7.



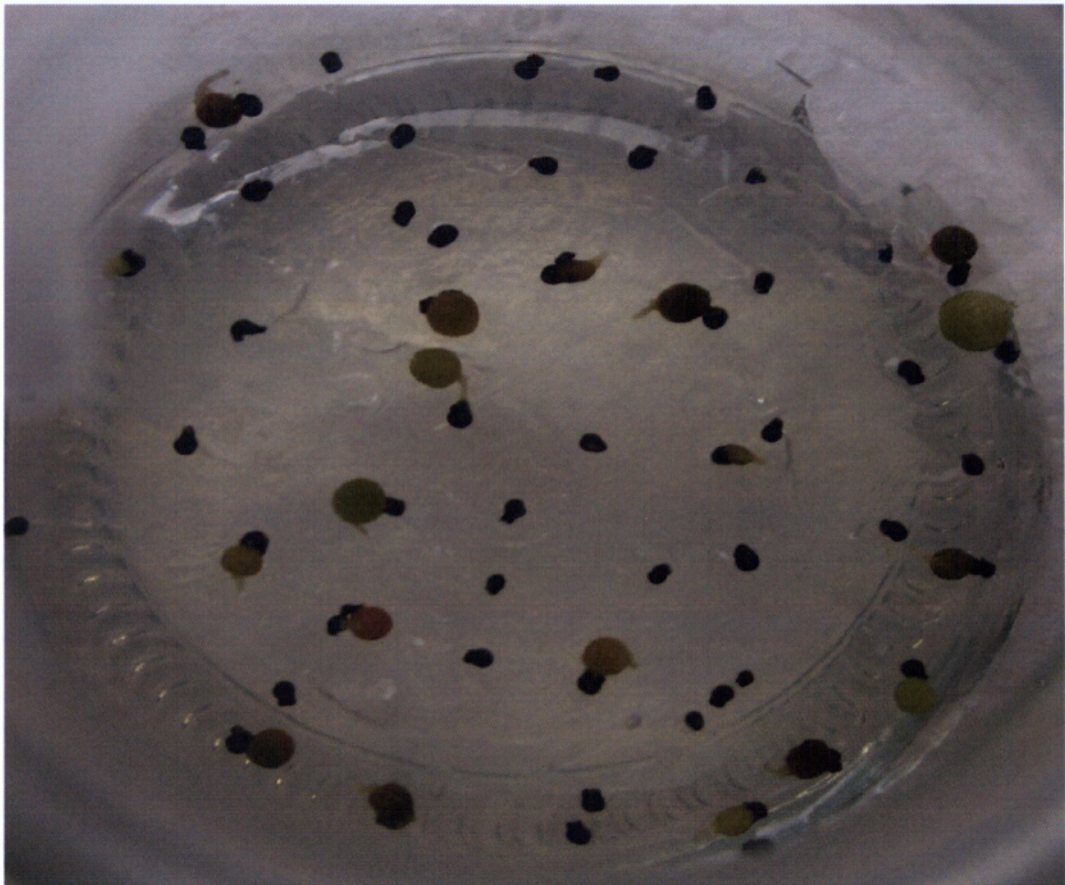
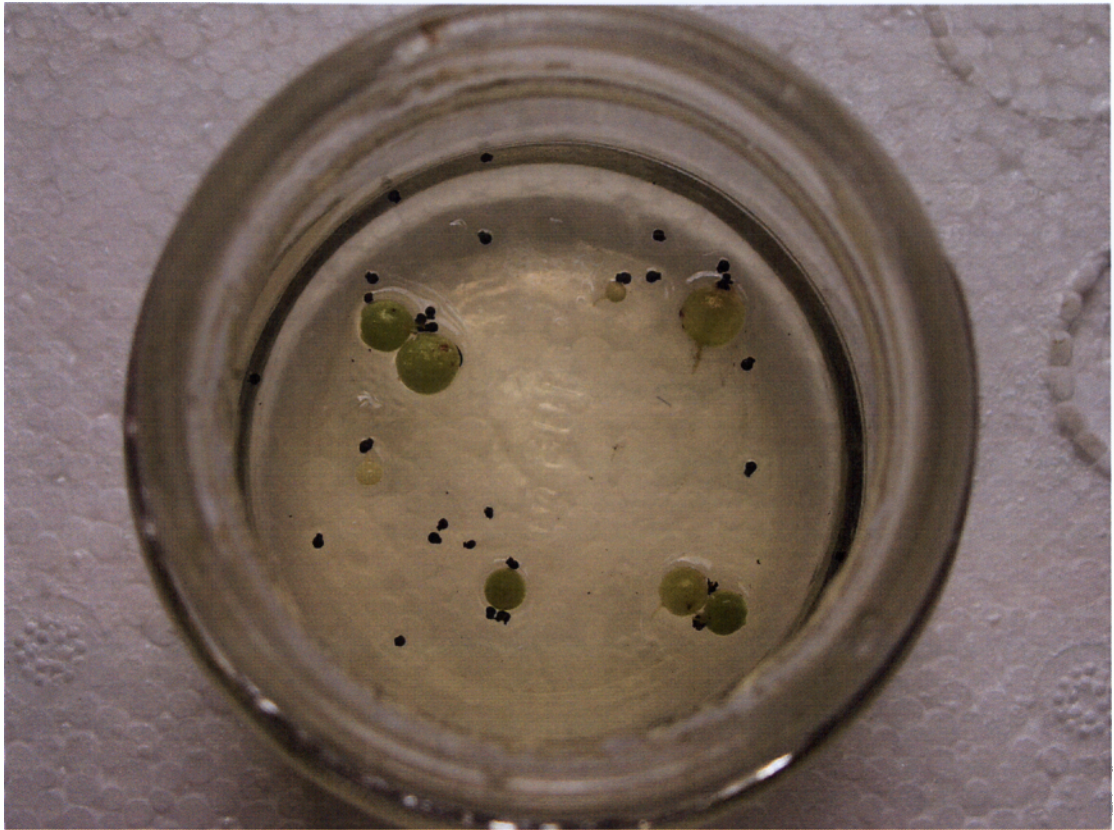
Σχήμα 3 : Σπόροι της *M. booli* που βλάστησαν *in vitro* (Φύτευση στις 28.07.2005) με απολύμανση 10% υδατικού διαλύματος χλωρίνης.

Πίνακας 7 : Σπόροι της *M. boohii* που βλάστησαν *in vitro* σε ½ MS στερεό υπόστρωμα και απολυμάνθηκαν με 10% υδατικό διάλυμα χλωρίνης. Κάθε βάζο καλλιέργειας περιείχε 30 σπόρους.

<i>Mammillaria boohii</i> Φύτευση στις 28/7/2005								
Ημερομηνία	Ημέρες	ΒΑΖΑΚΙΑ					Μ.Ο.	Μ.Ο. (%)
		1BB	2BB	3BB	4BB	5BB		
28/7/2005	1η	0	0	0	0	0	0	0
29/7/2005	2η	0	0	0	0	0	0	0
30-31/7/2005	3η	0	0	0	0	0	0	0
1/8/2005	4η	0	0	0	0	0	0	0
2/8/2005	5η	0	0	0	0	0	0	0
3/8/2005	6η	0	0	0	0	0	0	0
4/8/2005	7η	0	0	0	0	0	0	0
5/8/2005	8η	0	0	0	0	0	0	0
6-7/8/2005	9η	0	0	0	0	0	0	0
8/8/2005	10η	1	1	1	0	0	0,6	2
9/8/2005	11η	3	1	1	0	0	1	3,33
10/8/2005	12η	4	2	3	0	2	2,2	7,33
11/8/2005	13η	4	5	3	1	3	3,2	10,67
12/8/2005	14η	5	8	4	3	4	4,8	16
13-14/8/2005	15η	5	8	5	4	5	5,4	18
15/8/2005	16η	5	9	8	5	5	6,4	21,33
16/8/2005	17η	7	12	8	8	8	8,6	28,67
17/8/2005	18η	8	15	10	9	9	10,2	34
18/8/2005	19η	10	17	12	12	11	12,4	41,33
19/8/2005	20η	11	19	13	13	12	13,6	45,33
20-21/8/2005	21η	12	19	13	16	12	14,4	48
22/8/2005	22η	15	19	13	16	13	15,2	50,67
23/8/2005	23η	17	21	15	17	13	16,6	55,33
24/8/2005	24η	19	22	15	18	13	17,4	58
25/8/2005	25η	20	24	15	19	14	18,4	61,33
26/8/2005	26η	20	25	17	20	15	19,4	64,67
27-28/8/2005	27η	21	26	18	20	18	20,6	68,67
29/8/2005	28η	22	26	18	20	20	21,2	70,67
30/8/2005	29η	22	26	18	21	20	21,4	71,33

Αποτελέσματα

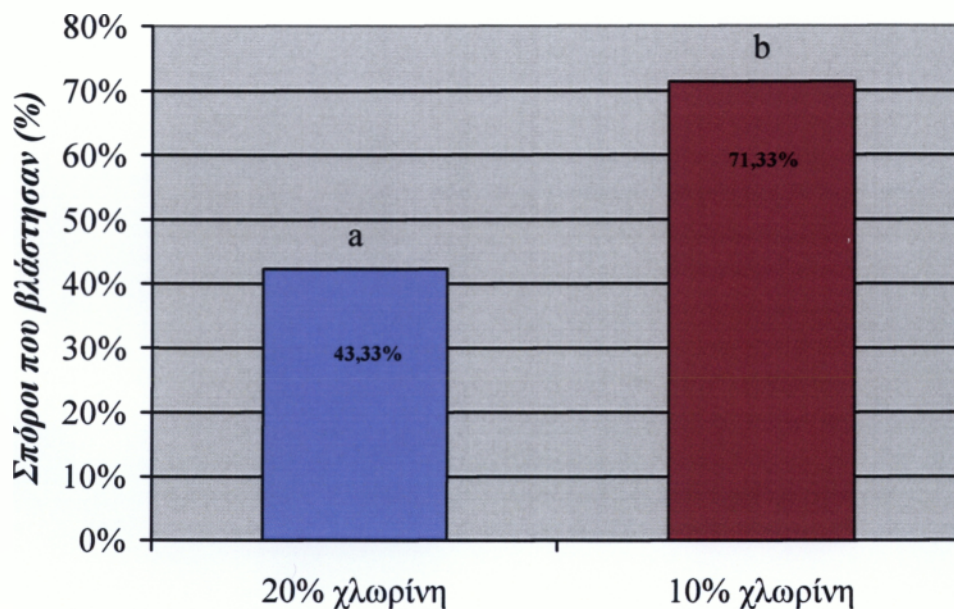
	Σύνολο	22	26	18	21	20		
	Τελικό ποσοστό %							71,33
	Σύνολο σπόρων που βλάστησαν					107		



Εικόνα 24 και 25 : Βλάστηση σπόρων της *M. booli* *in vitro*.

3.3 Επίδραση της απολύμανσης στη βλάστηση σπόρων της *M. booli*

Σπόροι της *M. booli* απολυμάνθηκαν με 20 και 10% υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου. Η επίδραση της χλωρίνης στη βλάστηση των σπόρων φαίνεται στο Σχήμα 4. Το υψηλότερο ποσοστό βλάστησης βρέθηκε στο 10% υδατικό διάλυμα χλωρίνης. Τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με την σύγκριση του t Student' s με $P^* = 0,048$ ($R^2 = 0,50$).



Σχήμα 4 : Επίδραση του επιπέδου χλωρίνης στη βλάστηση των σπόρων. Η σύγκριση των μέσων έγινε με το κριτήριο του t Student' s. (n=5)

Πίνακας 8 : Πίνακας της Ανάλυσης Διασποράς.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Άθροισμα τετραγώνου	Μέσο τετράγωνο	F	Prob > F
Χλωρίνη	1	1960,00	1960,00	7,9640	0,0220

3.4 Μέτρηση του μήκους των βλαστών του *M. booli*

3.4.1 Μέτρηση του μήκους των βλαστών της *M. booli* μετά από δύο και τρεις μήνες *in vitro* καλλιέργειας σε MS.

Σε στερεό υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες τοποθετήθηκαν *in vitro* σπορόφυτα της *M. booli* στις 7/07/05 και στις 28/07/05 και μετά από εκατό και ογδόντα ημέρες αντιστοίχως μετρήσαμε το μήκος των φυταρίων σε χιλιοστά.

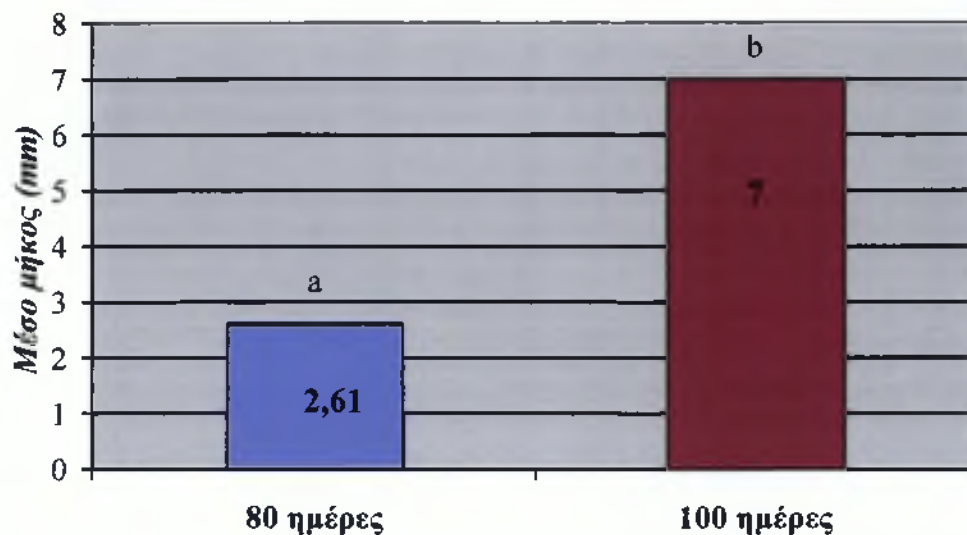
Τα αποτελέσματα φαίνονται στους Πίνακες 9 και 10.

Πίνακας 9 : Μέτρηση του μήκους των βλαστών της *M. booli* που η φύτευση τους έγινε στις 7/07/05 και μετά από εκατό ημέρες.

Φύτευση σε MS στις 7/07/05 Μέτρηση στις 17/10/05						
	Φυτά					Μέσο μήκος φυτών ανά βάζο (mm)
	1ο	2ο	3ο	4ο	5ο	
Βάζο 1	10	3	15	5	4	7,4
Βάζο 2	10	8	5	6	6	7
Βάζο 3	20	5	5	7	5	8,4
Βάζο 4	10	4	10	3	4	6,2
Βάζο 5	10	5	5	5	5	6
Μέσο μήκος (mm)						7

Πίνακας 10 : Μέτρηση του μήκους των βλαστών της *M. boollii* που η φύτευση τους έγινε στις 28/07/05 και μετά από ογδόντα ημέρες.

Φύτευση σε MS στις 28/07/05 Μέτρηση στις 17/10/05								
	Φυτά							Μέσο μήκος φυτών ανά βάζο (mm)
	1ο	2ο	3ο	4ο	5ο	6ο	7ο	
Βάζο 1	2	2	3	2	2	2	2	2,14
Βάζο 2	3	3	3	3	3	3	3	3
Βάζο 3	3	2	3	2	3	2	3	2,57
Βάζο 4	1	2	2	3	3	2	3	2,28
Βάζο 5	3	2	3	3	3	2	3	2,71
Βάζο 6	4	2	4	3	3	4	2	3,14
Βάζο 7	2	3	2	2	3	3	2	2,42
Μέσο μήκος (mm)								2,61



Σχήμα 5 : Μέσο μήκος βλαστών της *M. boollii* ογδόντα και εκατό ημέρες μήνες μετά.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5., εκατό ημέρες μετά την εμφύτευση το μήκος των βλαστών διαφέρει στατιστικά σημαντικά ($P^{**} = 0,01$, $R^2 = 0,57$).

Πίνακας 11 : Πίνακας της Ανάλυσης Διασποράς

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Άθροισμα τετραγώνου	Μέσο τετράγωνο	F	Prob > F
Χλωρίνη	1	56,246881	56,2469	123,06	< 0,001

3.4.2 Μέτρηση μήκους κάλου της *M. boollii*

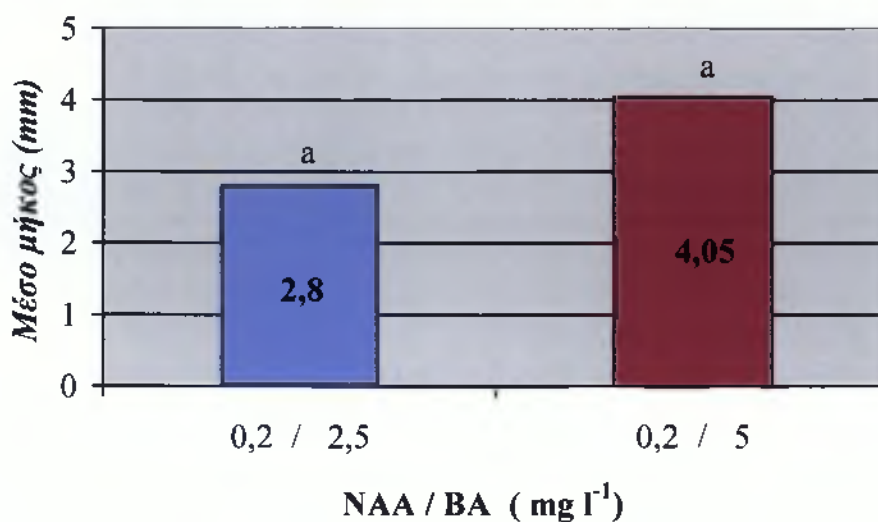
Φυτάρια της *M. boollii* μεταφέρθηκαν *in vitro* σε στερεό υπόστρωμα MS με 0,2 mg l⁻¹ NAA και 2,5 ή 5 mg l⁻¹ BA αφού πρώτα είχε κοπή το ριζίδιο και τοποθετήθηκαν κατακόρυφα επάνω στο υπόστρωμα. Δύο μήνες μετά μετρήθηκε το μέγιστο μήκος του κάλου σε χιλιοστά και τα αποτελέσματα φαίνονται στους Πίνακες 12 και 13.

Πίνακας 12 : Μέτρηση μήκους κάλου της *M. boollii* που η φύτευση σε φυτορρυθμιστικές ουσίες 0,2 mg l⁻¹ NAA και 2,5 mg l⁻¹ BA έγινε στις 31/08/05.

Φύτευση σε MS με 0,2 mg l ⁻¹ NAA / 2,5 mg l ⁻¹ BA στις 31/08/05 Μέτρηση στις 14/10/05					
	Έκφυτα				Μέσο μήκος κάλου ανά βάζο(mm)
	1ο	2ο	3ο	4ο	
Βάζο 1	4	3	3	2,5	3,125
Βάζο 2	5	3	2	1,5	2,875
Βάζο 3	2	2	2,5	2,5	2,25
Βάζο 4	4	3	2	2	2,75
Βάζο 5	3	3	3	3	3
Μέσο μήκος επέμβασης (mm)					2,8

Πίνακας 13 : Μέτρηση μήκους κάλου της *M. booli* που η φύτευση σε φυτορρυθμιστικές ουσίες 0,2 mg l⁻¹ NAA και 5 mg l⁻¹ BA έγινε στις 31/08/05.

Φύτευση σε MS με 0,2 mg l ⁻¹ NAA / 5 mg l ⁻¹ BA στις 31/08/05 Μέτρηση στις 14/10/05					
	Έκφυτα				Μέσο μήκος κάλου ανά βάζο(mm)
	1ο	2ο	3ο	4ο	
Βάζο 1	8	4	4	4	5
Βάζο 2	8	8	8	4	7
Βάζο 3	3	4	2	2	2,75
Βάζο 4	4	3	3	2	3
Βάζο 5	3	3	2	2	2,5
Μέσο μήκος επέμβασης (mm)					4,05



Σχήμα 6 : Μέσο μήκος κάλου της *M. booli* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0,2 mg l⁻¹ NAA και 2,5 ή 5 mg l⁻¹ BA. Η σύγκριση των μέσων έγινε με το κριτήριο του t Student' s. (n = 15).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6 μετά την εμφύτευση σε 0,2 mg l⁻¹ NAA και 2,5 ή 5 mg l⁻¹ BA το μήκος του κάλου δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά ($P^{ns} = 0,356$, $R^2 = 0,14$).

3.4.3 Μέτρηση βάρους κάλου της *M. booli*

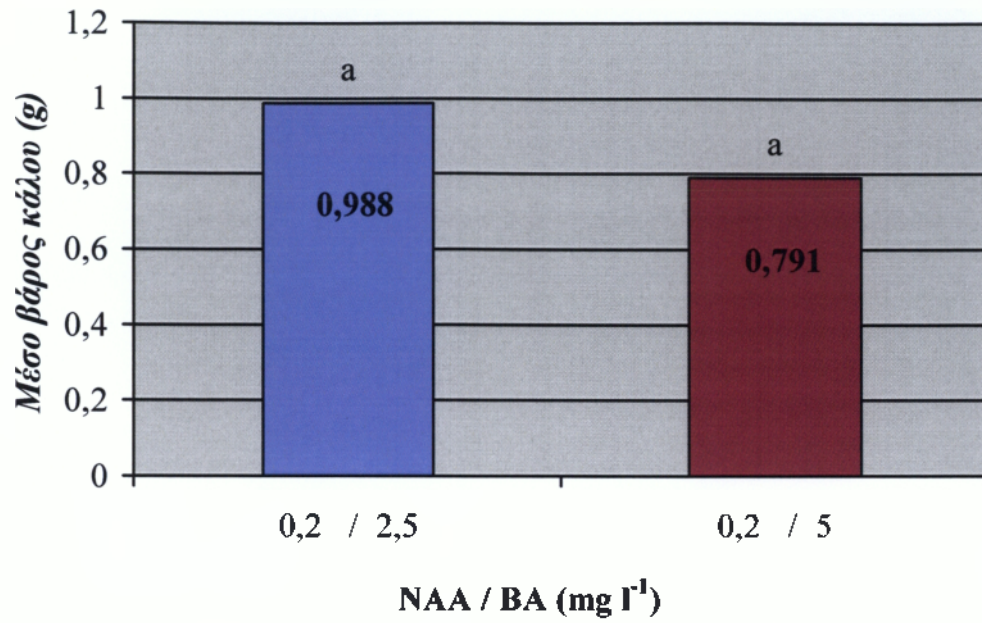
Έκφυτα της *M. booli* μεταφέρθηκαν *in vitro* σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με 0,2 mg l⁻¹ NAA και 2,5 ή 5 mg l⁻¹ BA. Πέντε μήνες μετά υπό ασηπτικές συνθήκες ζυγίστηκαν οι κάλοι και τα αποτελέσματα (Πίνακες 14, 15) δεν είναι στατιστικά σημαντικά, όπως φαίνεται στο Σχήμα 14 δείχνει να υπερτερεί το υπόστρωμα 0,2 mg l⁻¹ NAA και 2,5 mg l⁻¹ BA.

Πίνακας 14 : Μέτρηση βάρους κάλου σε γραμμάρια στις φυτορρυθμιστικές ουσίες 0,2 mg l⁻¹ NAA και 2,5 mg l⁻¹ BA.

Φύτευση στις 31/08/05 Μέτρηση 16/02/06					
	Βάρος κάλου σε g				
	1ο	2ο	3ο	4ο	Μέσο βάρος κάλου ανά βάζο (g)
Βάζο 1	1,02	2,9	1,51	0,01	1,360
Βάζο 2	3,97	1,2	0,5	0,35	1,505
Βάζο 3	0,49	1,14	1,78	-	1,137
Βάζο 4	0,54	0,26	0,19	0,64	0,407
Βάζο 5	0,41	0,58	0,76	0,38	0,532
	Μέσο βάρος (g)				0,988

Πίνακας 13 : Μέτρηση βάρους κάλου σε γραμμάρια στις φυτορρυθμιστικές ουσίες 0,2 mg l⁻¹ NAA και 5 mg l⁻¹ BA.

Φύτευση στις 31/08/05 Μέτρηση 16/02/06					
	Βάρος κάλου σε g				
	1ο	2ο	3ο	4ο	Μέσο βάρος κάλου ανά βάζο (g)
Βάζο 1	1,42	0,69	0,38	0,75	0,810
Βάζο 2	0,42	0,46	0,5	1,1	0,620
Βάζο 3	3,4	0,47	0,35	0,32	1,135
Βάζο 4	0,7	0,37	2,49	0,35	0,977
Βάζο 5	0,38	0,47	0,44	0,36	0,412
	Μέσο βάρος (g)				0,791



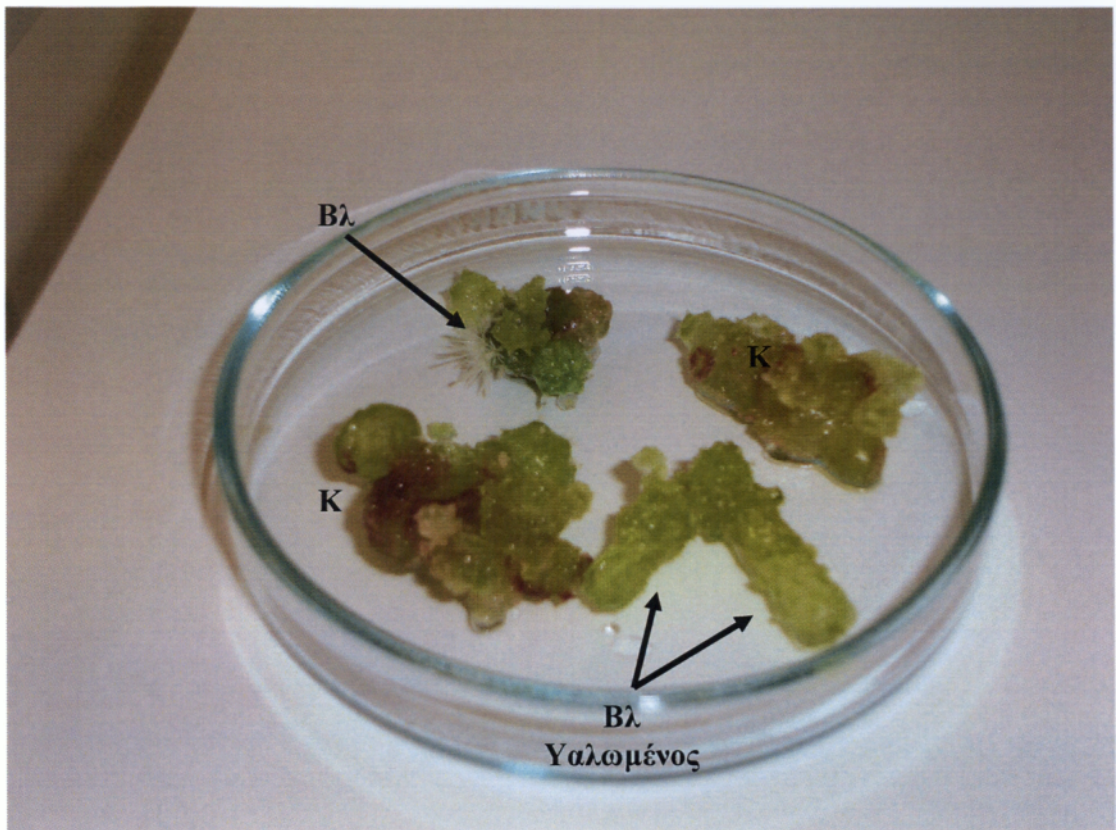
Σχήμα 7 : Μέσο βάρος κάλου της *M. boottii* πέντε μήνες μετά την εγκατάσταση. Η σύγκριση των μέσων έγινε με το κριτήριο του t Student' s. (n = 15).

3.4.4 Μέτρηση αναγεννημένων βλαστών της *M. boottii*

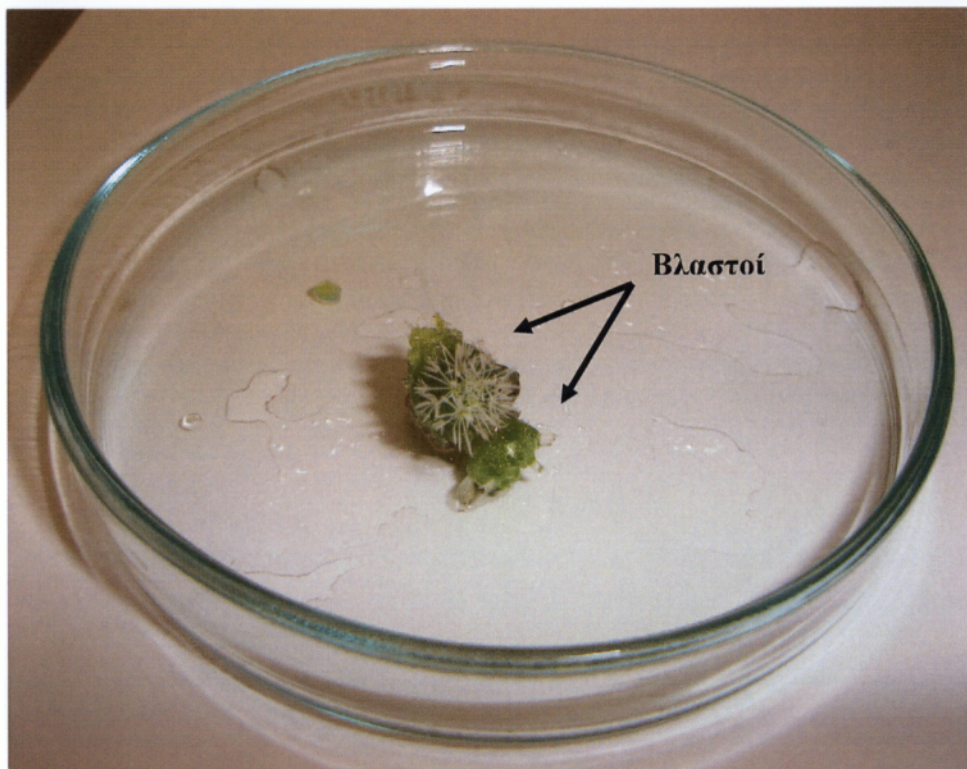
Κάλτοι που παρέμειναν πέντε μήνες στα θρεπτικά υποστρώματα MS με 0,2 mg l⁻¹ NAA και 2,5 ή 5 mg l⁻¹ BA σχημάτισαν βλαστούς. Οι βλαστοί που παρατηρήθηκαν κάποιοι έμοιαζαν με το μητρικό (Εικ. 27) (είχαν σχηματίσει ικανοποιητικό αριθμό αγκαθιών) ενώ κάποιος άλλος ήταν υαλωμένος (Εικ. 26).

Πίνακας 16 : Αριθμός αναγεννημένων βλαστών ανά έκφυτο της *M. boottii* μετά από 5 μήνες (n=20).

Σε MS με 0,2 mg l ⁻¹ NAA και 2,5 mg l ⁻¹ BA Μέτρηση στις 16/02/06				
	Έκφυτα σε κάθε βάζο			
	1ο έκφυτο	2ο έκφυτο	3ο έκφυτο	4ο έκφυτο
Βάζο 1	1	0	0	0
Βάζο 2	0	0	1	0
Βάζο 3	0	0	0	1
Βάζο 4	0	0	0	0
Βάζο 5	0	1	0	0
Σε MS με 0,2 mg l ⁻¹ NAA και 5 mg l ⁻¹ BA Μέτρηση στις 16/02/06				
Βάζο 1	0	0	0	0
Βάζο 2	0	0	1	0
Βάζο 3	0	0	0	0
Βάζο 4	0	1	1	0
Βάζο 5	0	0	0	1



Εικόνα 26 : Κάλος (Κ) και βλαστοί (Βλ = βλαστός, Βλ Υαλωμένος = Βλαστός υαλωμένος) της *M. booli*.



Εικόνα 27 : Βλαστοί *M. booli*.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 *In vitro* βλάστηση σπόρου της *M. boolii*.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η *in vitro* βλάστηση των σπόρων της *M. boolii* που πραγματοποιήθηκε σε στερεό υπόστρωμα 1/2 MS, με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της χλωρίνης στην *in vitro* βλάστηση.

Στους σπόρους της *M. boolii* που απολυμάνθηκαν με 10% χλωρίνη παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό βλάστησης (70%) και έδειξε να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την επέμβαση με 20% χλωρίνη (40%).

Θα μπορούσαμε να πούμε ότι η απολύμανση με 10% χλωρίνη είναι αρκετή για να μην έχουμε μολύνσεις και φάνηκε να αυξάνει το ποσοστό της βλαστικότητας του σπόρου σε σχέση με 20% χλωρίνη.

4.2 Μέτρηση του μήκους των βλαστών της *M. boolii*

Σπορόφυτα του είδους *M. boolii* μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και μετρήθηκε το μήκος των σποροφύτων ογδόντα και εκατό ημέρες μετά την εγκατάσταση.

Παρατηρήθηκε ότι στις εκατό ημέρες καλλιέργειας το μέσο μήκος των βλαστών διαφέρει στατιστικά σημαντικά απ' ότι στις ογδόντα ημέρες.

4.3 Μέτρηση του μήκους και του βάρους κάλου της *M. boolii*

Σπορόφυτα της *M. boolii* χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα και τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0,2/2,5 και 0,2/5 mg l⁻¹ NAA/BA. Τόσο το μήκος όσο και το βάρος του κάλου που σχηματίστηκε δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά στις δυο επεμβάσεις.

Όμως, το υπόστρωμα με 0,2/5 mg l⁻¹ NAA/BA φάνηκε να ξεχωρίζει ως προς το μήκος του κάλου ενώ το υπόστρωμα με 0,2/2,5 mg l⁻¹ NAA/BA φάνηκε να ξεχωρίζει ως προς το βάρος του κάλου.

4.4 Παραγωγή βλαστών

Πέντε μήνες μετά την παραμονή στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα, από τον παραγόμενο κάλο σχηματίστηκαν βλαστοί της *M. boolii*. Παρατηρήθηκαν βλαστοί που έμοιαζαν με το μητρικό φυτό, τόσο στο σχήμα όσο και στον αριθμό των αγκαθιών και βλαστοί που παρουσίασαν μεγάλο ποσοστό υάλωσης.

4.5 Επίλογος

Για την *M. boolii* ο πολλαπλασιασμός *in vitro* μπορεί να είναι ένας από τους τρόπους πολλαπλασιασμού για παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών. Δεδομένου όμως, ότι η *M. boolii* μπορεί να πολλαπλασιαστεί πολύ εύκολα με σπόρο πιθανόν να μη συνίσταται ο *in vitro* πολλαπλασιασμός για μικρή παραγωγή. Θα μπορούσε όμως να είναι ένα παράδειγμα για άλλα παχύφυτα που είναι σπάνια και κινδυνεύουν να εξαφανιστούν.

Το πρωτόκολλο για την *in vitro* βλάστηση σπόρων της *M. boolii* που επιτεύχθηκε στην παρούσα εργασία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για σπόρους κάκτων που είναι λίγοι σε αριθμό ή όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος δεν ευνοούν τη σπορά σε έδαφος.

Ενδεικτικό της νέας τάσης της επιστημονικής έρευνας και της αγοράς, σχετικά με το παραπάνω φυτό είναι η δημιουργία ενός σύγχρονου και κατάλληλα εξοπλισμένου εργαστηρίου ιστοκαλλιέργειας στην Ολλανδία, που ειδικεύεται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό παχυφύτων κυρίως σπάνιων ειδών (Διαδίκτυο 1).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ANDERSON, E. (2001). The cactus family. Timber Press, Portland.
- AULT, J.R. & BLACKMON, W.J. (1985). *In vitro* propagation of selected native cacti species. HortScience, 20: 541. Abs. 143.
- AULT, J.R. & BLACKMON, W.J. (1987). *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). HortScience, 22: 126-127.
- BAYLEY, A.D. & VAN STADEN, J. (1987). Propagation of *Gasteria croucheri* Bak. from shoot producing callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 11: 227-231.
- BACKEBERG C. (1932). Following in Dr. Rose's footsteps. Cactus Succulents J. 130-132.
- BENTZ, S.E. & PARLIMAN, B.J. (1985). Sources of explants for *in vitro* propagation of *Yucca glauca* Nutt. HortScience, 20: 540. Abs. 137.
- BENTZ, S.E. & PARLIMAN, B.J. & ACKERMAN, W.L. (1988). Factors affecting *in vitro* propagation of *Yucca glauca*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 14: 111-120.
- BEYL, C.A. & SHARMA, G.C. (1983). Picloram induced somatic embryogenesis in *Gasteria* and *Haworthia*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2: 123-132.
- BEYL, C.A. & WANG, W.C. & SHARMA, G.C. (1981). Tissue culture of *Gasteria* and *Haworthia*. HortScience, 16: 406. Abs. 51.
- BIGOT, C. (1976). Bourgeonnement *in vitro* a partir d' epiderme separe de feuille de *Bryophyllum daigremontianum* (Crassulaceae). Can. J. Bot. 54: 852-867.
- BINH, L.T., MUOI, L.T., OANH, H.T.K., THANG, T.D. & PHONG, D.T. (1990). Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 23: 67-70.
- BLAZICH, T.A. & NOVITZKY, R.T. (1984). *In vitro* propagation of *Sansevieria trifasciata*. HortScience, 19: 122-123.
- CHU, I.Y.E. (1986). The application of tissue culture to plant improvement and propagation in the ornamental horticulture industry. In Zimmerman, R. H. et al. (eds), Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Martinus Nijhoff. Pp. 15-33.

- CLAYTON, P.W., HUBSTENBERGER, J.F., PHILLIPS, G.C. & BUTLER-NANCE, S. (1990). Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 115: 337-343.
- COLOMAS, J. (1971). Obtention de cultures de tissus a partir de fragments de tiges de *Pachycereus pringlei* (S. Wats.) Br. et R. In C. R Acad. Sc. Paris Serie D 272: 1380-1382.
- CORNEANU, M.M., CORNEANU, G.C. & COPACESCU, S.N. (1990). Plant regeneration with somaclonal mvariability from *Mammillaria sp.* callus. Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Abs. No. A3-66, p. 99.
- DABEKAUSSEN, M.A.A., PIERIK, R.L.M., VAN DER LAKEN, J.D. & HOEK SPAANS, J. (1991). Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. Scientia Horticultura, 46: 283-294.
- DANIANO, C., CURIR, P., COSMI, T. & RUFFONI, B. (1986). Tissue culture of *Mammillaria spp.* HortScience, 21: 804. Abs. 1058.
- DELGADILLO-REYNOSO, M.G. (1990). A note on *in vitro* propagation of threatened and important economic cacti from Mexico. In Botanic Gardens Microprop. Newsletter 1: 22.
- ESCOBAR, A., H.A., VILLALOBOS A., V.M. & VILLEGASM., A. (1986). *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 7: 269-277.
- EVANS, N.E. (1990). Micropropagation: axillary bud multiplication. In Pollard, J.M.(eds), Methods in Molecular Biology, Vol. 6, Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. Pp. 93-103.
- FAY, M.F. & GRATTON (1992). Tissue culture of cacti and other Succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew Bradley 10: 33-48.
- FAY, M.F. & MUIR, H.J. (1990). The role of micropropagation in the conservation of European plants. Hernandez Bermejo et al., (1990), q.v.
- FAY, M.F. & REDWOOD, G.N. (1990). Micropropagation of rare species at the Royal Botanic Gardens, Kew. In Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Abs. A3-50, p.95.

- FIGUERA D. , CARLOS ANTONIO, DELA ROSA CARRILLO, MA DE LOURDES, PEREZ – MOLPHE – BALCH, EUGENIO.(2005). *IN VITRO* PROPAGATION OF EIGHT SPECIES OR SUBSPECIES OF *TURBINICARPUS* (CACTACEAE). *In vitro Cellular and Development Biology – Plant*. vol. 41(4): 540-545.
- GAISER, M.S., LAZARTE, J.E. & BROWN, O.R. (1981). *In vitro* propagation of *Epiphyllum crysocardium*. *HortScience*, 16: 425. Abs.194.
- GIUSTI, P., VITTI, D., FIOCCHETTI, F., COLLA, G., SACCARDO, F., TUCCI, M. (2002). *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* vol. 95: 319-332.
- GRATTON, J. & FAY, M.F. (1990). V' getative propagation of cacti and other succulents *in vitro*. In Pollard, J. W. & Walker, J. M. (eds), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 6. *Plant Cell and Tissue Culture Humana*, Press. Pp. 219-225.
- GUNTER, A. 1984. *Cacti*. London Press.
- HAVEL, L. & KOLAR, Z. (1983) Microexplant isolation from Cactaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 2: 349-353.
- JOHNSON, J.L. & EMINO, E.R. (1977a). Tissue culture propagation of *Opuntia polyacantha* as influenced by plant growth regulators. *HortScience*, 12: 239.
- JOHNSON, J.L. & EMINO, E.R. (1997b). Tissue culture propagation of *Mammillaria elongata* as influenced plant by growth regulators. *HortScience*, 12: 394.
- JOHNSON, J.L. & EMINO, E.R. (1979a). *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. *HortScience*, 14: 605-606.
- JOHNSON, J.L. & EMINO, E.R. (1979b). Tissue culture propagation of cacti. *Cact. Succ. J. (US)*, 51: 275-277.
- JONES, D. & TISSERAT, B. (1990). Clonal propagation of orchids. In Pollard, J.W. & Walker, J.M. (eds), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 6, *Plant Cell and Tissue Culture*. Humana Press. Pp. 181-191.
- KING, M. (1957). Studies on the tissue culture of cacti. *Cact. Succ. J. (US)*, 29: 102-104.
- KEEN B.,(1990). *CACTI AND SUCCULENTS*. Step by step to growing success. The Crowood Press Ltd, Wiltsire
- KOLAR, Z., BARTEK, J. & VYSKOT, B. (1976). Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* Craig through tissue cultures. *Experientia*, 32: 668-669.
- KRULIK, G. (1980). Tissue culture of succulent plants. *Nat. Cact. Succ. J.*,35: 14-17.

- LAZARTE, J.E., GAISER, M.S. & BROWN, O.R. (1982). *In vitro* propagation of *Epiphyllum chrysocardium*. HortScience, 17: 84.
- LASSOCINSKI W. (1985). Chlorophyll deficient cacti in tissue cultures. Acta horticulturae, Vol. No. 167, 287-293.
- MANTELL S.H. , J.A. MATTHEWS and R.A. McKEE, (1985). Principles of plant Biotechnology. An introduction genetic engineering in plants. BLACKWELL SCIENTIFIC PUB. OXFORD
- MARTINEZ-VASQUEZ, O. & RUBLIO, A. (1989). *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada. J. Hort. Sci., 64: 99-105.
- MARIN-HERNADEZ, T., J.MARQUEZ-GUZMAN, B. RODRIQUEZ-GARAY & A. RUBLUO.(1998). Early stages in the development of somatic embryogenesis in *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada (Cactaceae) a severely endangered species. *Pyton*. 62(1/2): 181-186.
- MAUSETH, J.D. (1977). Cactus tissue culture: a potential method of propagation. Cact. Succ. J. (US), 49: 80-81.
- MAUSETH, J.D. (1979). A new method for propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. Cact. Succ. J. (US), 51: 186-187.
- MAUSETH, J.D. (1984). Effect of growth rate, morphogenic activity, and phylogeny on shoot apical ultrastructure in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). Amer. J. Bot., 71: 1283-1292.
- MAUSETH, J.D. & HALPERIN, W. (1975). Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). Am. J. Bot., 62: 869-877.
- MEHRA, P.N. & CHEEMA, G.S.(1980). *In vitro* studies on *Mammillaria elongata* var. *tenuis* . Phytomorphology, 30: 241-249.
- MEHRA, A. & MEHRA, P.N. (1972). Differentiation in callus cultures of *Mesembryanthemum floribundum*. Phytomorphology, 22: 171-176.
- MINOCHA, S.C. & MEHRA, P.N. (1974). Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). Amer. J. Bot., 61: 168-173.
- ΜΠΑΛΩΤΗΣ, Γ.,(1997). Πολλαπλασιασμός *in vitro* των παχύφυτων *Mammillaria elongate* και *Haworthia fasciata*. ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ.
- MURALIDHAR, C.E. & MEHTA, A. R. (1986). Plant regeneration from bulb segments of Tuberosa. HortScience, 21: 859-860. Abs. 1456.

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- NAVA-ESPARZA, V.C. & YANEZ L., L. (1984). Propagacion de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. *Cact. Succ. Mex.*, 29: 3-7.
- PARE, P.W., MISCHKE, C.F., EDWARDS, R., DIXON, R.A., NORMAN, H.A., MABRY, T.J. (1992). Induction of phenylpropanoid pathway enzymes in elicitor-treated cultures of *Cephalocereus senilis*. *Phytochemistry*, 31: 149-153.
- PHILLIPS, G.C. & COLLINS, G.B. (1979). *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science*, 19: 59-64.
- PILBEAM, J. (1999). *Mammillaria*, The Cactus file handbook. , Nuffield Press, Pp 57.
- PIZZETTI MARIELLA (1985). In Simon & Schuster guide to Cacti and Succulents.
- RODRIGUEZ-GARAY, B. & A. RUBLUO.(1992). *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Bodecker). *Cact. Succ.J.(U.S.)* 64: 116-119.
- ROWLEY G. (1978). In "THE ILLUSTRATED ENCYCLOPEDIA OF SUCCULENTS". Ed. Gordon Rowley p.178-179, 201- 202.
- RUBLUO, A., ARRIAGA, E., ARIAS, S., PEREZ AMADOR, C., AMOR, D., SANTOS, E., ROJAS, E. & ELIZALDE, P. (1990). Tissue culture applications in the endangered *Mammillaria huitzipochtii*, (Cactaceae). Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Abs. No. A3-191, p.130.
- SACHAR, R.C. & IYER, R.D. (1959). Effect of auxin, kinetin and gibberellin on the placental tissue of *Opuntia dillenii* Haw. Cultured *in vitro*. *Phytomorphology*, 9: 1-3.
- SALISBURY F. & ROSS C. (1991). In "Plant physiology". Fourth edition, 242-244.
- SAVAGE A. D., JOHN KING, OLUF L. GAMBORG (1979). Recovery of pantothenate auxotroph a cell suspension culture of *Datyna innoxia* Mill. *Plant Science Letters*, 16, 367-376.
- SEENI, S. & GNANAM, A. (1980). Photosynthesis in cell suspension cultures of CAM plant *Chamaecereus silvestrii* (Cactaceae). *Physiol. Plant.*, 49: 465-472.
- SIMERDA, B. (1990). Effective ways of propagating endangered cacti. *Brit. Cact. Succ. J.*, 8: 9-12.
- STARLING, R.J. (1985). *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cact. Succ. J.(US)*, 57: 114-115.

- STARLING, R.J. & DODDS, J.H. (1983). Tissue-culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya*, 1: 84-90.
- STARLING, R.J. & HUTSON, R. (1984). Sterile culture of succulent plants. *Brit. Cact. Succ. J.*, 2: 69-70.
- STEINHART, C.E. (1962). Tissue culture of a cactus. *Science*, 137: 545-546.
- STUPPY, W. & NAGL, W. (1992). Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw . (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya*, 10: 85-88.
- TISSERAT, B., E.B. ESAN & T. MURASHIGE.(1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1:1-78.
- VYSKOT, B. & JARA, Z. (1984). Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *J. Hort. Sci.*, 59: 449-452.
- Διαδίκτυο 1 : www.succulent-tissue-culture.com
- Διαδίκτυο 2 : www.google.com