

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
Εργαστήριο Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ
ΚΑΝΟΝΙΚΩΝ & CRISTATA ΜΟΡΦΩΝ ΠΑΧΥΦΥΤΩΝ
IN VIVO & IN VITRO**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
Γεωργίου Ν. Μπαλιωτή

ΑΘΗΝΑ 2010

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ**

**Διερεύνηση της συμπεριφοράς κανονικών & *cristata* μορφών
παχυφύτων *in vivo* & *in vitro***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Γεωργίου Ν. Μπαλωτή

ΓΕΩΠΟΝΟΥ MSc.

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μαρία Παπαφωτίου
Αν. Καθηγήτρια Γ.Π.Α.**

ΑΘΗΝΑ 2010

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ**

**Διερεύνηση της συμπεριφοράς κανονικών & *cristata* μορφών
παχυφύτων *in vivo* & *in vitro***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Γεωργίου Ν. Μπαλωτή
ΓΕΩΠΟΝΟΥ MSc.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Παπαφωτίου Μαρία, Αναπλ. Καθηγήτρια Γ.Π.Α. (Επιβλέπουσα)

Χρονόπουλος Ιωάννης, Ομότιμος Καθηγητής Γ.Π.Α. (Μέλος)

Κατσιώτης Ανδρέας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α. (Μέλος)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παπαφωτίου Μαρία, Αναπλ. Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Χρονόπουλος Ιωάννης, Ομότιμος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Κατσιώτης Ανδρέας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Οικονόμου Αθανάσιος, Καθηγητής Α.Π.Θ.

Μπεμπέλη Πηνελόπη, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Κίντζιος Σπυρίδων, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Νεκτάριος Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2010

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. και αποτελεί αποτέλεσμα πολύχρονων προσπαθειών με στόχο την, όσο το δυνατόν, πληρέστερη και ευρύτερη προσέγγιση του φαινομένου της δεσμίωσης στα παχύφυτα. Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμότατα την Επιβλέπουσα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Μαρία Παπαφωτίου για την ανάθεση, την καθοδήγηση, τη συμπαράσταση και τις πολύτιμες υποδείξεις της, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλα τα στάδια αυτής της μελέτης. Στο σημείο αυτό θα ήθελα ιδιαίτερα να την ευχαριστήσω για το ήθος και τη στάση ζωής που επιδεικνύει και που αποτελεί παράδειγμα για όλους εμάς τους νεότερους φοιτητές της.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού του Γ.Π.Α. κ. Ανδρέα Κατσιώτη για την πολύτιμη συμβολή του στην εκπόνηση της επιγενετική ανάλυση του φαινομένου της δεσμίωσης καθώς και στην διόρθωση της παρούσας διατριβής, ως μέλους της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη συμβολή του στην εκπόνηση, καθώς και για τη συμμετοχή του στη διόρθωση της παρούσας διατριβής τον Ομότιμο Καθηγητή του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. κ. Ιωάννη Χρονόπουλο, ως μέλους της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω για το χρόνο που αφιέρωσαν για την εξέταση της διατριβής τους κ. Αθ. Οικονόμου, Καθηγητή του Εργαστηρίου Ανθοκομίας του Τμήματος Γεωπονίας του Α.Π.Θ., τη κα Π. Μπεμπέλη Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού του Γ.Π.Α., τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σπ. Κίντζιο του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Γ.Π.Α. και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Π. Νεκτάριο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. ως μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που μου προσέφεραν τη βοήθειά τους στην εκτέλεση των πειραμάτων μου, ιδιαίτέρως δε τους φίλους, Γεωπόνους κ. Διονυσία Λύρα, Επαμεινώνδα Κάρτσωνα, Κωνσταντίνο Μπερτσουκλή, Αιμιλία - Ελένη Νικολοπούλου, Νικόλαο Νικολουδάκη και Κωνσταντίνα Ρεκούμη.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στη γυναίκα μου Μαρία για την αμέριστη συμπαράστασή της και υπομονή που έδειξε όλα αυτά τα χρόνια καθώς και τους γονείς μου Νίκο και Μαρία για τη στήριξη που μου παρείχαν και σε αυτήν την προσπάθειά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	1
Abstract.....	3
Σκοπός της Έρευνας	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Παχύφυτα	9
1.1.1 Η γεωγραφική εξάπλωση παχυφύτων	9
1.1.1.1 Η γεωγραφική εξάπλωση της οικογένειας Cactaceae.	9
1.1.1.2 Η γεωγραφική εξάπλωση των παχυφύτων της οικογένειας Euphorbiaceae... ..	11
1.2 Χαρακτηριστικά παχυφύτων	12
1.3 Το φαινόμενο της Δεσμίωσης	17
1.3.1 Ορισμός του φαινομένου	17
1.3.2 Μορφολογία της δεσμίωσης	19
1.3.2.1 Εμφάνιση της δεσμίωσης στα φυτά	19
1.3.2.2 Μορφολογική – ανατομική ταξινόμηση της δεσμίωσης	20
1.3.3 Γενετική της δεσμίωσης	25
1.3.4 Φυσιολογία της δεσμίωσης	25
1.3.4.1 Φυσικοί, περιβαλλοντικοί παράγοντες	26
1.3.4.2 Τεχνητές επεμβάσεις	27
1.3.5 Ανάλυση της δεσμίωσης ως φαινόμενο ανώμαλης ανάπτυξης	32
1.3.5.1 Αλλαγές του σχήματος και του προτύπου ανάπτυξης του κορυφαίου μεριστώματος	33
1.3.5.2 Θεωρητική προσέγγιση της δεσμίωσης	34
1.3.6 Δεσμίωση και παχύφυτα	37
1.3.6.1 Το εξωτερικό ερέθισμα ως αίτιο δεσμίωσης στους κάκτους	37
1.3.6.2 Η κληρονομικότητα της δεσμίωσης στους κάκτους	38
1.3.6.3 Η ασθένεια ως πιθανή αιτία δεσμίωσης στους κάκτους	39

2.	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΝΟΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΔΕΣΜΙΩΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΠΑΧΥΦΥΤΩΝ ΣΕ <i>IN VITRO</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	41
2.1	Εισαγωγή	43
2.1.1	Πολλαπλασιασμός με σπόρο (εγγενής πολλαπλασιασμός)	44
2.1.2	Αγενής πολλαπλασιασμός παχυφύτων	46
2.1.2.1	Πολλαπλασιασμός με παραφυάδες	46
2.1.2.2	Πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα	46
2.1.2.3	Πολλαπλασιασμός με εμβολιασμό	47
2.1.2.4	<i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός παχυφύτων	48
2.1.2.4.1	Σύγκριση <i>in vitro</i> και <i>ex vitro</i> παχυφύτων	50
2.2	Υλικά και Μέθοδοι	61
2.2.1	Φυτικό Υλικό	61
2.2.1.1	<i>Mammillaria elongata</i>	62
2.2.1.2	<i>Euphorbia pugniformis</i> (Boissier)	64
2.2.1.3	<i>Euphorbia lactea</i> Hocw.	67
2.2.1.3.1	Διαφορές στη σύνθεση του χυμού της κανονικής και της <i>cristata</i> μορφής ...	68
2.2.2	Υποστρώματα καλλιέργειας	70
2.2.2.1	Υποστρώματα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	70
2.2.2.1.1	Υλικά θρεπτικών υποστρωμάτων <i>in vitro</i> καλλιέργειας	72
2.2.2.1.2	Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων	72
2.2.2.1.3	Παρασκευή “stock” διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών και άλλων ουσιών	73
2.2.2.2	Υποστρώματα <i>ex vitro</i> καλλιέργειας	74
2.2.3	Μέθοδοι απολύμανσης, αποστείρωσης και εγκατάστασης φυτικού υλικού...	74
2.2.3.1	Απολύμανση-εγκατάσταση εκφύτων	74
2.2.3.2	Υλικά απολύμανσης ιστών	74
2.2.3.3	Αποστείρωση εργαλείων και υλικών	75
2.2.4	Έκφυτα	75
2.2.5	Συνθήκες καλλιέργειας	78
2.2.5.1	Συνθήκες <i>ex vitro</i> καλλιέργειας	78
2.2.5.2	Συνθήκες επώασης	78
2.2.5.3	Δοχεία <i>in vitro</i> καλλιέργειας	78
2.2.5.4	Μεταφύτευση φυταρίων	78

2.2.6	Πειραματικό Σχέδιο - Εκτίμηση αποτελεσμάτων – Στατιστική επεξεργασία .	79
2.2.7	Προσδιορισμός του χρώματος φυταρίων της <i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i> “ <i>Grey Ghost</i> ”	80
2.3	Αποτελέσματα διερεύνησης της συμπεριφοράς κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων κατά τον <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμό	82
2.3.1	<i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός της <i>Mammillaria elongata</i>	82
2.3.1.1	Επίδραση χαμηλότερων συγκεντρώσεων NAA κατά τον <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμό της <i>Mammillaria elongata</i>	86
2.3.1.2	Υποκαλλιέργεια κάλου της <i>Mammillaria elongata</i>	87
2.3.2	<i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός της <i>Mammillaria elongata</i> var. <i>cristata</i>	89
2.3.2.1	Επίδραση του BA στην καλλιέργεια κάλου της <i>Mammillaria elongata</i> var. <i>cristata</i>	102
2.3.3	<i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός της <i>Euphorbia pugniformis</i>	107
2.3.4	<i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός της <i>Euphorbia pugniformis</i> var. <i>cristata</i>	111
2.3.4.1	Επίδραση υψηλότερων συγκεντρώσεων BA κατά τον <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμό της <i>Euphorbia pugniformis</i> var. <i>cristata</i>	119
2.3.4.2	Επίδραση της εποχής λήψης εκφύτων της <i>Euphorbia pugniformis</i> var. <i>cristata</i> στον <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμό	122
2.3.5	<i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός της <i>E. lactea</i>	127
2.3.5.1	Επίδραση των κυτοκινινών Zeatin και TDZ στον <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμό της <i>Euphorbia lactea</i>	130
2.3.6	<i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός της <i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i>	131
2.3.6.1	<i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός της <i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i> “ <i>Grey Ghost</i> ”	137
2.3.6.2	Επίδραση των υποκαλιεργειών στην διατήρηση της δεσμιωμένης μορφής της <i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i> “ <i>Grey Ghost</i> ”	138
2.3.6.3	Διατήρηση του ετεροχρωματισμού της <i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i> “ <i>Grey Ghost</i> ” στις υποκαλλιέργειες	140
2.3.7	Επίδραση του TIBA στην <i>in vitro</i> καλλιέργεια κανονικών και δεσμιωμένων μορφών των παχυφύτων <i>Mammillaria elongata</i> , <i>Euphorbia pugniformis</i> ...	141
2.3.7.1	Επίδραση του TIBA στην έκπτυξη και ανάπτυξη σποροφύτων της <i>Mammillaria elongata</i>	142

2.3.7.2	Επίδραση του TIBA στην υποκαλλιέργεια βλαστών της <i>Euphorbia pugniformis</i> var. <i>cristata</i>	142
2.3.8	Επίδραση του αζώτου στη διατήρηση της <i>cristata</i> μορφής στον <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμό	143
2.3.8.1	Επίδραση του αζώτου στη διατήρηση της <i>cristata</i> μορφής στην <i>Euphorbia pugniformis</i> var. <i>cristata</i>	144
2.3.8.2	Επίδραση του αζώτου στη διατήρηση της <i>cristata</i> μορφής στην <i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i>	145
2.3.9	Ριζοβολία	146
2.3.9.1	<i>In vitro</i> ριζοβολία βλαστών των κανονικών και δεσμιωμένων μορφών των παχυφύτων <i>Mammillaria elongata</i> , <i>Euphorbia pugniformis</i> , <i>Euphorbia lactea</i>	147
2.3.9.2	Εγκλιματισμός φυταρίων των τυπικών και δεσμιωμένων μορφών των παχυφύτων <i>Mammillaria elongata</i> , <i>Euphorbia pugniformis</i> , <i>Euphorbia lactea</i>	148
2.4	Συζήτηση – Συμπεράσματα	150
3.	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΝΟΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΔΕΣΜΙΩΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΠΑΧΥΦΥΤΩΝ ΣΕ <i>IN VIVO</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	157
3.1	Εισαγωγή	159
3.1.1	Επίδραση της αζωτούχου λιπάνσεως στην δημιουργία και διατήρηση δεσμιωμένων μορφών	159
3.1.2	Επίδραση εξωγενών φυτορρυθμιστικών ουσιών στην ανάπτυξη κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων	160
3.1.3	Επίδραση της <i>ex vitro</i> καλλιέργειας αναγεννημένων <i>in vitro</i> φυταρίων δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων	161
3.2.	Υλικά και Μέθοδοι	161
3.2.1	Φυτικό υλικό	161
3.2.2	Υποστρώματα <i>in vivo</i> καλλιέργειας παχυφύτων	161
3.2.3	Αζωτούχος λίπανση	162
3.2.4	Εφαρμογή φυτορρυθμιστικών ουσιών σε δεσμιωμένες και κανονικές μορφές παχυφύτων	163

3.2.5	Καταγραφή - Εκτίμηση αποτελεσμάτων	164
3.2.5.1	Πειράματα αζωτούχου λίπανσης	164
3.2.5.2	Πειράματα με φυτορυθμιστικές ουσίες.....	165
3.2.5.3	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	165
3.3	Αποτελέσματα διερεύνησης της συμπεριφοράς κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων σε <i>in vivo</i> καλλιέργεια.....	167
3.3.1	Επίδραση του αζώτου στη διατήρηση της <i>cristata</i> μορφής στην <i>Euphorbia rugniformis</i> var. <i>cristata</i> σε <i>in vivo</i> καλλιέργεια	167
3.3.2	Επίδραση εξωγενών φυτορυθμιστικών ουσιών ΤΙΒΑ, 2,4-D και ΒΑ στην ανάπτυξη κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων	179
3.3.2.1	Επίδραση του ΤΙΒΑ σε βλαστούς <i>Mammillaria elongata</i>	179
3.3.2.2	Επίδραση του 2,4-D στην ανάπτυξη της <i>Mammillaria elongata</i>	181
3.3.2.3	Επίδραση των ΤΙΒΑ, 2,4-D και ΒΑ στην ανάπτυξη της κανονικής και δεσμιωμένης μορφής της <i>Euphorbia rugniformis</i>	182
3.3.3	<i>In vivo</i> καλλιέργεια αναγεννημένων <i>in vitro</i> φυταρίων δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων	185
3.4	Συζήτηση – Συμπεράσματα	189
4.	ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΔΕΣΜΙΩΣΗΣ ΣΤΑ ΠΑΧΥΦΥΤΑ	193
4.1	Εισαγωγή	195
4.1.1	Μεθυλίωση – Ορισμός	196
4.1.2	Η μεθυλίωση στα φυτά	197
4.1.2.1	Εμφάνιση	197
4.1.2.2	Μέθοδοι προσδιορισμού μεθυλίωσης	198
4.1.2.3	Μηχανισμοί μεθυλίωσης – απομεθυλίωσης	200
4.1.2.4	Μεθυλίωση και έκφραση γονιδίων	203
4.1.2.5	Η μεθυλίωση ως παράγοντας γενετικής, επιγενετικής και σωμακλωνικής παραλλακτικότητας	205
4.1.3	Η επίδραση της 5-Azacytidine στη μεθυλίωση	207
4.1.3.1	Εισαγωγή	207
4.1.3.2	Ο ρόλος της 5-Azacytidine κατά την <i>in vitro</i> καλλιέργεια	208
4.1.4	Ρετρομεταθετά στοιχεία	209

4.1.4.1	Εισαγωγή	209
4.1.4.2	Κατηγορίες και δομή των ρετρομεταθετών στοιχείων	210
4.1.4.3	Ετερογένεια στην αλληλουχία της ομάδας των <i>Ty1</i> -copια ρετρομεταθετών στοιχείων	214
4.1.4.4	Ρύθμιση της έκφρασης και της μετάθεσης της ομάδας των <i>Ty1</i> -copια ρετρομεταθετών στοιχείων	215
4.1.4.5	Ο ρόλος των ρετρομεταθετών στοιχείων στην εξέλιξη των γονιδιωμάτων ...	216
4.1.4.6	Άλλοι πιθανοί ρόλοι των ρετρομεταθετών στοιχείων	218
4.2	Υλικά και Μέθοδοι	219
4.2.1	Φυτικό υλικό	219
4.2.2	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	219
4.2.3	Απομόνωση ολικού RNA και παραγωγή συμπληρωματικού DNA (cDNA) ..	220
4.2.4	Μέτρηση συγκέντρωσης DNA και RNA	223
4.2.5	Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων	224
4.2.6	Μέθοδοι προσδιορισμού της μεθυλίωσης με ένζυμα περιορισμού	224
4.2.6.1	Διαδικασία Πέπης	225
4.2.6.2	Έλεγχος πολυμορφισμού με RAPD εκκινητές	226
4.2.6.3	Εκτίμηση αποτελεσμάτων	226
4.2.7	Προσδιορισμός της μεθυλίωσης με τη χρήση της 5-Azacytidine κατά την <i>in</i> <i>vitro</i> καλλιέργεια της <i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i> “Grey Ghost”	227
4.2.7.1	Υλικά θρεπτικού υποστρώματος	227
4.2.7.2	Θρεπτικό υπόστρωμα – έκφυτα – εγκατάσταση εκφύτων	227
4.2.7.3	Εκτίμηση αποτελεσμάτων – Στατιστική επεξεργασία	228
4.2.8	Μέθοδοι προσδιορισμού <i>Ty1</i> -copια ρετρομεταθετών στοιχείων	228
4.2.8.1	Απομόνωση ρετρομεταθετών στοιχείων τύπου <i>Ty1</i> -copια	228
4.2.8.2	Κλωνοποίηση <i>Ty1</i> -copια ρετρομεταθετών στοιχείων σε πλασμιδιακό φορέα .	229
4.2.8.3	Εύρεση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε κλώνους <i>Ty1</i> -copια ρετρομεταθετών στοιχείων	233
4.2.9	Προσδιορισμός αριθμού αντιγράφων των <i>Ty1</i> -copια ρετρομεταθετών στοιχείων με τη μέθοδο της ημιποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (semi-quantitative PCR)	233
4.3	Αποτελέσματα επιγενετικής ανάλυσης του φαινομένου της δεσμίωσης στα παχύφυτα.....	235

4.3.1	Μέτρηση συγκέντρωσης DNA και RNA	235
4.3.2	Ύπαρξη Μεθυλίωσης στο γονιδίωμα της <i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i> “ <i>Grey Ghost</i> ”	237
4.3.3	Επίδραση της 5-Azacytidine στο υπόστρωμα καλλιέργειας εκφύτων της <i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i> “ <i>Grey Ghost</i> ”	241
4.3.4	Απομόνωση και χαρακτηρισμός <i>TyI</i> -copια ρετρομεταθετών στοιχείων στην <i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i> “ <i>Grey Ghost</i> ”	245
4.3.4.1	Απομόνωση <i>TyI</i> -copια ρετρομεταθετών στοιχείων με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και κλωνοποίηση των προϊόντων	245
4.3.4.2	Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε κλώνο <i>TyI</i> -copια ρετρομεταθετών στοιχείων	246
4.3.4.3	Προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων <i>TyI</i> -copια ρετρομεταθετών στοιχείων σε δεσμιωμένη και κανονική μορφή της <i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i> “ <i>Grey Ghost</i> ”	247
4.3.4.4	Προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων <i>TyI</i> -copια ρετρομεταθετών στοιχείων σε δεσμιωμένη και κανονική μορφή των παχυφύτων <i>Euphorbia</i> <i>pugniformis</i> και της <i>Mammillaria elongata</i>	249
4.4	Συζήτηση – Συμπεράσματα	253
5.	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	257
5.1	Διερεύνηση των κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων κατά τον <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμό	259
5.2	Διερεύνηση της συμπεριφοράς κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων σε <i>in vivo</i> καλλιέργεια	260
5.3	Επιγενετική ανάλυση του φαινομένου της δεσμίωσης στα παχύφυτα	261
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	265

Περίληψη

Στην παρούσα Διατριβή μελετήθηκε η συμπεριφορά *cristata* και κανονικών μορφών των παχυφύτων *Mammillaria elongata*, *Euphorbia pugniformis* και *E. lactea* σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες με στόχο τη διερεύνηση του μικροπολλαπλασιασμού των δύο μορφών, καθώς και του φαινομένου της δεσμίωσης.

Σε *in vitro* καλλιέργεια οι κανονικές μορφές των παχυφύτων διαφοροποίησαν βλαστούς σε υψηλότερες συγκεντρώσεις των φυτορρυθμιστικών ουσιών NAA και BA, κυρίως του BA, σε σχέση με τις δεσμωμένες μορφές. Και στις δύο μορφές ο σχηματισμός βλαστών επηρεάστηκε από την εποχή λήψης και το είδος των εκφύτων (περιοχή κορυφαίου μεριστώματος ή κάτω από το κορυφαίο μερίστωμα). Τα έκφυτα κορυφής της *M. elongata* var. *cristata* έδωσαν μεγαλύτερο αριθμό *cristata* βλαστών σε σχέση με έκφυτα κάτω από τη κορυφή. Κάλος που αναπτύχθηκε από έκφυτα δεσμωμένης μορφής έδωσε λιγότερους *cristata* βλαστούς σε σχέση με κανονικούς. Υψηλές συγκεντρώσεις NAA στο υπόστρωμα έδωσαν μόνο κάλο, ενώ η προσθήκη TIBA στο σύνηθες υπόστρωμα βλαστογένεσης δεν επέδρασε στο σχηματισμό *cristata* βλαστών. Υψηλή συγκέντρωση N του υποστρώματος σε *in vitro* καλλιέργεια εκφύτων δεσμωμένων μορφών *Euphorbia pugniformis* και *E. lactea* μείωσε τη βλαστογένεση, ενώ χαμηλή συγκέντρωση προκάλεσε μείωση των σχηματισθέντων κανονικών βλαστών. Δε παρατηρήθηκαν διαφορές στη ριζοβολία δεσμωμένων και κανονικών μικροβλαστών των τριών παχυφύτων, ούτε στον ακόλουθο *ex vitro* εγκλιματισμό των φυταρίων.

Σε *in vivo* καλλιέργεια φυτών *E. pugniformis* var. *cristata* η προσθήκη αζώτου στο υπόστρωμα προκάλεσε αύξηση του όγκου, του νεπού βάρους, του ξηρού βάρους και του εμβαδού του φυτού. Παρόμοια αύξηση φαινομενικά δεν παρατηρήθηκε στο ύψος και στο πλάτος του φυτού λόγω του βάρους των βλαστών που προκάλεσαν κάμψη τους. Υπήρξε ένδειξη αύξησης του αριθμού των κανονικών βλαστών που εκπύχθηκαν κατά τη διάρκεια των έξι μηνών καλλιέργειας, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Καμία από τις φυτορρυθμιστικές ουσίες που εφαρμόστηκαν, 2,4-D, TIBA, BA, σε κανονικές μορφές των παχυφύτων δε προκάλεσε τη δημιουργία *cristata* βλαστών. Παρατηρήθηκαν όμως, αλλαγές στη φυλλοταξία και από τις τρεις φυτορρυθμιστικές ουσίες, καθώς και πρόκληση δεσμωμένων εναέριων ριζών μέσω κάλου από το 2,4-D.

Η παρατήρηση για πέντε χρόνια των επιτυχώς εγκλιματισμένων σε *ex vitro* συνθήκες φυταρίων που παράχθηκαν *in vitro* από δεσμιωμένες μορφές, έδειξε ότι οι δεσμιωμένες μορφές σχημάτισαν και κανονικούς βλαστούς, ενώ οι κανονικοί βλαστοί που προήλθαν από δεσμιωμένες μορφές μετατράπηκαν σε *cristata* βλαστούς.

Κατά την επιγενετική ανάλυση του φαινομένου της δεσμίωσης παρατηρήθηκε μεθυλίωση και στις δύο μορφές (*cristata* και κανονική) της *E. lactea* var. *cristata*, ενώ και η χρήση της 5-Azacytidine σε *in vitro* καλλιέργεια έδειξε ότι η δεσμιωμένη μορφή είναι μεθυλιωμένη. Παρατηρήθηκε η ύπαρξη ρετρομεταθετών στοιχείων και στις δύο μορφές και των τριών παχυφύτων, ενώ στις δεσμιωμένες μορφές ο αριθμός των ρετρομεταθετών στοιχείων ήταν μεγαλύτερος.

ABSTRACT

In the present Thesis the behavior of *cristata* and normal forms of the succulent species *Mammillaria elongata*, *Euphorbia pugniformis* and *E. lactea* was investigated aiming to the micropropagation of these forms and the understanding of the phenomenon of fasciation.

In *in vitro* cultures, explants from normal forms produced shoots when higher concentrations of NAA and BA - mainly BA - were used, compared with explants from *cristata* forms. Shoot formation was also affected by the season of the year and the explant origination (meristematic area of the shoot tip, below the shoot tip area). Explants of *M. elongata* var. *cristata* excised from the apical meristem area provided higher number of *cristata* shoots, compared to those derived from below the meristematic zone. Callus derived from *cristata* forms produced less *cristata* shoots than normal shoots. High NAA concentrations in the medium induced callus only, while the addition of TIBA to the blastogenesis medium did not affect the production of *cristata* shoots.

High concentrations of N in the *in vitro* culture medium of *Euphorbia pugniformis* and *E. lactea* reduced proliferation of shoots, while the lowest concentration used resulted to lower production of normal shoots. No differences were observed in rooting of normal and *cristata* microshoots of the three succulent species neither on the *ex vitro* acclimatization of the microplants.

When *E. pugniformis* var. *cristata* plants were cultivated *in vivo*, the addition of N in the substrate resulted to an augmentation of the volume, and an increase of the fresh and dry weight along with an increase of the plant total area. There was no apparent increase of the plant height and width, due to the increased weight of the shoots that led to a bending. Though an increase of the normal shoots was observed the effect was not statistically significant. None of the PGRs (2,4-D, TIBA, BA) applied to normal shoots resulted to *cristata* shoot production, while changes were observed in the phyllotaxy. 2,4-D induced though *cristata* aerial root production through callus.

Successfully acclimatized plants from *in vitro* culture were observed for five years. It was recorded that *cristata* forms provided also normal shoots, while the normal shoots – having been derived from *cristata* forms- turned back to *cristata* shoots.

The epigenetic analysis of the fasciation phenomenon, showed the existence of methylation in both forms - *cristata* and normal - of *E. lactea* var. *cristata*. The addition of 5-

Azacytidine in the *in vitro* culture medium showed also methylation of the *cristata* form. There were also observed retrotransposons in both forms of the three succulent species, while their number was higher in the *cristata* forms.

Σκοπός της Έρευνας

Η απόκλιση από τη φυσιολογική στην ανάπτυξη των ζωντανών οργανισμών προκαλούσε πάντα το ανθρώπινο ενδιαφέρον. Από το 1832 ο Isidore Geoffroy άρχισε να μελετά επιστημονικά μορφολογικές παρεκκλίσεις προσδίδοντάς τους την λέξη Τερατολογία. Αρχικά, οι δυσμορφίες των ζώων προσέλκυαν περισσότερο το ενδιαφέρον των ανθρώπων δημιουργώντας διάφορους μύθους, θρύλους και δεισιδαιμονίες (Rowley, 2006).

Η τερατολογία στο φυτικό βασίλειο αναπτύχθηκε ως επιστημονικό πεδίο τον 19^ο αιώνα με σημαντικές δημοσιεύσεις όπως “Vegetable Teratology” του Masters (1869) και η “Principles of plant Teratology” του Wordsell (1915-1916).

Από το μεγάλο εύρος τερατολογικών φαινομένων στα φυτά το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δεσμίωση (Fasciation) που εμφανίζεται σε ένα εύρος οικογενειών των ανώτερων φυτών και έχει μεγάλο οικονομικό – ανθοκομικό ενδιαφέρον στα παχύφυτα. Το ενδιαφέρον του φαινομένου αυτού εκφράστηκε στα δύο βιβλία ειδικά για παχύφυτα με πρώτο το “The Enigma of the Origin of Monstrosity and Cristation in Succulent Plant” Wolthuys (1945) και το “Teratopia: The World of Cristate and Variegated Succulents” του Rowley (2006). Το φαινόμενο παρουσιάζεται ως αλλαγή της σημειακής ανάπτυξης του κορυφαίου μεριστώματος σε γραμμική ανάπτυξη σχηματίζοντας λοφία (crest) ή μάζες όπως ο εγκέφαλος. Μέχρι σήμερα έχουν γίνει προσπάθειες *in vitro* και *in vivo* να εξηγήσουν την αιτία αλλά το φαινόμενο δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητό.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του φαινομένου της δεσμίωσης σε παχύφυτα των οικογενειών Cactaceae και Euphorbiaceae. Χρησιμοποιήθηκαν τα είδη *Mammillaria elongata*, *Euphorbia pugniformis* και *E. lactea* κανονικής και δεσμιωμένης μορφής, είδη με μεγάλο ανθοκομικό ενδιαφέρον και στις δύο μορφές τους. Οι δεσμιωμένες μορφές και των τριών αυτών ειδών δεν ανθίζουν και κατά συνέπεια δε σποροπαράγουν, έτσι σε επιχειρηματική κλίμακα ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται με μοσχεύματα. Η ανάπτυξη μεθόδων μικροπολλαπλασιασμού των μορφών αυτών θα διευκόλυνε τον πολλαπλασιασμό τους. Διερευνήθηκε η συμπεριφορά δεσμιωμένων μορφών σε σύγκριση με κανονικές μορφές σε *in vitro* καλλιέργεια, με ταυτόχρονη ανάπτυξη μεθόδων μικροπολλαπλασιασμού των τριών ειδών παχυφύτων στην κανονική και δεσμιωμένη μορφή, η επίδραση των κυτοκινινών του θρεπτικού υποστρώματος και της εποχής λήψης των εκφύτων στην έκφραση του φαινομένου, η επίδραση του αζώτου στη διατήρηση της δεσμιωμένης μορφής, καθώς και η

ριζοβολία και ο εγκλιματισμός των φυταρίων και η διατήρηση της δεσμώσης μετά τον εγκλιματισμό σε *ex vitro* συνθήκες. Διερευνήθηκε επίσης συγκριτικά, η συμπεριφορά κανονικών και δεσμιωμένων μορφών *in vivo* υπό την επίδραση αζωτούχου λιπάνσεως και ο ρόλος αυτής στη διατήρηση της δεσμιωμένης μορφής, καθώς και η επίδραση διάφορων εξωγενών φυτορυθμιστικών ουσιών στη δημιουργία δεσμώσης. Τέλος, έγινε προσπάθεια ανάλυσης του φαινομένου επιγενετικά, με τη διερεύνηση ύπαρξης ή μη μεθυλίωσης στο DNA των δεσμιωμένων φυτών, χρησιμοποιώντας ισοσχιζομερή περιοριστικά ένζυμα και την 5-Azacytidine, που είναι παράγοντας απομεθυλίωσης *in vitro*. Επιπροσθέτως, ερευνήθηκε και η παρουσία ρετρομεταθετών στοιχείων στην κανονική και δεσμιωμένη μορφή και των τριών παχυφύτων.



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Παχύφυτα

Η λέξη παχύφυτα είναι ένας γενικός όρος που καλύπτει ένα μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών με χαρακτηριστικά διογκωμένα βλαστικά τμήματα (παχιά σαρκώδη φυτικά όργανα). Ακριβέστερος όρος είναι "χυμόφυτα" (succulents, από τη λατινική λέξη succus που σημαίνει χυμός) (Rowley, 1978). Οι Willert *et al.* (1990) ορίζουν ως παχύφυτο ένα οποιοδήποτε φυτό που διαθέτει τουλάχιστον έναν ιστό που μπορεί να αποθηκεύει νερό, που πέρα από τις άλλες πιθανές λειτουργίες του, παρέχει και εγγυάται μια προσωρινή αποθήκευση νερού, γεγονός που καθιστά το φυτό ανεξάρτητο από τις καιρικές συνθήκες όσον αφορά την έλλειψη νερού. Οικολόγοι, όπως οι Raunkiaer (1907) και Warming (1909), διέκριναν τα παχύφυτα, ως ένα τύπο ξηρόφυτων. Τα παχύφυτα εμφανίζουν πολλές μορφολογικές διαφορές όσον αφορά το σχήμα, τα άνθη ή τους καρπούς τους, έχουν όμως ως κοινό χαρακτηριστικό τη δυνατότητα να αποθηκεύουν στους ειδικά διαμορφωμένους ιστούς τους νερό. Ανάλογα τον ιστό που αποθηκεύεται το νερό διακρίνονται σε παχύφυτα ρίζας, βλαστών και φύλλων.

Για μια πιο εύκολη διάκριση των παχυφύτων από τα άλλα φυτά διάφοροι φυσιολόγοι, με πρώτο τον Delf (1911, 1912), όρισαν τον βαθμό χυμότητας (την ικανότητα αποθήκευσης νερού) ενός φύλλου, ως την περιεκτικότητα του νερού στον κορεσμό προς την επιφάνεια του φύλλου. Σύμφωνα με τους Willert *et al.* (1990) το πρόβλημα στη μέτρηση του Delf ήταν ότι πρώτον δεν ξεχώριζε εάν ήταν παχύφυτο όλο το φυτό ή ένα μέρος του και δεύτερον ότι η μέτρηση αυτή γίνεται στον υδατικό κορεσμό που τα παχύφυτα δεν έχουν. Για το λόγο αυτό πρότειναν τη μεταβλητή που ονόμασαν πηλίκιο χυμότητας (SQ) που ισούται με την ποσότητα νερού που αποθηκεύεται στο φυτό (ή σε κάποιο όργανό του) και είναι η διαφορά νωπού και ξηρού βάρους σε 1 g οργανικής ουσίας.

Οι κάκτοι είναι παχύφυτα (παχύφυτα βλαστού), όμως 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 ακινάρα που σημαίνει φυτό με αιχμηρές ακίδες.

1.1.1 Γεωγραφική εξάπλωση παχυφύτων

1.1.1.1 Η γεωγραφική εξάπλωση της οικογένειας Cactaceae

Οι κάκτοι είναι αυστηρά ιθαγενή φυτά του Νέου Κόσμου (με εξαίρεση το *Rhipsalis baccifera*). Η οικογένεια Cactaceae εμφανίζεται από το 56° 15" βόρειο γεωγραφικό πλάτος (Καναδά) (Moss, 1959, Parfitt, 1991) έως το 50° νότιο γεωγραφικό πλάτος (Αργεντινή, Παταγονία) (Russell and Felker, 1987). Παρουσιάζει ενδιαφέρον, το ότι μέλη της

υποοικογένειας *Opuntioideae* βρίσκονται και στα δυο άκρα του γεωγραφικού πλάτους, η *Opuntia fragilis* στο Βορρά και τα *Maihueniopsis darwinii*, *Maihuenia patagonica* και ο *Pterocactus australis* στο νότο.

Σε μια ακτίνα Ανατολής-Δύσης, οι κάκτοι εμφανίζονται στην ήπειρο της Νότιας Αμερικής, περίπου 1000 Km δυτικά από την δυτική άκρη της ηπείρου έως τα νησιά Γκαλαπάγκος, και ανατολικά περίπου 400 Km έως το βραζιλιάνικο νησί Fernando de Noronha. Οι κάκτοι εμφανίζονται από ακτή σε ακτή στη Βόρεια Αμερική και έως την Καραϊβική. Εμφανίζουν επίσης μια ευρεία υψομετρική διαφορά, με την *Opuntia galapageia* στο επίπεδο της θάλασσας και την *Austrocylindropuntia floccosa* σε περίπου 4.500 m στις Άνδεις (Anderson, 2001).

Διάφορα είδη *Opuntia* και διάφορα γένη της υποοικογένειας *Cactoideae* έχουν εισαχθεί από τους ανθρώπους στη Μεσόγειο, την Αφρική, την Ασία, και την Αυστραλία, όπου έχουν γίνει ιθαγενή. Παρά το ευρύ φάσμα εξάπλωσης της υποοικογένειας *Opuntioideae*, όλοι οι άλλοι κάκτοι είναι είτε στη Νότια είτε τη Βόρεια Αμερική. Τα τροπικά γένη *Harrisia*, *Hylocereus*, *Melocactus*, *Pereskia*, *Pilosocereus* και *Rhipsalis* βρίσκονται και στις δύο περιοχές, ιδιαίτερα σε όλα τα προς τον ισημερινό γεωγραφικά πλάτη. Η *Mammillaria* βρίσκεται επίσης και στις δύο περιοχές (B. και N. Αμερική), καθώς επίσης και στην Καραϊβική (Anderson, 2001).

Υπάρχουν τρία κύρια κέντρα εξάπλωσης κάκτων (Barthlott and Hunt, 1993). Το βόρειο κέντρο είναι στο Μεξικό και τις άνυδρες νοτιοδυτικές Ηνωμένες Πολιτείες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τη φυλή *Cactaeae* και τα κεραιοειδή *Pachycereaeae*. Ένα από τα δύο νότια αμερικανικά κέντρα εξάπλωσης κατανέμεται στις άνυδρες και ημιάνυδρες περιοχές των νοτιοδυτικών Άνδεων, συμπεριλαμβανομένων των περιοχών του Περού, της Βολιβίας, της Χιλής, και της Αργεντινής. Οι αντιπροσωπευτικότερες φυλές σε αυτό το κέντρο είναι η *Browningieae*, *Notocactaeae* και *Trichocereaeae*. Το άλλο κέντρο εξάπλωσης στη νότια Αμερική είναι η ανατολική Βραζιλία, η οποία περιλαμβάνει την άνυδρη βλάστηση (*caatinga*) και την ορεινή, βραχώδη βλάστηση (*campo rupestre*). Η φυλή που αντιπροσωπεύεται σε αυτό το κέντρο είναι η *Cereaeae*.

Οι τροπικοί επιφυτικοί κάκτοι έχουν δύο κέντρα εξάπλωσης. Το πρώτο κέντρο είναι προς τον ατλαντικό, το τροπικό δάσος της νοτιοανατολικής Βραζιλίας, δευτερευόντως στη Βολιβία, με τη μεγάλη εξάπλωση της *Rhipsalideae*. Το δεύτερο είναι τα δάση της Κεντρικής Αμερικής, με χαρακτηριστικό την *Hylocereaeae*.

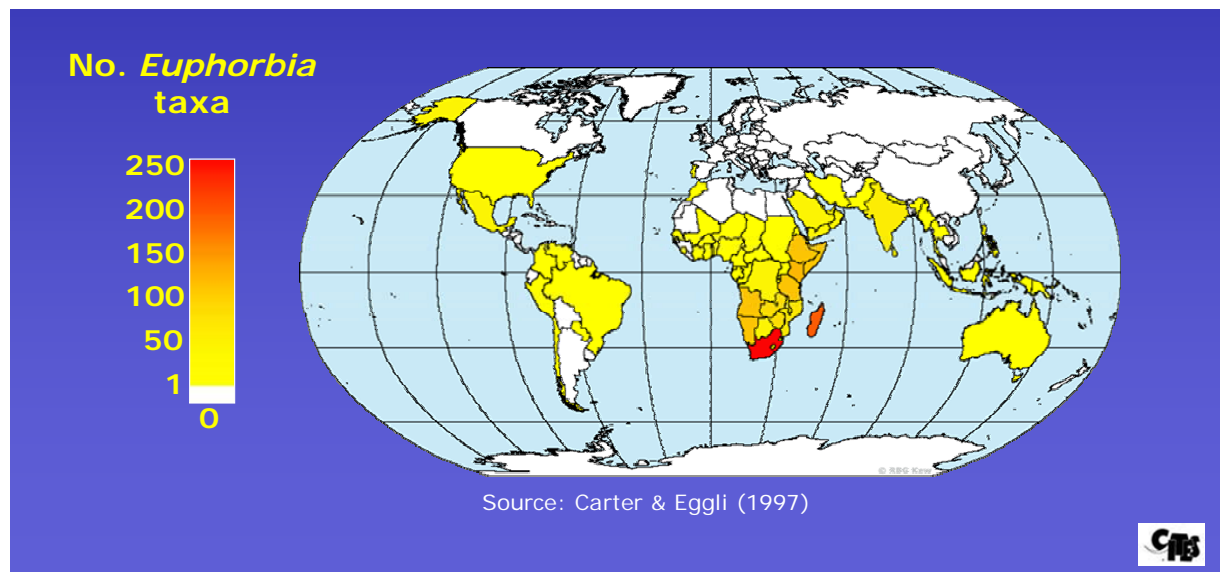
Οι κάκτοι φύονται σε μια ποικιλομορφία βιότοπων, που κυμαίνονται από το τροπικό δάσος ως την εξαιρετικά ξηρή έρημο *Atacama* της Χιλής. Οι περισσότερες περιοχές κάκτων

έχουν τουλάχιστον εποχιακές βροχοπτώσεις, εν τούτοις σε πολλές περιοχές των νοτιοδυτικών Ηνωμένων Πολιτειών και της Baja Καλιφόρνια το ποσό βροχόπτωσης είναι ελάχιστο. Οι παράκτιες έρημοι της Χιλή και του Περού έχουν κάκτους, ιδιαίτερα τις *Coriaria*, *Eriosyce* και *Eulychnia*, οι οποίοι επιζούν με την εποχιακή ομίχλη αποκαλούμενη «camanchaca» στη Χιλή και «garua» στο Περού. Αυτές οι ομίχλες μπορούν να είναι η μόνη διαθέσιμη υγρασία σε αυτούς τους κάκτους, εκτός από τις βροχές που εμφανίζονται κάθε δεκαετία (Anderson, 2001).

1.1.1.2 Η γεωγραφική εξάπλωση των παχύφυτων της οικογένειας Euphorbiaceae

Η Euphorbiaceae ανήκει στις κοσμοπολίτικες οικογένειες και απαντάται παντού εκτός από την Αρκτική. Αν και τα κέντρα εξάπλωσης της οικογένειας θεωρούνται οι τροπικές περιοχές της Ινδο-Μαλαισιανής περιοχής, της Αμερικής και της Αφρικής πολλά είδη απαντώνται και στη Μεσόγειο. Δύο παχύφυτα που αυτοφύονται και στην Ελλάδα είναι τα *Euphorbia dendroides* και *E. characias*.

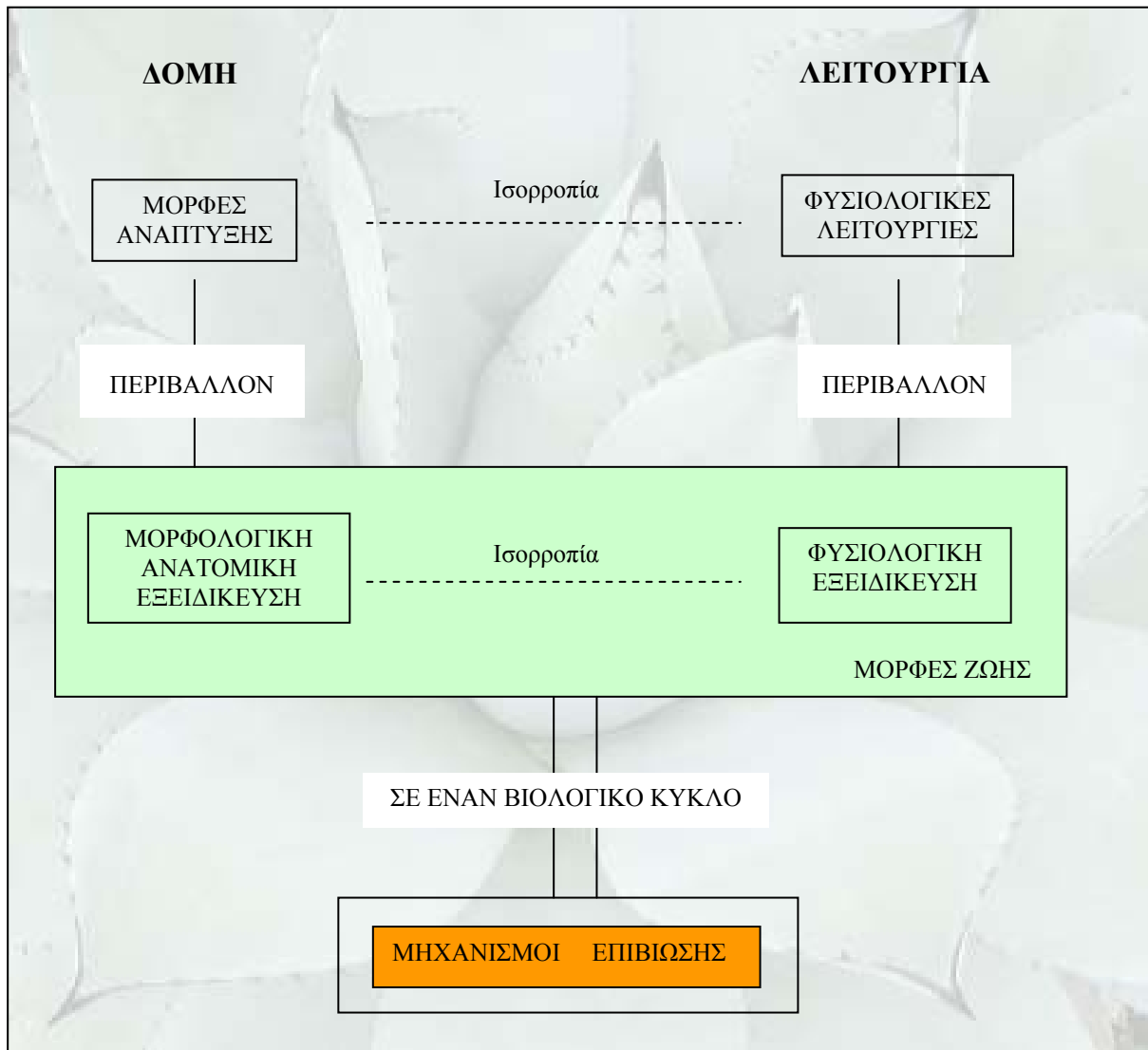
Πρόκειται για μια μεγάλη οικογένεια με πολλά είδη οικονομικής σημασίας (π.χ. *Hevea brassiliensis* - Καουτσουκόδενδρο, *Manihot esculenta* – Μανιόκα και καλλιεργείται για τον εδάδιμο κόνδυλο, *Ricinus communis* – Ρετινολαδιά για το Καστορέλαιο, *Sapium sabiniferum* – για το έλαιο ως Βιοντίζελ). Απαντώνται σε μια ποικιλία βιοτόπων που κυμαίνεται από το τροπικό δάσος ως και την έρημο Ναμίμπια. Οι Carter and Egli (1997) στην προσπάθειά τους να δείξουν το κοσμοπολίτικο χαρακτήρα της οικογένειας, κατέγραψαν την εξάπλωση των παχύφυτων ειδών της (Εικ.1) στο παγκόσμιο χάρτη.



Εικ. 1. Γεωγραφική εξάπλωση παχύφυτων της οικογένειας Euphorbiaceae (Πηγή www.kew.org/conservation/CITES_User_Guides/CITESsucculents).

1.2 Χαρακτηριστικά παχυφύτων

Οι φυσικές περιοχές διαβίωσης των παχυφύτων χαρακτηρίζονται από ξηρές περιόδους διαφόρου διάρκειας. Αποτέλεσμα αυτού είναι η σποραδική τους αύξηση, ενώ η προσαρμογή τους σε αυτές τις συνθήκες είναι το χαρακτηριστικό των φυτών αυτών. Οι Willert *et al.* (1992) πιστεύουν ότι τα φυτά αυτά για να ανταπεξέλθουν στις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος έχουν αναπτύξει μηχανισμούς επιβίωσης τροποποιώντας μορφολογικά χαρακτηριστικά και φυσιολογικές λειτουργίες προσαρμόζοντας τα μεν στις δε (Σχ. 1).



Σχ. 1. Σχηματική απεικόνιση της δομής και της λειτουργίας των φυτών σε σχέση με τους μηχανισμούς επιβίωσης (Πηγή: Willert *et al.*, 1992).

Οι μηχανισμοί επιβίωσης στα παχύφυτα επικεντρώνονται στους διάφορους τρόπους να εξοικονομούν νερό ή να μειώνουν στο ελάχιστο τις απώλειες νερού, μιας και το διαθέσιμο νερό σε αυτές τις περιοχές από βροχοπτώσεις είναι συγκεντρωμένο μέσα σε μια περίοδο

του χρόνου. Η εξοικονόμηση ή ελαχιστοποίηση απωλειών νερού επιτυγχάνεται με το άνοιγμα των στοματίων τη νύχτα, με το να βρίσκονται τα στομάτια βυθισμένα μέσα στην επιδερμίδα, ή με το να καλύπτονται οι ιστοί με τρίχες ή χνούδι. Οι βλαστοί των κάκτων έχουν συνήθως 15 έως 70 στομάτια ανά τετραγωνικό χιλιοστόμετρο, ενώ στα φύλλα των δυκοτυλήδων, υπάρχουν από 100 έως 300 στομάτια ανά τετραγωνικό χιλιοστόμετρο (Conde 1975, Pimienta-Barrios *et al.*, 1993, Nobel, 1994). Τα άνθη τους (Εικ. 2, 3) που είναι πηγή εξόδου μεγάλων ποσοτήτων νερού, ανοίγουν τη νύχτα ή ανοίγουν για μικρό χρονικό διάστημα.



Εικ. 2. Άνθος *Hylocereus undatus* που ανθίζει τη νύχτα (10x10 cm) (Προσωπικό αρχείο).



Εικ. 3. Άνθη *Mammillaria elongata* που ανθίζουν ημέρα (~1x1 cm) (Προσωπικό αρχείο).

Το νερό αποθηκεύεται στα σαρκώδη τμήματα των παχυφύτων, 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 τη θερμοκρασία του 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 σπάζουν όταν έχουν έλλειψη ή περίσσια νερού αντίστοιχα (Gunter, 1984). Ένα αξιοπρόσεκτο χαρακτηριστικό γνώρισμα των κάκτων είναι ότι, όταν είναι πλήρως ενυδατωμένοι, το νερό αποτελεί το 90 - 94% του βλαστού (Gibson and Nobel, 1986). Στη μέγιστη ικανότητα συγκράτησης ύδατος οι πλευρές και τα φυμάτια είναι διογκωμένα. Κατά τη διάρκεια της ξηράς περιόδου, καθώς το νερό χάνεται μέσω της επιφάνειας με την εξατμισοδιαπνοή, οι πλευρές και τα φυμάτια ισιώνουν χάνουν τη διογκωση αυτή διαμορφώνοντας κατά συνέπεια μια «ρυτιδωμένη» εμφάνιση της επιφάνειας. Ως εκ τούτου, σε ένα «αυλακωτό» είδος, ο βλαστός μπορεί να επεκταθεί και να συμπτυχθεί εποχιακά όπως

ένα ακορντεόν (Anderson, 2001). Σε αυτό βοηθάει και η σπειροειδής διάταξη των φυματίων (Gibson and Nobel, 1986).

Μερικοί κάκτοι με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό π.χ. 20% μπορεί να συνεχίσουν να αυξάνονται, ενώ ένα μη παχύφυτο ξηραίνεται συχνά όταν η περιεκτικότητα σε νερό μειωθεί κάτω από 50% (Gibson and Nobel, 1990).

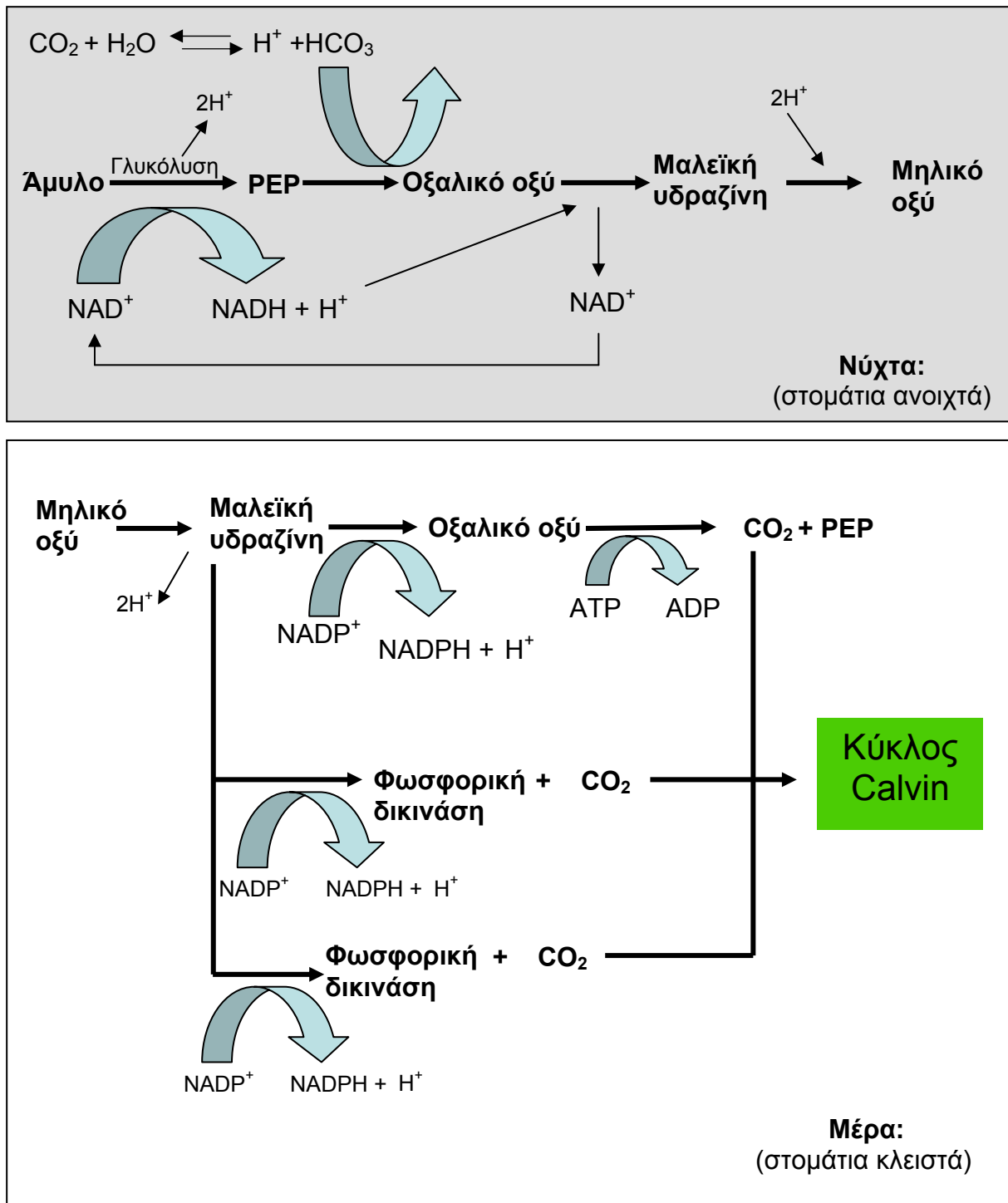
Ένα άλλο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό γνώρισμα των κάκτων είναι η ταχύτητα με την οποία ο βλαστός μπορεί να ανακτήσει το χαμένο νερό μετά από περίοδο ξηρασίας. Η απορρόφηση νερού στο βλαστό του *Ferocactus acanthodes* είναι σημαντική μέσα σε 12 h, και ο βλαστός μπορεί να ενυδατωθεί πλήρως σε μερικές ημέρες. Η πρόσληψη νερού μπορεί ακόμη να εμφανιστεί μετά από μικρές βροχοπτώσεις (7 mm). Στην περίπτωση ενός ενήλικου βαρελοειδούς κάκτου, το ποσό του νερού που απορροφάται σε μερικές ημέρες από ένα πρόσφατα υγρό έδαφος μπορεί να είναι περίπου τα 20 l. Αντίθετα, θα διαρκούσε περίπου 40 ημέρες για να χάσει αυτό το ίδιο ποσό νερού μέσω της εξατμισοδιαπνοής (Gibson and Nobel, 1990).

Η γρήγορη πρόσληψη ύδατος είναι ακόμα πιο ενδιαφέρουσα σε ότι αφορά στο ριζικό σύστημα. Κατά τη διάρκεια των περιόδων ξηρασίας οι επιφανειακές ρίζες έχουν χαρακτηριστικά σχετικά λίγους νέους πλευρικούς κλάδους. Όταν το νερό εφαρμόζεται στις παλαιές ρίζες, οι οφθαλμοί που βρίσκονται στις καταβολές της ρίζας επιμηκύνονται γρήγορα, συχνά χωρίς έντονη κυτταροδιαίρεση, για να διαμορφώσουν τις ρίζες βροχής. Η ύγρανση του χώματος οδηγεί επίσης σε επανυδάτωση των παλαιών ριζών, το οποίο αυξάνει πολύ την αγωγιμότητά τους σε διάστημα λίγων ωρών. Όταν η περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό μειώνεται, οι ρίζες βροχής συρικνώνονται και χάνονται, η αγωγιμότητα των παλαιών ριζών μειώνεται, και για μια ακόμη φορά τα φυτά επιστρέφουν στη χαμηλή αγωγιμότητα του ριζικού συστήματος που είναι κατάλληλο για συνθήκες ξηρασίας. Αυτές οι αλλαγές έχουν ως αποτέλεσμα ότι το πολύτιμο νερό στο βλαστό δεν χάνεται εύκολα πίσω στο έδαφος (Gibson and Nobel, 1990).

Μια θεμελιώδης διαφορά των παχυφύτων από τα άλλα φυτά, που σχετίζεται με την οικονομία του νερού έγκειται στο κύκλο της φωτοσύνθεσης. 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 ανοικτά τη μέρα και κλειστά τη νύχτα, ενώ στα παχύφυτα ισχύει το αντίθετο. Μ' αυτό επιτυγχάνεται η μείωση της απώλειας του νερού

από το φυτό μας και τα στομάτια ανοίγουν όταν οι θερμοκρασίες είναι χαμηλές, σε σχέση με την ημέρα, και υπάρχει αυξημένη υγρασία στο περιβάλλον.

Κατά τη διάρκεια της νύχτας (στομάτια ανοικτά), τα παχύφυτα απορροφούν διοξείδιο του άνθρακα από την ατμόσφαιρα και με τη βοήθεια της PEP καρβοξυλάσης παράγουν οργανικά οξέα (μηλικό οξύ κυρίως) με αποτέλεσμα την απότομη αύξηση της οξύτητας του κυτταρικού χυμού ($\text{pH} = 4$ κατά τη νύχτα). Κατά τη διάρκεια της ημέρας τα στομάτια είναι κλειστά και το μηλικό οξύ που παράχθηκε τη νύχτα διασπάται, με έναν από τους τρεις μηχανισμούς (Σχ. 2) σε CO_2 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 όξινος μεταβολισμός των Κρασσουλασών (*Crassulacean acid metabolism, CAM*), (Salisbury and Ross, 1991).



Σχ. 2. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης του CO₂ από τα CAM φυτά (Πηγή Salisbury and Ross, 1991).

1.3 Το φαινόμενο της Δεσμίωσης

1.3.1 Ορισμός του φαινομένου

Οι παραμορφωμένοι – πεπλατυσμένοι βλαστοί (*fasciated*) που παρατηρούνται σε πολλά φυτά, έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον των ανθρώπων για αιώνες. Τα πιο γνωστά παραδείγματα είναι τα τεράστια φυτά του κάκτου *Carnegia gigantea* στην Αριζόνα και οι αρωκάρειες (*Araucaria cunninghamii*) στην Αυστραλία.

Από το 1590 οι βοτανολόγοι έδωσαν μεγάλη σημασία σε αυτό το φαινόμενο, το οποίο μπορεί να ενταχθεί στις τερατομορφίες (monstrosities). Το 1905 ο De Vries έγραψε τα εξής: «... οι τερατομορφίες θεωρούνται συχνά ως ένα τυχαίο συμβάν και δικαίως από μορφολογικής πλευράς, ενώ από φυσιολογικής πλευράς αποκλείεται το τυχαίο. Μερικά εσωτερικά κληρονομικά χαρακτηριστικά είναι παρόντα αν και συχνά είναι σε λανθάνουσα κατάσταση και οι παρατηρούμενες ανωμαλίες θεωρούνται ως οι αντιδράσεις αυτής της έμφυτης τάσης τους στις εξωτερικές συνθήκες. Οι τερατομορφίες θα πρέπει πάντα να μελετώνται από τη σκοπιά των φυσιολόγων» (Gorter, 1965).

Η λέξη “*fasciation*” που χρησιμοποιείται για τη περιγραφή του φαινομένου προέρχεται από την λατινική λέξη “*fascia*” που σημαίνει δεσμίωση.

Άλλος ένας όρος πέραν της δεσμίωσης που τον βρίσκουμε στη βιβλιογραφία για παχύφυτα είναι και ο όρος *cristata* (Rowley, 2006). Ο Graham (1962) λέει, ότι οποιαδήποτε ανωμαλία στην κορυφή του φυτού χαρακτηρίζεται ως δεσμίωση και αν αυτή ακολουθείται από μια συμμετρική δομή τότε είναι *cristata*.

Μια γενική διάκριση μπορεί να γίνει μεταξύ της κανονικής δεσμίωσης (true fasciation) και της σύμπτυξης. Οι κανονικές δεσμιώσεις χαρακτηρίζονται από μια αλλαγή στη δομή της αναπτυσσόμενης κορυφής, ενώ η σύμπτυξη δημιουργείται από την συνένωση-συγχώνευση δύο ή περισσότερων αναπτυσσόμενων κορυφών.

Σε όλες αυτές τις ανωμαλίες η φυλλοταξία του βλαστού χάνει την κανονικότητά της και στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχει μια αύξηση στον αριθμό των φύλλων (Ottoline and Furner, 1992, Albersten *et al.*, 1983, Gorter, 1965).

Η δεσμίωση εμφανίζεται σε έναν μεγάλο αριθμό φυτών, με εξαίρεση τα αλόφυτα και τα υγρόφυτα, ενώ είναι κοινό φαινόμενο στα μεσόφυτα και ξηρόφυτα. Ωστόσο, δεν φαίνεται να εμφανίζεται στα Κρυπτόγαμα (μη αγγειώδη φυτά) (εξαίρεση το *Fucus* sp.) (Gorter, 1965). Το 1948 ο White έδωσε μια λίστα από 107 οικογένειες αγγειωδών φυτών στις οποίες έχει παρατηρηθεί η δεσμίωση (Πίν. 1). Με βάση τη βιβλιογραφία (White, 1948, Mertens and Burdick, 1954, Karagiozova and Meshineva, 1977, Boke and Ross, 1978, Srivastava and Glock, 1987, Werner, 1988, Varga *et al.*, 1988), αλλά και από προσωπικές παρατηρήσεις, η

δεσμίωση συναντάται τόσο σε ξυλώδη (δένδρα και θάμνους), όσο και σε ποώδη φυτά. Η δεσμίωση εμφανίζεται τόσο στη φύση όσο και σε καλλιεργούμενα φυτά, αν και στα δεύτερα η παρατήρηση είναι πιο εύκολη σε σχέση με τα πρώτα.

Πίν. 1. Οικογένειες φυτών που έχει παρατηρηθεί δεσμίωση (Πηγή White, 1948).

Οικογένειες φυτών			
Acanthaceae	Compositae	Lauraceae	Primulaceae
Aceraceae	Convolvulaceae	Leguminosae	Punicaceae
Azooaceae	Cornaceae	Liliaceae	Ranunculaceae
Amaranthaceae	Crassulaceae	Linaceae	Resedaceae
Amaryllidaceae	Cruciferae	Loranthaceae	Rhamnaceae
Anacardiaceae	Curcubitaceae	Lycopodiaceae	Rosaceae
Anonaceae	Cyatheaceae	Lythraceae	Rubiaceae
Apocynaceae	Cycadaceae	Malvaceae	Rutaceae
Aquifoliaceae	Dioscoreaceae	Meliaceae	Salicaceae
Araceae	Dipsacaceae	Moraceae	Sapindaceae
Araliaceae	Droseraceae	Musaceae	Sapotaceae
Asclepiadaceae	Epacridaceae	Myrtaceae	Saxifragaceae
Berberidaceae	Equisetaceae	Oenotheraceae	Scrophulariaceae
Betulaceae	Ericaceae	Oleaceae	Simarubaceae
Bignoniaceae	Euphorbiaceae	Orchidaceae	Solanaceae
Boraginaceae	Fagaceae	Orobanchaceae	Sterculiaceae
Bromeliaceae	Gentianaceae	Oxalidaceae	Tamaricaceae
Cactaceae	Geraniaceae	Palmae	Taxaceae
Campalunaceae	Gesneraceae	Papaveraceae	Thymelaeaceae
Capparidaceae	Goodeniaceae	Ptyloccaceae	Tiliaceae
Caprifoliaceae	Graminae	Pinacea	Ulmaceae
Caryophyllaceae	Guttiferae	Piperaceae	Umbeliferae
Casuarinaceae	Haemodoraceae	Plantaginaceae	Valerianaceae
Celastraceae	Halorrhagaceae	Plumbaginaceae	Verbenaceae
Chenopodiaceae	Iridaceae	Polemoniaceae	Violaceae
Clethraceae	Juglandaceae	Polygonaceae	Vitaceae
Combretaceae	Labiatae	Polypodiaceae	

1.3.2 Μορφολογία της δεσμίωσης

1.3.2.1 Εμφάνιση της δεσμίωσης στα φυτά

Πρακτικά όλα τα όργανα του φυτού μπορούν να δεσμιωθούν. Μερικές φορές δεσμίωση μπορεί να συμβεί σε ένα μόνο μέρος του φυτού, όπως ένας βραχίονας (βλαστός), ενώ άλλες φορές σε όλο το φυτό. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθούν όλοι οι τύποι της δεσμίωσης πάνω σε ένα φυτό. Σύμφωνα με την Gorter (1965) έχει παρατηρηθεί δεσμίωση σε: ρίζες, εναέριες ρίζες, βλαστοί, υπόγειοι βλαστοί, βραχίονες, φύλλα, ταξιανθίες, άνθη και καρπούς (Πίν. 2, Εικ. 4).

Πίν. 2. Βιβλιογραφικές αναφορές όσον αφορά στη δεσμίωση που παρατηρείται ανά όργανο του φυτού (Πηγή Gorter, 1965).

Δεσμιωμένο τμήμα φυτού	Είδος	Αναφορά
Ρίζες	<i>Cecropia palmata</i> , <i>Vicia faba</i> <i>Tradescantia flumineusis</i>	Lopriore (1904) Lopriore and Buscaglioni (1903) Bloch (1938)
Βλαστοί	<i>Pissum sativum</i> <i>Nicoiana tabacum</i>	Gorter (1965) Gorter (1965)
Υπόγειοι Βλαστοί	<i>Solanum tuberosum</i> <i>Spirea sorbifolia</i> <i>Oxalis crenata</i>	White (1916) De Vries (1909, 1910) Hus (1906)
Ταξιανθίες	<i>Celosia cristata</i>	Gorter (1965)
Άνθη	<i>Pissum umbellatum</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	White (1916) Gorter (1965)
Καρποί	<i>Ananas</i> sp. <i>Morus</i> sp.	White (1916) Gorter (1965)
Φύλλα		Van Stevenick (1956)

Σε μερικές περιπτώσεις ένας βλαστός μπορεί να εμφανίζει τόσο μέρη με δεσμίωση όσο και κανονικά. Ο Kuster (1952) ανέφερε ότι το ανθικό στέλεχος του *Lupinus angustifolia* στα

πρώτα 10 cm ήταν δεσμιωμένο και το υπόλοιπο ήταν κανονικό. Επίσης ο Georgescu (1927) ανέφερε την περίπτωση της *Gaillardia* sp., στην οποία τα πρώτα 30 cm του στελέχους ήταν κανονικά και τα ακόλουθα 12-15 cm ήταν δεσμιωμένα.

1.3.2.2 Μορφολογική – ανατομική ταξινόμηση της δεσμίωσης

Ο Moquin-Tandon (1840) ήταν ο πρώτος ο οποίος διατύπωσε την ιδέα ότι η δεσμίωση οφείλεται στην αλλαγή του σχήματος ενός απλού αναπτυσσόμενου σημείου (κορυφαίο μερίστωμα) (Nestler 1894, Lebedeva, 1963), ενώ ο Linnaeus (1751) είχε υποστηρίξει την θεωρία της συγχώνευσης μερικών αναπτυσσόμενων κορυφών (Zielinski 1945, Vitkovskii 1959, Karagiozova and Meshineva, 1977). Οι Boke and Ross (1978) και οι Nilsson *et al.* (1996) θεωρούν ως αιτία της δεσμίωσης μια ορμονική αστάθεια εντός του φυτού.

Τόσο η αλλαγή του σχήματος της κορυφής, όσο και η συγχώνευση των κορυφών εμφανίζεται εξίσου, γι' αυτό κρίνεται αναγκαίος ο διαχωρισμός τους σε δύο βασικές κατηγορίες, τις πραγματικές δεσμώσεις (true fasciations) και τις συμπτώξεις.

1. Πραγματική Δεσμίωση χαρακτηρίζεται κάθε αλλαγή στο σχήμα ενός κορυφαίου μεριστώματος και εμφανίζεται με τρεις μορφές: σχήμα ταινίας, ακτινωτή δεσμίωση και σχήμα δακτυλιδιού.

A. Ταινιωτή δεσμίωση (band fasciation). Ένας βλαστός (ή ρίζα) με μια κανονική κυλινδρική βάση βαθμιαία διευρύνεται και πλαταίνει (Εικ. 5α, β, γ), με την εγκάρσια περιοχή να επεκτείνεται προς μια κατεύθυνση (η ονομαζόμενη «τοξοειδές επίπεδο» από τον Georgescu, 1927), ενώ η άλλη διάσταση (το «εγκάρσιο επίπεδο» κατά Georgescu, 1927) δεν μεταβάλλεται. Το σημαντικό είναι ότι το κορυφαίο μερίστωμα από αναπτυσσόμενο σημείο μετατρέπεται σε αναπτυσσόμενη ράχη (ridge).



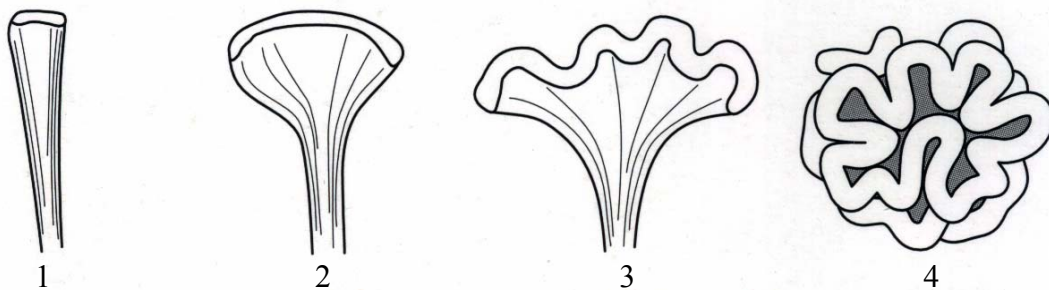
Εικ. 4. Δεσμίωση σε βλαστούς *Forsythia* sp. (α), σε άνθη *Celosia cristata* (β) και *Zerbera* sp. (γ), σε καρπούς *Actinidia deliciosa* (δ) και σε βλαστό του *Echinocereus* sp. (ε), (α, β, γ, Προσωπικό αρχείο, δ και ε Διαδίκτυο)



Εικ. 5. Ταινιωτή δεσμώση σε βλαστό της *Melia azedarach*, Άλσος Κηφισιάς (α), σε βλαστό *Laurus nobilis*, Εθνικός Κήπος (β), σε ανθικό στέλεχος της *Anemone* sp., Γ.Π.Α. (γ). (Προσωπικό αρχείο).

Ο τύπος αυτός της ταινιωτής δεσμώσης δεν παρουσιάζει καμία ειδική ανατομική δομή. Οι διαφορές από τον κανονικό βλαστό οφείλονται μόνο στο ότι η ανάπτυξη παύει να είναι σημειακή και γίνεται γραμμική. Ο λόγος των διάφορων ιστών είναι ο ίδιος, όπως και στον κανονικό βλαστό. Σ' αυτήν την μορφή υπάρχουν περισσότερες ηθμαγγειώδεις δεσμίδες λόγω των περισσότερων φύλλων που σχηματίζονται στους δεσμιωμένους βλαστούς. Η ανατομία των δεσμιωμένων ιστών είναι παρόμοια με αυτή των κανονικών. Η μόνη διαφορά που παρατηρείται είναι στην ποσότητα των ιστών καθώς και στην ανάπτυξή τους ως προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση. Πιέσεις που αναπτύσσονται στις διάφορες ζώνες του μεριστώματος έχουν ένα δευτερογενές αποτέλεσμα στο σχήμα της δεσμώσης. Η αύξηση του πλάτους των κυττάρων της εντεριώνης υποδηλώνει ότι όντως υφίστανται τέτοιες πιέσεις (Gorter, 1965, Boke and Ross, 1978, Sharma and Fletcher, 2002, Traas and Vernoux, 2002) (Σχ. 3).

Β. Ακτινωτή ή αστεροειδής δεσμώση. Σε αυτή τη σπάνια δεσμώση, το κορυφαίο μερίστωμα δεν μοιάζει με «ράχη» αλλά δίνει μια αστεροειδή μορφή του στελέχους σε εγκάρσια τομή, π.χ. *Celosia cristata* (De Vries, 1903). Σήμερα, αυτού του είδους τη δεσμώση πολλοί την συμπεριλαμβάνουν στην ταινιωτή δεσμώση ως μια πιο εκτεταμένη μορφή και την παρομοιάζουν με την όψη εγκεφάλου (brain-like fasciation) (Rowley, 2006) (Σχ. 3).



Σχ. 3. Στάδια ανάπτυξης της ταινιωτής δεσμώσης, 1: αρχικό στάδιο 2 και 3: ενδιάμεσο στάδιο 4: τελικό στάδιο (μορφή εγκεφάλου) (Πηγή: Rowley, 2006)

Γ. Δακτυλιωτή δεσμώση (ring fasciation): χαρακτηρίζεται από ένα ετήσιο αναπτυσσόμενο σημείο. Είναι πολύ σπάνιο στη φύση, αλλά μπορεί να δημιουργηθεί σε μερικά φυτικά μέρη (Εικ. 6 α, β), όπως στην ανθοταξία της τομάτας (Gorter, 1951) και στα φύλλα του

Lupinus sp. (Van Steveninck, 1956), με την εφαρμογή 2,3,5 τριοδοβενζοϊκού οξέος (ΤΙΒΑ) και άλλων φυτορυθμιστικών ουσιών. Φυσική εμφάνιση αυτής της μορφής παρατηρήθηκε από τον De Vries (1891) στη *Peperomia maculosa*.

Στη δακτυλιωτή δεσμίωση οι ιστολογικές σχέσεις είναι διαφορετικές. Υπάρχουν δύο αγγειώδεις δακτύλιοι (ένας εσωτερικός και ένας εξωτερικός, με τον εσωτερικό σε αντίστροφο προσανατολισμό) στον δεσμιωμένο βλαστό σε σχέση με τον έναν που υπάρχει στον κανονικό βλαστό. Σε εγκάρσια τομή φαίνεται ότι στον εσωτερικό δακτύλιο όλοι οι ιστοί είναι αντίστροφα διατεταγμένοι.

Όταν η κορυφή είναι σε στάδιο ανάπτυξης το κορυφαίο μερίστωμα αντιδρά στο ΤΙΒΑ και αρχίζει να φτιάχνει ένα δεύτερο δακτύλιο. Αυτό είναι φανερό σε μια κατά μήκος τομή, όπου τα κύτταρα του παρεγχύματος επιμηκύνονται κατά μία ακτινωτή κατεύθυνση. Αυτό είναι σημαντικό για την εξήγηση της ανάπτυξης της δακτυλιωτής δεσμίωσης (Gorter, 1965).



Εικ. 6. Δακτυλιωτή δεσμίωση
α) σε ανθικό δίσκο της *Bella perennis*, Εθνικός Κήπος,
(Προσωπικό αρχείο)
β) σε βλαστό της *Aylostera heliosa*, πηγή Rowley (2006).

2. Σύμπτυξη χαρακτηρίζεται η συγχώνευση δύο ή περισσότερων αναπτυσσόμενων κορυφών. Οι συμπτώξεις διαφέρουν από τις πραγματικές δεσμίωσεις, αλλά όταν η συγχώνευση εμφανισθεί σε πολύ νεαρό στάδιο η διάκριση μεταξύ σύμπτυξης και πραγματικής δεσμίωσης γίνεται δύσκολη. Οι συμπτώξεις έχουν πάντα σχήμα ταινίας και σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζονται αυλακώσεις κατά μήκος. Σε πολλά φυτά η εμφάνιση της σύμπτυξης οφείλεται στην επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών (Linser *et al.*, 1953).

1.3.3 Γενετική της δεσμίωσης

Είναι αδύνατον να αναπτυχθεί το θέμα της δεσμίωσης χωρίς να γίνει λόγος για κληρονομικότητα, κι όλα αυτά λόγω των κλασσικών πειραμάτων του Mendel και την εκτεταμένη δουλειά του De Vries (1903) που έκανε με δεσμιωμένα φυτά.

Ο πρώτος βρήκε ότι διασταυρώσεις δεσμιωμένων x κανονικών φυτών του μοσχομπίζελου (δεσμίωση στο βλαστό) έδωσαν πλήρη κυριαρχία των κανονικών στην F_1 , ενώ στην F_2 ο λόγος ήταν 3 κανονικά : 1 δεσμιωμένα φυτά.

Ο De Vries κατέληξε ότι η δεσμίωση οφείλεται σε έναν χαρακτήρα “**ever-spotting**” και σημείωσε τη μεγάλη επιρροή των περιβαλλοντικών συνθηκών στην έκφραση αυτού του χαρακτήρα. Βρήκε επίσης ότι το ποσοστό των δεσμιωμένων φυτών μπορεί να αυξηθεί με την επιλογή. Εξαιτίας της εξάρτησης από περιβαλλοντικούς παράγοντες, ειδικά τη θερμοκρασία και τη θρέψη, η δεσμίωση δημιουργεί πολλά προβλήματα στο γενετιστή (Gorter, 1965). Ο φαινότυπος των παραμορφωμένων ιστών δεν είναι σταθερός, αλλά περιπλέκεται από τη διεισδυτικότητα και την εκφραστικότητα των γονιδίων (Albersten *et al.*, 1983). Η συσχέτιση των αλληλομόρφων καθορίζει την ένταση των συμπτωμάτων. Ακόμα υπάρχει η πιθανότητα αλληλεπίδρασης του γονιδιώματος με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όσον αφορά την έκφραση της παραμόρφωσης (Tang and Skorupska, 1997).

Από πειράματα που έγιναν με εμβολιασμό δεσμιωμένων φυτών *Glycine max* σε κανονικά και το αντίστροφο, φάνηκε ότι ο φαινότυπος του φυτού καθορίζεται από το εμβόλιο και ότι δεν υπάρχει μεταφορά κάποιας ουσίας από τον ένα ιστό στον άλλο (Alberten *et al.*, 1983).

1.3.4 Φυσιολογία της δεσμίωσης

Οι διάφοροι παράγοντες οι οποίοι προκαλούν δεσμίωση μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες (Gorter, 1965, Bairathi and Nathawai, 1978, Driss-Ecole, 1981, Behera and Patnaik, 1982, Rance *et al.*, 1982, Albertsen *et al.*, 1983, LaMotte *et al.*, 1988, Binggeli, 1990):

A. φυσικοί, περιβαλλοντικοί παράγοντες

B. τεχνητές επεμβάσεις

1.3.4.1 Φυσικοί, περιβαλλοντικοί παράγοντες

1) Επίθεση εντόμων

Ο Κnox (1908) περιέγραψε πολλούς τρόπους δεσμίωσης σε μερικά είδη *Oenothera*, που προκλήθηκαν από τα ωά της νυχτοπεταλούδας *Mompha* στο κορυφαίο μερίστωμα. Είναι μια περίπτωση πραγματικής δεσμίωσης που οφείλεται στον τραυματισμό του κορυφαίου μεριστώματος με αποτέλεσμα μερικά κύτταρα να ξυλοποιούνται, ενώ άλλα να αναπτύσσονται ανώμαλα. Έντομα, σύμφωνα με την Gorter (1965), που προκαλούν δεσμίωση φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίν. 3. Έντομα και ακάρεα που προκαλούν δεσμίωση στα φυτά

Έντομα	Φυτό	Αναφορά
<i>Aulax hieracii</i> (gall wasp)	<i>Hieracium vulgatum</i>	De Vries (1899)
<i>Cecidomyia erigerpui</i>	<i>Erigon canadense</i>	Hus (1906)
Προνύμφες από Coleoptera	<i>Rhaphanus raphanistrum</i> <i>Picris hieracioides</i>	Molliard (1900)
Άκαρι	Φυτό	Αναφορά
<i>Phytopus</i> sp.	Φυτά της Οικ. Valerianaceae	Peyritsch (1888)

Πηγή Gorter (1965).

2) Πίεση

Έχει παρατηρηθεί ότι πολλές φορές η πίεση μπορεί να προκαλέσει δεσμίωση. Στην *Tecoma radicans* βρέθηκε βλαστός με δεσμίωση λόγω της πρόσφυσής της σε τοίχο (Sorauer, 1921). Επίσης, ο πρώτος βλαστός του σπαραγγιού ο οποίος εξέρχεται από το έδαφος είναι περισσότερο δεσμιωμένος απ' ό,τι αυτοί που αναπτύσσονται αργότερα και μια πιθανή εξήγηση είναι η φυσική πίεση στο κορυφαίο μερίστωμα (Gorter, 1965).

3) Εποχική επιρροή, πυκνότητα σποράς και συνωστισμός σποροφύτων

Ο De Vries (1903) πειραματιζόμενος με τα φυτά *Crepis biennis* και *Taraxacum officinale* απέδειξε ότι ο χρόνος σποράς επηρεάζει τη δεσμίωση με ποσοτικό τρόπο. Σπορά

των παραπάνω φυτών τον Απρίλιο και Μάιο οδήγησε 30-40% δεσμιωμένα φυτά ενώ τον Ιούλιο και Σεπτέμβριο 2 και 0% αντίστοιχα.

Όσον αφορά το συνωστισμό των σποροφύτων, ο Shibuya (1939) βρήκε ότι το λινάρι αναπτυσσόμενο σε αποστάσεις φύτευσης 5x5 cm έδωσε 10.3% δεσμιωμένα φυτά ενώ σε αποστάσεις 10x10, 20x20 και 30x20 cm έδωσε 15.3, 17, 34.8% αντίστοιχα. Σε παρόμοιο αποτέλεσμα είχε καταλήξει και ο De Vries (1903).

4) Μείωση της θερμοκρασίας.

Το ψύχος έχει αναφερθεί ως πιθανή αιτία δεσμίωσης από τον White (1948). Μερικές φορές μια σχετική μείωση της θερμοκρασίας, ακολουθούμενη από μια υψηλότερη, είναι η αιτία της δεσμίωσης. Τα παραπάνω μελετήθηκαν από τον Beyer (1936) στον *Hyacinthus* sp. (var. L'Innocence) και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4. Το αντίθετο αποτέλεσμα μπορεί επίσης να παρατηρηθεί όταν τη θερμοκρασία των 35 °C ακολουθήσει αυτή των 20 °C (καταστέλλεται η δεσμίωση και μειώνεται ο αριθμός των ανθέων ανά φυτό) (Gorter, 1965).

Πίν. 4. Η επίδραση της θερμοκρασίας στη δεσμίωση του *Hyacinthus* sp. (Πηγή Beyer, 1936).

Θερμοκρασία	δεσμιωμένα φυτά (%)	Μ.Ο. αριθμού ανθέων / φυτό
20 °C, συνεχόμενη	63,5	33,9
30 °C, συνεχόμενη	28,4	40,8
20 °C, για 10 ημέρες και μετά 30 °C	70,7	44,8

1.3.4.2 Τεχνητές επεμβάσεις

1) Αποκεφαλισμός σποροφύτων και αποφύλλωση

Αποκεφαλισμός του κύριου στελέχους σποροφύτων είναι μια κλασσική και συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για παραγωγή δεσμιωμένων κορυφαίων βλαστών. Ο Sachs (1859) ήταν ο πρώτος ο οποίος χρησιμοποίησε αυτή τη μέθοδο για να πάρει δεσμιωμένους βλαστούς στο *Phaseolus vulgaris*. Ο ίδιος εξήγησε αυτό το φαινόμενο με τη μετακίνηση μιας θρεπτικής ουσίας στον κορυφαίο βλαστό. Ο Reed (1912) πέτυχε την πρόκληση της δεσμίωσης στο *Phaseolus multiflorus* αφαιρώντας 2.5 cm της κορυφής του νεαρού σποροφύτου, οπότε οι βλαστοί που εκπύχθηκαν από τους μασχαλαίους οφθαλμούς των κοτυληδόνων ήταν σε μεγάλο ποσοστό δεσμιωμένοι.

2) Τραυματισμός της αναπτυσσόμενης κορυφής

Μια σειρά πειραμάτων με τραυματισμούς – κοπή της αναπτυσσόμενης κορυφής δοκιμάστηκαν από τον Loiseau (1954, 1955) με το *Impatiens royle* Walp. Ο τραυματισμός της περιφερειακής ζώνης της αναπτυσσόμενης κορυφής κατέστειλε το σχηματισμό φύλλων με τέτοιο τρόπο ώστε οι σπείρες με τρία φύλλα να αντικατασταθούν με σπείρες των δύο φύλλων στο 20% των περιπτώσεων. Όταν το ακραίο τμήμα του κορυφαίου μεριστώματος τραυματίστηκε ο αριθμός των φύλλων ανά σπείρα αυξήθηκε.

Η επαγωγή δεσμίωσης από τον τραυματισμό της αναπτυσσόμενης κορυφής είναι ο μόνος άμεσος τρόπος για να δείχθει ότι οι δεσμιώσεις προκαλούνται από τον αποχωρισμό του μεριστωματικού ιστού από το κορυφαίο μερίστωμα. Όλα τα είδη των ανωμαλιών μπορούν να αναπτυχθούν. Η πιο ανώμαλη ανάπτυξη προκαλείται όταν η κεντρική ζώνη του κορυφαίου μεριστώματος ακρωτηριασθεί.

3) Ιονίζουσα ακτινοβολία

Δεσμίωση καθώς και παρόμοια φαινόμενα συχνά έχουν παρατηρηθεί μετά από έκθεση των φυτών σε ακτινοβολία που προκαλεί ιονισμό και πιο συγκεκριμένα σε ακτίνες X (Johnson, 1936, Irvine, 1940, Sankewitsch, 1952, Kress, 1953) καθώς και σε ακτίνες γ (D' Amato, 1957 κ.α.).

4) Προσβολή από μύκητες, βακτήρια και ιούς

Δεδομένα που αφορούν στην πειραματική παραγωγή δεσμιωμένων φυτών ύστερα από μόλυνση με μύκητα αναφέρονται από τους Munchi and Patel (1930) για το φυτό *Lathyrus odoratus* (μοσχομπίζελο) από *Fusarium* sp. και *Rhizoctonia* sp.

Το *Agrobacterium tumefaciens* (καρκίνος της ελιάς), καθώς και παρόμοια βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν δεσμίωση. Ο Brown (1927) περιέγραψε δεσμίωση στο φυτό *Lathyrus odoratus* που οφείλετο στο *Agrobacterium tumefaciens*.

Στα πειράματα των Muncie and Patel (1930) η δεσμίωση στο μοσχομπίζελο παρουσιάστηκε όταν μολύνθηκαν με τον μύκητα *Rhizoctonia solani* και 12 μη-παθογόνα βακτήρια.

Η Lacey (1936) απομόνωσε βακτήρια από διάφορα φυτά που όταν μολύνουν σπορόφυτα του *Lathyrus odoratus* του προκαλούν δεσμίωση, αλλά δε μπόρεσε να τα αναγνωρίσει.

Οι Murai *et al.* (1980) βρήκαν ότι το *Corynebacterium fascians* προκαλεί δεσμίωση ή το σύμπτωμα της σκούπας της μάγισσας στα δικότυλα φυτά. Η ασθένεια αυτή

χαρακτηρίζεται από την έλλειψη της κυριαρχίας της κορυφής. Τα συμπτώματα αυτής της ασθένειας μπορούν να προκληθούν με επέμβαση στους σπόρους ή στα σπορόφυτα με κυτοκινίνες, δηλώνοντας ότι μπορεί να οφείλεται αυτή η ασθένεια στην κυτοκινίνη που παράγεται από το βακτήριο.

Ένα άλλο βακτήριο που προκαλεί επίσης δεσμίωση είναι το *Rhodococcus fascians* (Crespi *et al.*, 1992) λόγω ενός γραμμικού πλασμιδίου που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της κυτοκινίνης. Παρόμοια συμπτώματα με αυτά του βακτηρίου παρατηρήθηκαν με την εφαρμογή υψηλών επιπέδων κινετίνης (6-furfuryl amino purine) στο μοσχομπίζελο.

Επίσης, όταν νεαρά φυτά *Lupinus luteus* μολύνθηκαν με τον ιό του μωσαϊκού του μπιζελιού (Troll, 1952) παράχθηκαν φυτά με πλάγια ανάπτυξη και διαφορετικών ειδών ανωμαλίες ανάπτυξης. Οι αφίδες είναι ικανές να μεταδώσουν το μόλυσμα από ιομένα φυτά του *Lupinus angustifolius* σε άλλα φυτά, προκαλώντας συμπτώματα ανώμαλης ανάπτυξης. Σε γενικές γραμμές όμως, ο ρόλος των ιών στην πρόκληση δεσμίωσης δεν έχει μελετηθεί πλήρως. Είναι πιθανόν σε πολλές περιπτώσεις μια μόλυνση από ιό να είναι μια πιθανή αιτία δεσμώσεως.

5) Παράγοντες πολυπλοειδισμού

Η εμφάνιση της δεσμίωσης σε μερικές περιπτώσεις έχει σημειωθεί μετά από επεμβάσεις στα φυτά με ουσίες που οδηγούν σε πολυπλοειδισμό. Στον πίνακα 5 έγινε μια ομαδοποίηση αυτών των παραγόντων από τα πειράματα των Havas and Felfoldy (1947).

Τέτοιοι παράγοντες συχνά προκαλούν μια διόγκωση (φούσκωμα) των οργάνων σαν αποτέλεσμα της ανάπτυξης των κυττάρων κατά την εγκάρσια κατεύθυνση. Τέτοια διόγκωση, που συνοδεύεται από μια διατάραξη της σχετικής ανάπτυξης στο κορυφαίο μερίστωμα, μπορεί να προκαλέσει δεσμίωση (Gorter, 1965).

6) Λίπανση

Καλή ανόργανη λίπανση ή ισχυρή οργανική συντελεί στην εμφάνιση δεσμίωσης. Ο Hus (1908) χρησιμοποίησε την παραπάνω παρατήρηση ως εξής: «κατά το χρόνο εμφάνισης του πρώτου άνθους, τα φυτά διατηρούνται στεγνά, δίνοντας τόσο νερό όσο χρειάζεται για να αποφευχθεί η μάρανση. Η περίοδος άνθησης είναι τώρα πολύ μικρή, γιατί πολλά άνθη δεν αναπτύσσονται. Όταν τα φυτά ποτίζονται άφθονα και δέχονται περιστασιακά λίπανση σε υγρή μορφή, παράγουν αρκετές δεσμώσεις, δεν ισχύει όμως σ' όλα τα φυτά. Σε γενικές γραμμές η μέθοδος αυτή αποδίδει μόνο για φυτά τα οποία είναι σε καλή κατάσταση θρέψης». Μερικά είδη που αντιδρούν σ' αυτή τη μέθοδο είναι τα: *Antirrhinum majus*, *Actinomeris*

squarrosa, *Solanum lycopersicum*, *Oenothera lamarckiana*, *Lythrum virgatum*. Είδη τα οποία δεν αντιδρούν είναι τα: *Solanum pseudocapsicum*, *S. nigrum*, *Capsicum annum* (Gorter, 1965).

Επίσης, έχει βρεθεί ότι η τροφοπενεία Zn προκαλεί διάφορες ανωμαλίες στις βελόνες και δεσμίωση κορυφής σε φυτά *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (Rance *et al.*, 1982).

Πίν. 5. Εμφάνιση δεσμιωμένων φυτών μετά την εφαρμογή ουσιών που προκαλούν πολυπλοειδισμό (Πηγή Havas and Felfoldy, 1947 στη Gorter, 1965).

Φυτό, όργανο επέμβασης	Παράγοντας πολυπλοειδισμού	Αποτέλεσμα (δεσμιωμένα / κανονικά)
Σιτάρι, ρίζες	colchicine	9 στα 4.500
Σιτάρι, ρίζες	phenylurethane	1 στα 400
Σιτάρι, βλαστοί	colchicine	6 στα 4.500
Σιτάρι, βλαστοί	morphine	1 στα 60
Τομάτα, ανθοταξία	acenapthene	περισσότερα άνθη / ταξιανθία
Φασόλι, φύλλα	colchicine	στα 60 (= 44.7%) πολυπλοειδή φυτά τα 10 είχαν δεσμιωμένα φύλλα, καμία δεσμίωση σε αυτά που παρέμειναν διπλοειδή

7) Εφαρμογή φυτορυθμιστικών ουσιών

Δεσμίωσεις έχουν παρατηρηθεί σε πολλά φυτά τα οποία έχουν ψεκαστεί με ρυθμιστές ανάπτυξης, συνήθως ζιζανιοκτόνα όπως το 2,4 D (2,4 Dichloro phenoxyacetic acid) και το 2,4,5 T (2,4,5 Trichloro phenoxyacetic).

Ι) Δεσμίωση που παρατηρήθηκε μετά από ψεκασμό με φυτορυθμιστικές ουσίες

Αναρίθμητα φυτά έχουν παρατηρηθεί να αντιδρούν στην εφαρμογή των ρυθμιστών ανάπτυξης με διατάραξη της ανάπτυξης (malformation, fasciation) (Norman *et al.*, 1950, Zimmerman, 1951, Van Overbeek, 1952, Crafts, 1953).

Οι Linser *et al.* (1953) παρατήρησαν διάφορες ανωμαλίες των φύλλων σε διάφορα φυτά μετά από ψεκασμό με 2,4 D και το 2,5 D με αποτέλεσμα το αναπτυσσόμενο σημείο να περικλείεται από δύο ή περισσότερα συγχωνευμένα φύλλα που παρατηρήθηκε στα: *Capsella bursa-pastoris*, *Anthemis arvensis*, *Euphorbia peplus*, *Melandrium album* κ.α.

Δεσμίωση ριζών, συγκόλλησή τους και ανάπτυξη προς τα πάνω παρατηρήθηκε στο καλαμπόκι μετά από εφαρμογή 2,4 D σε μεγάλες δόσεις (Βυζαντινόπουλος, 1992).

II) Εφαρμογή φυτορυθμιστικών ουσιών για παραγωγή δεσμίωσης

Οι Laibach and Mai (1936) εφάρμοσαν πάστα λανολίνης με την αυξίνη IAA σε κορυφαίους οφθαλμούς των *Coleus thyrsoideus* και *Lycopersicon esculentum*. Αυτή η εφαρμογή προκάλεσε την ανάπτυξη δεσμιωμένων κορυφαίων βλαστών, σημεία ανάπτυξης σε σχήμα δακτυλίου καθώς και φύλλα χωνιώδους σχήματος. Ο Irvine (1940) έδωσε για πρώτη φορά σκίτσα της περιοχής γύρω από την κορυφή δείχνοντας συγχώνευση των καταβολών των φύλλων.

Με την εφαρμογή ορμονών ανάπτυξης (IAA, NAA) στο βλαστό των φυτών, οι Scheibe and Wohrmann-Hillmann (1957) προκάλεσαν δεσμίωση σε φυτά του *Pisum sativum* τα οποία ήταν ακριβή αντίγραφα του γενετικού τύπου “*fasciata*”. Επίσης, το *Pisum sativum* δεν έδειξε να δεσμιώνεται με την εφαρμογή του TIBA, όπως συμβαίνει με άλλα φυτά.

Οι Burton (1947) και Watson (1948) εφάρμοσαν 2-Chlorophenoxyacetic-acid με λανολίνη στην επιφάνεια των φύλλων, καθώς και υδατικά διαλύματα σε ενέσιμη μορφή στο κεντρικό νεύρο των φύλλων νεαρών φυτών φασολιού. Το αποτέλεσμα ήταν τα φύλλα να παραμορφωθούν, τα νεύρα να δεσμιωθούν και τα ελάσματα να συστραφούν.

Οι Price *et al.* (1950) βρήκαν δεσμιωμένους κορυφαίους βλαστούς και φύλλα με κώνους τον επόμενο χρόνο μετά τον ψεκασμό των φύλλων ζαχαρότευτλων με 2,4 D (50 mg Γ⁻¹).

Το TIBA, που θεωρείται ανταγωνιστής της αυξίνης, μπορεί επίσης να προκαλέσει δεσμίωση. Ο Wenck (1952) βρήκε ότι η εφαρμογή του TIBA προκάλεσε την εμφάνιση σύμπτυξης του μίσχου και του ελάσματος του φύλλου στο *Codiaeum variegatum f. interruptum*. Αυτό φαίνεται να οφείλεται σε μια μείωση της κατά μήκος ανάπτυξης του μίσχου και του μεσαίου νεύρου, ενώ το φυλλικό έλασμα αναπτύσσεται κανονικά. Δεσμίωση μετά την εφαρμογή TIBA αναφέρθηκε επίσης από τους Harder and Oppermann (1952) στην *Kalanchoe blossfeldiana*.

Ενώ οι παραπάνω ερευνητές παρατήρησαν τυπικές δεσμώσεις σχήματος ταινίας και κωνοποιήσεις ή παρόμοιες ανωμαλίες, η Gorter (1951) μπόρεσε τεχνητά να δημιουργήσει δεσμίωση τύπου δακτυλιδιού σε ταξιανθίες τομάτας με την επέμβαση του TIBA. Η ουσία εφαρμόστηκε με πάστα λανολίνης στις κοτυληδόνες πολύ νεαρών σποροφύτων. Η ανάπτυξη μειώθηκε και μετά από 4-6 βδομάδες το κορυφαίο μερίστωμα του κυρίως βλαστού μετατράπηκε σε αναπτυσσόμενο δακτυλίδι, το οποίο μετά εξελίχθηκε σε σχήμα χωνιοειδούς

δακτυλιωτού βλαστού. Δοκιμάστηκε επίσης, να γίνει εμβάπτιση των σπόρων σε διαλύματα των φυτορυθμιστικών ουσιών καθώς και έκθεση των φυτών σε ατμούς των για να προκληθεί δεσμίωση (Kendrick and Middleton, 1954).

Δεσμίωση καρπών τομάτας παρατήρησαν οι Asahira *et al.* (1982) αφού ψέκασαν δυο φορές με τους παρεμποδιστές αυξίνης TIBA (10 ppm), NAP (sodium N-1-naphthylphthalamic acid) (10 ppm) και Bendroquinone (2-benzimidoyl-3-hydroxyl-1, 4-naphthoquinone) (50 ppm) στο 2^ο φύλλο φυτών υδροπονικής τομάτας.

Τύποι δεσμίωσης

Όλους τους παραπάνω παράγοντες που πιθανόν να είναι υπεύθυνοι για τη δεσμίωση, ο White (1948) τους ομαδοποίησε στους παρακάτω τύπους:

1. Δεσμίωση που έχει να κάνει με πειράματα βελτίωσης, διασταυρώσεων με τυπικές μορφές κτλ.
2. Δεσμίωση που οφείλεται σε φυσικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, που ο χαρακτήρας δεν αναπαράγεται στις μετέπειτα γενιές.
3. Δεσμίωση που εμφανίζεται τυχαία, ο λόγος πρόκλησής της είναι άγνωστος και μεταδίδεται ο χαρακτήρας αγενώς. Σ' αυτό τον τύπο ανήκουν οι περιπτώσεις των παχυφύτων (White, 1948).
4. Δεσμίωση που μπορεί να προκληθεί τεχνητά και σε μερικές περιπτώσεις μεταδίδεται ο χαρακτήρας αγενώς.
5. Δεσμίωση που δεν μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε μια από τις παραπάνω κατηγορίες και η αιτία πρόκλησης είναι άγνωστη.

1.3.5 Ανάλυση της δεσμίωσης ως φαινόμενο ανώμαλης ανάπτυξης

Ως ένα φαινόμενο ανώμαλης και μη κανονικής ανάπτυξης, η δεσμίωση μπορεί να συγκριθεί με τους όγκους. Στους όγκους η ανώμαλη ανάπτυξη μπορεί να αρχίσει από το κάμβιο ή από οποιοδήποτε άλλο ιστό. Στα δεσμιωμένα φυτά, ωστόσο, η ανώμαλη ανάπτυξη πάντα ξεκινάει από αναπτυσσόμενη κορυφή. Γι' αυτό τα δεσμιωμένα όργανα έχουν μια δομή που διαφέρει ελαφρώς μόνο, από τα αντίστοιχα κανονικά όργανα. Όταν έχουν συντελεστεί οι χαρακτηριστικές αλλαγές της κυτταρικής διαίρεσης στο αναπτυσσόμενο μερίστωμα, τα δεσμιωμένα φυτά χαρακτηρίζονται από μια κανονική αλλά ανώμαλη ανάπτυξη καθώς και μια αύξηση του όγκου τους.

Παλιότερα πίστευαν ότι η αύξηση του όγκου οφείλονταν στην αύξηση της μεταφοράς των θρεπτικών και άλλων ουσιών στο δεσμιωμένο όργανο. Αργότερα, άλλοι ερευνητές

προσπάθησαν να εξηγήσουν τη δεσμίωση με τη βοήθεια των φυτορρυθμιστικών ουσιών. Έτσι, υψηλές συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών προκαλούν την ανάπτυξη των κυττάρων εγκάρσια αντί της κατά μήκος αύξησης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πλάτυνση του κορυφαίου μεριστώματος, μια αλλαγή χαρακτηριστική της δεσμίωσης όπως έχει χαρακτηριστεί από τον Grupe (1956). Όταν TIBA εφαρμόστηκε σε νεαρά σπορόφυτα του *Solanum lycopersicum* (Gorter, 1951) το κορυφαίο μερίστωμα έδειξε μια διατάραξη της κυτταρικής διαίρεσης στα υποδερμικά στρώματα. Τα τοιχώματα αυτών των κυττάρων ήταν ανώμαλα παχυμένα γιατί τα υλικά των κυτταρικών τοιχωμάτων εναποτίθενται χωρίς την επακόλουθη μεγέθυνση των κυττάρων.

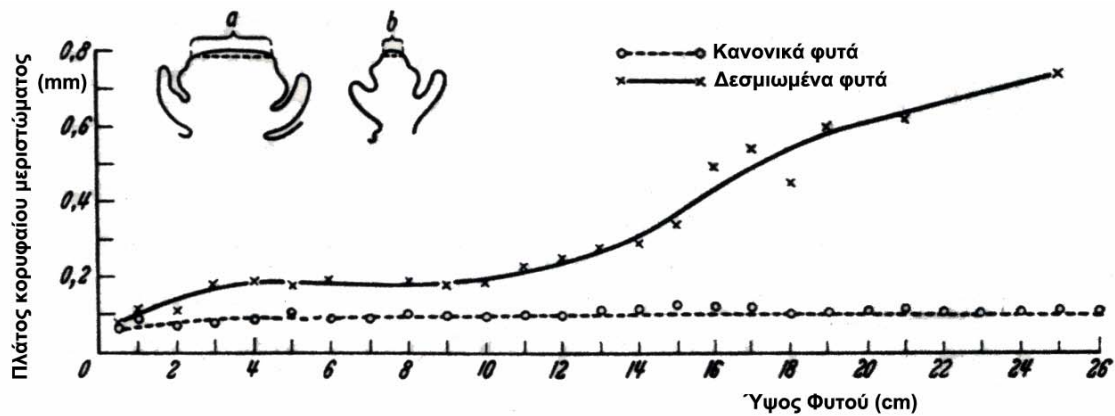
Καθώς στα κανονικά φυτά η εφαρμογή φυτορρυθμιστικών ουσιών προκαλεί ακριβώς την ίδια ανάπτυξη με αυτή των δεσμιωμένων φυτών, ενώ στα δεσμιωμένα δεν προκαλεί καμία αντίδραση, συμπεραίνεται ότι οι ενδογενείς φυτορρυθμιστικές ουσίες παίζουν κάποιο ρόλο στη δεσμίωση.

Οι Varga *et al.* (1988) ενισχύουν την άποψη της Gorter με πειράματα που έκαναν στην *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. Συγκεκριμένα με αύξηση των συγκεντρώσεων IAA και ζεατίνης προκάλεσαν αύξηση της δεσμίωσης. Αργότερα, οι Nehra *et al.* (1992) απέδειξαν ότι η προσθήκη κυτοκινίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα μπορεί να οδηγήσει στη δεσμίωση φύλλων και στολώνων στη φράουλα.

Οι Varga *et al.* (1988) παρατήρησαν ότι το πρώτο σύμπτωμα δεσμίωσης σε *K. blossfeldiana* Poelln. *in vitro* ήταν η αλλαγή στην φυλλοταξία. Η άποψη αυτή ενισχύεται από τους Kuhlemeier and Reinhardt (2001), με πειράματα που έκαναν στο φυτό *Arabidopsis* sp.

1.3.5.1 Αλλαγές του σχήματος και του προτύπου ανάπτυξης του κορυφαίου μεριστώματος

Το σημαντικό σημείο στην ταινιωτή δεσμίωση, είναι οι αλλαγές του σχήματος του κορυφαίου μεριστώματος που από κωνικό μετατρέπεται σε ρυτιδόμορφο ή δακτυλιωτό. Ο Grupe (1956) έβαλε το φαινόμενο κάτω από μια ποσοτική βάση με το να μετρήσει το πλάτος του κορυφαίου μεριστώματος στα κανονικά και δεσμιωμένα φυτά του *Pisum sativum*. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 4. όπου το πλάτος του μεριστώματος στα δεσμιωμένα φυτά αυξάνεται όσο αυξάνεται το ύψος του φυτού. Ένα δεσμιωμένο φυτό ύψους 40 cm έχει ένα κορυφαίο μερίστωμα 10 φορές μεγαλύτερο απ'ότι το κανονικό.



Σχ. 4. Σύγκριση του πλάτους του κορυφαίου μεριστώματος δεσμιωμένων και κανονικών φυτών του *Pisum sativus* (Πηγή Gorter, 1965).

Πέραν από το μέγεθος του κορυφαίου μεριστώματος συμβαίνουν και άλλες αλλαγές στο δεσμιωμένο φυτό όπως αλλαγή στη φυλλοταξία, στον αριθμό των φύλλων και στα επίπεδα της αυξίνης (IAA) του φυτού (Fambrini *et al.*, 2006).

1.3.5.2 Θεωρητική προσέγγιση της δεσμίωσης

Στο δεσμιωμένο κορυφαίο μερίστωμα οι κανονικές αντικλινείς κυτταρικές διαιρέσεις πιθανώς αντικαθιστώνται από περικλινείς. Στη δακτυλιωτή δεσμίωση ένας δακτύλιος μεριστωματικών κυττάρων παίζει το ρόλο κορυφαίων κυττάρων. Όταν αρχίζει η πρώτη μη κανονική κυτταρική διαίρεση, η συσχέτιση στο κορυφαίο μερίστωμα διαταράσσεται. Το σχήμα του κορυφαίου μεριστώματος δεν είναι το ίδιο με αυτό των κανονικών φυτών και αυτή η μη κανονικότητα δηλώνει ότι η συσχέτιση της ανάπτυξης δε διαταράσσεται κατά έναν τυχαίο τρόπο, αλλά επικρατεί μια κανονική ανάπτυξη τουλάχιστον στην αρχή (Gorter, 1965).

Σ' αυτήν την εκτίμηση φτάνει και ο Schoute (1936), ο οποίος έδωσε μια ακόμα πιο ικανοποιητική εξήγηση του τι μπορεί να συμβαίνει στο κορυφαίο μερίστωμα. Το σημείο εκκίνησης του Schoute είναι ότι σε κάθε κορυφαίο μερίστωμα υπάρχει ένα κεντρικό τμήμα στο οποίο δεν έχει δημιουργηθεί κανένα όργανο. Εξωτερικά αυτής της πρώτης ζώνης υπάρχει μια πιθανή μάλλον στενή, δεύτερη ζώνη στην οποία προκαλείται η δημιουργία των διάφορων οργάνων, αλλά καμία διαφοροποίηση δεν είναι ορατή. Εξωτερικά της δεύτερης ζώνης ακολουθεί μια πλατιά τρίτη ζώνη στην οποία τα διάφορα παραγόμενα όργανα αρχίζουν να διαφοροποιούνται. Σ' αυτή τη ζώνη είναι ορατές οι καταβολές των φύλλων, τα ίχνη των φύλλων και τα κορυφαία μεριστώματα, όπως και οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Και οι τρεις ζώνες αναπτύσσονται προς τις τρεις διαστάσεις χωρίς τα τρία τμήματα αυτά να

αναμιγνύονται μεταξύ τους και η ανάπτυξη κάθε ζώνης είναι σε πλήρη αρμονία με τις άλλες. Οι Steeves and Sussex (1989) διαχώρισαν παρόμοια το κορυφαίο μερίστωμα σε τρεις ζώνες και τρία στρώματα κυττάρων. Στην 1^η ζώνη (περιφερειακή) που αποτελείται από ταχέως διαιρούμενα κύτταρα που παράγουν νέα όργανα με συγκεκριμένη φυλλοταξία, στη 2^η ζώνη (κεντρική) με κύτταρα που δε διαιρούνται γρήγορα και στην 3^η ζώνη, που βρίσκεται κάτω από τη 2^η, σχηματίζει την εντεριώνη και τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Τα τρία στρώματα κυττάρων χωρίζονται σε L1 τα επιδερμικά κύτταρα, L2 τα υποδερμικά κύτταρα και L3 όλα τα υπόλοιπα κύτταρα, όπου τα κύτταρα στα δύο πρώτα (L1, L2) στρώματα έχουν αντικλινείς διαιρέσεις ενώ στο L3 διαιρέσεις προς όλες τις κατευθύνσεις επιτρέποντας στο φυτό να αναπτύσσεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Για να λειτουργήσει το κορυφαίο μερίστωμα κανονικά είναι ουσιαστική η ύπαρξη των τριών ζωνών και των τριών στρωμάτων και όταν η κεντρική περιοχή των κυττάρων δεν ελέγχεται μπορεί να εμφανιστούν φαινότυποι παρόμοιοι με τις δεσμωμένες μορφές (Fambrini *et al.*, 2006, Sharma and Fletcher, 2002, Traas and Vernoux, 2002).

Ο Schoute υποστήριξε ακόμη ότι σε εύρωστους βλαστούς η πρώτη ζώνη είναι μεγαλύτερη απ' ότι σε αδύναμους. Ως απόδειξη, παραθέτει το γεγονός ότι η φυλλοταξία στους βλαστούς συνήθως διαφέρει ανάλογα με τη ζωνρότητα τους και ότι ο αριθμός των παραστοιχιών των φύλλων στους ισχυρούς βλαστούς είναι πάντα υψηλότερος απ' ότι στους αδύναμους. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς μια μεγαλύτερη πρώτη ζώνη περιβάλλεται από έναν πλατύτερο δακτύλιο της ζώνης δύο (II), μέσα στον οποίο υπάρχει αρκετός διαθέσιμος χώρος για να προκληθεί οργανογένεση και να παραχθούν περισσότερες παραστοιχίες φύλλων. Η δεσμίωση μπορεί να ξεκινήσει με μια ασυνήθη μεγέθυνση της πρώτης (I) ζώνης, που πιθανόν να προκαλείται από υπερβολική διατροφή του βλαστού με συνέπεια την εμφάνιση ασυνήθιστου αριθμού περιφερειακών οργάνων στην τρίτη (III) ζώνη.

Σε μερικές περιπτώσεις αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μια δυσαρμονία, ειδικά όταν η I και II ζώνη καταλαμβάνουν ένα ασυνήθως μεγάλο τμήμα της κορυφής του μεριστώματος, έτσι ώστε η πιθανότητα εγκάρσιας ανάπτυξης της ζώνης III να περιορίζεται. Όταν η εγκάρσια ανάπτυξη δεν ακολουθεί τη συνήθη αναλογία εμφανίζεται πλάτυνση του βλαστού με τις ακόλουθες συνέπειες: η δακτυλιωτή ζώνη των νεαρών οργάνων γίνεται φαρδύτερη απ' ότι αναλογεί στην ποσότητα των εσωτερικών ιστών. Σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να γίνει δακτυλιοειδής ή πεπλατυσμένη, ενώ σε άλλες ελλειπτική ή με πτυχώσεις. Το τι θα γίνει στην κάθε περίπτωση εξαρτάται από το είδος και τη συνοχή του ιστού.

Είναι προφανές ότι αυτές οι διαφορετικές περιπτώσεις, όπως υποστηρίζεται από τον Schoute, μπορεί να δώσουν ταινιωτή ή δακτυλιωτή δεσμίωση. Στην περίπτωση της ταινιωτής

δεσμίωσης, ο παραπάνω ερευνητής θεωρεί ότι, ακόμα και όταν η έλλειψη έχει μικρές διαστάσεις η δυνατότητα για εγκάρσια ανάπτυξη αυξάνεται στα όργανα τα οποία βρίσκονται στις άκρες του μεγάλου άξονα (με αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης στις περιοχές αυτές), ενώ για τα όργανα στις άκρες του μικρού άξονα ο χώρος για εγκάρσια ανάπτυξη μειώνεται. Έτσι η εγκάρσια ένταση θα αυξηθεί στα σημεία αυτά, και θα επεκτείνει τις εσωτερικές ζώνες (ζώνη I και II), με αποτέλεσμα στην επίπεδη πλευρά της έλλειψης, η ζώνη II να γίνει μακρύτερη και να δίνει αυξημένο αριθμό νέων οργάνων και έτσι να προωθείται περαιτέρω η δεσμιωμένη ανάπτυξη. Σύμφωνα με την παραπάνω άποψη, «η ταινιωτή δεσμίωση δεν είναι τίποτα παραπάνω από ένα φαινόμενο διεύρυνσης, μια παθητική εγκάρσια επέκταση του κεντρικού κορυφαίου μεριστώματος του βλαστικού κώνου». Η θεωρία του Schoute δεν εξηγεί μόνο τα εξωτερικά μορφολογικά φαινόμενα της ταινιωτής δεσμίωσης, αλλά είναι σε πλήρη συμφωνία με το γεγονός ότι η ιστολογική διαφοροποίηση στα δεσμιωμένα όργανα εμφανίζεται να είναι η ίδια όπως και στα κανονικά μέρη, με μόνη διαφορά την ποσότητα του παραγόμενου ιστού (Boke and Ross, 1978, Kitin *et al.*, 2005).

Η δακτυλιωτή δεσμίωση μπορεί να εξηγηθεί με παρόμοιο τρόπο. Στη δεύτερη περίπτωση, ο Schoute πιστεύει ότι η ζώνη I και ειδικά το κέντρο της μπορεί να αναπτύξει μια έλλειψη ενός «οφθαλμικού παράγοντα» ή κάποιων ειδικών απροσδιόριστων ουσιών σχηματισμού οργάνων λόγω της μεγάλης αύξησης αυτής της περιοχής.

Οι συμπτύξεις είναι διαφορετικές από τις αληθινές δεσμιώσεις, γιατί προκαλούνται από την συγχώνευση δύο ή περισσότερων βλαστικών κορυφών. Ο Schoute υποθέτει ότι η συγχώνευση οφείλεται στην επέκταση της περιοχής των δύο ή περισσότερων νέο δημιουργούμενων βλαστικών κορυφών, «μια επέκταση η οποία λαμβάνει χώρα συνήθως πριν οι βλαστικές κορυφές γίνουν ορατές σαν καταβολές στο μητρικό όργανο». Η συγχώνευση πιθανόν να εμφανίζεται στο στάδιο το οποίο οι κώνοι βρίσκονται στο στάδιο της ζώνης I, διότι αλλιώς, όργανα τα οποία θα είχαν ήδη σχηματισθεί θα περιέβαλλαν τα κορυφαία μεριστώματα (Gorter, 1965).

Στη θεωρία του Schoute καταλήγουν και οι σημερινές ιστολογικές αναλύσεις δεσμιωμένων και κανονικών φυτών, τόσο σε φυτά που δεν είναι γνωστή η αιτία της δεσμίωσης π.χ. στον *Echinocereus reichenbachii* (Boke and Ross, 1978), όσο και σε φυτά που είναι γνωστή η αιτία δεσμίωσης π.χ. η δεσμίωση να οφείλεται στο γονίδιο *STF* στον *Helianthus annuus* (Fambrini *et al.*, 2006).

1.3.6 Δεσμίωση και παχύφυτα

Το φαινόμενο είναι πολύ κοινό στις διάφορες οικογένειες των παχυφύτων με μεγάλη έμφαση στις οικογένειες Cactaceae και Euphorbiaceae. Ο Shurly (1959) αναφέρει πάνω από 50 γένη παχυφύτων στα οποία έχει βρεθεί η *cristata* μορφή (*Echeveria*, *Euphorbia*, *Sedum*, *Stapelia* κ.α.).

Εκτός της δεσμιωμένης μορφής του βλαστού παρατηρείται δεσμίωση ακόμη και στη ρίζα (*Mammillaria microcarpa*, Snyder and Weber, 1966).

Ο Stratham (1953-55) αναφέρει ότι οι δεσμιωμένες μορφές εμφανίζονται μόνο αφού πρώτα έχει αναπτυχθεί για λίγο η κανονική μορφή. Το ίδιο υποστηρίζει και ο Hester (1940), ο οποίος αναφέρει ότι *cristata* φυτά της *Carnegia gigantea* είχαν ύψος ένα μέτρο και η ηλικία τους ήταν 30 ετών. Επίσης αναφέρει ότι η διαδικασία της δεσμίωσης ξεκινάει με την παρεμβολή μιας επιπλέον πτυχής (ribs) στην αντίθετη κατεύθυνση από την οποία θα δημιουργηθεί η νέα δεσμίωση, χωρίς να προσδιορίζει σε πόσο χρόνο εμφανίζεται πριν την εμφάνιση της *cristata*.

Ελάχιστη έρευνα έχει γίνει για την κατανομή των *cristata* μορφών μέσα σε έναν πληθυσμό ενός είδους. Ο Hummel (1935-37) αναφέρει ότι ένας συλλέκτης παρατήρησε πως ο αριθμός των *cristata* είναι μεγαλύτερος προς τη πλευρά του Ειρηνικού ωκεανού παρά προς την ενδοχώρα των ΗΠΑ. Ο Gates (1929-1931) αναφέρει ότι όπου βρεθεί ένα είδος με *cristata* μορφή πολύ κοντά του θα βρεθούν και άλλα. Ο δε Graham (1962) υποστηρίζει ότι εάν σε μια περιοχή υπάρχουν τέσσερα είδη κάκτων και ένα από τα είδη αυτά παρουσιάζει στη περιοχή αυτή *cristata* μορφή, δεν είναι απίθανο να βρεθούν και οι *cristata* μορφές των άλλων τριών ειδών.

1.3.6.1 Το εξωτερικό ερέθισμα ως αίτιο δεσμίωσης στους κάκτους

Η δουλειά του Wolthuy (1938) είναι ένα τυπικό παράδειγμα πειραματισμού προς τη μεριά του εξωτερικού παράγοντα που ευθύνεται για τις *cristata* μορφές. Χρησιμοποίησε νεαρά φυτά του γένους *Echinopsis* sp. και εφάρμοσε τα ακόλουθα εξωτερικά ερεθίσματα:

1. κοπή κατά μήκος του κέντρου της αναπτυσσόμενης κορυφής
2. κοπή μακριά από την αναπτυσσόμενη κορυφή
3. τοποθέτηση σκουριασμένων καρφιών μέσα στο φυτό
4. χάραξη όλου του φυτού με ένα μαχαίρι
5. πρόσθεση σε εναίσιμη μορφή των ουσιών: Λακτικό οξύ, οξαλικό οξύ, φορμικό οξύ, καθώς άλλα χημικά και καθαρό νερό
6. φύτευση των φυτών σε διάφορα υποστρώματα με διαφορετικό βαθμό υγρασίας

Το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό σε κάθε περίπτωση.

Ο Houghton (1930) πίστευε ότι οι εξωτερικές συνθήκες, όπως ο τύπος του υποστρώματος και η θερμοκρασία έχουν μια ευρεία επιρροή στην ανάπτυξη *cristata* μορφών, και ότι κάτω από φτωχές συνθήκες εμφανίζουν μια τάση να επανέλθουν στον κανονικό τύπο ανάπτυξης. Από την άλλη μεριά, ο Butterfield (1962) ισχυρίστηκε ότι η επιστροφή στην κανονική μορφή εμφανίζεται όταν οι συνθήκες ανάπτυξης είναι στο optimum.

Δοκιμάστηκε επίσης και η κολχικίνη η οποία προκαλεί μεταλλάξεις στα φυτά, αλλά τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά (Stratham, 1953-55). Το αρσενικό οξύ δοκιμάστηκε επίσης σε εβδομαδιαία εφαρμογή μαζί με αζωτούχα άλατα στην *Opuntia cylindrica* (Kewen, 1929-31). Οι *cristata* μορφές ξαναγύρισαν στην κανονική μορφή μετά από τέσσερα χρόνια.

Αποτυχία για παραγωγή *cristata* είχαν και πειράματα με διάλυμα άνθρακα και πίσσας (Levine, 1933). Παρόμοιες αποτυχίες είχαν και η εφαρμογή ακτίνων X, ή άλλων ραδιενεργών πηγών (Hummel, 1935-1937).

Οι Boissevain and Davidson (1940) υποστήριξαν ότι όταν επιτίθενται έντομα στη μια πλευρά του φυτού, διεγείρεται η ανάπτυξη στην αντίθετη κατεύθυνση. Ο West (1929) πρότεινε την πιθανότητα ότι, αντί η *cristata* να ενεργοποιείται από κάποιον διεγερόμενο παράγοντα, μπορεί να οφείλεται στην απομάκρυνση κάποιου παρεμποδιστικού παράγοντα.

1.3.6.2 Η κληρονομικότητα της δεσμίωσης στους κάκτους

Μέχρι τώρα έχει αποδειχθεί ότι στη *Celosia cristata* και στο *Chamaecereus silvestrii* (var. *crassicaulis*) η *cristata* οφείλεται σε κληρονομικό παράγοντα (Hester, 1940). Ο Johansen (1929-1931) καθώς και άλλοι συγγραφείς διατύπωσαν ότι η απάντηση στο ερώτημα αν η *cristata* οφείλεται σε κληρονομικό παράγοντα θα μπορούσε να δοθεί αν γίνονταν πολλά πειράματα με το σπόρο των φυτών αυτών. Ο Shurly (1959) όμως ανέφερε ότι τα φυτά *cristata* σπάνια ανθίζουν και παράγουν σπόρο. Ο Houghton (1929-1931) ανέφερε ότι σπόροι από το *Echinopsis multiplex* var. *cristata* έδωσαν στην F₁ 3% *cristata* φυτά. Μερικά παχύφυτα *cristata* παράγουν ένα καλό ποσοστό *cristata* σποροφύτων Butterfield (1962). Ο Hunter (1984) ανέφερε ότι σπορόφυτα τα οποία προήλθαν από τον *Cereus peruvianus* var. *monstrosus* διατήρησαν την monstrose μορφή 100%. Παρόμοιες εργασίες από τον ίδιο έδειξαν ότι σπόροι που προέρχονταν από *cristata* μορφή του *Gymnocalycium mihanovichii* έδωσαν στην F₁ 30% *cristata* φυτά. Αλλά πολλές *cristata* μορφές της *Echeveria* sp. ξαναγυρίζουν στην κανονική μορφή όταν λιπαίνονται και ποτίζονται αρκετά ώστε να ενθαρρυνθεί η εύρωστη ανάπτυξη. Ακόμη και όταν αφαιρεθούν οι κανονικοί βλαστοί, όλο το φυτό μπορεί να είναι λιγότερο ή περισσότερο κανονικό. Οι *Euphorbia* sp. μερικές φορές

δημιουργούν *cristata* και υπάρχει μια τάση σε πολλές περιπτώσεις η νέα ανάπτυξη να ξαναγυρίζει στη κανονική μορφή και πράγματι σε μερικές περιπτώσεις είναι δύσκολη η αποφυγή μεγάλου ποσοστού κανονικής ανάπτυξης (Butterfield, 1962).

Ο Hunter (1984) ανέφερε ότι ένας αριθμός φυτών *cristata* ανθοφόρησε ικανοποιητικά, καταρρίπτοντας τον “μύθο” ότι οι *cristata* δεν ανθίζουν. Σύμφωνα με τον ίδιο οι *Mammillaria wildii*, *M. zeilmanniana* και *Rebutia heliosa* είναι από τις πιο γνωστές *cristata* που ανθίζουν.

1.3.6.3 Η ασθένεια ως πιθανή αιτία δεσμίωσης στους κάκτους

Η ασθένεια ως παράγοντας για *cristata* φυτά δε θα πρέπει να παραβλέπεται. Ο Shurly (1959) ανέφερε ότι τα φυτά *cristata* είναι ισχυρότερα γενικά απ’ ότι τα κανονικά και ότι η δεσμίωση δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ασθένεια. Ο Backeberg (1931-1933) τόνισε ότι στα φυτά αυτά δεν παρεμποδίζεται η ανάπτυξη και ότι η *cristata* μορφή εμφανίζεται σε μεγάλης ηλικίας, δυνατά και εμφανώς υγιή φυτά.

Η Higgins (1933) ανέφερε ότι εάν η *cristata* δεν οφείλεται στην καταστροφή της κορυφής, τότε μπορεί να οφείλεται σε ασθένεια του αναπτυσσόμενου σημείου ανάλογης με την υπερβολική ανάπτυξη που βρίσκεται μερικές φορές στα φύλλα ως αποτέλεσμα μόλυνσης από μύκητες ή την επίθεση μικροσκοπικών εντόμων. Οι Boissevain and Davidson (1940) θεώρησαν ότι η πρόκληση της *cristata* στα *Coloradoa mesae verdae* και *Echinocereus coccineus* οφείλεται στην αντίδραση του φυτού στις προνύμφες εντόμων που ζουν μέσα στο φυτό. Πολλοί συγγραφείς ανέφεραν την εύρεση ιών σε κάκτους, αλλά κανένας δεν μπόρεσε να το συσχετίσει με τη *cristata* μορφή (Weber and Kenda, 1952, Rosenzopf, 1951, Milicic, 1954, Chessin *et al.*, 1961, Uschdrawit, 1962).

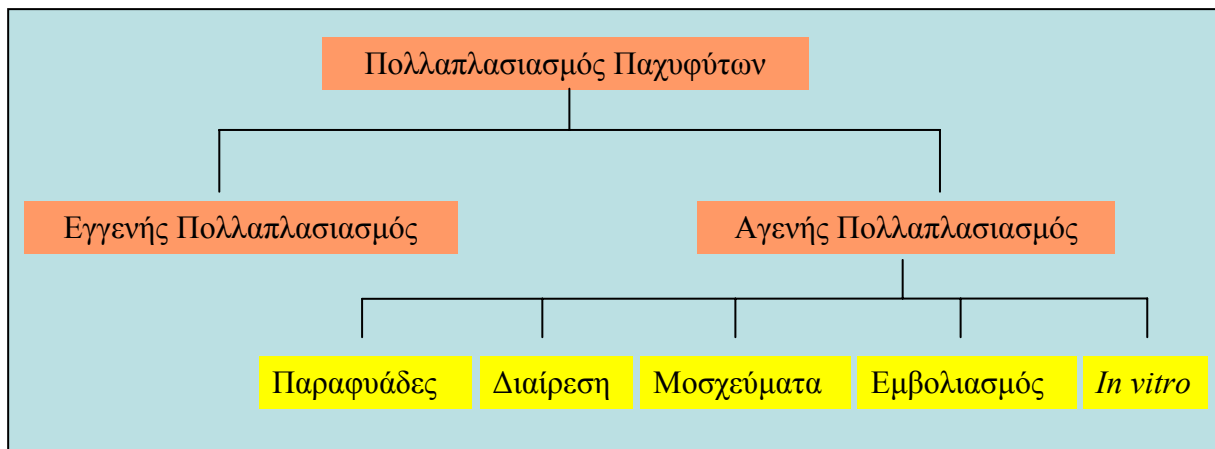


Διερεύνηση της συμπεριφοράς κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων σε *in vitro* καλλιέργεια

2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΝΟΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΔΕΣΜΙΩΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΠΑΧΥΦΥΤΩΝ ΣΕ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

2.1 Εισαγωγή

Τα παχύφυτα γενικά πολλαπλασιάζονται εύκολα, αλλά υπάρχουν και είδη που παρουσιάζουν δυσκολίες (Clayton *et al.*, 1990). Ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται είτε εγγενώς με σπόρο, είτε αγενώς με παραφυάδες, διαίρεση, μοσχεύματα, εμβολιασμό και ιστοκαλλιέργεια (Pizzetti, 1985, Σχ. 5).



Σχ. 5. Σχηματική απεικόνιση του πολλαπλασιασμού παχυφύτων.

Η εφαρμογή του *in vitro* πολλαπλασιασμού στα παχύφυτα βοηθάει στο να ξεπεραστούν δυσκολίες όπως ο λήθαργος του σπόρου, η χαμηλή βλαστικότητα, οι άγονοι σπόροι, η μικρή ανάπτυξη και η μη διαθεσιμότητα σπόρων από φυτά που είναι σπάνια ή είναι υπό εξαφάνιση (Minocha and Mehra, 1974, Clayton *et al.*, 1990). Ελαχιστοποιεί τον απαιτούμενο μεγάλο αριθμό που χρειάζεται να υπάρχει ως μητρικό υλικό και μειώνει τη παραλλακτικότητα που προέρχεται από σπόρο (Johnson and Emimo, 1979). Τέλος, η ιστοκαλλιέργεια είναι μια καλή μέθοδος πολλαπλασιασμού για έγχρωμες μορφές (φυτά χωρίς χλωροφύλλη) κάκτων που εμβολιάζονται σε πράσινα υποκείμενα (Lassocinski, 1985), για βελτίωση ή υβριδισμό νέων ποικιλιών, καθώς και για τον πολλαπλασιασμό δεσμιωμένων μορφών (Johnson and Emimo, 1979).

Ιδιαίτερα για τις δεσμιωμένες μορφές, οι οποίες πολλαπλασιάζονται εμπορικά με μοσχεύματα ή εμβολιασμό, ο *in vitro* πολλαπλασιασμός είναι απαραίτητος λόγω του περιορισμένου μητρικού υλικού, καθώς και της μη ύπαρξης σπόρου, αφού οι περισσότερες αν όχι όλες οι δεσμιωμένες μορφές δεν ανθίζουν. Στην βιβλιογραφία δεν υπάρχουν άλλες

αναφορές για μικροπολλαπλασιασμό δεσμιωμένων μορφών πέραν των Papafotiou *et al.* (2001) και Balotis and Papafotiou (2003), που αφορούν στον πολλαπλασιασμό *in vitro* των *Mammillaria elongata* var. *crinata* και *Euphorbia pugniformis* var. *crinata*, όπου και στις δύο δεσμιωμένες μορφές παρατηρήθηκε συγχρόνως με δεσμιωμένους και η αναγέννηση βλαστών κανονικής μορφής.

Στόχος της παρούσας έρευνας ήταν η διερεύνηση της συμπεριφοράς δεσμιωμένων και κανονικών μορφών των παχύφυτων *M. elongata*, *E. pugniformis* και *E. lactea* σε *in vitro* καλλιέργεια και η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου πολλαπλασιασμού. Εξετάστηκε η επίδραση αυξίνης και κυτοκίνης, η εποχή λήψης των εκφύτων (*M. elongata* var. *crinata*), η συγκέντρωση του αζώτου του θρεπτικού υποστρώματος στις *E. pugniformis* var. *crinata* και *E. lactea* var. *crinata*, καθώς και η διατήρηση του χρώματος μετά από πέντε συνεχείς υποκαλλιέργειες στην έγχρωμη ποικιλία *E. lactea* var. *crinata* “Grey Ghost”. Τέλος, εξετάστηκε η ριζοβολία των αναγεννημένων βλαστών και ο *ex vitro* εγκλιματισμός φυταρίων και των δύο μορφών των τριών παχύφυτων.

2.1.1 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 κυρίως από την ηλικία του. Επίσης, ο λήθαργος του σπόρου, που είναι μέρος της προσαρμογής του φυτού στο φυσικό του 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 γιββεριλλικό οξύ (Rowley, 1978).

Ο καλύτερος χρόνος σποράς είναι στην αρχή της βλαστικής περιόδου με κατάλληλους μήνες τους Μάρτιο, Απρίλιο και Μάιο. Παχύφυτα (π.χ. *Haworthia* sp.) και κάκτοι (π.χ. *Gymnocalycium* sp.) 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 βλάστησης διαφέρει από είδος σε είδος. Μερικά βλαστάνουν ταχύτατα όπως σε δύο μέρες (*Stapelia* sp.) ή έξι ημέρες (*Mammillaria elongata*) και άλλα κάνουν από μερικές βδομάδες έως μερικούς μήνες. Η βλαστική 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, είναι 25 έως 30 °C (Anderson, 2001). Μείωση της θερμοκρασίας στους 20 ή 15 °C τη νύχτα είναι επιθυμητή 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 καλλίτερο αερισμό.

Η μέθοδος σποράς των παχυφύτων δεν 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 η έκπτυξη των σποροφύτων. Η εμφάνιση των φυταρίων δείχνει πόσο φως χρειάζονται. Κιτρινωπά φυτά θέλουν περισσότερο φως, ενώ φυτά με μπρούτζινο χρώμα χρειάζονται σκιά (Pizzetti, 1985).

Σοβαρός κίνδυνος για τα σπορόφυτα είναι η σήψη τους λόγω προσβολής από μύκητες. Ειδικά, αν το μίγμα χώματος έχει αλκαλική αντίδραση, τα σπορόφυτα χάνουν τις ρίζες τους, αδυνατίζουν και προσβάλλονται εύκολα από μύκητες. Μπορεί να ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό με τη χρήση κάποιου μυκητοκτόνου (Gunter, 1984).

Με αυτόν το τρόπο πολλαπλασιάζεται εμπορικά η *M. elongata*, μιας και σπορόφυτά της παράγουν αρκετό σπόρο από τον πέμπτο χρόνο της καλλιέργειας τους.

Οι σπόροι των εφορβιδών έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής (χαμηλή βιωσιμότητα) γι' αυτό και σπάνια χρησιμοποιούνται για εμπορικούς σκοπούς. Το ποσοστό της βλάστησης μπορεί να πέσει κάτω από το 50% μόλις μετά από λίγες εβδομάδες. Γενικότερα οι σπόροι θα πρέπει να διατηρούνται στεγνοί στους 5 °C σε αεροστεγή δοχεία. Η ξηρασία και οι υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να προκαλέσουν την γρήγορη μείωση της βλαστικότητας (Διαδίκτυο 1).

Η συγκομιδή των σπόρων παρουσιάζει ένα πρόβλημα. Οι καρποί των εφορβιδών έχουν σκληρά εξωτερικά περιβλήματα που αποτελούνται από τρία χωρίσματα, το καθένα από τα οποία περιέχει έναν σπόρο. Όταν η κάψα σκιστεί εκρήγνυται διασκορπίζοντας τους σπόρους σε εκπληκτικά μεγάλες αποστάσεις. Η θερμοκρασία του σπορείου τη νύχτα δεν πρέπει να πέφτει κάτω από τους 18 °C, ωστόσο κατά την διάρκεια της ημέρας μπορεί να φτάσει στους 40 °C, με 25 °C να είναι η ιδανική τιμή. Μιας και στο φυσικό περιβάλλον η βροχόπτωση είναι άτακτη, δεν βλαστάνουν όλοι οι σπόροι την ίδια στιγμή για να διασφαλίσουν έτσι την επιβίωση του είδους. Η βλάστηση τείνει να γίνεται κατά κύματα, για παράδειγμα, μετά από μια, οχτώ ή και 15 εβδομάδες. Επιπλέον η περίοδος της βλάστησης μπορεί να ποικίλει από είδος σε είδος (Διαδίκτυο 1).

2.1.2 Αγενής πολλαπλασιασμός παχυφύτων

Είναι ένας εύκολος και γρήγορος τρόπος πολλαπλασιασμού με τη μόνη διαφορά ότι δεν υπάρχει αρκετό πολλαπλασιαστικό υλικό για τη 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, και αναπαραγωγής με μέρη του φυτού που δεν είναι από τη 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 από σπόρο (Haage, 1963, Gunter, 1984, Pizzeti, 1985).

2.1.2.1 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 υψηλό σημείο. Πολλά είναι 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 βδομάδα ως και κάποιους μήνες, ανάλογα με το μέγεθος του βλαστού, σε σκιερό μέρος για να στεγνώσει και να επουλωθεί η πληγή (Haage, 1963, Pizzeti, 1985).

2.1.2.2 Πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα

Σύμφωνα με τον Gunter (1984) αυτός ο τρόπος πολλαπλασιασμού χρησιμοποιείται για έναν μεγάλο αριθμό παχυφύτων βλαστού και φύλλου. Τα μοσχεύματα είναι τμήματα βλαστών ή φύλλων τα οποία παίρνονται από το φυτό και αφού αφεθούν για κάποιο χρονικό διάστημα για 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 στο υπόστρωμα. Σχεδόν όλα τα μέλη της οικογένειας Cactaceae (εκτός των σφαιρικών κάκτων) μπορούν να πολλαπλασιαστούν με τη μέθοδο αυτή. Ειδικότερα στις δεσμιωμένες μορφές της οικογένειας είναι ο κύριος (εμπορικός) τρόπος πολλαπλασιασμού.

Στην οικογένεια Euphorbiaceae ο πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα είναι ο πιο εύκολος τρόπος για πολλά είδη, και είναι επίσης και ένας τρόπος να κλαδευτεί – περιοριστεί ένα φυτό ξανά στο αρχικό του σχήμα. Τα σφαιρικά φυτά που δεν διακλαδίζονται όπως η *E.*

bupleurifolia ή η *E. piscidermis* μπορεί να κοπούν στην κορυφή ενθαρρύνοντας την παραγωγή πλάγιων βλαστών τα οποία μπορούν αργότερα να αποκοπούν και να φυτευτούν. Η καλύτερη εποχή λήψης μοσχευμάτων είναι η άνοιξη όταν ξεκινά η ανάπτυξη. Τα μοσχεύματα που κόβονται το φθινόπωρο ή το χειμώνα έχουν λίγο χρόνο να βγάλουν ρίζες γι' αυτό θα πρέπει να λαμβάνονται μόνο όταν υπάρχει ανάγκη να διασφαλιστεί ένα φυτό από το να υποφέρει από το σάπισμα των ριζών (Διαδίκτυο 1).

Ο χυμός των εφορβιδών που εμφανίζεται μετά το κόψιμο πρέπει να ξεπλένεται εντελώς με νερό ή με ψεκάσμο κρύου νερού το οποίο ανακόπτει γρήγορα την εκροή. Η δημιουργία ριζών μπορεί να πάρει περισσότερο χρόνο από τον αναμενόμενο, αλλά μπορεί να επιταχυνθεί η διαδικασία αυξάνοντας την θερμοκρασία του υποστρώματος γύρω στους 25 °C. Η απευθείας έκθεση στον ήλιο πρέπει να αποφεύγεται για τα μοσχεύματα που δεν έχουν βγάλει ακόμα ρίζες για να μην αφυδατωθούν (Διαδίκτυο 1).

Μερικά είδη εφόρβιας της Μαδαγασκάρης (*E. francoii*, *E. pachypodiodes*, *E. ankarensis*, *E. milloti*) έχουν αναπαραχθεί με επιτυχία από κομμένα φύλλα που είχαν αποσπαστεί με προσοχή από τα μητρικά φυτά (όχι κόψιμο), και είχαν τοποθετηθεί μέσα σε κύβους τύρφης (jiffy-7) οι οποίοι στην συνέχεια τοποθετούνται σε έναν δίσκο που περιέχει άμμο. Η επιφάνεια της άμμου θα πρέπει να καλύπτεται με νερό (τοποθετώντας τα φύλλα απ' ευθείας σε άμμο με υγρασία μπορεί επίσης να αποφέρει αποτέλεσμα αλλά με μεγαλύτερες απώλειες). Η χρήση ορμόνης ριζοβολίας και μυκητοκτόνου βοηθά. Τα φύλλα των *E. deccaryi*, *E. primulifolia*, *E. morati*, *E. cremersii* και *E. decidua* θα βγάλουν ρίζες αλλά δεν θα παράγουν φυτά. Θα παραμείνουν φύλλα με ρίζες (Διαδίκτυο 1).

Με αυτό τον τρόπο πολλαπλασιάζονται οι δεσμιωμένες μορφές και των τριών παχυφύτων που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη καθώς και οι κανονικές μορφές των *E. pugniiformis* και *E. lactea*.

2.1.2.3 Πολλαπλασιασμός με εμβολιασμό

Εμβολιασμός είναι η τεχνητή 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 παχυφύτων που δεν μπορούν να φωτοσυνθέσουν λόγω του ότι τους λείπει η χλωροφύλλη π.χ. το *Gymnocalicium mihanovichii* var. "*Hibotan*" ή ακόμη και των δεσμιωμένων παχυφύτων.

Τα εμβολιασμένα φυτά αυξάνονται ταχύτερα και συνήθως έχουν διαφορετική εμφάνιση από τα αυτόριζα, αναπτύσσονται γρηγορότερα ή δημιουργούν δύσμορφα σχήματα, αλλά διατηρούν τους βοτανικούς τους χαρακτήρες (Gunter, 1984).

Και τα δυο φυτά, εμβόλιο – υποκείμενο, θα πρέπει να βρίσκονται στη περίοδο ανάπτυξης τους. Το εμβόλιο θα πρέπει να κόβεται όσο το δυνατόν πιο κοντά στο αναπτυσσόμενο μέρος του, μιας και εκεί τα αγγεία είναι πιο πυκνά. Θα πρέπει κατά το δυνατό το εμβόλιο και το υποκείμενο να έχουν την ίδια διάμετρο βλαστού. Οι κομμένες επιφάνειες θα πρέπει να δεθούν γερά με ελαστικούς επιδέσμους, σε σχήμα σταυρού πάνω από την κορυφή του φυτού και κάτω από την γλάστρα. Τα φυτά θα πρέπει να τοποθετηθούν σε αεριζόμενο και σκιερό μέρος για 7-10 ημέρες πριν οι επίδεσμοι απομακρυνθούν.

Ως υποκείμενα για κάκτους μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα *Trichocereus bridgesii*, *T. macrogonus*, *Cereus peruvianus*, *Myrtillocactus geometricans*, *Eriocereus jusbertii* και *Hylocereus undatus*. Ανθεκτικά υποκείμενα θεωρούνται τα *M. geometricans* και *E. jusbertii* (Pizzetii, 1985). Το πιο συνηθισμένο υποκείμενο για τον εμβολιασμό κάκτων σε εμπορική κλίμακα είναι το *Hylocereus undatus*, που έχει όμως μικρή διάρκεια ζωής (κάθε δυο χρόνια πρέπει να χρησιμοποιείται νέο υποκείμενο).

Σχεδόν όλα τα είδη του γένους *Euphorbia* είναι κατάλληλα για υποκείμενα, αλλά πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι ορισμένα “δυνατά” υποκείμενα μπορεί να αλλάξουν την εμφάνιση του εμβολίου. Δυνατά αναπτυσσόμενα υποκείμενα είναι τα *E. ingens*, *E. candelabrum*, *E. canariensis*, *E. grandicornis* και *E. trigona*. Ένα ισχυρό υποκείμενο είναι η *E. fruticosa*. Ένα λιγότερο σφριγηλό αλλά αξιόπιστο υποκείμενο είναι η *E. obesa*. Η *E. mammillaris* η οποία χρησιμοποιείται συνήθως, είναι αξιόπιστη αλλά φαίνεται να έχει μικρή διάρκεια ζωής. Για τις Μαδαγασκαριανές εφόρβιες που σχηματίζουν caudex, όπως η *E. capsaintemariensis*, *E. moratii*, *E. primulifolia* ή *E. ambovombensis*, συνιστάται ως υποκείμενο η *E. milii* var. *hislopii* (Διαδίκτυο 1).

Με αυτό το τρόπο πολλαπλασιασμού πολλαπλασιάζεται η έγχρωμη ποικιλία *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”.

2.1.2.4 *In vitro* πολλαπλασιασμός παχυφύτων

Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός, ως μέθοδος παραγωγής φυτών, εδώ και 50 χρόνια είναι μια κύρια μέθοδος πολλαπλασιασμού για ένα μεγάλο αριθμό ειδών όπως ορχιδέες, φυτά εσωτερικού χώρου κ.λ.π. Ο αγενής αυτός τρόπος πολλαπλασιασμού και η μεγάλη επιτυχία που έχει σε εμπορική κλίμακα για φυτά εσωτερικού χώρου (διεφενεμπάχια, συγκόνιο κτλ., Chu, 1986, Evans, 1990, Jones, 1990) έχει εξαπλωθεί και στα παχύφυτα.

Με τον όρο *in vitro* πολλαπλασιασμό εννοούμε τη μέθοδο καλλιέργειας φυτικών οργάνων ή φυτικών ιστών ή φυτικών κυττάρων ή και πρωτοπλαστών σε ειδικά υποστρώματα υπό ασηπτικές συνθήκες με στόχο την αναπαραγωγή νέων φυτών. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών σε μικρό χρονικό διάστημα απαλλαγμένων από παθογόνους μικροοργανισμούς, ενώ συγχρόνως απαιτείται περιορισμένο σχετικά μητρικό υλικό, μικρής έκτασης εγκαταστάσεις και η παραγωγή είναι ανεξάρτητη της εποχής.

Μέχρι τώρα, η μέθοδος αυτή, έχει χρησιμοποιηθεί για τον πολλαπλασιασμό και διάσωση σπάνιων ειδών παχυφύτων, όπως της *Mammillaria san-angelensis* (Martinez – Vazquez and Rubluo, 1989), καθώς και για τη προώθηση της επιστημονικής γνώσης. Δεν αποτελεί τη κύρια μέθοδο πολλαπλασιασμού για παχύφυτα δεδομένου ότι αυτά πολλαπλασιάζονται εύκολα με μοσχεύματα ή παράγουν άφθονο σπόρο. Η μέθοδος αυτή όμως θα μπορούσε να είναι αρκετά σημαντική για είδη που δεν κάνουν σπόρο ή το πολλαπλασιαστικό υλικό δεν είναι αρκετό για πολλαπλασιασμό με μοσχεύματα. Σ' αυτήν την περίπτωση ανήκουν και οι δεσμιωμένες (*cristata*) μορφές των παχυφύτων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι *cristata* μορφές δεν κάνουν σπόρο ή και αν κάνουν τα σπορόφυτα δεν δίνουν πάντα *cristata* μορφές (Hunter, 1984, Butterfield, 1962). Ο τρόπος αυτός θα μπορούσε να δώσει λύση στην ποσότητα του μητρικού πολλαπλασιαστικού υλικού που θα χρειαζότανε κατά τις συμβατικές μεθόδους αγενούς πολλαπλασιασμού.

Η πρώτη αναφορά πολλαπλασιασμού παχυφύτου με ιστοκαλλιέργεια ήταν για το είδος *Mammillaria woodsii* (Kolar *et al.*, 1976). Τρία χρόνια αργότερα ακολούθησε η αναφορά των Johnson and Emino (1979) για τον επιτυχή *in vitro* πολλαπλασιασμό της *Mammillaria elongata*. Από τότε μέχρι σήμερα έχουν πολλαπλασιαστεί με τη μέθοδο αυτή πολλά είδη παχυφύτων και πολλά που είναι προς εξαφάνιση.

Η μέχρι τώρα έρευνα έδειξε ότι ως έκφυτα μπορούν να χρησιμοποιηθούν: κορυφαίο μερίστωμα (Clayton *et al.*, 1990), πλάγιος οφθαλμός (Papafotiou *et al.*, 2001, Μπαλωτής, 1997, Παπαφωτίου *et al.*, 1998, Escobar *et al.*, 1986, Vyskot and Jara, 1984, Johnson and Emino, 1979, Mauseth, 1979 κ.α.), σπόρος (Μπαλωτής, 1997, Stuppy and Nagl, 1992, Starling and Hutson, 1984, Krulik, 1980 κ.α.), ιστοί σποροφύτων (Delgadillo-Reynoso, 1990, Ault and Blackmon, 1985), εντεριώνη (Kolar *et al.*, 1976), κομμάτι βλαστού (Gaiser, 1981), ωάρια (Corneanu *et al.*, 1990), ταξιανθία (Fay and Muir, 1990) κ.α.

Αν και οι έρευνες μέχρι σήμερα είχαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό παχυφύτων, δεν έχει καθιερωθεί αυτός ο τρόπος πολλαπλασιασμού στα παχύφυτα. Με βάση την βιβλιογραφική ανασκόπηση από το 1959 μέχρι και το 2009 στον

παρακάτω Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι προσπάθειες που έχουν γίνει στον *in vitro* πολλαπλασιασμό παχυφύτων και κάκτων κατά αλφαβητική σειρά οικογενειών.

2.1.2.4.1 Σύγκριση *in vitro* και *ex vitro* παχυφύτων

Αρκετά παχύφυτα, ειδικά απειλούμενα είδη, έχουν πολλαπλασιαστεί επιτυχώς *in vitro*. Τα περισσότερα είδη όμως είναι δύσκολα στην καλλιέργεια, καθώς και αργής ανάπτυξης. *In vitro* παρατηρήθηκαν γενικά αυξημένοι ρυθμοί ανάπτυξης σε σχέση με φυτά που προέρχονταν από *ex vitro* συνθήκες.

Στην *Mammillaria woodsii* (Kollar *et al.*, 1976), η μέθοδος αυτή επιταχύνει την ανάπτυξη κατά ένα χρόνο σε σχέση με το συνήθη τρόπο πολλαπλασιασμού (σπόρο). Σε παρόμοια συμπεράσματα ως προς τον μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης των φυταρίων *in vitro* σε σχέση με τα σπορόφυτα κατέληξαν πολλοί ερευνητές (Minocha and Mehra, 1974, Bonnes *et al.*, 1993, Μπαλωτής, 1997). Επίσης φυτάρια από *in vitro* πολλαπλασιασμό του *M. wrightii* άνθησαν το επόμενο καλοκαίρι της εγκατάστασής τους στο θερμοκήπιο, ενώ τα σπορόφυτα ανθίζουν σε ηλικία 3-5 ετών (Vyskot and Jara, 1984).

Σημαντικό ρόλο στο γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης παίζουν οι μικροπεριβαλλοντικές μεταβλητές μέσα στο βάζο καλλιέργειας (όπως υψηλή σχετική υγρασία) καθώς επίσης οι ρυθμιστές ανάπτυξης και η σουκρόζη (Malda *et al.*, 1999).

Οι Malda *et al.* (1999) χρησιμοποίησαν σπορόφυτα *in vitro* της *Coryphantha minima* μέσα σε βάζα που έκλειναν αεροστεγώς και σε βάζα που γινόταν ανταλλαγή αερίων. Στα βάζα με την υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία (αεροστεγή βάζα) παρατηρήθηκαν φυτάρια με αυξημένο μέγεθος και όγκο σε σχέση με τα βάζα στα οποία γινόταν ανταλλαγή αερίων. Την εξήγηση δίνουν οι παραπάνω ερευνητές λέγοντας ότι αυτό μπορεί να οφείλεται στη γρήγορη αποξήρανση του υποστρώματος λόγω μειωμένης σχετικής υγρασίας. Παρόμοιες αναφορές, πάνω στην επίδραση της χαμηλής υγρασίας στην ανάπτυξη, είναι αυτές των Shallanon and Maziere (1992) στα τριαντάφυλλα.

Ακόμη οι Malda *et al.* (1999), αναφέρουν ότι σε *in vitro* συνθήκες ο κάκτος *Coryphantha minima* φαίνεται να δεσμεύει CO₂ συνεχόμενα, τόσο τη νύχτα όσο και την ημέρα, μεταβάλλοντας τον τυπικό CAM μεταβολισμό. Όταν τα φυτάρια αυτά μεταφέρονταν σε *ex vitro* συνθήκες, τα φυτά επανέρχονται στον τυπικό CAM μεταβολισμό μετά από δύο μήνες.

Σε αντίθεση με τα παχύφυτα, τα μη σαρκώδη φυτά σπάνια επιδεικνύουν τόσο υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης *in vitro*. Από μελέτες των De Yue και Pesjardins (1993), η *in vitro*

καλλιέργεια των υπόλοιπων φυτών περιορίζει την ιδανική τους εξέλιξη, λόγω της μείωσης της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και κατά συνέπεια του ρυθμού ανάπτυξης.

Πίν. 6. Βιβλιογραφική ανασκόπηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού παχυφύτων και κάκτων (κατά αλφαβητική σειρά οικογενειών).

Οικογένεια	Γένος	Είδος	Βιβλιογραφία
Agavaceae	<i>Agave</i>	<i>arizonica</i>	Powers and Backhaus, 1989
	<i>Aloe</i>	<i>fourcoydes</i>	Robert <i>et al.</i> , 1992
		<i>sisalana</i>	Das, 1992
		<i>tequilana</i>	Robert <i>et al.</i> , 1992
	<i>Hesperaloe</i>	<i>parviflora</i>	Richwine <i>et al.</i> , 1994
	<i>Polianthes</i>	<i>tuberosa</i>	Shen <i>et al.</i> , 1991
	<i>Yucca</i>	<i>glauca</i>	Bentz and Talbott, 1992
		Brott and Read, 1993	
Aizoaceae	<i>Aloinopsis</i>	<i>acuta</i>	Fay and Gratton, 1992
	<i>Aptenia</i>	<i>cordifolia</i>	
	<i>Aridaria</i>	<i>splendens</i>	
	<i>Cerochlamys</i>	<i>pachyphylla</i>	
	<i>Conophytum</i>	<i>lambertense</i>	
	<i>Delosperma</i>	sp.	
	<i>Dracophilus</i>	sp.	
	<i>Fenestraria</i>	<i>aurantiaca</i> f. <i>rhopalophylla</i>	
	<i>Gibbaeum</i>	<i>petrense</i>	
	<i>Lampranthus</i>	<i>amoenus</i>	
		<i>bicolor</i>	
		<i>brownii</i>	
		<i>roseus</i>	
		<i>stipulaceus</i>	
		sp.	
	<i>Mesembryanthemum</i>	<i>crystallinum</i>	Abou-Madour, 1992
		<i>nodiflorum</i>	
<i>Oscularia</i>	<i>deltoides</i>	Fay and Gratton, 1992	
<i>Pleiospilos</i>	<i>dekenahii</i>	Fay <i>et al.</i> , 1995	
<i>Ruschia</i>	<i>viridifolia</i>	Fay and Gratton, 1992	
<i>Ruschianthium</i>	<i>falcatus</i>		

	<i>Stomatium</i>	<i>laeve</i>	
	<i>Tischleria</i>	<i>peersii</i>	
	<i>Trichodiadema</i>	sp.	
Aloaceae (Liliaceae)	<i>Aloe</i>	<i>juvenna</i>	Mohamed-Yasseen and Davenport, 1993a
		<i>volkensii</i>	Mohamed-Yasseen and Davenport, 1993a
		spp.	Hayashi, 1987
	<i>Astroloba</i>	spp.	
	<i>Chortolirion</i>	<i>angolense</i>	
	<i>Gasteria</i>	<i>baylissianna</i>	Fay <i>et al.</i> , 1995
		<i>beckeri</i>	
	<i>Haworthia</i>	<i>comptoniana</i>	Rogers, 1993 a, b
		<i>mirabilis</i>	Kochhar, 1994
		spp.	Hayashi, 1987
		spp.	Rogers, 1993a
	<i>Poellnitzia</i>	<i>rubriflora</i>	Hayashi, 1987
	Asclepiadaceae	<i>Caralluma</i>	<i>edulis</i>
<i>europa</i>			
<i>foulcheri</i>			
<i>gracilipes</i>			
<i>moniliformis</i>			
<i>priogonium</i>			
<i>sinaica</i>			
<i>socotrana</i>			
<i>speciosa</i>			
<i>staintonii</i>			
<i>tuberculata</i>			
<i>turneri</i>			
<i>Ceropegia</i>		<i>ampilata</i>	
		<i>barklyi</i>	
		<i>brownii</i>	
		<i>conrathii</i>	
		<i>fimbriata</i>	
		<i>grandis</i>	
		<i>haygarthii</i>	
		<i>leroyi</i>	
		<i>mocambicensis</i>	
		<i>nilotica</i>	
		<i>racemosa</i>	

		<i>radicans</i>		
		<i>rendallii</i>		
		<i>rupicola</i>		
		<i>sandersoni</i>		
		<i>seticorona</i>		
		<i>somalensis</i>		
		<i>stapeliiformi</i>		
		<i>variegata</i> var <i>cornigea</i>		
	<i>Duvalia</i>	<i>corderoyi</i>		
	<i>Echidnopsis</i>	<i>chrysantha</i>		
		<i>leachii</i>		
		<i>montana</i>		
		<i>repens</i>		
	<i>Frerea</i>	<i>indica</i>		
	<i>Hoodiopsis</i>	<i>aff. triebneri</i>		
	<i>Huernia</i>	<i>aspera</i>		
		<i>barbata</i>		
		<i>boleana</i>		
		<i>guttata</i>		
		<i>hystrix</i>		
			Amoo <i>et al.</i> 2009	
Asclepiadaceae	<i>Huernia</i>	<i>insigniflora</i>	Fay and Gratton, 1992	
		<i>keniensis</i>		
		<i>kennedyana</i>		
		<i>laevis</i>		
		<i>leachii</i>		
		<i>lodarensis</i>		
		<i>macrocarpa</i>		
		<i>procumbens</i>		
		<i>recondita</i>		
		<i>saudiarabica</i>		
		<i>tanganyikensis</i>		
		<i>Ophionella</i>		<i>arcuta</i>
		<i>Orbea</i>		<i>variegata</i>
	<i>Orbeopsis</i>	<i>lutea</i>		
	<i>Pachycymbium</i>	<i>baldatii</i>		
		<i>deflersianum</i>		
		<i>dummeri</i>		
		<i>gemugofanum</i>		
<i>keithii</i>				

		<i>rogersii</i>	
		<i>schweinfurthii</i>	
		<i>sprengeri</i>	
	<i>Pectinaria</i>	<i>longipes</i>	
	<i>Piaranthus</i>	<i>pillansii</i>	
	<i>Quaqua</i>	<i>aff. acutiloda</i>	
	<i>Rhytidocaulon</i>	<i>sheilae</i>	
	<i>Stapelia</i>	<i>flavopurpurea</i>	
		<i>grandiflora</i>	
		<i>gigantea</i>	
		<i>hirsuta</i>	
		<i>leendertziae</i>	
		<i>macowanii</i>	
		<i>rectifera</i>	
		<i>semota</i>	Mohamed-Yasseen and Davenport, 1993a
		<i>schintzii</i>	Fay and Gratton, 1992
		<i>Stapelianthus</i>	<i>keraudrenae</i>
	<i>Trichocaulon</i>	<i>cactiforme</i>	
	<i>Tradentea</i>	<i>ausana</i>	
		<i>jucunda</i>	
		<i>longipes</i>	
Cactaceae	<i>Acanthocalyclium</i>	<i>spiniflorum</i>	
	<i>Ariocarpus</i>	<i>kotschoubeyanus</i>	Moebius <i>et al.</i> , 2003
		<i>kotschoubeyanus (Lem)</i>	Sawsan, 2004
		<i>kotschoubeyanus</i>	Santos-Diaz <i>et al.</i> , 2006
		<i>retusus</i>	Stuppy and Nagl, 1992
		<i>trigonus</i>	Starling and Hutson, 1984
	<i>Astrophytum</i>	<i>capricorne</i>	Cardenas <i>et al.</i> , 1993
		<i>myriostigma</i>	Fay and Gratton, 1992
		<i>myriostigma</i>	Vyskot and Jara, 1984
		<i>ornatum</i>	Sanchez Martinez, 1994
	<i>Aztekium</i>	<i>ritteri</i>	Rodriguez-Garay and Rubluo, 1992
		<i>ritteri</i>	Corneanu, 1994
		<i>ritteri</i>	Fay and Gratton, 1992

	<i>Cephalocereus</i>	<i>senilis</i>	Bonness <i>et al.</i> , 1993
	<i>Cereus</i>	<i>peruvianus</i>	Mangolin <i>et al.</i> , 1994, Oliveira and Machado, 2003, Machado and Prioli, 1996
	<i>Coryphantha</i>	<i>elephantidens</i>	Bhau and Wakhlu, 2001
		<i>macromeris</i>	Smith <i>et al.</i> , 1991
	<i>Cumarinia</i>	<i>odorata</i>	Fay and Gratton 1992
	<i>Discocactus</i>	<i>alatus</i>	
	<i>Echinocactus</i>	<i>grusonii</i>	Sanchez Martinez, 1994
		<i>grusonii</i>	Delgadillo-Reynoso, 1990
		<i>grusonii</i>	Fay and Gratton, 1992
	<i>Echinocereus</i>	<i>dasyacanthus</i>	Ault and Blackmon, 1985
		<i>rigidissimus</i>	Fay and Gratton, 1992
	<i>Echinopsis</i>	<i>chamaecereus</i>	Mauseth, 1979
		<i>spachianus</i>	Vyskot and Jara, 1984
	<i>Epiphyllum</i>	<i>chrysocardium</i>	Gaiser <i>et al.</i> , 1981
	<i>Epithelantha</i>	<i>hybrid</i>	Mauseth, 1979
		<i>micromeris</i>	Fay and Gratton, 1992
	<i>Escobaria</i>	<i>emskoetteriana</i>	
		<i>minima</i>	Giusti <i>et al.</i> , 2002
		<i>missouriensis</i>	Clayton <i>et al.</i> , 1990
		<i>robbinsorum</i>	
	<i>Ferocactus</i>	<i>covillei</i>	Ault and Blackmon, 1985
		<i>cylindraceutus</i>	Ault and Blackmon, 1987
		<i>histris</i>	Sanchez Martinez, 1994
		<i>latispinus</i>	Fay and Gratton, 1992
		<i>wislizeni</i>	Ault and Blackmon, 1985
	<i>Hattoria</i>	<i>salicornioides</i>	Mauseth, 1979
		<i>herminiae</i>	Fay and Gratton, 1992
	<i>Hylocereus</i>	<i>antiguensis</i>	

		<i>calcaratus</i>	Johnson and Emino, 1979 b	
		<i>undatus</i>	Mohamed-Yasseen, 1994	
Cactaceae	<i>Hylocereus</i>	<i>undatus</i>	Mohamed-Yasseen, 2002	
	<i>Leuchtenbergia</i>	<i>principis</i>	Starling and Hutson, 1984, Starling, 1985	
	<i>Lobivia</i>	<i>binghamiana</i>	Mauseth, 1979	
	<i>Maihuenia</i>	<i>poeppigii</i>	Fay and Gratton, 1992	
	<i>Mammillaria</i>	<i>albilanata</i>		
		<i>albicoma</i>		Wyka <i>et al.</i> , 2006
		<i>bocasana</i>		Ramirez-Malagon <i>et al.</i> , 2007
		<i>carmenae</i>		Vyskot and Jara, 1984
		<i>densispina</i>		Ramirez-Malagon <i>et al.</i> , 2007
		<i>duwei</i>		Delgadillo and Reynoso, 1990
		<i>elongata</i>		Johnson and Emino, 1979 a
		<i>elongata</i>		Papafotiou <i>et al.</i> , 2001
		<i>goldii</i>		Fay and Gratton, 1992
		<i>gracillis</i>		
		<i>gracillis pfeiff.</i>		Balen <i>et al.</i> , 2002
		<i>haageana</i>		Rubluo <i>et al.</i> , 1993
		<i>hahniana</i>		Sanchez Martinez, 1994
		<i>hahniana</i>		Ramirez-Malagon <i>et al.</i> , 2007
		<i>hernandezii</i>		Fay and Gratton, 1992
		<i>hutcisoniana</i>		Ramirez-Malagon <i>et al.</i> , 2007
		<i>huitzilopochtli</i>		Rubluo <i>et al.</i> , 1990
		<i>huitzilopochtli</i>		Rubluo <i>et al.</i> , 1993
		<i>humboldtii</i>		Fay and Gratton, 1992
		<i>lasiacantha</i>		
	<i>mammillaris</i>			
	<i>mathildae</i>		Sanchez Martinez, 1994	
<i>muehlenpfordtii</i>				
<i>nana</i>		Fay and Gratton, 1992		
<i>orcutii</i>		Ramirez-Malagon <i>et</i>		

			<i>al.</i> , 2007
		<i>parkinsonii</i>	Sanchez Martinez, 1994
		<i>parkonsonii</i>	Fay and Gratton, 1992
		<i>pectinifera</i>	Guisti <i>et al.</i> , 2002
		<i>pectinifera</i>	Ramirez-Malagon <i>et al.</i> , 2007
		<i>parbella</i>	
		<i>picta</i>	
		<i>prolifera</i>	Vyskot and Jara, 1984
		<i>rhodantha</i>	Ramirez-Malagon <i>et al.</i> , 2007
		<i>san-angelensis</i>	Rubluo <i>et al.</i> 1993, 1994
		<i>san-angelensis</i>	Sanchez Martinez, 1994
Cactaceae	<i>Mammillaria</i>	<i>san-angelensis</i>	Martinez and Rubluo, 1989
		<i>solisioides</i>	Fay and Gratton, 1992
		sp.	Corneanu <i>et al.</i> , 1990
		spp.	Fay and Gratton, 1992
		21 spp.	Damiano <i>et al.</i> , 1986
		<i>theresae</i>	Fay and Gratton, 1992
		<i>viperina</i>	Fay and Gratton, 1992
		<i>woodsii</i>	Kolar <i>et al.</i> , 1976
		<i>wrightii</i>	Clayton <i>et al.</i> , 1990
		<i>zephyranthoides</i>	Ramirez-Malagon <i>et al.</i> , 2007
	<i>Mediocactus</i>	<i>coccineus</i>	Infante, 1992
	<i>Melocactus</i>	<i>bellavistensis</i>	Hernandez Hernandez <i>et al.</i> , 1994
		<i>bellavistensis</i>	Sanchez Martinez, 1994
		<i>broadwayi</i>	Fay and Gratton, 1992
	<i>Nopalea</i>	<i>cochenillifera</i>	Brasil <i>et al.</i> , 2005
	<i>Notocactus</i>	<i>magnificus</i>	De Medeiros <i>et al.</i> , 2006
	<i>Obregonia</i>	<i>broadwayi</i>	Fay and Gratton, 1992
	<i>Opuntia</i>	<i>amyclaea</i>	Escobar <i>et al.</i> , 1986
		<i>basilaris</i>	Mauseth, 1979
		<i>basiliensis</i>	Fay and Gratton, 1992
<i>dillenii</i>		Sachar and Lyer, 1959	
<i>echios</i> var. <i>gigantea</i>		Fay and Muir, 1990	

			Fay and Gratton, 1992
		<i>ellisiana</i>	Juarez and Passera, 2002
		<i>ficus-indica</i>	Khalafalla <i>et al.</i> , 2007
			Aliyu and Mustapha, 2007
			Mohamed-Yasseen and Davenport, 1993b
		<i>lanigera</i>	Estrada-Luna <i>et al.</i> , 2008
		<i>nigrispina</i>	Fay and Gratton, 1992
		<i>polyacantha</i>	Mauseth and Halperin, 1975
		<i>polyacantha</i>	Mauseth, 1984
		sp. (<i>Tephrocactus chilensis</i>)	Krulik, 1980
		spp.	Fay and Muir, 1990
		<i>taylori</i>	Fay and Gratton, 1992
	<i>Pachycereus</i>	<i>pringlei</i>	Mauseth, 1979
	<i>Parodia</i>	<i>leninghausii</i>	Fay and Gratton, 1992
	<i>Pediocactus</i>	<i>bradyi</i>	Clayton <i>et al.</i> , 1990
		<i>despainii</i>	
		<i>knowltonii</i>	Simerda, 1990
		<i>knowltonii</i>	Clayton <i>et al.</i> , 1990
Cactaceae	<i>Pediocactus</i>	<i>paradinei</i>	
		<i>peeblesiana</i> var <i>fickeisenii</i>	Simerda, 1990
		<i>winkleri</i>	Clayton <i>et al.</i> , 1990
	<i>Pelecyphora</i>	<i>aselliformis</i>	SantosDiaz, 2003b
	<i>Pereskia</i>	<i>aculeata</i>	Mauseth, 1979
	<i>Pilosocereus</i>	<i>robinii</i>	Quijala <i>et al.</i> 2009
	<i>Rebutia</i>	<i>muscula</i>	Coria and Valverde, 2008
	<i>Rhipsalis</i>	<i>teres</i>	Johnson and Emino, 1979
	<i>Schlumbergera</i>	<i>truncate</i>	Al-Ramamneh <i>et al.</i> , 2006
	<i>Sclerocactus</i>	<i>mesae-verdae</i>	Clayton <i>et al.</i> , 1990
		<i>papyracanthus</i>	
		<i>spinosior</i>	
	<i>Selenicereus</i>	<i>grandiflorus</i>	Mauseth, 1979

		<i>magalanthus</i>	Pelah <i>et al.</i> , 2002	
	<i>Stenocactus</i>	<i>albatus</i>	Fay and Gratton, 1992	
	<i>Stenocereus</i>	sp.	Dubrovsky, 1999	
	<i>Turbinicarpus</i>	<i>loui</i>	SantosDiaz, 2003a	
		<i>lophophoroides</i>	Fay and Gratton, 1992	
		<i>pseudomacrochele</i>	Fay and Gratton, 1992	
Crassulaceae	<i>Adromischus</i>	sp.		
	<i>Aichryson</i>	<i>gonzalezhernandezii</i>		
		<i>pachycaulon</i>		
		<i>palmense</i>		
		<i>porphyrogennetos</i>		
	<i>Crassula</i>	<i>barklyi</i>		
		<i>deceptrix</i>		
		<i>lanuginosa</i>		Fay and Gratton, 1992
		<i>pyramidalis</i>		
		<i>sarcocaulis</i>		
		<i>streyi</i>		
	<i>Dudleya</i>	<i>edulis</i>		
	<i>Echeveria</i>	<i>ciliata</i>		
		<i>sanchez-mejoradae</i>		
	<i>Kalanchoe</i>	<i>bracteata</i>		
		<i>figuereidoi</i>		
		<i>grandiflora</i>		
		<i>laciniata</i>		
		<i>luciae</i>		
		<i>lanceolata</i>		
		<i>marmorata</i>		
		<i>mitejea</i>		
		<i>obdusa</i>		
<i>aff. pumila</i>				
<i>schweinfurthii</i>				
<i>Monanthes</i>	<i>pallens</i>			
<i>Sedum</i>	<i>stahlii</i>			
	<i>Sempervivum</i>	<i>tectorum</i>	Dobos <i>et al.</i> , 1994	
Crassulaceae	<i>Sempervivum</i>	<i>tectorum</i>	Sanchez Martinez, 1994	
Dracaenaceae	<i>Nolina</i>	<i>recurvata</i>	Samyn, 1993	
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia</i>	<i>actinoclada</i>	Fay and Gratton, 1992	
		<i>antisyphilitica</i>	Jakobek <i>et al.</i> , 1986	
		<i>antisyphilitica</i>	Huang and Backhaus,	

			1990
		<i>caput-medusae</i>	Fay and Gratton, 1992
		<i>gariepina</i>	
		<i>graciliramea</i>	
		<i>handiensis</i>	Gonzalez Aleman <i>et al.</i> , 1988
		<i>handiensis</i>	Bramwell, 1990
		<i>lactea</i>	Fay and Gratton, 1992
		<i>milli</i>	Airo <i>et al.</i> , 2003
		<i>omariana</i>	Fay and Gratton, 1992
		<i>omqriana</i>	Gratton and Fay, 1990
		<i>oraihopus</i>	Fay and Gratton, 1992
		<i>platyclada</i>	
		<i>pugniformis</i>	
		<i>pulcherrima</i>	
		sp.	
		<i>susannae</i>	
		<i>taunensis</i>	Tideman and Hawker, 1982
		<i>tirucalli</i>	Yamamoto <i>et al.</i> , 1981, Misawa <i>et al.</i> , 1982
Passifloraceae	<i>Adenia</i>	<i>goetzei</i>	Krogstrup <i>et al.</i> , 2006

2.2 Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1 Φυτικό Υλικό

Για τη διενέργεια των πειραμάτων *in vitro* χρησιμοποιήθηκαν τα είδη *M. elongata*, *M. elongata* var. *cristata*, *E. pugniformis*, *E. pugniformis* var. *cristata*, *E. lactea*, *E. lactea* var. *cristata* και *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”.

Τα μητρικά φυτά της *M. elongata* (δέκα φυτά) ήταν ηλικίας δύο-τριών ετών, ενώ τα φυτά της *M. elongata* var. *cristata* (έξι φυτά) ήταν ηλικίας τριών ετών και αναπτύσσονταν σε θερμαινόμενο γυάλινο θερμοκήπιο και προήλθαν από τα «Φυτώρια Πουλημένου».

Πέντε μητρικά φυτά της *E. pugniformis* var. *cristata* ήταν ηλικίας τριών ετών και αναπτύσσονταν στο γυάλινο θερμαινόμενο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. Ένα φυτό της τυπικής μορφή της *E. pugniformis* είχε ηλικία 4 ετών και προήλθε από τα «Φυτώρια Πουλημένου».

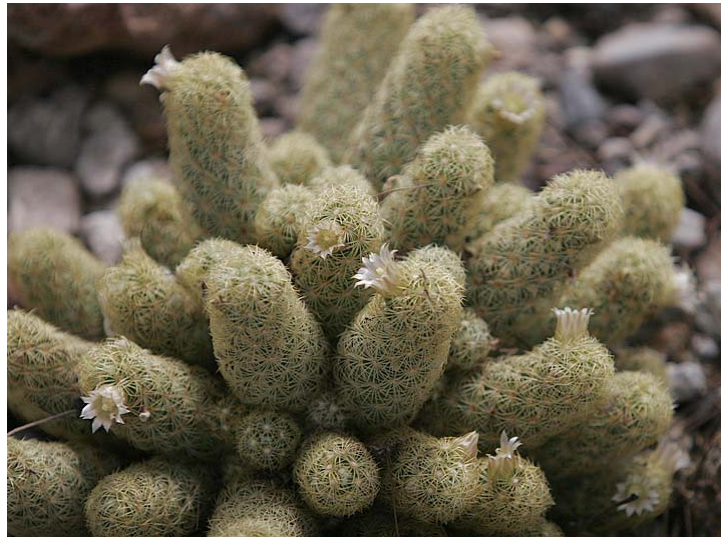
Το μητρικό φυτό της *E. lactea* var. *cristata* (ένα φυτό) ήταν ηλικίας πέντε ετών και προήλθε από μόσχευμα βλαστού και αναπτυσσόταν σε θερμαινόμενο γυάλινο θερμοκήπιο. Τέσσερα μητρικά φυτά της *E. lactea* ήταν ηλικίας ενός έτους, που αναπτύχθηκαν από μοσχεύματα βλαστού σε γυάλινο θερμαινόμενο θερμοκήπιο.

Το μητρικό φυτό της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” ήταν ηλικίας 3 ετών και προήλθε από εμβολιασμό από τα «Φυτώρια Πουλημένου» ενώ αναπτύσσονταν στο γυάλινο θερμαινόμενο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α.

Τα παραπάνω φυτά επιλέχθηκαν έτσι ώστε να είναι υγιή και διατηρήθηκαν στο γυάλινο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, με ελαφρά σκίαση το καλοκαίρι. Δινόταν μεγάλη προσοχή στο πότισμα (όχι πότισμα από πάνω), ώστε να περιοριστεί η ανάπτυξη παθογόνων εδάφους και η μόλυνση των φυτών.

2.2.1.1 *Mammillaria elongata*

Κλάση	: Δικοτυλήδονα
Υποκλάση	: Caryophyllidae
Τάξη	: Caryophyllales
Οικογένεια	: Cactaceae
Φυλή	: Cacteae
Γένος	: <i>Mammillaria</i>
Σειρά	: Leptocladodae
Είδος	: <i>elongata</i>



Εικ. 7. *Mammillaria elongata* σε ανθοφορία

Το όνομα του φυτού έχει αλλάξει αρκετές φορές από τότε που πρωτοπεριγράφηκε το 1828. Γύρω στα εκατό χρόνια κατατασσόταν στο γένος *Leptocladodia* από τον Buxbaum, αλλά τελικά κατέληξε στη σημερινή ονομασία (Pizzetti, 1985, Anderson, 2001).

Το γένος *Mammillaria* περιλαμβάνει 10 υπογένη (Pilbeam, 1999) και γύρω στα 300 είδη (Mace and Mace, 2001, Anderson, 2001) που τα περισσότερα είναι ιθαγενή του Μεξικού. Το γένος αυτό δημιουργήθηκε από τον Andrian Hardy Haworth το 1812 στο βιβλίο του Synopsis Plantarum Succulentarum με την περιγραφή του είδους *M. simplex*. Το ίδιο φυτό όμως είχε προηγουμένα περιγραφεί από τον Λιναίο το 1753, στο έργο του Species Plantarum, ως *Cactus mammillaris* (Pilbeam, 1999, Anderson, 2001).

Το συγκεκριμένο είδος κατάγεται από το Hidalgo και το Queretaro του Μεξικού και φύτεται σε υψόμετρο 1.350-2.400 m (Pilbeam, 1999). Πρόκειται για ένα δυκοτυλίδο φυτό ($2n=22$), με κυλινδρικούς βλαστούς που περιέχουν υδατώδη χυμό (ομάδα Hydrochylus, σε αντίθεση με άλλα είδη του γένους με γαλακτώδη χυμό που ανήκουν στην ομάδα Galactochylus), όρθιους ή πλαγιασμένους σε σωρούς (ύψους 5-10 cm), που φέρουν μικρά φυμάτια (tubercles) με γυμνές μασχάλες τα οποία είναι διατεταγμένα σε σπείρες (Εικ. 7). Τα φυμάτια έχουν αγκάθια, συνήθως όλα με ακτινωτή διάταξη κυρτά προς τα κάτω, αλλά μερικές φορές υπάρχει και ένα κεντρικό αγκάθι (μήκους 5mm), χρώματος κίτρινου ή καφέ – κόκκινου με σκουρότερη κορυφή. Τα άνθη είναι άμισχα ακτινόμορφα, ερμαφρόδιτα μήκους 1-2 cm. Έχουν πέταλα λεπτά, διατεταγμένα σε σειρά, που στη βάση τους ενώνονται σχηματίζοντας σωλήνα. Οι στήμονες είναι πολυάριθμοι και βρίσκονται πάνω από την ωοθήκη και ο ύπερος αποτελείται από απλό στύλο με πολυσχιδές στίγμα. Το χρώμα των

ανθέων είναι άσπρο-κίτρινο ή ανοιχτό ροζ και εμφανίζονται την άνοιξη (Μάρτιος – Απρίλιος), ενώ στην Ελλάδα μπορεί να έχουμε και μια δεύτερη ανθοφορία κατά το φθινόπωρο (Οκτώβριος – Νοέμβριος, προσωπική παρατήρηση). Ο καρπός είναι μονοκύτταρη ράγα, σχήματος ροπάλου, σαρκώδης μη διαρυσμένη χρώματος κοκκινωπού και περιέχει πολλούς σπόρους που όταν ωριμάσουν έχουν χρώμα πορτοκαλί. Οι οφθαλμοί είναι δύο ειδών, από το ένα είδος οφθαλμού εμφανίζονται τα αγκάθια ενώ από το άλλο άνθη και νέοι βλαστοί (Synge, 1981). Η κύρια διαγνωστική διαφορά είναι ότι ο οφθαλμός που δίνει τα άνθη και τους νέους βλαστούς βρίσκεται στη βάση του φυματίου και όχι στη κορυφή μαζί με τον οφθαλμό που δίνει τα αγκάθια όπως συμβαίνει στα άλλα είδη. Τα φυμάτια των φυτών του γένους είναι διατεταγμένα γύρω από το σώμα του κατά έλικες (λογαριθμικά). Κάθε είδος έχει ένα χαρακτηριστικό αριθμό που προκύπτει από το κλάσμα που για αριθμητή έχει τον αριθμό των ελίκων κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού, ενώ για παρανομαστή τον αριθμό των ελίκων κατά την αντίθετη φορά. Αυτός ο αριθμός για τη *M. elongata* είναι 3/5 (αριθμοί που ακολουθούν την ακολουθία του Fibonacci) (Rowley, 1990).

Η *M. elongata* έχει πολλές ποικιλίες και δύο υποείδη (Pilbeam, 1999). Πολλαπλασιάζεται κυρίως με σπόρο. Η δεσμιωμένη μορφή του ανήκει στην ταινιωτή δεσμίωση και παρουσιάζει συχνά μορφή εγκεφάλου (Εικ. 8 α, β) με τελικό ύψος 10-20 cm. Η μορφή αυτή δεν ανθίζει και πολλαπλασιάζεται με μοσχεύματα.

Και οι δύο μορφές έχουν μεγάλη εμπορική αξία καθώς η κανονική μορφή παρουσιάζει μεγάλη παραλλακτικότητα στο χρώμα των αγκαθιών της σε καλλιέργεια, ενώ το σχήμα της δεσμιωμένης μορφής προσελκύει το ενδιαφέρον των συλλεκτών και γενικώς των φίλων των κάκτων.



Εικ. 8 α και β. *Mammillaria elongata* var. *cristata* (Προσωπικό αρχείο)

2.2.1.2 *Euphorbia pugniformis* (Boissier)

Κλάση	: Δικοτυλήδονα
Υποκλάση	: Caryophyllidae
Τάξη	: Caryophyllales
Οικογένεια	: Euphorbiaceae
Φυλή	: Euphorbieae
Γένος	: <i>Euphorbia</i>
Σειρά	: Pseudo-medusae
Είδος	: <i>pugniformis</i>



Εικ. 9. *Euphorbia pugniformis* μεγάλης ηλικίας
(Προσωπικό αρχείο)

Η οικογένεια Euphorbiaceae αποτελεί μια μεγάλη και κοσμοπολίτικη οικογένεια φυτών. Εκτιμάται ότι περιλαμβάνονται γύρω στα 300 γένη και πάνω από 5.000 είδη, εκ των οποίων τα 2.000 ανήκουν στο γένος *Euphorbia* (Καββάδας, 1956).

Ένα κοινό χαρακτηριστικό σχεδόν όλων των ειδών της οικογένειας είναι ο κολλώδης, λευκός χυμός που εκρέει από κομμένες επιφάνειες. Ο χυμός μερικών ειδών είναι δηλητηριώδης, ενώ άλλων προκαλεί ερεθισμό στα μάτια και σε ανοιχτές πληγές. Στα αρχαία χρόνια τα φυτά του γένους χρησιμοποιούνταν για να δηλητηριάζουν τα ψάρια σε μερικές Μεσογειακές χώρες. Άλλα είδη, ωστόσο, είναι τελείως αβλαβή και τουλάχιστον δύο, η *Euphorbia esculenta* και η *E. hamata*, χρησιμοποιούνται ως τροφή ζώων (Haage, 1963).

Η οικογένεια των εφορβιδών ανάλογα με τον τύπο του άνθους χωρίζεται σε διάφορες φυλές. Η φυλή Euphorbieae, στην οποία ανήκει και η *Euphorbia pugniformis*, περιλαμβάνει φυτά που τα άνθη τους είναι σε ταξιανθία κυάθιο, δηλ. στο κέντρο της ταξιανθίας βρίσκεται ένα θηλυκό άνθος που περιβάλλεται από έναν αριθμό αρσενικών ανθέων (Καββάδας, 1956). Στο γένος *Euphorbia* το κυάθιο είναι συμμετρικό γύρω από δύο άξονες, έναν οριζόντιο και έναν κατακόρυφο.

Το όνομα του γένους εμφανίζεται για πρώτη φορά στο Βιβλίο XXV της Φυσικής Ιστορίας του Πλίνιου (23-79 μ.Χ), το τελευταίο και μη ολοκληρωμένο βιβλίο λόγω του θανάτου του στην καταστροφή της Πομπηίας από το ηφαίστειο (79 μ.Χ). Σύμφωνα με τον Πλίνιο: «Στα χρόνια των πατεράδων μας, ο βασιλιάς Juba ο 2^{ος} της Μαυριτανίας ανακάλυψε ένα φυτό στο οποίο έδωσε το όνομα *Euphorbia* για να τιμήσει τον ιατρό του Euphorbus,

αδερφό του Musa, τον οποίο αναφέρω νωρίτερα πως έσωσε την ζωή του τελευταίου Αυτοκράτορα Αυγούστου» (Haage, 1963).

Το είδος *Euphorbia rugniformis* είναι ένα μικρόσωμο παχύφυτο (5-10 cm), το οποίο ανήκει στην υποφυλή των Ψευδομεδουσών. Στην υποφυλή αυτή ανήκουν παχύφυτα με χαρακτηριστικό ροπαλοειδή κορμό (Εικ. 9), ο οποίος φέρει μια κεφαλή με χοντρούς ελικοειδείς βλαστούς (Rowley, 1978). Ο κορμός έχει πάχος 6 – 7.5 cm και είναι επέκταση της σαρκώδους ρίζας του φυτού. Δε φέρει αγκάθια και έχει 2-3 σειρές ελικοειδών βλαστών (δευτεροταγείς βλαστοί) γύρω από το βυθισμένο κορυφαίο μερίστωμα του βλαστού, το οποίο σε αυτό το σημείο έχει πολύ πυκνά φυμάτια (tubercles). Οι δευτεροταγείς βλαστοί είναι επίσης καλυμμένοι με φυμάτια, μεγαλώνουν προς τα έξω και επάνω με μια ελαφρώς τοξοειδή καμπύλη. Κάθε φυμάτιο είναι εφοδιασμένο με ένα μικρό (3 mm) αλλά εμφανές φυλλάριο (Haage, 1963). Οι βλαστοί αυτοί μπορεί να παχύνουν στο κορυφαίο μερίστωμα και να εξελιχθούν σε ροπαλόμορφους βλαστούς, που με την πάροδο του χρόνου δε θα διαφέρουν σε τίποτα από το μητρικό ροπαλοειδή βλαστό (εκτός του ότι αυτός ο βλαστός είναι συνδεδεμένος με το μητρικό ρόπαλο). Τα άνθη του φυτού εμφανίζονται στο τέλος της άνοιξης, βρίσκονται γύρω από το κορυφαίο μερίστωμα του ροπαλοειδούς βλαστού, έχουν κιτρινοπράσινο χρώμα και πλάτος 3-5 mm. Παρατηρήθηκε επίσης άνθηση σε ετήσιους δευτερογενείς βλαστούς, όπου όμως τα άνθη αυτά παρουσιάζονται πολύ αργότερα σε σχέση με τα άνθη του ροπαλοειδούς βλαστού. Αυτοί οι ανθοφόροι βλαστοί έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής, γιατί αποξηραίνονται και πέφτουν από τη βάση τους (Werner, 1988). Η περιοχή καταγωγής του παχύφυτου είναι η Ν. Αφρική.

Πολλαπλασιάζεται κυρίως με σπόρο, ή αγενώς με αποκοπή ροπαλόμορφων βλαστών από το μητρικό βλαστό. Παρατηρήθηκε επίσης από τον συγγραφέα και ο πολλαπλασιασμός του φυτού αυτού με μοσχεύματα κυλινδρικών βλαστών.

Όπως πολλοί κάκτοι έτσι και η *E. rugniformis* έχει *cristata* μορφή, που περιλαμβάνει δύο διαφορετικούς τύπους ανάπτυξης. Αυτό παρατηρείται και σε άλλα φυτά του γένους *Euphorbia* π.χ. *E. woodii* (Rowley, 1978). Άνθηση δεν έχει παρατηρηθεί σε κανέναν από τους δύο δεσμιωμένους τύπους (Forchert, 1984).

Στον πρώτο τύπο, δεσμιώνεται ο κεντρικός ροπαλοειδής βλαστός (κορμός) ενώ οι πλάγιοι βλαστοί είναι ίδιοι με αυτούς της κανονικής μορφής (Εικ. 10).

Ο δεύτερος τύπος *cristata* έχει εξελιχθεί από τις άκρες των πλάγιων βλαστών. Το φυτό δεν έχει κορμό και το σχήμα των βλαστών είναι πεπλατυσμένο - κυματοειδές (Εικ. 11). Όπως και στην κανονική μορφή, οι βλαστοί φέρουν μικρά φυλλάρια, μήκους περίπου 3 mm.

Ο πολλαπλασιασμός των δεσμιωμένων μορφών γίνεται είτε με μοσχεύματα τμήματος του φυτού είτε με εμβολιασμό (Haage, 1963).

Πιο δημοφιλείς μορφές στους συλλέκτες είναι ο δεύτερος τύπος *cristata* (δεσμίωση πλάγιων βλαστών) και η κανονική μορφή ενώ ο πρώτος τύπος *cristata*, λόγω σπανιότητας, είναι περιζήτητος.



Εικ. 10. Δεσμιωμένος κορμός *E. rugniformis* var. *cristata* (Προσωπικό αρχείο)



Εικ. 11. Δεσμιωμένος πλάγιος βλαστός *E. rugniformis* var. *cristata* (Προσωπικό αρχείο)

2.2.1.3 *Euphorbia lactea* Hocw.

Κλάση	: Δικοτυλήδονα
Υποκλάση	: Caryophyllidae
Τάξη	: Caryophyllales
Οικογένεια	: Euphorbiaceae
Φυλή	: Euphorbieae
Υποφυλή	: Euphorbiinae
Γένος	: <i>Euphorbia</i>
Είδος	: <i>lactea</i>



Εικ. 12. *Euphorbia lactea* (Προσωπικό αρχείο)

Η περιοχή καταγωγής αυτού του είδους είναι η Ανατολική Ινδία. Πρόκειται για ένα δενδρόμορφο θαμνώδες παχύφυτο, ύψους 2.50-5.0 m, σκούρου πράσινου χρώματος με πολλές διακλαδώσεις και βλαστούς ορθότονης ανάπτυξης (Εικ. 12). Οι βλαστοί σχηματίζουν, σε επίπεδο κάθετο προς αυτούς, 3-4 γωνίες, είναι πεπλατυσμένοι και έχουν πάχος 2-5 cm. Κατά μήκος των νεύρων και σε όλες τις επιφάνειες διαγράφεται μια λευκή γαλακτώδης ταινία που καταλήγει σε οφθαλμό. Φέρει φυμάτια με ζεύγη κοντών αγκαθιών σκούρου μαύρου χρώματος μαζί με ένα μικρό (1-1.5 mm) φυλλάριο που δε διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα πάνω στο φυτό (Εικ. 12, Καββάδας, 1956).

Η ταξιανθία που είναι κυάθιο εμφανίζεται σε ετήσιο βλαστό, είναι κίτρινου χρώματος και έχει κοντό ποδίσκο (Sajeva and Costanzo, 1995). Το είδος αυτό πολλαπλασιάζεται κυρίως με μοσχεύματα. Χαρακτηρίζεται στις λίστες φαρμακευτικών φυτών ως δηλητηριώδες και έχει το χαρακτηριστικό άσπρο χυμό της οικογένειας.



Εικ. 13. *Euphorbia lactea* var. *cristata* (Προσωπικό αρχείο)

Η *cristata* μορφή του παχυφύτου θεωρείται από πολλούς σαν ζωντανό γλυπτό (Εικ. 13). Το χρώμα του φυτού είναι σκούρο πράσινο και οι κορυφές ανοιχτότερου χρώματος ενώ η νέα βλάστηση έχει κόκκινο-καφέ χρώμα, το δε μέγεθός του μπορεί να ξεπεράσει το ένα μέτρο. Δεν ανθίζει. Πολλαπλασιάζεται κυρίως με μοσχεύματα και με εμβολιασμό (Werner, 1988) ειδικά οι ποικιλίες άσπρη, κίτρινη και κόκκινη (Εικ. 14).

Οι έγχρωμες δεσμωμένες μορφές έχουν μεγάλη εμπορική αξία ως γλαστρικό φυτό, ενώ η κανονική μορφή χρησιμοποιείται σε κήπους.

2.2.1.3.1 Διαφορές στη σύνθεση του χυμού της κανονικής και της *cristata* μορφής

Οι Lynn and Cleve (1987) μελετώντας το χυμό 18 ειδών ευφορβιδών παρατήρησαν διαφορές στη σύνθεση, καθώς και στις επιπτώσεις του χυμού της κανονικής και *cristata* μορφή της *E. lactea* στο αίμα ανθρώπου και προβάτου (Πίν. 7 και 8).



Εικ. 14. Διάφορες ποικιλίες (εμβόλια) *E. lactea* var. *cristata* (α, β, γ Προσωπικό αρχείο και δ, Διαδίκτυο)

Πίν. 7. Μετρήσεις των πρωτεϊνών, υδρογονανθράκων, ολικών στερεών και pH στην *E. lactea* κανονικής και *cristata* μορφής (Πηγή Lynn and Cleve, 1987).

Πηγή χυμού	Πρωτεΐνες	Υδρογ/θρακες	Ολικά στερεά	pH
<i>E. lactea</i>	19.1	0.9	Δ.Μ.	4.8
<i>E. lactea</i> var. <i>cristata</i>	9.7	0.4	40	Δ.Μ.

Δ.Μ. = δεν έγινε μέτρηση

Πίν. 8. Μέτρηση της συγκόλλησης των ερυθροκυττάρων στο αίμα προβάτου και ανθρώπου (Πηγή Lynn and Clevete, 1987).

Πηγή χυμού	Προβάτου	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα ΑΒ	Ομάδα 0
<i>E. lactea</i>	1600	6400	6400	6400	6400
<i>E. lactea</i> var. <i>crystata</i>	10240	6400	12800	12800	51200

2.2.2 Υποστρώματα καλλιέργειας

2.2.2.1 Υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειας

Σε όλα τα *in vitro* υποστρώματα καλλιέργειας και για τα τρία είδη (*M. elongata*, *E. pugniiformis* και *E. lactea* κανονικές και δεσμιωμένες μορφές) χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα MS (Murasige and Skoog, 1962). Τα υποστρώματα εμπλουτίστηκαν με φυτορρυθμιστικές ουσίες, κυτοκινίνη (BA) και αυξίνη (NAA), με βάση προγενέστερες εργασίες *in vitro* πολλαπλασιασμού των *M. elongata* και *E. pugniiformis* (Parafotiou *et al.*, 2001, Balotis and Parafotiou, 2003, Μπαλωτής, 2001). Στην τυπική μορφή της *E. lactea* δοκιμάστηκαν επίσης και οι κυτοκινίνες Zeatin και TDZ.

Στα πειράματα επίδρασης του αζώτου στη διατήρηση της δεσμιωμένης μορφής των *E. pugniiformis* var. *crystata* και *E. lactea* var. *crystata* χρησιμοποιήθηκε MS και τροποποιήθηκε ως προς τη συγκέντρωση του N (Πίν. 9).

Πίν. 9. Συστατικά (μάκρο-ιχνοστοιχεία) των υποστρωμάτων MS (Murashige and Skoog, 1962).

Συστατικά	MS	0.5 MS	0.25 MS	1.5 MS	2.0 MS
NH ₄ NO ₃	1650	825	412.5	2475	3300
KNO ₃	1900	950	475	2850	3800
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	440	440	440
MgSO ₄ .7 H ₂ O	370	370	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170	170
FeSO ₄ .7 H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3
MnSO ₄ .4 H ₂ O	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
KI	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ . H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
CoCL ₂ .6 H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Myo-inositol	100	100	100	100	100
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Pyridoxine.HCl	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Thiamine.HCl	0.1	0.1	0.1	1.0	1.0
Glycine	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

Για τη ριζοβολία μικροβλαστών χρησιμοποιήθηκε MS με IBA στις συγκεντρώσεις 0.5 mg l⁻¹ και 1.0 mg l⁻¹.

Όλα τα υποστρώματα περιείχαν 20 g l⁻¹ σουκρόζη και σταθεροποιήθηκαν με 8 g l⁻¹ άγαρ. Το pH όλων των υποστρωμάτων ρυθμίστηκε με αραιό HCl 1N ή αραιό NaOH 1N στην τιμή 5.6 πριν τη τοποθέτηση του άγαρ και την αποστείρωση.

2.2.2.1.1 Υλικά θρεπτικών υποστρωμάτων *in vitro* καλλιέργειας

1. Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) σε σκόνη χωρίς IAA, KINETIN και σακχαρόζη της εταιρίας SIGMA
2. Σακχαρόζη εμπορίου
3. Αυξίνες: Ναφθαλινοξικό οξύ (NAA), MB= 186.2, της εταιρίας SIGMA
Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA), MB= 203.2, της εταιρίας SIGMA
4. Παρεμποδιστής αυξίνης: 2,3,5-τριοδοβενζοϊκό οξύ (TIBA), MB = 499.8, της εταιρίας SIGMA
5. Κυτοκίνινες: N-6-Βενζυλαδενίνη (BA), MB= 225.25, της εταιρίας MERCK
6. Άγαρ, της εταιρίας Ρουμπουλάκης ΑΕ
7. Νιτρικό αμμώνιο, NH_4NO_3 , M.B.= 80.04, της εταιρίας Riedel-de Haen
8. Νιτρικό κάλιο, KNO_3 , M.B.=101.11, της εταιρίας MERCK
9. Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M.B.= 147.0, της εταιρίας SIGMA
10. Ένυδρο θεικό μαγνήσιο, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, M.B.= 246.48, της εταιρίας Mallinckrodt AR
11. Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4 , M.B.= 136.09, της εταιρίας Mallinckrodt
12. Ένυδρος θειικός σίδηρος, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, M.B.= 278.01, της εταιρίας Mallinckrodt
13. Na_2 EDTA, M.B.= 372.24, της εταιρίας Fluka A.G.
14. Θεικό μαγγάνιο, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, M.B.= 169.02, της εταιρίας MERCK
15. Ένυδρος θειϊκός ψευδάργυρος, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, M.B.= 287.54, της εταιρίας MERCK
16. Βορικό οξύ, H_3BO_3 , M.B.= 61.83, της εταιρίας Ρουμπουλάκης ΑΕ
17. Ιωδιούχο κάλιο, KI, M.B.= 166.00, της εταιρίας BDH Analar
18. Ένυδρο Μολυβδαινικό Νάτριο, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M.B.= 241.95, της εταιρίας MERCK
19. Ένυδρος θειικός χαλκός, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, M.B.= 249.68, της εταιρίας Mallinckrodt
20. Ένυδρο χλωριούχο κοβάλτιο, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, M.B.= 237.93, της εταιρίας MERCK
21. Μυοινοσιτόλη, M.B.= 180.16, της εταιρίας Mikrobiologie
22. Νικοτινικό οξύ, M.B.= 123.11, της εταιρίας MERCK
23. Πυριδοξίνη, M.B.= 205.64, της εταιρίας MERCK
24. Θιαμίνη, M.B.= 337.3, της εταιρίας SIGMA
25. Γλυσίνη, M.B.= 75.07, της εταιρίας MERCK

2.2.2.1.2 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων

Σε απεσταγμένο νερό προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες (αναλόγως του όγκου του υπό παρασκευή υποστρώματος) MS, σουκρόζης και φυτορρυθμιστικών ουσιών από “Stock”

διαλύματα (παρ. 2.2.2.1.3) και αναδεύονταν με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι να διαλυθούν. Ακολουθούσε η ογκομέτρηση (προσθήκη απεσταγμένου νερού ως τον επιθυμητό όγκο) και στη συνέχεια η ρύθμιση του pH στη τιμή 5.6 της κλίμακας. Στη συνέχεια προστίθετο το άγαρ και ακολουθούσε θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση μέχρι τη διάλυση του άγαρ. Το διάλυμα μοιραζόταν ανά 20 ml σε κάθε βάζο καλλιέργειας.

2.2.2.1.3 Παρασκευή “stock” διαλυμάτων φυτορυθμιστικών και άλλων ουσιών

Τα stock διαλύματα των φυτορυθμιστικών ουσιών περιείχαν την κάθε φυτορυθμιστική ουσία σε ποσοστό 10% (w/v).

1. 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 ζεστού (με βραστό νερό κρυστάλλωνε η ουσία) απεσταγμένου νερού.
2. Παρασκευή “stock” διαλύματος ζεατίνης. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg zeatin, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml απεσταγμένου νερού.
3. Παρασκευή “stock” διαλύματος TDZ. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg TDZ, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml απεσταγμένου νερού.
4. 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 προσθέτονταν 100 ml ζεστού απεσταγμένου νερού.
5. 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 βραστού απεσταγμένου νερού.
6. Παρασκευή “stock” διαλύματος TIBA. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml, τοποθετούνταν 10 mg TIBA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99.9%). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml βραστού απεσταγμένου νερού.

Για τη παρασκευή των υποστρωμάτων του MS με υποδιπλασιασμό και υποτετραπλασιασμό των αζωτούχων ενώσεων χρειάστηκε να δημιουργηθούν “stock” διαλύματα για πολλές ενώσεις λόγω των πολύ μικρών συγκεντρώσεων ουσιών που απαιτούνταν. Έγιναν “stock” διαλύματα στις KI, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6$

H₂O, Nicotinic acid, Pyridoxine.HCl και Thiamine.HCl. Η διάλυσή τους έγινε σε απεσταγμένο νερό.

Όλα τα “stock” διαλύματα αποθηκεύονταν σε ψυγείο στους 5° C για ένα μήνα το πολύ.

2.2.2.2 Υποστρώματα *ex vitro* καλλιέργειας

Καλά ανεπτυγμένα, ριζοβολημένα *in vitro* φυτάρια μεταφέρθηκαν *ex vitro* σε υπόστρωμα που αποτελείτο από τύρφη και περλίτη σε αναλογία 1:2 (v/v). Η τύρφη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Klasmann – Deilmann (Base Substrate 1 fine) με pH 6 χωρίς τη προσθήκη λιπασμάτων, ενώ ο περλίτης της εταιρείας Perloflor. Πριν τη χρήση του το εδαφικό υπόστρωμα απολυμάνθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) για 20 min, σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1.1 atm.

2.2.3 Μέθοδοι απολύμανσης, αποστείρωσης και εγκατάστασης φυτικού υλικού

2.2.3.1 Απολύμανση-εγκατάσταση εκφύτων

Πριν την τοποθέτηση των εκφύτων στο θρεπτικό υπόστρωμα, γινόταν επιφανειακή απολύμανση των ιστών. Γενικά, διαλέγονταν ιστοί υγιείς και πριν την απολύμανση πλένονταν με άφθονο τρεχούμενο νερό.

Οι βλαστοί των δεσμιωμένων μορφών κόβονταν, σε μικρά τεμάχια των 2-3 cm², ενώ των τυπικών μορφών σε βλαστούς των 2-3 cm και τοποθετούνταν σε καθαρή αιθυλική αλκοόλη για 15 sec. Στη συνέχεια τοποθετούνταν σε κωνική φιάλη με 200 ml αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό που περιείχε 15% χλωρίνη και 2-3 σταγόνες/100 ml Tween-20 (προσκολλητική ουσία), υπό συνεχή ανάδευση για 15 min, υπό ασηπτικές συνθήκες σε τράπεζα νηματικής ροής (laminar flow cabinet). Ακολουθούσε ξέπλυμα 3 φορές με 200 ml απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό. Κάθε ξέπλυμα διαρκούσε 3 min και γινόταν υπό συνεχή ανάδευση.

Η κοπή των εκφύτων γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε τράπεζα νηματικής ροής (Laminar flow cabinet), επάνω σε ήδη αποστειρωμένο πλακάκι. Η επιφάνεια πάνω στην οποία γινόταν η κοπή απολυμαίνονταν τακτικά με καθαρή αιθυλική αλκοόλη.

Τα έκφυτα τοποθετούνταν στο υπόστρωμα έτσι ώστε η επιφάνεια κοπής να έρχεται σε επαφή με αυτό.

2.2.3.2 Υλικά απολύμανσης ιστών

Για την επιφανειακή απολύμανση των εκφύτων χρησιμοποιούνται τα εξής υλικά :

α) αιθυλική αλκοόλη (95°)

β) χλωρίνη εμπορίου, που περιέχει NaOCl 4.5% σε διαθέσιμο χλώριο

γ) προσκολλητική ουσία Tween-20 (Polyxyethylenesorbitan Monolaurate) της εταιρείας MERCK

2.2.3.3 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών

Η αποστείρωση γινόταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) για 20 min, σε θερμοκρασία 121° C και πίεση 1.1 atm.

Όλα τα δοχεία με τα υποστρώματα καλύπτονταν με φύλλο αλουμινίου καθώς και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στις εμφυτεύσεις ή απολυμάνσεις όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκι πάνω στο οποίο γίνονταν οι κοπές των εκφύτων, κωνικές φιάλες και δοχεία με απεσταγμένο νερό. Τα διαφανή πλαστικά φίλμ με τα οποία καλύπτονταν τα βάζα μετά τη τοποθέτηση των εκφύτων τοποθετούνταν μέσα σε γυάλινα τρυβλία petri εναλλάξ με διηθητικό χαρτί και όλο το τρυβλίο σκεπαζόταν με φύλλο αλουμινίου. Βιδωτά καπάκια σε δοχεία τοποθετούνταν κατά την αποστείρωση χαλαρά κλεισμένα μέσα στον κλίβανο.

Μολυσμένα δοχεία καλλιέργειας πριν ανοιχτούν και πλυθούν αποστειρώνονταν για 40 min, σε θερμοκρασία 121 °C και σε πίεση 1.1 atm.

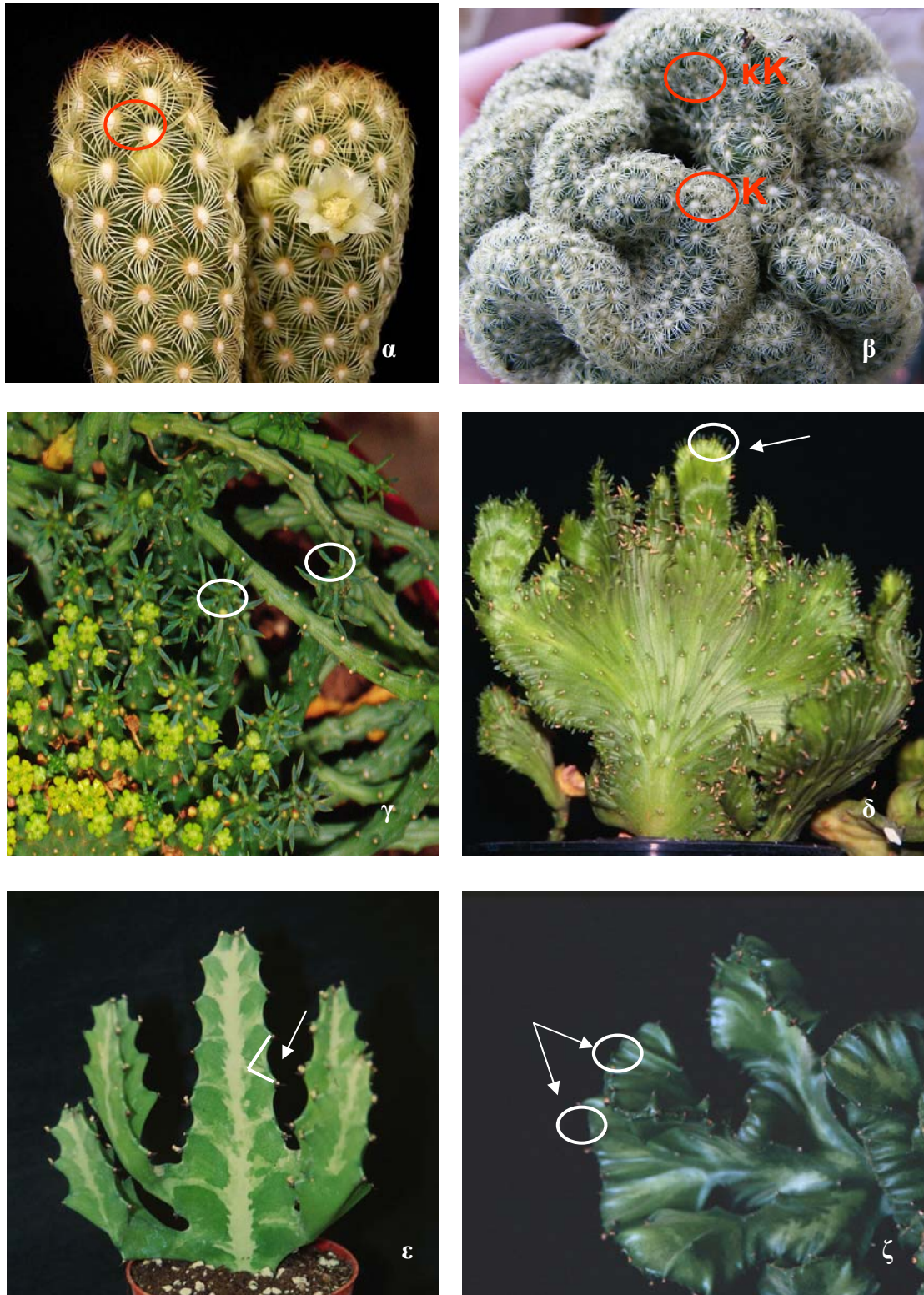
2.2.4 Έκφυτα

Ως έκφυτα της *M. elongata* χρησιμοποιούνταν φυμάτια και η περιοχή γύρω από αυτά (5x5mm), αφού πρώτα είχαν αφαιρεθεί-κοπεί τα αγκάθια που έφερε το φυμάτιο. Τα έκφυτα προέρχονταν από τα κορυφαία 2 cm του βλαστού (Εικ. 15α). Τα έκφυτα που χρησιμοποιούνταν στην περίπτωση της κανονικής μορφής της *E. rugniformis* ήταν εγκάρσιες τομές δευτερευόντων βλαστών πάχους 5 mm, που περιελάμβαναν ένα φυμάτιο καθώς και τη γύρω περιοχή από αυτό (Εικ. 15γ). Τα έκφυτα και στις δύο κανονικές μορφές προέρχονταν είτε από την κορυφή του βλαστού (έκφυτα κορυφής), είτε από την περιοχή 1 cm κάτω από αυτή (έκφυτα βάσης). Στην κανονική μορφή της *E. lactea* τα έκφυτα προέρχονταν από την περιοχή μεταξύ των δύο ζευγών αγκαθιών (Εικ. 15ε).

Στη δεσμιωμένη μορφή της *M. elongata* χρησιμοποιούνταν τρία φυμάτια μαζί και η περιοχή γύρω από αυτά (7x7mm), αφού πρώτα είχαν αφαιρεθεί-κοπεί τα αγκάθια που έφερε το κάθε φυμάτιο. Τα έκφυτα χωρίστηκαν σε έκφυτα κορυφής (Κ) όπου κόβονταν κατά μήκος της ζώνης που αποτελεί το κορυφαίο μερίστωμα και σε έκφυτα μέσης (κΚ) όπου κόβονταν 1 cm κάτω από τη ζώνη του κορυφαίου μεριστώματος (Εικ. 15β). Στη *cristata* μορφή της *E. rugniformis* τα έκφυτα κορυφής ήταν τμήματα φυτικού ιστού 5x5 mm, όπου κόβονταν κατά μήκος της ζώνης που αποτελεί το κορυφαίο μερίστωμα, κάθετα προς αυτό, έτσι ώστε κάθε

έκφυτο να περιλαμβάνει 4-5 φυμάτια (έκφυτα κορυφής) (Εικ. 15δ). Λόγω έλλειψης φυτικού υλικού της *E. lactea* χρησιμοποιήθηκαν μόνο έκφυτα κορυφής που κόβονταν με παρόμοιο τρόπο με αυτό της *E. pugniiformis* var. *cristata* (Εικ. 15ζ). Στην *E. lactea* var. *cristata* “*Grey Ghost*” χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής.

Στις υποκαλλιέργειες των *cristata* μορφών, το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν βλαστοί με τη χαρακτηριστική μορφή *cristata*, οι οποίοι προέρχονταν από την αρχική εμφύτευση και από τους οποίους κόπηκαν έκφυτα κορυφής όπως περιγράφηκε παραπάνω για τα *ex vitro* φυτά.



Εικ. 15. Έκφυτα κορυφής της *Mammillaria elongata* (α), έκφυτα κορυφής (K) και μέσης (κK) της *M. elongata* var. *crystata* (β), κορυφής της *Euphorbia pugniformis* κανονικής (γ) και δεσμιωμένης μορφής (δ), και έκφυτα της *E. lactea* κανονικής (ε) και δεσμιωμένης μορφής (ζ).

2.2.5 Συνθήκες καλλιέργειας

2.2.5.1 Συνθήκες *in vivo* καλλιέργειας

Τα φυτά (μητρικά και εγκλιματισμένα *ex vitro* φυτάρια) καλλιεργούνταν στο γυάλινο θερμαινόμενο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου με κατά μέσο όρο $T_{\text{ημέρας}}$ 25 °C και $T_{\text{νύχτας}}$ 15 °C.

2.2.5.2 Συνθήκες επώασης

Όλα τα έκφυτα επωάζονταν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με ένταση φωτός περί τα 4000 lux ($37.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), φωτοπερίοδο 16 h και θερμοκρασία 25 °C, ενώ η υγρασία του θαλάμου ήταν γύρω στο 50%.

2.2.5.3 Δοχεία *in vitro* καλλιέργειας

Σ' όλα τα στάδια καλλιέργειας *in vitro* χρησιμοποιήθηκαν βάζα που είχαν όγκο 80 ml, από διαφανές γυαλί, χωρίς καπάκι. Για καπάκι χρησιμοποιήθηκε διαφανές πλαστικό φιλμ από PVC σχήματος κυκλικού δίσκου διαμέτρου 4 cm μεγαλύτερης από τη διάμετρο του βάζου, που σταθεροποιείτο με τη βοήθεια κοινών ελαστικών δακτυλίων. Κατά την καλλιέργεια κάθε βάζο περιείχε 20 ml θρεπτικού υποστρώματος.

2.2.5.4 Μεταφύτευση φυταρίων

Μετά την λήψη των τελικών αποτελεσμάτων από τα πειράματα βλαστογένεσης, κάποιοι από τους αναγεννημένους βλαστούς μεταφέρονταν σε υπόστρωμα ριζοβολίας για την έκπτυξη ριζών.

Φυτάρια έριζα, αλλά και όσα δε ανέπτυξαν ρίζες κατά την παραμονή τους στο υπόστρωμα ριζοβολίας, τοποθετούνταν *ex vitro* σε εδαφικό υπόστρωμα τύρφης : περλίτη 1:2, αφού προηγουμένως πλένονταν οι ρίζες τους πολύ καλά με νερό, για να φύγει τελείως το θρεπτικό υπόστρωμα από αυτές, ώστε να μειωθούν οι μολύνσεις από παθογόνα εδάφους. Μετά την μεταφύτευση των φυταρίων, το υπόστρωμά τους ποτιζόταν καλά και ακολουθούσε ριζοπότισμα με μυκητοκτόνο (Benlate της εταιρείας Dupont).

Την πρώτη εβδομάδα τα φυτάρια τοποθετούνταν στην υδρονέφωση, με θερμοκρασία υποστρώματος 26 °C στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, καλυμμένα τελείως με διαφανές πλαστικό κουτί, ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη δυνατή υγρασία. Μετά την πρώτη εβδομάδα, το πλαστικό άρχιζε να αφαιρείται σταδιακά και

τελικά απομακρυνόταν τελείως, οπότε τα φυτάρια έβγαιναν από την υδρονέφωση και τοποθετούνταν σε πάγκο καλλιέργειας του γυάλινου, θερμαινόμενου θερμοκηπίου.

2.2.6 Πειραματικό Σχέδιο - Εκτίμηση αποτελεσμάτων – Στατιστική επεξεργασία

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το Εντελώς Τυχαίοποιημένο Σχέδιο (η τοποθέτηση των εκφύτων έγινε τυχαία στα διάφορα βάζα καλλιέργειας, καθώς τυχαία ήταν και η τοποθέτηση των βάζων καλλιέργειας στο θάλαμο επώασης).

Τα αποτελέσματα σε πειράματα βλαστογένεσης καταγράφονταν 2 μήνες μετά την εμφύτευση των εκφύτων. Μέσα σε 20 ημέρες μετά την εμφύτευση στη *E. pugniformis* var. *cristata*, ήταν ορατοί οι πρώτοι βλαστοί τύπου *cristata*, ενώ στις άλλες δύο δεσμιωμένες μορφές (*M. elongata* var. *cristata* και *E. lactea* var. *cristata*) ήταν εμφανή μετά τον πρώτο μήνα. Στις κανονικές μορφές των *M. elongata* και *E. pugniformis*, οι πρώτοι βλαστοί ήταν ορατοί 30 ημέρες μετά από την εμφύτευση, ενώ η βλαστογένεση στην *E. lactea* παρατηρήθηκε δύο μήνες μετά την εμφύτευση. Γινόταν καταγραφή του ποσοστού βλαστογένεσης (αριθμός εκφύτων που έδωσε βλαστούς επί τις εκατό), του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε, το ποσοστό καλογένεσης (αριθμός εκφύτων που σχημάτισαν κάλο επί τις εκατό). Για την καλύτερη εκτίμηση της αντίδρασης των εκφύτων υπολογίστηκε και το γινόμενο πολλαπλασιασμού, ως το γινόμενο του ποσοστού αντίδρασης των εκφύτων, επί του αριθμού βλαστών που παρήχθησαν ανά έκφυτο που αντέδρασε.

Τα αποτελέσματα σε πειράματα ριζοβολίας καταγράφονταν ένα μήνα από την εμφύτευση των βλαστών στα υποστρώματα ριζοβολίας και καταγραφόταν το ποσοστό ριζοβολίας (αριθμός εκφύτων που έδωσαν ρίζες επί τις εκατό) και ο μέσος αριθμός ριζών ανά έκφυτο.

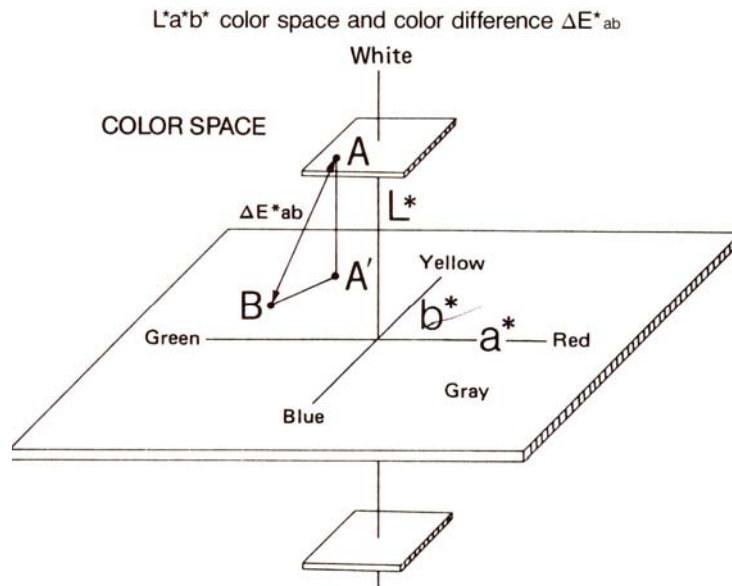
Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων στα πειράματα βλαστογένεσης έγινε με διπαραγοντική και μονοπαραγοντική ανάλυση της διασποράς (ANOVA) (οι δύο παράγοντες ήταν τα δύο είδη φυτορρυθμιστικών ουσιών στις οποίες τοποθετήθηκαν τα έκφυτα). Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων δημιουργήθηκε ένας πίνακας για κάθε πείραμα που περιέχει τον μέσο όρο βλαστών ανά επέμβαση, καθώς και τις τιμές του F για τις κύριες επιδράσεις των δύο παραγόντων, όπως και τη τιμή του F της αλληλεπίδρασής τους. Το “*” δίπλα στη τιμή του F δηλώνει ότι η τιμή του F είναι σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας (P) 5 %, ενώ η ένδειξη “NS” δηλώνει ότι η τιμή του F δεν είναι σημαντική σε επίπεδο 5 %. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε επίπεδο 5 %.

Στα πειράματα ριζοβολίας χρησιμοποιήθηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Μονοπαραγοντικό Σχέδιο, με εξεταζόμενο παράγοντα τη συγκέντρωση της αυξίνης, IBA, που περιείχαν τα υποστρώματα ριζοβολίας.

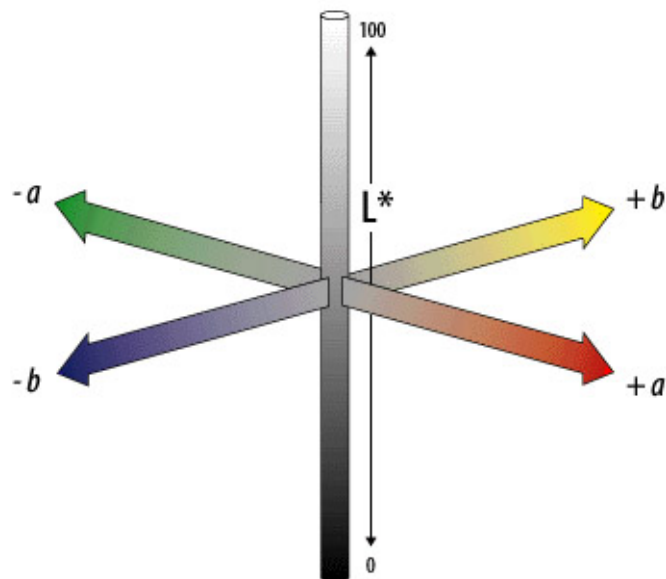
Τέλος, έγινε σύγκριση των μέσων των παραγόντων (διπαραγοντική ανάλυση) αλλά και των μέσων όλων των επεμβάσεων (μονοπαραγοντική ανάλυση) με την μέθοδο των Tukey-Kramer (HSD). Οι μέσοι που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σημειώνονται με διαφορετικά γράμματα του λατινικού αλφάβητου στους πίνακες των αποτελεσμάτων ή στα σχήματα.

2.2.7 Προσδιορισμός του χρώματος φυταρίων της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”

Μετρήθηκε το χρώμα σε φυτάρια της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” που προέρχονταν από συνεχείς υποκαλλιέργειες με χρωματόμετρο Minolta (Model CR-300, Minolta Co. Ltd., Osaka). Το όργανο αποδίδει το χρώμα με τις παραμέτρους L^* , a^* και b^* . Η παράμετρος L^* εκφράζει τη φωτεινότητα του χρώματος, η παράμετρος a^* εκφράζει τη διαβάθμιση του χρώματος από το πράσινο (αρνητικές τιμές) στο κόκκινο (θετικές τιμές) και η παράμετρος b^* εκφράζει τη διαβάθμιση του χρώματος από το μπλε (αρνητικές τιμές) στο κίτρινο (θετικές τιμές) (Σχήμα 6). Ο αρνητικός λόγος $-a^*/b^*$ σχετίζεται με την περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη, με τις μεγαλύτερες τιμές να αντιστοιχούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις χλωροφύλλης (Alexopoulos *et al.*, 1995). Οι μετρήσεις (L^* , a^* και b^*) ελήφθησαν σε τέσσερα φυτάρια κάθε υποκαλλιέργειας σε δύο διαφορετικά σημεία του φυταρίου. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των τιμών που ελήφθησαν από 6 φυτάρια κάθε υποκαλλιέργειας και υπολογίστηκε επίσης η χροιά του χρώματος h^* (hue saturation), βάση του τύπου, $h^* = (\arctan(b^*/a^*) + 180^\circ)$, εφόσον η τιμές του a^* είναι αρνητικές. Στο Σχήμα 7 φαίνεται η χρωματική χροιά σε τρισδιάστατη απεικόνιση σε συνδυασμό με τη φωτεινότητα.



Σχ. 6: Απεικόνιση των λαμβανομένων μετρήσεων με το χρωματόμετρο Minolta εκφρασμένες με τις συντεταγμένες L, a, b.



Σχ. 7. Η χρωματική χροιά σε τρισδιάστατη απεικόνιση σε συνδυασμό με τη φωτεινότητα

2.3 Αποτελέσματα διερεύνησης της συμπεριφοράς κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό

2.3.1 *In vitro* πολλαπλασιασμός της *Mammillaria elongata*

Η πρώτη αναφορά *in vitro* πολλαπλασιασμού της *M. elongata* έγινε το 1979 από τους Johnson και Emimo οι οποίοι έκαναν αναγέννηση βλαστών σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών (10 mg l⁻¹ NAA και 60 mg l⁻¹ BA). Ένα χρόνο μετά οι Mechra και Cheema (1980) πολλαπλασίασαν τη ποικιλία “*tenuis*” της *M. elongata* από βλαστούς σε ανθοφορία με μικρότερες συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών (2 mg l⁻¹ NAA και 2 mg l⁻¹ BAP). Σε δικά μας πειράματα Parafotiou *et al.* (2001) παρατηρήθηκε βλαστογένεση στη *M. elongata* σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις των Johnson και Emimo (1979), ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις που αναφέρουν αυτοί οι ερευνητές έδωσαν ανοιχτοπράσινο υδαρή κάλο (Parafotiou *et al.*, 2001). Σκοπός των παρακάτω πειραμάτων ήταν η δημιουργία ενός πρωτοκόλλου *in vitro* πολλαπλασιασμού της *M. elongata* που να αποτελεί μοντέλο σύγκρισης για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της δεσμιωμένης μορφής της. Ταυτόχρονα ερευνήθηκε εάν η εποχή λήψης των εκφύτων σε σχέση με την ανθοφορία του είδους επηρεάζει την οργανογένεση *in vitro*.

Φυμάτια της *M. elongata* (παρ. 2.2.4) καλλιεργήθηκαν τέλος Οκτωβρίου, μετά τη φθινοπωρινή άνθηση, τέλος Φεβρουαρίου, πριν την ανοιξιάτικη άνθηση, τέλος Μαΐου, μετά την ανοιξιάτικη άνθηση και τέλος Ιουνίου σε εννέα συνδυασμούς τριών συγκεντρώσεων NAA (0.2, 1.0 και 5.0 mg l⁻¹) και τριών συγκεντρώσεων BA (2.5, 5.0 και 10 mg l⁻¹). Σε όλους τους συνδυασμούς φυτορρυθμιστικών ουσιών σχηματίστηκε κάλος ένα μήνα μετά την καλλιέργεια και αναγέννηση βλαστών πάνω στον κάλο. Για την καλύτερη εκτίμηση της αντίδρασης των εκφύτων υπολογίστηκε το γινόμενο πολλαπλασιασμού, ως το γινόμενο του ποσοστού εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς επί του μέσου αριθμού των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε.

Φυμάτια που ελήφθησαν τέλος Οκτωβρίου, τέλος Φεβρουαρίου και τέλος Ιουνίου σχημάτισαν το μεγαλύτερο μέσο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο και είχαν το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης, όταν καλλιεργήθηκαν σε 0.2 mg l⁻¹ NAA και 2.5 ή 5.0 mg l⁻¹ BA (Πίν. 10). Φυμάτια που πάρθηκαν τέλος Μαΐου σχημάτισαν μόνο κάλο. Υψηλότερα ποσοστά εκφύτων που αντέδρασαν σχηματίζοντας βλαστούς παρατηρήθηκαν τον Οκτώβριο και Ιούνιο σε σχέση με το Φεβρουάριο.

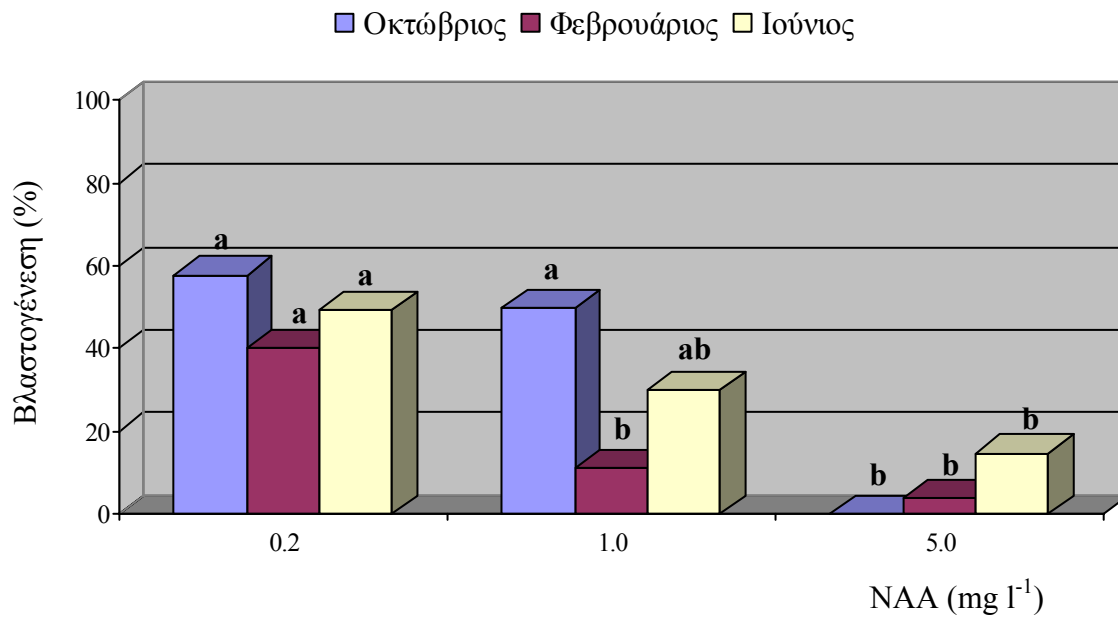
Η συγκέντρωση των φυτορρυθμιστικών ουσιών επηρέασε σημαντικά το ποσοστό βλαστογένεσης καθώς και τον αριθμό των αναγεννημένων βλαστών (Σχ. 8 και 9).

Πίν. 10. Ποσοστό εκφύτων *M. elongata* που αντέδρασαν σχηματίζοντας βλαστούς, μέσος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο και γινόμενο πολλαπλασιασμού μετά από 60 ημέρες καλλιέργειας, σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA, τον Οκτώβριο, τον Φεβρουάριο και τον Ιούνιο. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

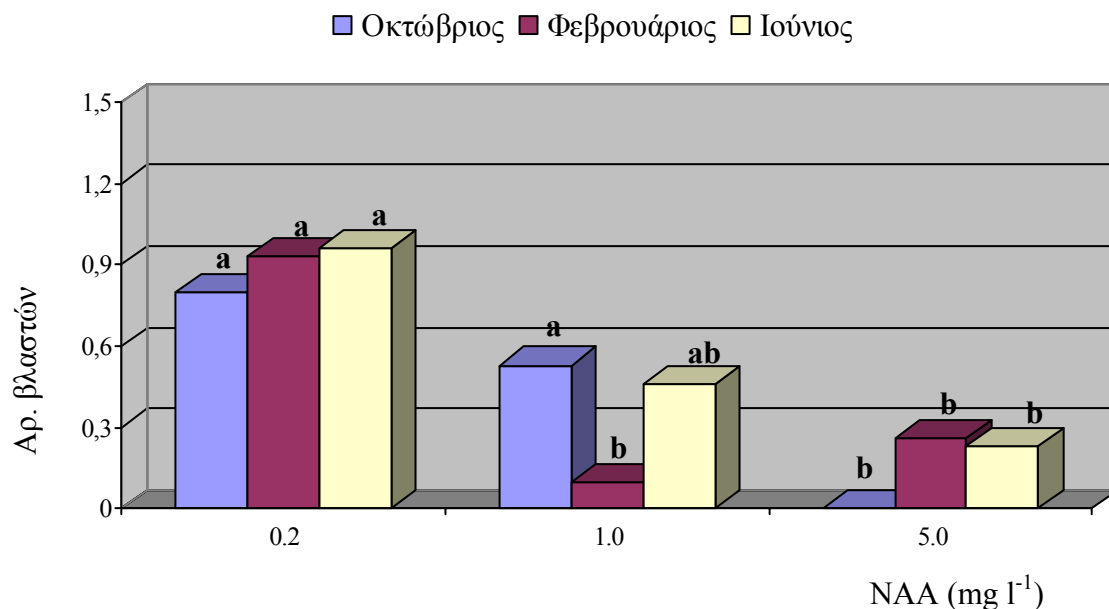
Συγκέντρωση (mg l ⁻¹)		Βλαστογένεση (%)			Μ. αρ. Βλαστών/ Έκφυτο			Γινόμενο Πολλαπλασιασμού		
NAA	BA	Οκτ.	Φεβ.	Ιούν.	Οκτ.	Φεβ.	Ιούν.	Οκτ.	Φεβ.	Ιούν.
0.2	2.5	50ab	50ab	71b	1.3b	1.2 a	0.7ab	0.65	0.35	0.85
1.0	2.5	50ab	22ab	44ab	0.5ab	0.8 a	0.2a	0.25	0.04	0.35
5.0	2.5	0a	0a	0a	0.0a	0.0 a	0.0a	0.00	0.00	0.00
0.2	5.0	88b	35ab	44ab	1.7b	0.9 a	0.9ab	1.50	0.31	0.39
1.0	5.0	35ab	0a	35ab	0.5ab	0.5 a	0.0a	1.17	0.00	0.17
5.0	5.0	0a	64b	33ab	0.0a	0.6 a	0.6ab	0.00	0.38	0.19
0.2	10	35ab	35ab	33ab	0.4a	0.8 a	1.2b	0.14	0.42	0.26
1.0	10	64ab	11a	11a	0.6ab	0.1 a	0.1a	0.38	0.01	0.01
5.0	10	0a	11a	11a	0.0 a	0.1 a	0.1a	0.00	0.01	0.01
		F _{NAA} *	F _{NAA} *	F _{NAA} *	F _{NAA} *	F _{NAA} *	F _{NAA} *			
		F _{BA} *	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} *	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} *	F _{BA} ^{NS}			
		F _{NXB} *	F _{NXB} *	F _{NXB} *	F _{NXB} *	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} *			

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.

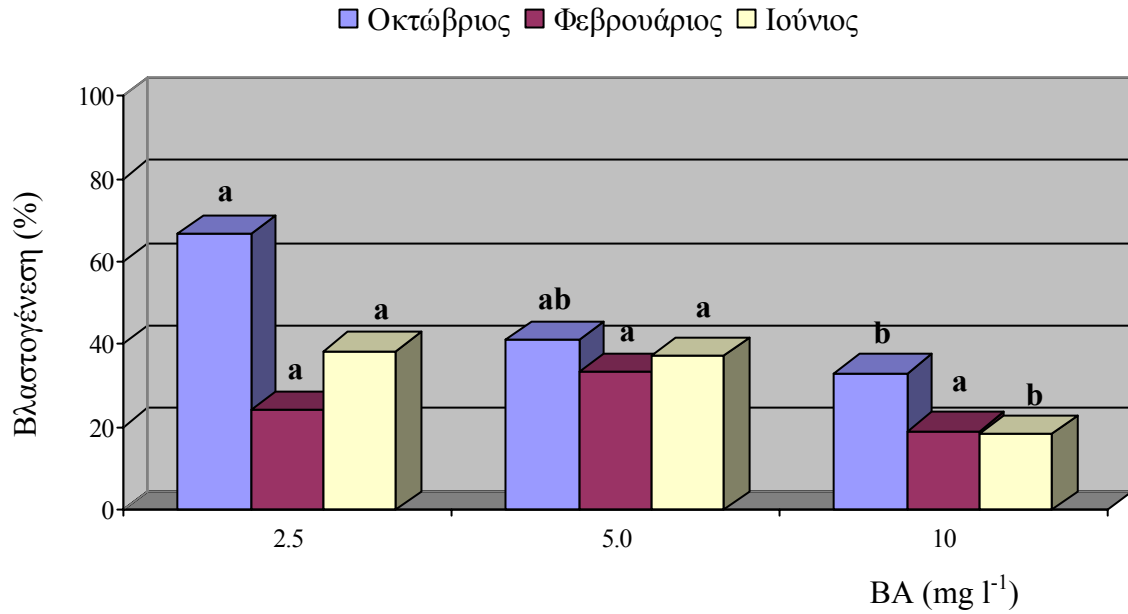
Μελετώντας τα επίπεδα της αυξίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα και στις τρεις εποχές καλλιέργειας φαίνεται ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης της αυξίνης από 0.2 σε 5 mg l⁻¹ μειώθηκε το ποσοστό των εκφύτων που έδωσαν βλαστούς καθώς και ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών (Σχ. 8 και 9). Ιδίως το Φεβρουάριο, η αύξηση της συγκέντρωσης της αυξίνης ακόμη και στο 1 mg l⁻¹, παρεμπόδισε έντονα τη βλαστογένεση. Η αύξηση της συγκέντρωσης του BA τον Οκτώβριο και Ιούνιο από 2.5 σε 5.0 μείωσε το ποσοστό των εκφύτων που έδωσε βλαστούς καθώς και τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών, ενώ το Φεβρουάριο δε φάνηκε να επηρέασε τη βλαστογένεση (Σχ. 10 και 11).



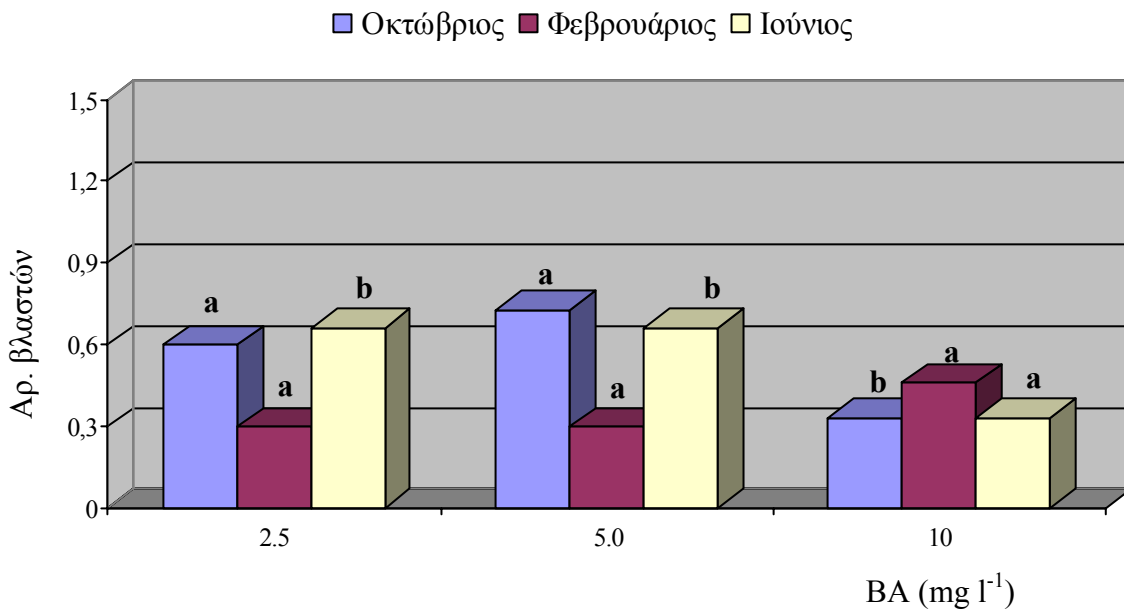
Σχ. 8. Επίδραση του NAA στη βλαστογένεση κατά τις διάφορες εποχές λήψης εκφύτων *M. elongata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Σχ. 9. Επίδραση του NAA στον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν κατά τις διάφορες εποχές λήψης εκφύτων *M. elongata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Σχ. 10. Επίδραση του BA στη βλαστογένεση κατά τις διάφορες εποχές λήψης εκφύτων *M. elongata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



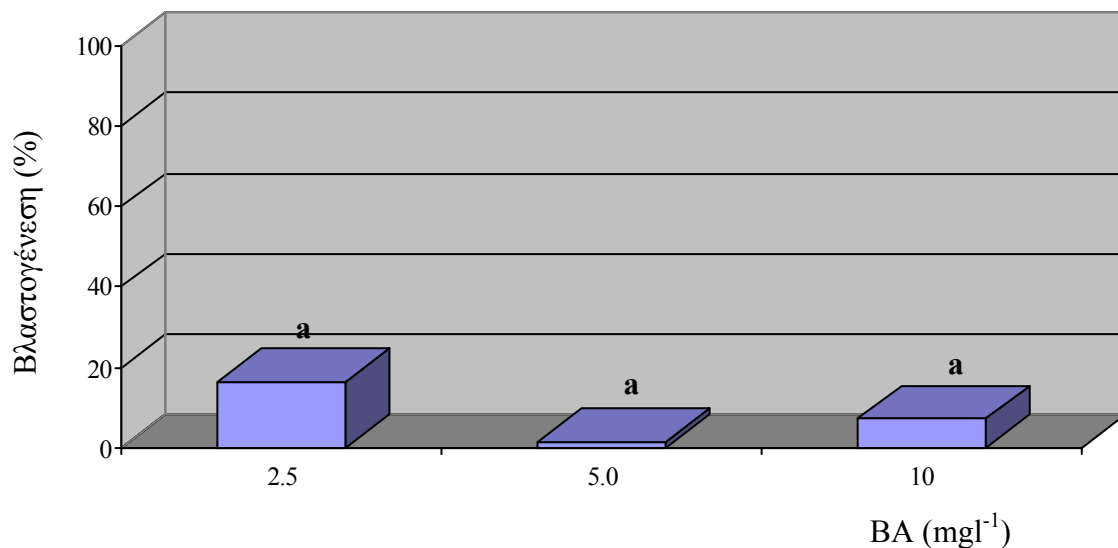
Σχ. 11. Επίδραση του BA στον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν κατά τις διάφορες εποχές λήψης εκφύτων *M. elongata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

2.3.1.1 Επίδραση χαμηλότερων συγκεντρώσεων NAA κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *Mammillaria elongata*

Η χαμηλή βλαστογενετική ικανότητα των εκφύτων το Φεβρουάριο και το ότι αυξανόμενη της συγκέντρωσης NAA μειώθηκε η βλαστογένεση και ο αριθμός των αναγεννημένων βλαστών, οδήγησε στο να εξεταστεί η επίδραση χαμηλότερων συγκεντρώσεων NAA (0.0, 0.1 και 0.2 mg l⁻¹), σε συνδυασμό με τις ίδιες συγκεντρώσεις BA.

Έτσι, έκφυτα *M. elongata* καλλιεργήθηκαν *in vitro* το Φεβρουάριο σε στερεό υπόστρωμα MS με 0, 0.1 και 0.2 mg l⁻¹ NAA και 2.5, 5 και 10 mg l⁻¹ BA σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς.

Βλαστοί σχηματίστηκαν κατευθείαν πάνω στο έκφυτο και όχι μέσω κάλου. Σε μερικά έκφυτα παρατηρήθηκε επίσης η έκπτυξη άνθους, τυχαία σε ότι αφορά στα υποστρώματα καλλιέργειας. Οι υψηλές συγκεντρώσεις BA σε συνδυασμό με τις χαμηλές συγκεντρώσεις NAA έδωσαν υψηλά ποσοστά σχηματισμού κάλου. Αν και τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά υπήρξε η ένδειξη ότι το ποσοστό βλαστογένεσης επηρεάστηκε αρνητικά από την αύξηση του BA στο υπόστρωμα (Πίν. 11, Σχ. 12).



Σχ. 12. Επίδραση του BA στη βλαστογένεση εκφύτων *M. elongata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

Πίν. 11. Ποσοστό εκφύτων *M. elongata* που αντέδρασαν σχηματίζοντας βλαστούς και ποσοστό εκφύτων που σχημάτισαν κάλο, μετά από 60 ημέρες καλλιέργειας σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA, το Φεβρουάριο. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

Συγκέντρωση (mg l ⁻¹)		Βλαστογένεση (%)	Καλογένεση (%)
NAA	BA	Φεβ.	Φεβ.
0.0	2.5	16.6 a	77.7 a
0.1	2.5	22.2 a	77.7 a
0.2	2.5	11.1 a	77.7 a
0.0	5.0	0.0 a	100 a
0.1	5.0	5.5 a	77.7 a
0.2	5.0	0.0 a	88.8 a
0.0	10	11.1 a	83.3 a
0.1	10	0.0 a	100 a
0.2	10	11.1 a	83.3 a
		F_{NAA}^{NS}	F_{NAA}^{NS}
		F_{BA}^{NS}	F_{BA}^{NS}
		F_{NXB}^{NS}	F_{NXB}^{NS}

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.

2.3.1.2 Υποκαλλιέργεια κάλου *Mammillaria elongata*

Οι Johnson και Emínio (1979) ανέφεραν ότι παρατηρήθηκε βλαστογένεση από κάλο *M. elongata* σε ασυνίθιστα υψηλές συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών (60 mg l⁻¹ NAA και 80 mg l⁻¹ BA). Εδώ διερευνήθηκε η βλαστογένεση από κάλο σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών.

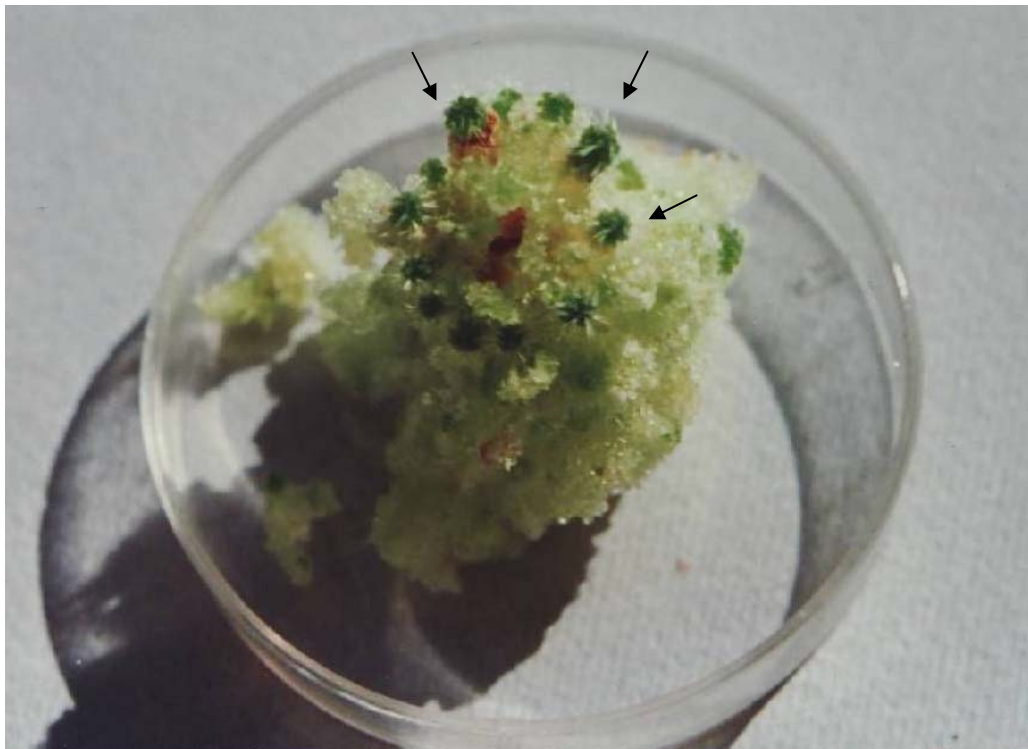
Έτσι, κάλος που σχηματίστηκε σε διάφορα υποστρώματα καλλιέργειας *M. elongata* τεμαχίστηκε και τοποθετήθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0.2 mg l⁻¹ NAA και 2.5 ή 5 mg l⁻¹ BA (υποστρώματα που έδωσαν υψηλά ποσοστά βλαστογένεσης, κεφ. 2.3.1). Μετά από 60 ημέρες μετρήθηκε ο αριθμός των βλαστών που παράχθηκε και ο κάλος υποκαλλιεργήθηκε για δεύτερη φορά, μετά απ' το τεμαχισμό του στα τέσσερα.

Και στις δυο υποκαλλιέργειες παρατηρήθηκε σχηματισμός βλαστών από κάλο σε όλα τα έκφυτα (Πίν. 12, Εικ. 16). Στην πρώτη υποκαλλιέργεια περισσότεροι βλαστοί σχηματίστηκαν στο υπόστρωμα που περιείχε 5 mg l⁻¹ BA, ενώ η δεύτερη υποκαλλιέργεια έδωσε υψηλό αριθμό αναγεννημένων βλαστών και στα δύο υποστρώματα.

Πίν. 12. Μέσος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο μετά από δυο υποκαλλιέργειες *in vitro* κάλου της *M. elongata*, μετά από 60 ημέρες καλλιέργειας σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

Συγκέντρωση (mg l ⁻¹)		Αριθμός Βλαστών	
NAA	BA	1 ^η Υποκαλλιέργεια	2 ^η Υποκαλλιέργεια
0.2	2.5	1.66 a	2.55 b
0.2	5.0	2.66 b	2.37 b
		F _{BA} * F _{NXB} ^{NS}	F _{BA} ^{NS} F _{NXB} ^{NS}

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.



Εικ. 16. Αναγέννηση βλαστών από καλλιέργεια κάλου *M. elongata*

2.3.2 *In vitro* πολλαπλασιασμός της *Mammillaria elongata* var. *cristata*

Οι δεσμιωμένες μορφές των παχύφυτων πολλαπλασιάζονται κυρίως με μοσχεύματα ή εμβολιασμό. Το μεγαλύτερο πρόβλημα είναι ότι δεν υπάρχει αρκετό πολλαπλασιαστικό υλικό. Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός θα έλυne το πρόβλημα αυτό. Σε ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, ενώ πολλά παχύφυτα έχουν πολλαπλασιαστεί *in vitro*, καμία αναφορά (πέραν όσων προέκυψαν από τη παρούσα μελέτη) δεν έχει γίνει για μικροπολλαπλασιασμό δεσμιωμένων μορφών τόσο στα παχύφυτα όσο και σε άλλα είδη φυτών. Το ερώτημα είναι κατά πόσον οι φυτορρυθμιστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια θα επηρεάσουν τη διατήρηση της *cristata* μορφής. Στόχος λοιπόν των πειραμάτων ήταν αφ' ενός η δημιουργία ενός πρωτοκόλου για τη παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών με ιστοκαλλιέργεια, αλλά ταυτόχρονα η διερεύνηση της συμπεριφοράς της *cristata* μορφής σε σύγκριση με την κανονική μορφή, σε *in vitro* συνθήκες.

Συνδυασμοί φυτορρυθμιστικών ουσιών που έδωσαν καλή βλαστογένεση στην κανονική μορφή της *M. elongata* (0.2 mg l^{-1} NAA με 2.5 ή 5 mg l^{-1} BA) (κεφ. 2.3.1) δοκιμάστηκαν και στην καλλιέργεια της δεσμιωμένης μορφής της *M. elongata* με έκφυτα φυμάτια κορυφής (κεφ. 2.2.4) που ελήφθησαν τον Οκτώβριο. Αποτέλεσμα ήταν ο σχηματισμός ανοιχτόχρωμου πρασινοκίτρινου, υαλώδους κάλου χωρίς δημιουργία βλαστών. Λόγω αυτού του αποτελέσματος δοκιμάστηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών με στόχο τη βλαστογένεση.

Έτσι έκφυτα κορυφής που προέρχονταν από το κορυφαίο μερίστωμα και περιελάμβαναν 2-3 φυμάτια (K) και έκφυτα μέσης που προέρχονταν από την περιοχή ακριβώς κάτω από το κορυφαίο μερίστωμα (κK) (κεφ. 2.2.4) καλλιεργήθηκαν τον Οκτώβριο και το Φεβρουάριο σε 16 διαφορετικά υποστρώματα με συνδυασμό τεσσάρων συγκεντρώσεων NAA (0.0 , 0.1 , 0.2 και 0.5 mg l^{-1}) και τεσσάρων συγκεντρώσεων BA (0.0 , 0.1 , 0.2 και 0.5 mg l^{-1}). Σχεδόν το 100% των εκφύτων της κορυφής και το 50-70% των εκφύτων της μέσης αντέδρασαν σχηματίζοντας είτε έναν δεσμιωμένο βλαστό ή έναν κανονικό βλαστό ή μόνο κάλο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους Πίνακες 13 και 14.

Πίν. 13. Ποσοστό εκφύτων κορυφής (Κ) ή μέσης (κΚ) της *M. elongata* var. *cristata* που έδωσαν *cristata* και κανονικούς βλαστούς, όταν καλλιεργήθηκαν σε MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις NAA και BA τον Οκτώβριο και το Φεβρουάριο. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

Συγκέντρωση (mg l ⁻¹)		Οκτώβριος				Φεβρουάριος	
		<i>Cristata</i> Βλαστός (%)		Κανονικός βλαστός (%)		<i>Cristata</i> Βλαστός (%)	Κανονικός Βλαστός (%)
NAA	BA	Κ	κΚ	Κ	κΚ	Κ	Κ
0.0	0.0	38ab	17ab	13a	33ab	15 ab	54 b
0.1	0.0	33a	6a	0a	27ab	13 a	53 b
0.2	0.0	100 b	17ab	0a	17ab	60 ab	20 a
0.5	0.0	33a	50ab	33b	0a	--	--
0.0	0.1	50ab	22ab	33b	33ab	71 b	0 a
0.1	0.1	100 b	25ab	0a	53 b	67 b	8 a
0.2	0.1	33a	11ab	0a	17ab	50 ab	0 a
0.5	0.1	50ab	23ab	0a	8ab	--	--
0.0	0.2	100 b	--	0a	--	47 ab	0 a
0.1	0.2	75ab	27ab	17ab	20ab	29 ab	7 a
0.2	0.2	50ab	8ab	0a	17ab	29 ab	0 a
0.5	0.2	33a	56b	0a	11ab	--	--
0.0	0.5	67ab	14ab	0a	53 b	--	--
0.1	0.5	25a	22ab	0a	22ab	--	--
0.2	0.5	33a	0a	0a	0a	--	--
0.5	0.5	33a	33ab	0a	0a	--	--
		F _{NAA} *	F _{NAA} *	F _{NAA} *	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}
		F _{BA} *	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} *	F _{BA} *	F _{BA} *	F _{BA} *
		F _{NXB} *	F _{NXB} *	F _{NXB} *	F _{NXB} *	F _{NXB} *	F _{NXB} *

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.

-- μη καταγεγραμμένη τιμή

Πίν. 14. Μέσος αριθμός *cristata* και κανονικών βλαστών που σχηματίστηκαν πάνω σε έκφυτα της *M. elongata* var *cristata*, από φυμάτια κορυφής (Κ) ή κάτω από την κορυφή (κΚ) του βλαστού, που καλλιεργήθηκαν σε MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις NAA και BA τον Οκτώβριο και το Φεβρουάριο. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

Συγκέντρωση (mg l ⁻¹)		Οκτώβριος				Φεβρουάριος	
		<i>Cristata</i> Βλαστός		Κανονικός βλαστός		<i>Cristata</i> Βλαστός	Κανονικός βλαστός
NAA	BA	Κ	κΚ	Κ	κΚ	Κ	Κ
0.0	0.0	2.0 bc	1.5 b	9.0abc	3.5ab	1.0 a	3.5a
0.1	0.0	1.0abc	2.0 b	8.0abc	4.5ab	0.5 a	1.0a
0.2	0.0	2.0 c	0.0a	4.0a	0.0a	1.3 a	3.7a
0.5	0.0	0.5ab	0.0a	4.6abc	0.0a	--	--
0.0	0.1	0.9ab	0.5a	4.5abc	7.5ab	1.1 a	4.9ab
0.1	0.1	1.5 bc	0.0a	10.3 c	0.0a	1.8 a	3.6ab
0.2	0.1	0.0a	0.5a	0.0a	4.0ab	1.4 a	7.6ab
0.5	0.1	0.9ab	0.0a	9.8 b	0.0a	--	--
0.0	0.2	2.0 bc	--	5.3abc	--	1.6 a	5.7b
0.1	0.2	1.0abc	0.0a	7.2abc	8.0ab	1.3 a	8.7b
0.2	0.2	0.3a	1.0 b	0.0a	7.0ab	2.0 a	7.2b
0.5	0.2	0.0a	1.0 b	0.0a	10 b	--	--
0.0	0.5	1.5abc	0.0a	2.8a	0.0a	--	--
0.1	0.5	1.0abc	1.0 b	4.0a	5.0ab	--	--
0.2	0.5	0.7ab	--	4.0a	--	--	--
0.5	0.5	0.4a	0.0a	7.5abc	0.0a	--	--
		F _{NAA} *	F _{NAA} *	F _{NAA} *	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}
		F _{BA} *	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} *	F _{BA} *	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} *
		F _{NXB} *	F _{NXB} *	F _{NXB} *	F _{NXB} *	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} *

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.

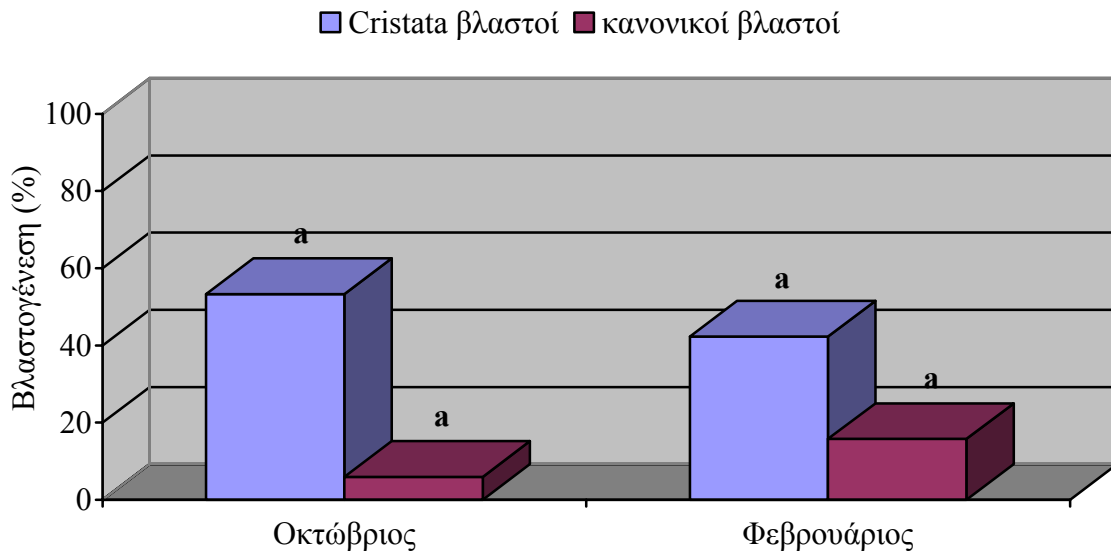
-- μη καταγεγραμμένη τιμή

Μετά από δύο μήνες καλλιέργειας στα παραπάνω υποστρώματα, σε κάποια έκφυτα σχηματίστηκε μόνο κάλος, σε άλλα ένας κανονικός βλαστός (συχνά με ρίζες) και στην πλειοψηφία των εκφύτων ένας διογκωμένος *cristata* βλαστός (Εικ. 17 α). Κανονικοί και *cristata* βλαστοί σχηματίζονταν κατευθείαν πάνω στο έκφυτο χωρίς τη μεσολάβηση κάλου (Εικ. 17 γ και δ). Σε κάποια από τα έκφυτα ο *cristata* βλαστός συνυπήρχε με κάλο (Εικ. 17 β, ε και στ). Έκφυτα από την κορυφή (Κ) του βλαστού αντέδρασαν και σχημάτισαν *cristata* βλαστούς σε υψηλότερα ποσοστά από ότι έκφυτα από την περιοχή κάτω από την κορυφή (κΚ) (Πίν. 13).

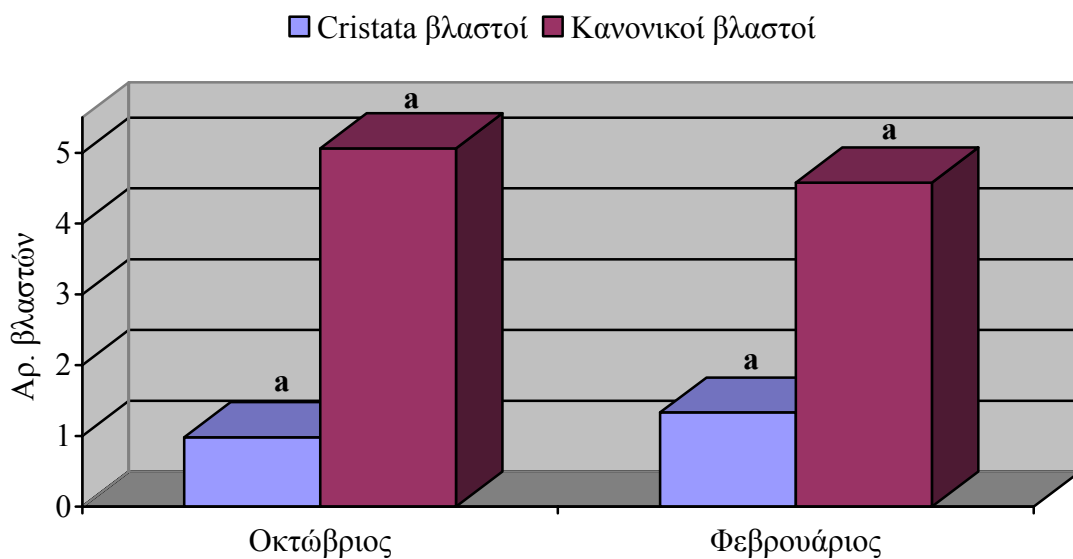
Η εποχή που άρχισε η καλλιέργεια δεν φαίνεται να επηρέασε το ποσοστό αντίδρασης και τον αριθμό των βλαστών που παράχθηκαν (Σχ. 13, 14), αν και υπήρξε η ένδειξη ότι τον Οκτώβριο υψηλότερο ποσοστό εκφύτων στο σύνολό τους σχημάτισε *cristata* βλαστούς. Όταν το υπόστρωμα δεν περιείχε φυτορρυθμιστικές ουσίες ή περιείχε μόνο 0.1 mg l^{-1} NAA η αντίδραση διέφερε μεταξύ των δύο εποχών και το Φεβρουάριο περισσότερα έκφυτα κορυφής αντέδρασαν σχηματίζοντας κανονικούς βλαστούς απ' ότι *cristata* βλαστούς. Τον Οκτώβριο υπήρξε η ένδειξη ότι η σταδιακή αύξηση του NAA επέφερε μείωση του ποσοστού των εκφύτων που έδωσαν *cristata* βλαστούς, ενώ μείωσε τον αριθμό *cristata* βλαστών ανά έκφυτο (Σχ. 15, 16), ενώ και στις δύο εποχές αύξηση του BA προκάλεσε μείωση του σχηματισμού κανονικών βλαστών (Σχ. 17) αν και υπήρχε σημαντική αλληλεπίδραση από τις δύο φυτορρυθμιστικές ουσίες στις περισσότερες περιπτώσεις (Πίν. 13 και 14). Το Φεβρουάριο η έλλειψη του BA στο υπόστρωμα προκάλεσε τον σχηματισμό κανονικών βλαστών στα περισσότερα έκφυτα, ενώ η προσθήκη BA προκάλεσε το σχηματισμό *cristata* βλαστών (Σχ. 17, 18).

Πίν. 15. Γινόμενο πολλαπλασιασμού ως προς το σχηματισμό *cristata* βλαστών της *M. elongata* var. *cristata* μετά από 60 ημέρες καλλιέργειας, σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA, τον Οκτώβριο και το Φεβρουάριο. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

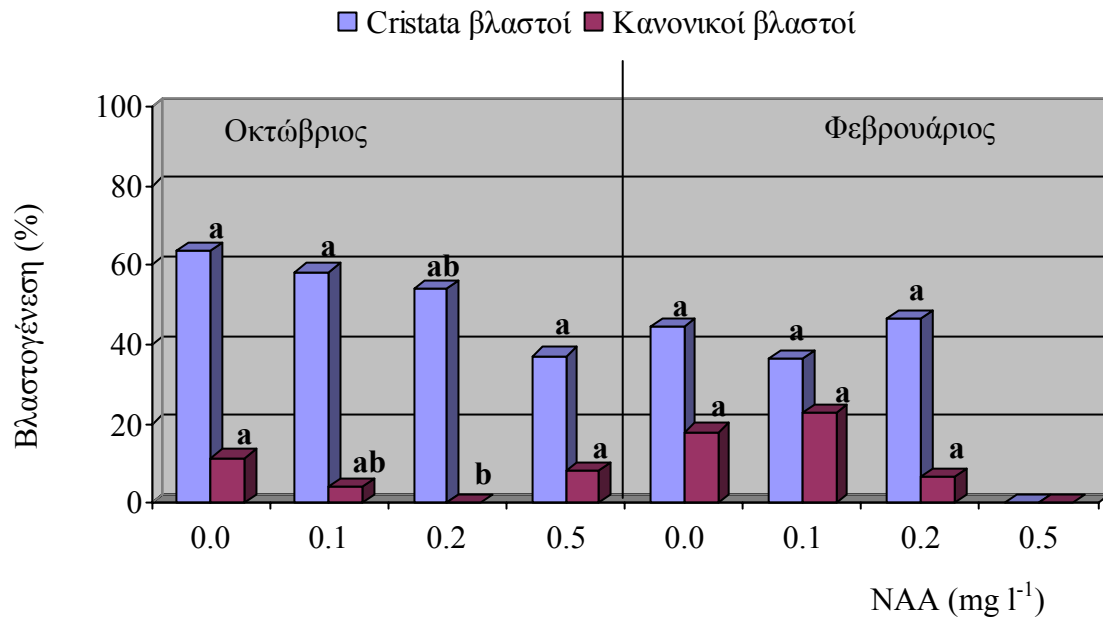
ΓΙΝΟΜΕΝΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ				
Συγκέντρωση (mg l ⁻¹)		<i>Cristata</i> Βλαστός		
		Οκτώβριος		Φεβρουάριος
NAA	BA	Κ	κΚ	Κ
0.0	0.0	0.76	0.25	0.15
0.1	0.0	0.33	0.12	0.009
0.2	0.0	2.00	0.0	0.78
0.5	0.0	0.16	0.0	-
0.0	0.1	0.45	0.11	0.78
0.1	0.1	1.5	0.0	1.21
0.2	0.1	0.0	0.05	0.7
0.5	0.1	0.45	0.0	-
0.0	0.2	2.0	-	0.75
0.1	0.2	0.75	0.0	0.38
0.2	0.2	0.15	0.08	0.58
0.5	0.2	0.0	0.56	--
0.0	0.5	1.0	0.0	--
0.1	0.5	0.25	0.22	--
0.2	0.5	0.23	0.0	--
0.5	0.5	0.13	0.0	--



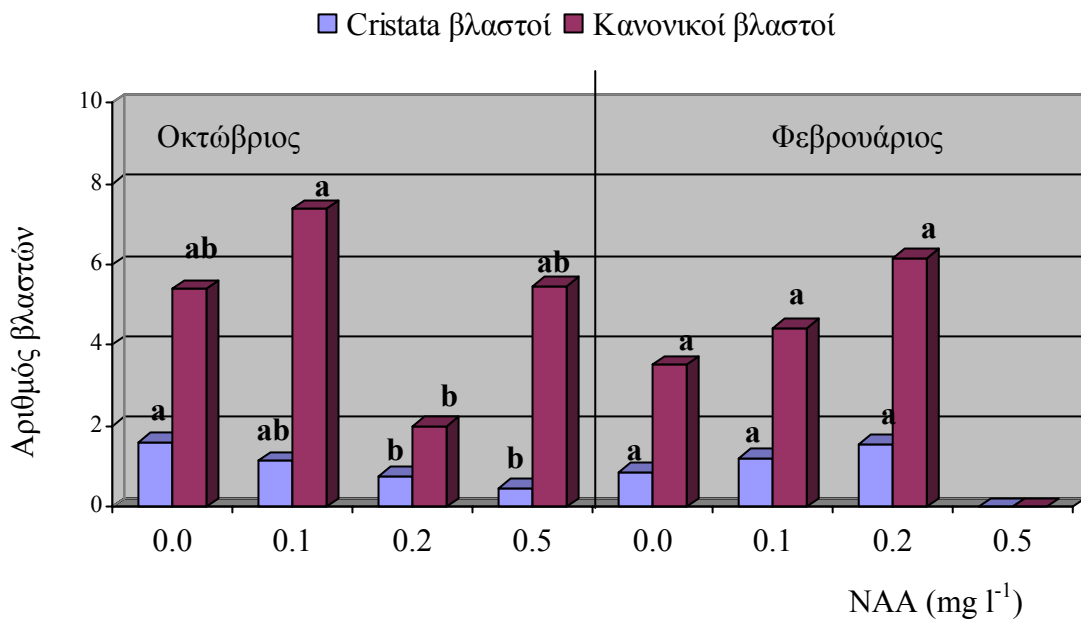
Σχ. 13. Επίδραση της εποχής εγκατάστασης των εκφύτων κορυφής (Κ) *M. elongata* var. *cristata* στη βλαστογέννεση. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



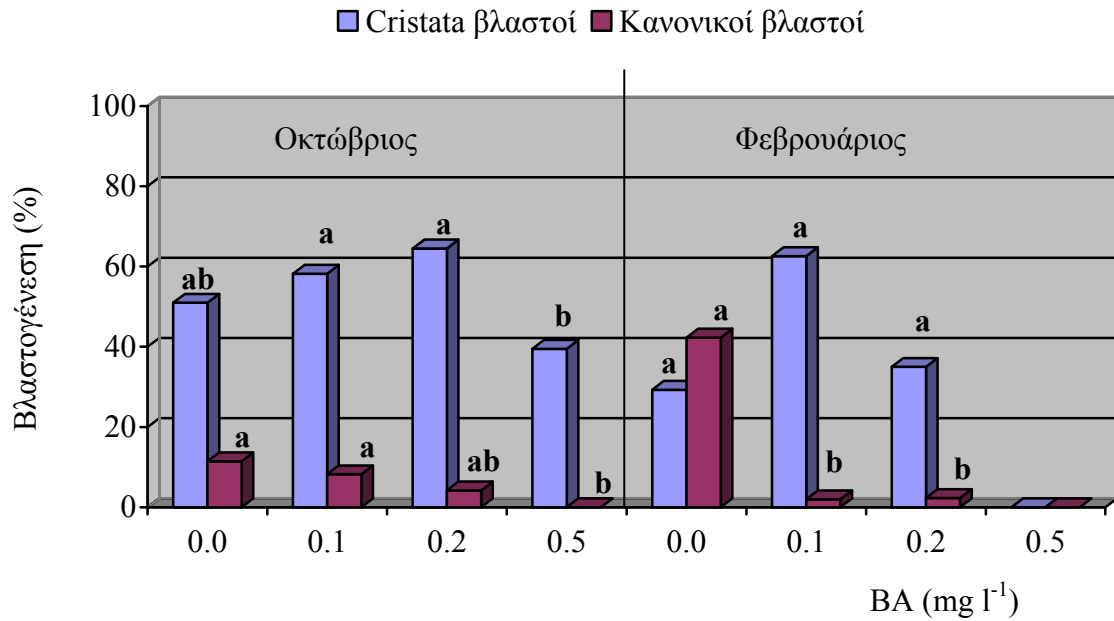
Σχ. 14. Επίδραση της εποχής εγκατάστασης των εκφύτων κορυφής (Κ) της *M. elongata* var. *cristata* στον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



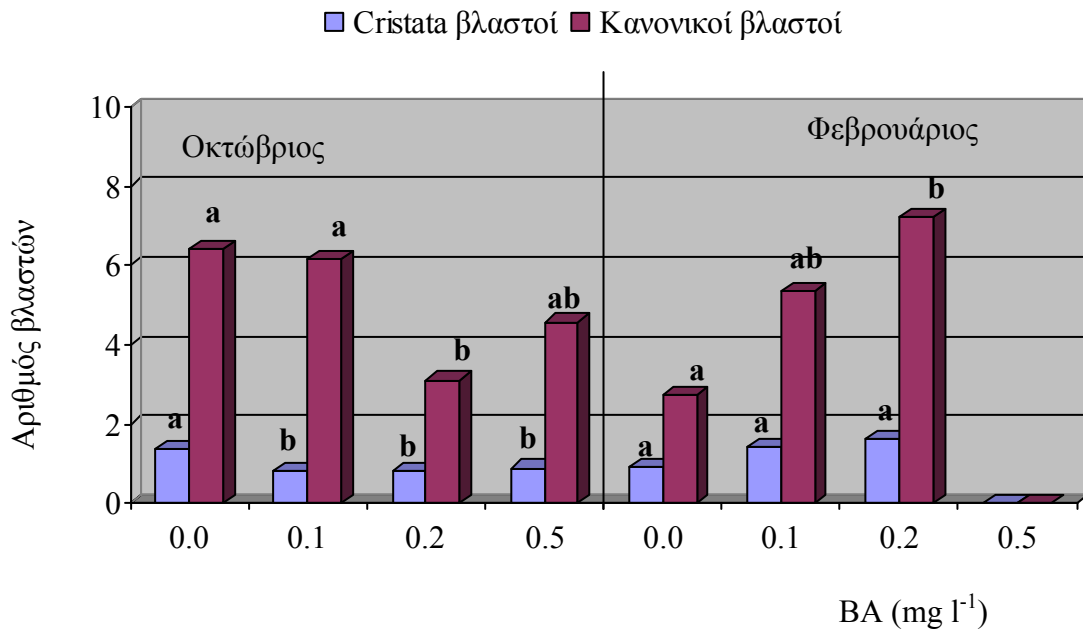
Σχ. 15. Επίδραση του NAA στη βλαστογένεση εκφύτων *M. elongata* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Σχ. 16. Επίδραση του NAA στο μέσο αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν από έκφυτα *M. elongata* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Σχ. 17. Επίδραση του BA στη βλαστογένεση εκφύτων *M. elongata* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Σχ. 18. Επίδραση του BA στο μέσο αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν από έκφυτα *M. elongata* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

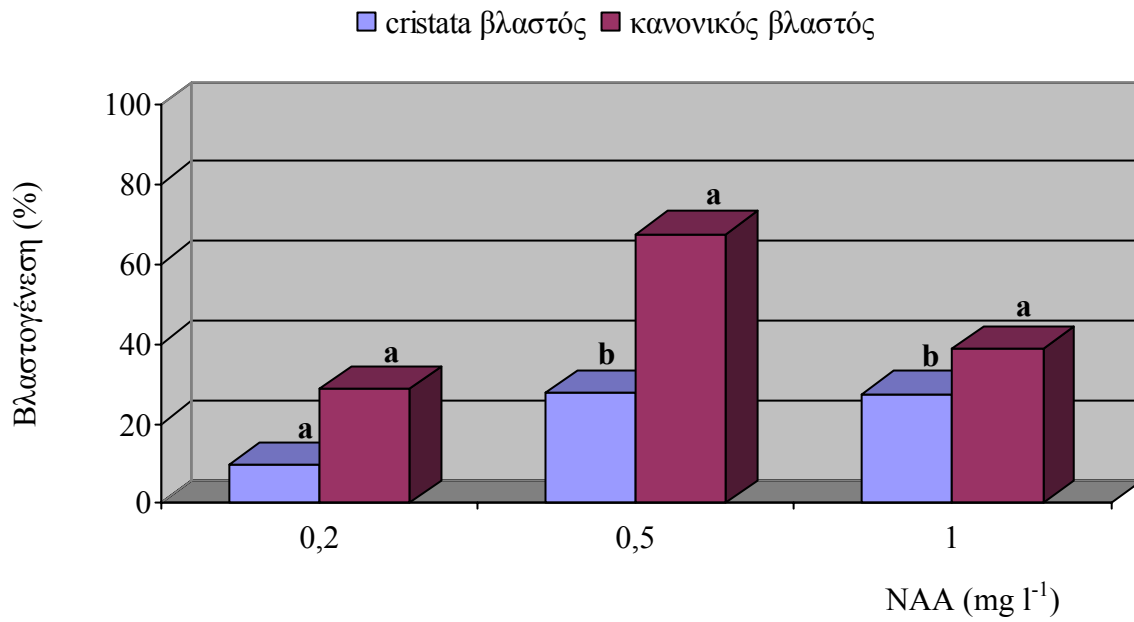
Ο συνδυασμός 0.1 mg l^{-1} NAA με 0.1 mg l^{-1} BA καθώς και τα 0.2 mg l^{-1} NAA μόνα τους, και στις δύο εποχές, προκάλεσαν το σχηματισμό *cristata* βλαστών σε υψηλό ποσοστό εκφύτων κορυφής και ως συνέπεια τη δημιουργία υψηλού αριθμού *cristata* βλαστών (Πίν. 15). Τα 0.2 mg l^{-1} BA χωρίς NAA, επίσης ευνόησαν το σχηματισμό *cristata* βλαστών, αλλά προκάλεσαν υπρενυδάτωση σχεδόν στο 50% των παραγόμενων βλαστών.

Σε έκφυτα από την περιοχή κάτω από την κορυφή (κΚ) η αύξηση του NAA από 0 σε 0.5 mg l^{-1} μείωσε το σχηματισμό των κανονικών βλαστών και αύξησε τους *cristata* (Πίν. 14). Για το λόγο αυτό, δοκιμάστηκε σε επόμενο πείραμα η χρήση υψηλότερης συγκέντρωσης NAA, 1 mg l^{-1} , που σε συνδυασμό με 0.2 , 0.5 και 1.0 mg l^{-1} BA, έδωσε παρόμοια αποτελέσματα. Έτσι, 60 ημέρες μετά την εμφύτευση παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού διαφοροποίησης *cristata* βλαστών με αύξηση της συγκέντρωσης του NAA στο υπόστρωμα (Πίν. 16, Σχ. 19, 20) και υπήρξε η ένδειξη ότι ευνοϊκότερο υπόστρωμα για σχηματισμό *cristata* ήταν αυτό με 0.5 mg l^{-1} NAA και 1.0 mg l^{-1} BA. Η διαφοροποίηση κανονικών βλαστών επηρεάστηκε από τη συγκέντρωση του BA και αύξησή του από 0.5 σε 1 mg l^{-1} επέφερε αύξηση των κανονικών βλαστών (Σχ. 21, 22).

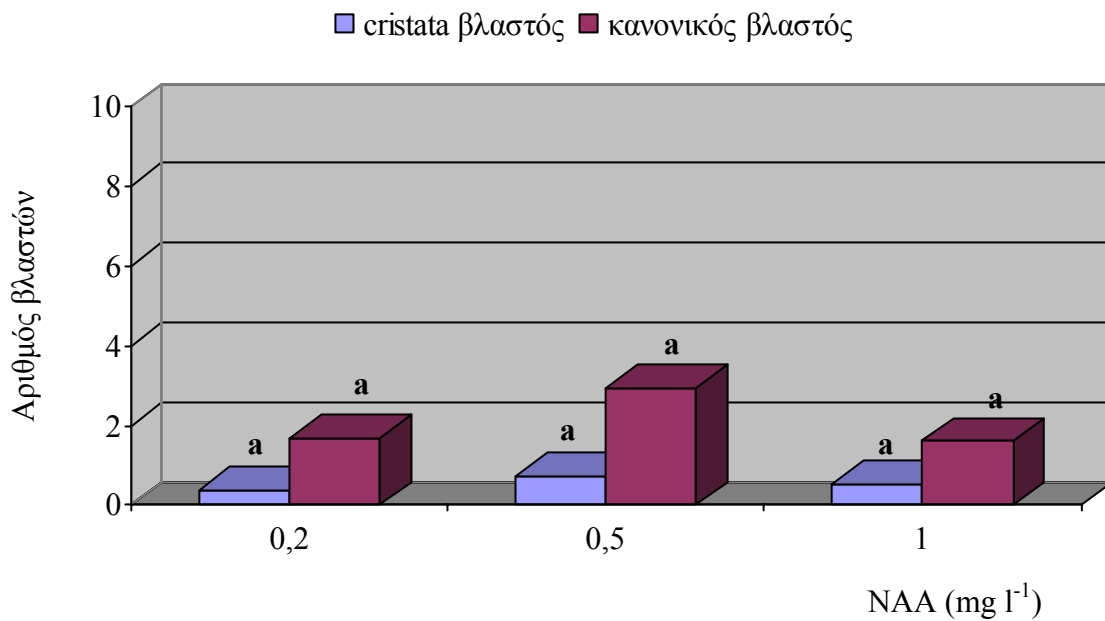
Πίν. 16. Ποσοστό εκφύτων μέσης (κΚ) της *M. elongata* var. *cristata* που αντέδρασαν δίνοντας *cristata* βλαστούς, κανονικούς βλαστούς και κάλο, μετά από καλλιέργεια σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

Συγκέντρωση (mg l ⁻¹)		Ποσοστό (%)			Μέσος αριθμός	
NAA	BA	<i>Cristata</i> βλαστοί	Κανονικοί βλαστοί	κάλος	<i>Cristata</i> βλαστοί	Κανονικοί βλαστοί
0.2	0.2	7 a	20 a	18 a	0.33 a	1.22 a
0.5	0.2	19.9 a	70 a	18 a	0.60 a	3.10 a
1.0	0.2	16 a	45 a	15 a	0.55 a	2.45 a
0.2	0.5	22 a	22 a	19 a	0.38 a	0.50 a
0.5	0.5	33.3 a	50 a	15 a	0.57 a	0.86 a
1.0	0.5	33.3 a	49 a	19 a	0.70 a	1.20 a
0.2	1.0	0 a	44 a	19 a	0.44 a	3.33 a
0.5	1.0	30 a	83 a	19 a	1.10 a	4.90 a
1.0	1.0	33.3 a	22 a	19 a	0.38 a	1.22 a
		F _{NAA} *	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}
		F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} *
		F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}

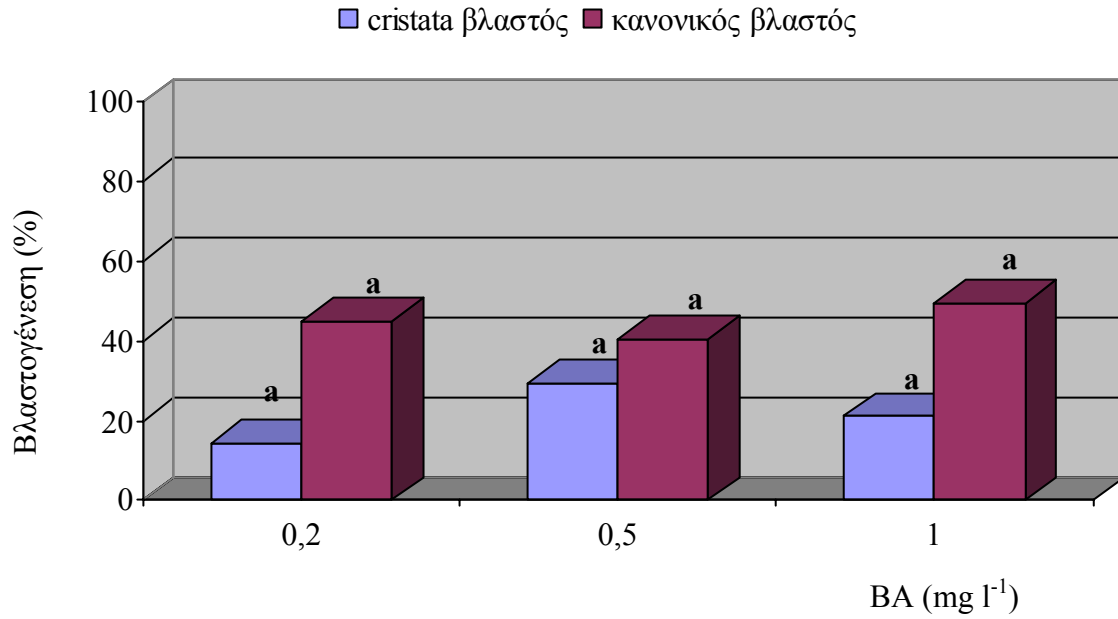
* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.



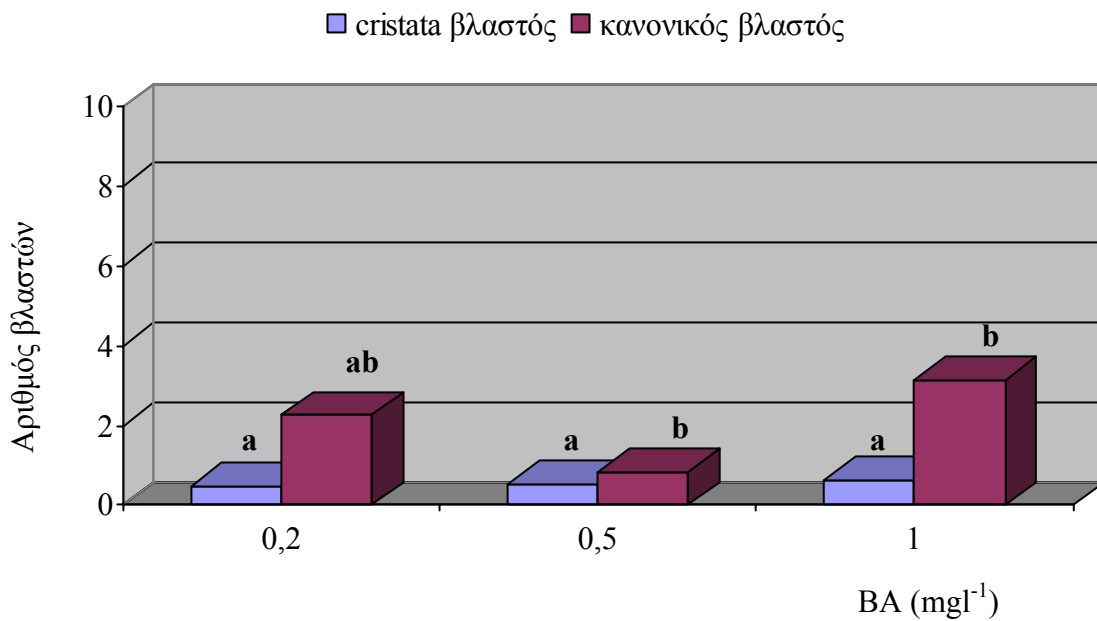
Σχ. 19. Επίδραση του NAA στη βλαστογένεση εκφύτων κάτω από τη κορυφή (κΚ) της *M. elongata* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



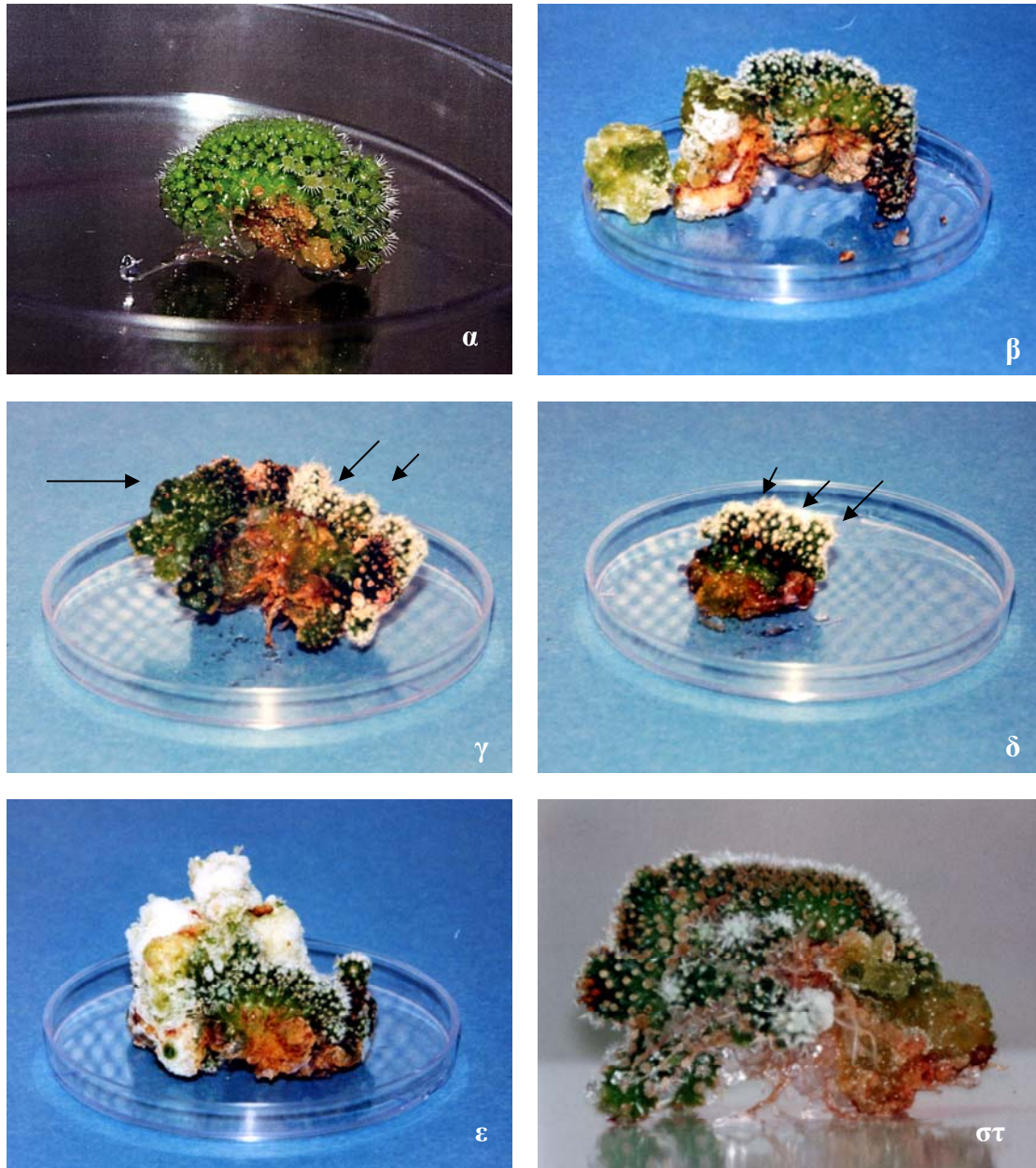
Σχ. 20. Επίδραση του NAA στο μέσο αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν από έκφυτα της *M. elongata* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Σχ. 21. Επίδραση του BA στη βλαστογένεση εκφύτων *M. elongata* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Σχ. 22. Επίδραση του BA στο μέσο αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν από έκφυτα *M. elongata* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Εικ. 17. *In vitro* αναγεννημένος *cristata* βλαστός (α), *cristata* βλαστός μαζί με κάλο (β), υαλωμένος *cristata* βλαστός με κανονικούς βλαστούς (γ), κανονικοί βλαστοί (δ), κανονικοί βλαστοί με κάλο (ε) και δεσμιωμένος βλαστός ηλικίας 5 μηνών (στ) της *M. elongata* var. *cristata*.

2.3.2.1 Επίδραση του ΒΑ στην καλλιέργεια κάλου της *Mammillaria elongata* var. *cristata*

1^ο πείραμα καλλιέργειας κάλου

Κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *M. elongata* var. *cristata* από έκφυτα κορυφής το φθινόπωρο, μερικά έκφυτα σχημάτισαν μόνο κάλο, χωρίς να διαφοροποιήσουν κάποιο είδος βλαστού (Πίν. 17). Ο κάλος αυτός 60 ημέρες από την εμφύτευση των εκφύτων, καθαρίστηκε από την πλευρά που ήταν σε επαφή με το αρχικό υπόστρωμα (εγκατάστασης) και υποκαλλιεργήθηκε σε MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για να ερευνηθεί η αντίδρασή του ως προς τη διαφοροποίηση *cristata* βλαστών.

Ο κάλος που υποκαλλιεργήθηκε αντέδρασε με τον ίδιο τρόπο, όταν μεταφέρθηκε σε σκέτο MS, σχηματίζοντας *cristata* και κανονικούς βλαστούς (Πίν. 18, Εικ. 18 α, β) οι οποίοι ήταν σχεδόν όλοι υαλωμένοι. Έτσι ο σχηματισμός βλαστών στην *M. elongata* var. *cristata* παρατηρήθηκε τόσο κατευθείαν πάνω στο έκφυτο, όσο και διαμέσου κάλου. Τα διαφορετικά επίπεδα φυτορρυθμιστικών ουσιών στο υπόστρωμα, από όπου ο κάλος προερχόταν, δε φάνηκε να επηρέασαν το σχηματισμό βλαστών που αναγεννήθηκαν από το κάλο.

Πίν. 17. Ποσοστό εκφύτων κορυφής της *M. elongata* var. *cristata*, που αντέδρασε σχηματίζοντας μόνο κάλο, όταν καλλιεργήθηκε το Φεβρουάριο σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς φυτορρυθμιστικών ουσιών NAA και BA, 60 ημέρες μετά την αρχική εμφύτευση. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

NAA (mg l ⁻¹)	BA (mg l ⁻¹)	Καλογένεση (%)
0.0	0.0	15a
0.1	0.0	27ab
0.2	0.0	20a
0.0	0.1	21ab
0.1	0.1	25ab
0.2	0.1	50ab
0.0	0.2	53ab
0.1	0.2	64 b
0.2	0.2	71 b
		F _{NAA} ^{NS}
		F _{BA} *
		F _{NXB} *

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.

Πίν. 18. Ποσοστό κάλου (προερχόμενου από έκφυτα κορυφής της *M. elongata var cristata*), που αντέδρασε σχηματίζοντας *cristata* και κανονικούς βλαστούς, και μέσος αριθμός *cristata* και κανονικών βλαστών όταν μεταφέρθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=10$.

Υπόστρωμα προέλευσης (mg l ⁻¹)		<i>Cristata</i> βλαστοί (%)	Μ. Αρ. <i>cristata</i> βλαστών	Κανονικοί βλαστοί (%)	Μ. αρ. κανονικών βλαστών
NAA	BA				
0.0	0.0	100 a	2.0 a	50 a	2.0 a
0.1	0.0	75 a	1.8 a	100 a	3.5 ab
0.2	0.0	67 a	1.0 a	100 a	6.7 b
0.0	0.1	50 a	0.8 a	100 a	7.5 b
0.1	0.1	67 a	1.7 a	67 a	6.7 b
0.2	0.1	71 a	1.6 a	86 a	6.0 b
0.0	0.2	88 a	1.8 a	88 a	6.4 b
0.1	0.2	78 a	1.9 a	89 a	6.2 b
0.2	0.2	67 a	1.0 a	75 a	6.3 b
		F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}
		F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} [*]
		F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} [*]

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.

2^ο πείραμα καλλιέργειας κάλου

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση των αυξινών και κυτοκινινών στη μορφή των βλαστών που αναγενούνται από κάλο *M. elongata var. cristata*, καλλιεργήθηκαν έκφυτα κορυφής *M. elongata var cristata*, τον Απρίλιο, σε MS με 1 mg l⁻¹ NAA και 5, 10 mg l⁻¹ BA. Τα υποστρώματα αυτά είχαν χρησιμοποιηθεί και στην *in vitro* καλλιέργεια της κανονικής μορφής *M. elongata* (κεφ. 2.3.1) και προκάλεσαν μεγάλη παραγωγή κάλου. Μετά από καλλιέργεια 60 ημερών σχηματίστηκε πλούσιος κάλος υδαρής ανοιχτού πράσινου χρώματος.

Ο κάλος αυτός αφού χωρίστηκε σε μικρότερα κομμάτια υποκαλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, ή με 0.2 mg l^{-1} NAA σε συνδυασμό με 0.2 ή 2.5 mg l^{-1} BA (υποστρώματα που είχε παρατηρηθεί βλαστογένεση στη *M. elongata*, κεφ. 2.3.1).

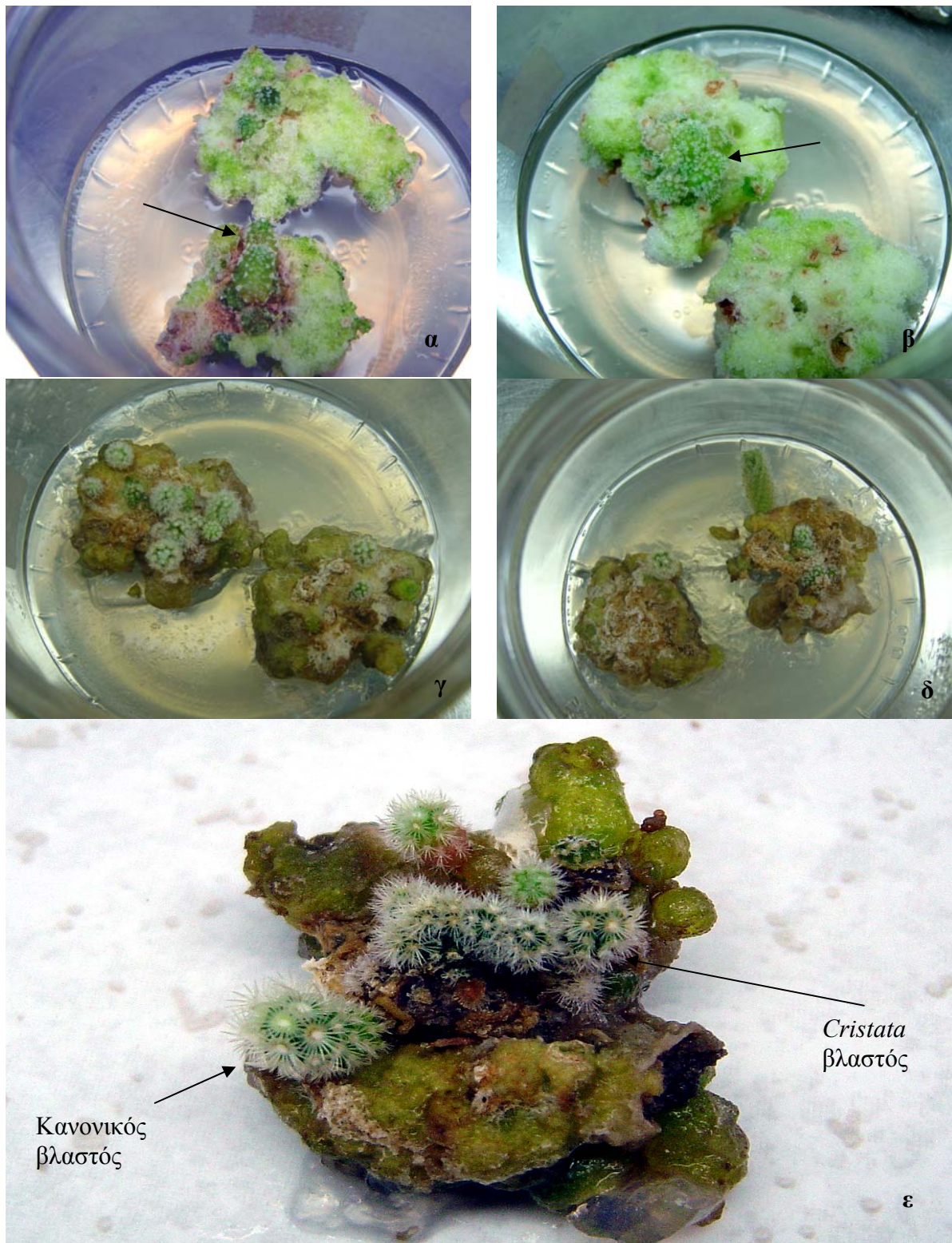
Κατά τη λήψη των αποτελεσμάτων (60 ημέρες μετά την τοποθέτηση), ο κάλος είχε χάσει την υδαρή μορφή του (Εικ. 18 γ, δ, ε) και είχε σχηματίσει κανονικούς και δεσμιωμένους βλαστούς.

Η αύξηση του BA στο υπόστρωμα προκάλεσε το σχηματισμό κανονικών βλαστών έναντι των *cristata* ενώ περισσότεροι *cristata* βλαστοί σχηματίστηκαν σε σκέτο MS (Πίν. 19).

Πίν. 19. Ποσοστό κάλου (προερχόμενου από καλλιέργεια εκφύτων κορυφής της *M. elongata* var *cristata* σε MS με 1 mg l^{-1} NAA και 5, 10 mg l^{-1} BA), που αντέδρασε σχηματίζοντας *cristata* και κανονικούς βλαστούς, όταν μεταφέρθηκε σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς φυτορρυθμιστικών ουσιών καθώς και ο μέσος αριθμός *cristata* και κανονικών βλαστών που σχηματίστηκαν. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=10$.

Συγκέντρωση (mg l^{-1})		<i>Cristata</i> Βλαστός (%)	Μ. αρ. <i>cristata</i> Βλαστών	Κανονικός Βλαστός (%)	Μ.αρ. κανονικών Βλαστών
NAA	BA				
0.0	0.0	100 a	1.8 a	50 a	2.0a
0.2	0.2	75 ab	1.0 a	75 ab	6.3b
0.2	2.5	50 b	0.9 b	100 b	9b
		$F_{\text{NAA}}^{\text{NS}}$	$F_{\text{NAA}}^{\text{NS}}$	$F_{\text{NAA}}^{\text{NS}}$	$F_{\text{NAA}}^{\text{NS}}$
		F_{BA}^*	$F_{\text{BA}}^{\text{NS}}$	F_{BA}^*	F_{BA}^*
		F_{NXB}^*	F_{NXB}^*	F_{NXB}^*	F_{NXB}^*

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.



Εικ. 18. *Cristata* (α) και κανονικοί βλαστοί (β) που αναγενήθηκαν κατά την υποκαλλιέργεια κάλου *M. elongata* var. *cristata* σε MS με 0 ή 0.2 mg l⁻¹ NAA και 0, 0.2 ή 2.5 mg l⁻¹ BA, 60 ημέρες μετά την εγκατάσταση της υποκαλλιέργειας. Κανονικοί (γ, δ) και *cristata* (ε) βλαστοί που σχηματίστηκαν ως ανωτέρω, 90 ημέρες μετά την εγκατάσταση της υποκαλλιέργειας. Ο κάλος δημιουργήθηκε από έκφυτα κορυφής σε MS με 1 mg l⁻¹ NAA και 5 ή 10 mg l⁻¹ BA.

2.3.3 *In vitro* πολλαπλασιασμός της *Euphorbia rugniformis*

Ενώ από το 1982 άρχισε ο *in vitro* πολλαπλασιασμός ειδών του γένους *Euphorbia* (Tideman & Hawker, 1982), δεν υπάρχει καμία αναφορά στη βιβλιογραφία για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *E. rugniformis* πέραν όσων προήλθαν από τη παρούσα μελέτη (Μπαλωτής και Παπαφωτίου, 2004α). Πρόκειται για ένα μικρόσωμο παχύφυτο, το οποίο ανήκει στην υποφυλή των Ψευδομεδουσών, με χαρακτηριστικό ροπαλοειδή κορμό, ο οποίος φέρει μια κεφαλή από χοντρούς ελικοειδείς βλαστούς (κεφ. 2.2.1.2) και έχει δύο δεσμιωμένες μορφές με μεγάλη εμπορική αξία. Στα πλαίσια της σύγκρισης της συμπεριφοράς κανονικών και δεσμιωμένων μορφών *in vitro* διερευνήθηκε ο μικροπολλαπλασιασμός του είδους.

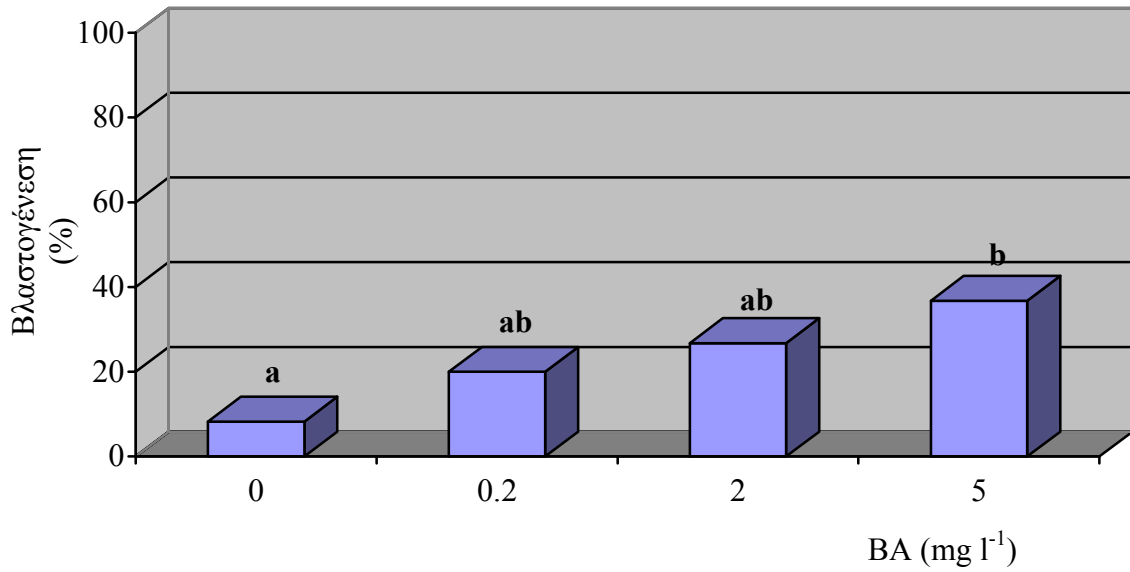
Έτσι, φυμάτια της *E. rugniformis* (κεφ. 2.2.4) καλλιεργήθηκαν τέλη Ιουνίου σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με δεκαέξι συνδυασμούς τεσσάρων συγκεντρώσεων NAA (0.0, 0.2, 0.5 και 1.0 mg l⁻¹) και τεσσάρων συγκεντρώσεων BA (0.0, 0.2, 2.0 και 5.0 mg l⁻¹). Η επιλογή των υποστρωμάτων έγινε βάση των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στον μικροπολλαπλασιασμό της κανονικής μορφής της *M. elongata* (κεφ. 2.3.1). Τα έκφυτα μέσης και κορυφής είχαν παρόμοια αντίδραση και λόγω έλλειψης μεγάλης ποσότητας εκφύτων κορυφής (κάθε βλαστός έδινε ένα έκφυτο κορυφής και 5-10 έκφυτα μέσης) στο συγκεκριμένο πείραμα παρουσιάζονται μόνο αποτελέσματα που αφορούν στα έκφυτα μέσης.

Ο σχηματισμός βλαστών ξεκίνησε 20 ημέρες από την εμφύτευση. Το ποσοστό εκφύτων που έδωσαν βλαστούς, καθώς και ο αριθμός των αναγεννηθέντων βλαστών επηρεάστηκε τόσο από το BA, όσο και από την αλληλεπίδραση των NAA και BA (Πίν. 20, Σχ. 23). Η αύξηση του BA ευνόησε τη διαφοροποίηση βλαστών. Το υψηλότερο ποσοστό σχηματισμού βλαστών παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 5 mg l⁻¹ BA χωρίς NAA, ενώ περισσότεροι βλαστοί φάνηκε να σχηματίζονται στα υποστρώματα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις BA (Πίν. 20, Σχ. 26). Χαρακτηριστικό ήταν, ότι στα περισσότερα έκφυτα διαφοροποιήθηκαν πολλοί πλάγιοι βλαστοί (Εικ. 19). Σε έκφυτα που διαφοροποιήθηκε ένας μόνο βλαστός, ο βλαστός αυτός μετά από την πάροδο τεσσάρων μηνών εξελίχθηκε σε ρόπαλο με πολλούς πλάγιους βλαστούς. Το NAA δε φάνηκε να επηρέασε τη βλαστογέννηση καθώς και τον αριθμό των σχηματισθέντων βλαστών (Σχ. 24, 25).

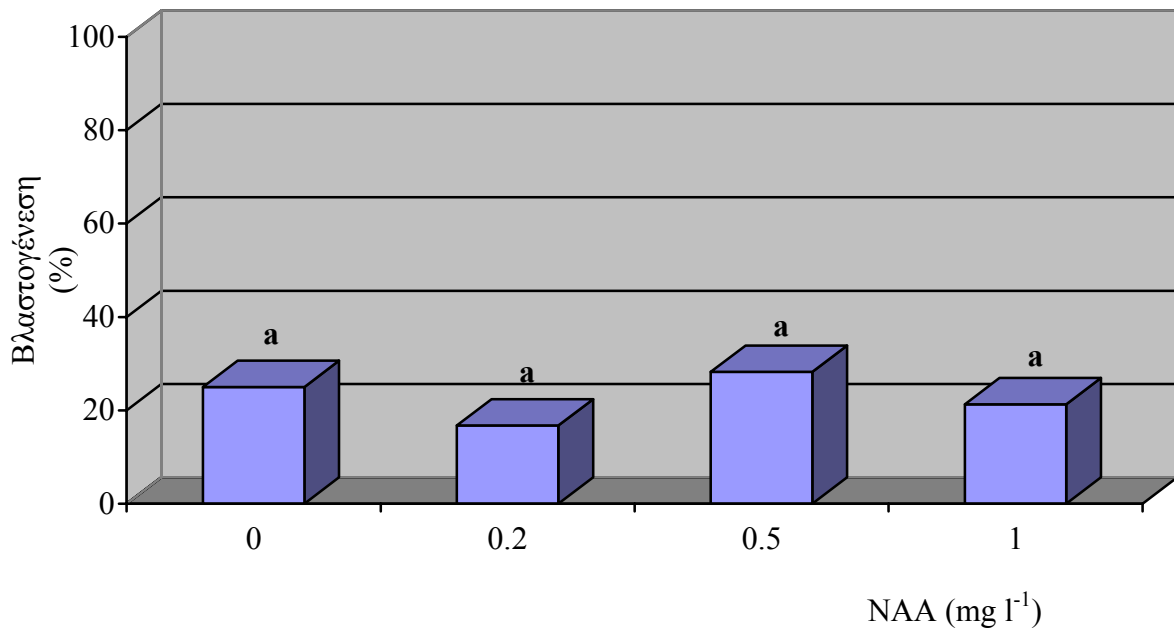
Πίν. 20. Ποσοστό εκφύτων *E. rugniformis* που αντέδρασαν σχηματίζοντας βλαστούς, μέσος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε και δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού μετά από 60 ημέρες καλλιέργειας, σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA, τον Οκτώβριο, τον Φεβρουάριο και τον Ιούνιο. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

Συγκέντρωση (mg l^{-1})		Βλαστογένεση (%)	Μ. αρ. Βλαστών	Γινόμενο πολλαπλασιασμού
NAA	BA			
0	0	0 a	0 a	0
0.2	0	7 a	0.1 a	0
0.5	0	13 a	1 ab	0.13
1	0	13 a	1 ab	0.13
0	0.2	13 a	1.5 ab	0.20
0.2	0.2	20 ab	2 ab	0.40
0.5	0.2	20 ab	1.3 ab	0.26
1	0.2	27 ab	1.5 ab	0.40
0	2	34 ab	5.1 b	1.70
0.2	2	13 a	2 ab	0.26
0.5	2	40 b	1.8 ab	0.72
1	2	20 ab	2.8 ab	0.56
0	5	53 b	4.1 b	2.17
0.2	5	27 ab	3.4 ab	0.91
0.5	5	40 b	3.4 ab	1.36
1	5	27 ab	4.8 b	1.30
		$F_{\text{NAA}}^{\text{NS}}$	$F_{\text{NAA}}^{\text{NS}}$	
		F_{BA}^*	F_{BA}^*	
		F_{NXB}^*	F_{NXB}^*	

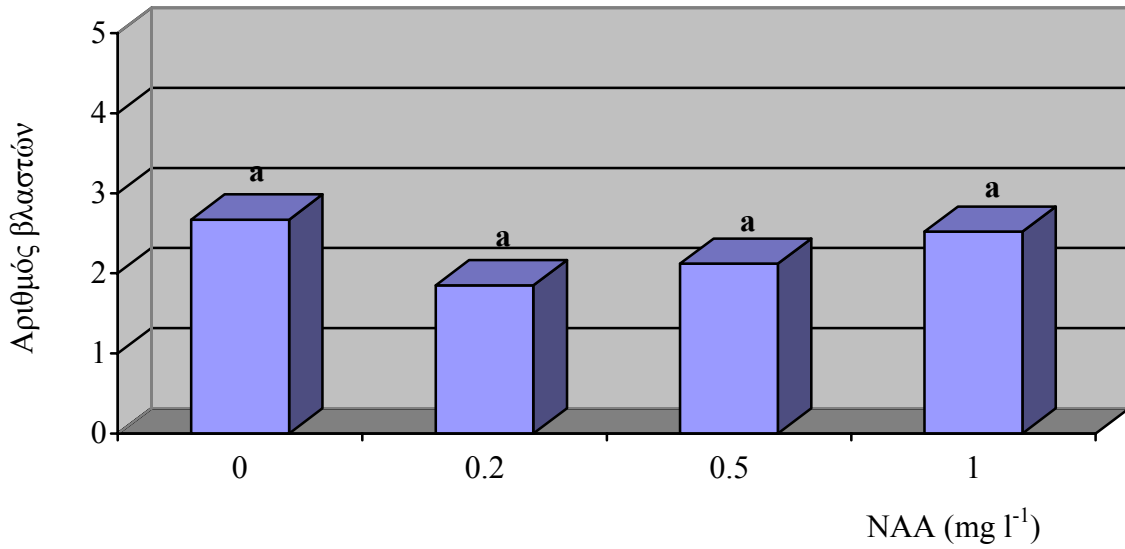
* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.



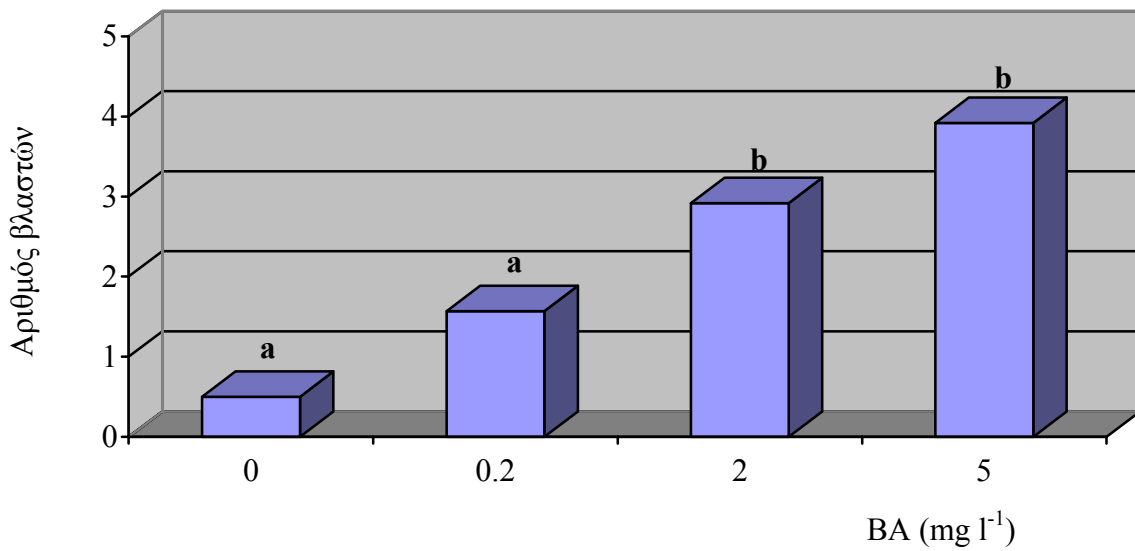
Σχ. 23. Επίδραση του BA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. rugniformis*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



Σχ. 24. Επίδραση του NAA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. rugniformis*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



Σχ. 25. Επίδραση του NAA στον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν σε έκφυτα *E. rugniformis*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Σχ. 26. Επίδραση του BA στον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν σε έκφυτα *E. rugniformis*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Εικ. 19. Έκπτυξη βλαστών από έκφυτα μέσης *Euphorbia pugniformis*

2.3.4 *In vitro* πολλαπλασιασμός της *Euphorbia pugniformis* var. *cristata*

Η *E. pugniformis* παρουσιάζει δύο δεσμιωμένες μορφές ανάλογα με το εάν δεσμιωθεί ο βλαστός ρόπαλο (πρωτοταγής βλαστός) ή εάν δεσμιωθεί ο πλάγιος βλαστός του ροφάλου (δευτεροταγής βλαστός) (κεφ. 2.2.1.2). Η δεύτερη μορφή λόγω του εύκολου πολλαπλασιασμού της (μοσχεύματα) βρίσκεται πιο εύκολα στο εμπόριο. Σκοπός των πειραμάτων ήταν ο *in vitro* πολλαπλασιασμός της *E. pugniformis* var. *cristata* αποσκοπώντας αφενός σε αποδοτικότερη μέθοδο πολλαπλασιασμού για επιχειρηματική χρήση δεδομένου ότι οι *cristata* μορφές της δεν ανθίζουν (Forcherts, 1984) και αφ'ετέρου στη διερεύνηση του φαινομένου της δεσμίωσης. Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός της δεσμιωμένης *E. pugniformis* έχει εν μέρει διερευνηθεί (Balotis and Papafotiou, 2003).

Έκφυτα (κεφ. 2.2.4) της *E. pugniformis* var. *cristata* κόπηκαν τον Ιούνιο από το δεύτερο είδος της δεσμιωμένης μορφής (δεσμιωμένος δευτεροταγής βλαστός). Τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 16 συνδυασμούς τεσσάρων συγκεντρώσεων NAA (0.0, 0.2, 0.5 και 1.0 mg l⁻¹) και τεσσάρων συγκεντρώσεων BA (0.0, 0.2, 2.0 και 5.0 mg l⁻¹). Η βλαστογένεση άρχισε να παρατηρείται 20 ημέρες από την εμφύτευση. Τα έκφυτα έδιναν αρχικά μια διόγκωση και στη συνέχεια διαφοροποιούνταν *cristata* ή κανονικοί βλαστοί. Μετά την παρέλευση δύο μηνών οι *cristata* βλαστοί μπορούσαν εύκολα να διακριθούν σε *cristata* κορμούς ή *cristata* βλαστούς (Εικ. 20), ενώ οι κανονικοί βλαστοί σε κορμούς (βλαστοί ρόπαλο) ή βλαστούς.

Το ποσοστό των σχηματισθέντων *cristata* κορμών, 30 ημέρες μετά την εμφύτευση, επηρεάστηκε από την αλληλεπίδραση των φυτορρυθμιστικών ουσιών, ενώ διαφάνηκε η τάση όσο αυξάνεται το BA να αυξάνεται το ποσοστό δημιουργίας *cristata* (Πίν. 21, Σχ. 27, 29, 33). Το υψηλότερο ποσοστό εκφύτων που έδωσε *cristata* μορφές (100 %) παρατηρήθηκε στα υποστρώματα με 0.5 ή 1.0 mg l⁻¹ NAA και 2.0 mg l⁻¹ BA (Πίν. 21), ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός *cristata* βλαστών (1.4) στο υπόστρωμα με 0.1 mg l⁻¹ NAA και 0.2 mg l⁻¹ BA (Πίν. 22). Η προσθήκη NAA στο υπόστρωμα δεν επηρέασε τη βλαστογένεση *cristata* και κανονικών βλαστών (Σχ. 31, 33).

Σε 90 ημέρες μετά την εμφύτευση, οι *cristata* κορμοί και βλαστοί εξελίχθηκαν δίνοντας είτε *cristata* μορφές (βλαστούς ή ρόπαλα), είτε ανάμεικτα *cristata* μορφές και κανονικούς βλαστούς ή νεκρώθηκαν. Το ποσοστό διατήρησης της *cristata* μορφής επηρεάστηκε σημαντικά από τις συγκεντρώσεις των φυτορρυθμιστικών ουσιών (Πίν. 21). Σε υψηλές συγκεντρώσεις BA διατηρήθηκε η *cristata* μορφή (Σχ. 30, 34), ενώ το NAA δε φάνηκε να επηρέασε τη διαφοροποίηση βλαστών (Σχ. 28, 32).

Πίν. 21. Ποσοστό εκφύτων *E. pugniformis* var. *cristata* που αντέδρασαν σχηματίζοντας δεσμωμένους (*cristata* κορμούς, *cristata* βλαστούς) και κανονικούς βλαστούς, μετά από 30 και 90 ημέρες καλλιέργειας σε υπόστρωμα MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD $P=0.05$, $n = 15$.

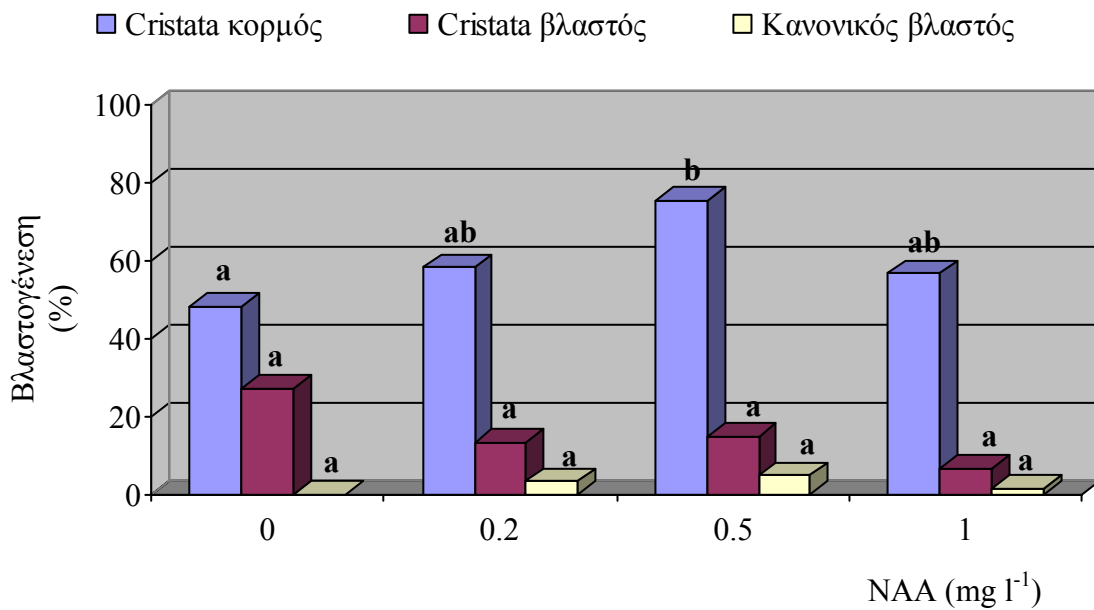
Συγκέντρωση NAA / BA (mg l ⁻¹)	30 ημέρες καλλιέργειας			90 ημέρες καλλιέργειας		
	<i>Cristata</i> Κορμός (%)	<i>Cristata</i> Βλαστός (%)	Κανονικός Βλαστός (%)	<i>Cristata</i> Κορμός (%)	<i>Cristata</i> Βλαστός (%)	Κανονικός Βλαστός (%)
0.0/0.0	20 ab	13.33 a	0 a	100 c	0 a	0 a
0.0/0.2	66.66 ab	40 a	0 a	50 ab	0 a	50 a
0.0/2.0	40 ab	0 a	0 a	50 ab	0 a	0 a
0.0/5.0	66.66 bc	55.55 a	0 a	13.33 a	0 a	20 a
0.2/0.0	33 ab	13.33 a	6.66 a	83.33 bc	0 a	16.66 a
0.2/0.2	73.32 bc	20 a	6.66 a	66.66 bc	0 a	16.66 a
0.2/2.0	46.66 ab	0 a	0 a	33.33 ab	0 a	0 a
0.2/5.0	80 bc	0 a	0 a	20 a	0 a	0 a
0.5/0.0	86.66 bc	20 a	0 a	0 a	6,66 a	26.66 a
0.5/0.2	40 ab	40 a	0 a	58.33 ab	0 a	25 a
0.5/2.0	100 c	0 a	20 a	100 c	0 a	0 a
0.5/5.0	75 bc	0 a	0 a	88.88bc	0 a	0 a
1.0/0.0	6.66 a	26.66 a	0 a	0 a	0 a	33.33 a
1.0/0.2	86.66 bc	0 a	6.66 a	73.33 bc	0 a	0 a
1.0/2.0	100 c	0 a	0 a	91.66 bc	0 a	0 a
1.0/5.0	33.33 ab	0 a	0 a	50 ab	0 a	0 a
	F _{NAA} *	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}
	F _{BA} *	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} *	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}
	F _{NXB} *	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} *	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.

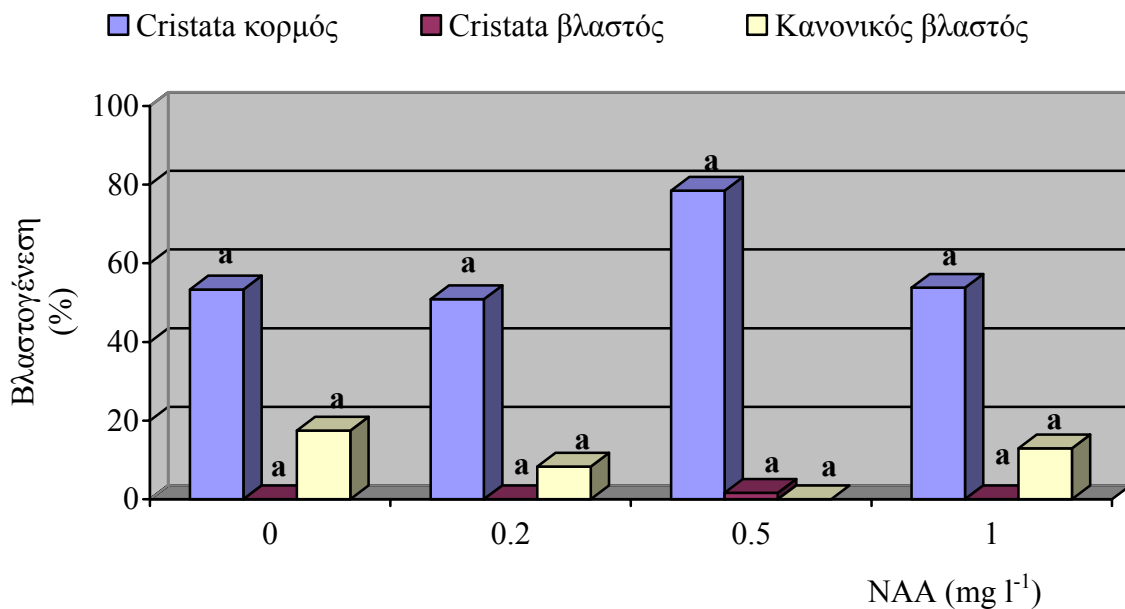
Πίν. 22. Μέσος αριθμός σχηματισθέντων βλαστών *E. rugniformis* var. *cristata* ανά έκφυτο που αντέδρασε, μετά από 30 και 90 ημέρες καλλιέργειας σε υπόστρωμα MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD $P=0.05$, $n = 15$.

Συγκέντρωση NAA / BA (mg l ⁻¹)	30 ημέρες καλλιέργειας			90 ημέρες καλλιέργειας		
	<i>Cristata</i> Κορμός	<i>Cristata</i> Βλαστός	Κανονικός Βλαστός	<i>Cristata</i> Κορμός	<i>Cristata</i> Βλαστός	Κανονικός Βλαστός
0.0/0.0	1	1 b	0 a	1 a	1 a	0 a
0.0/0.2	1	1 b	2 ab	1 a	1 a	1.66 ab
0.0/2.0	1	1 b	0 a	1.3 ab	1 a	1 ab
0.0/5.0	1	1 b	0 a	1 a	1 a	4 ab
0.2/0.0	1	1 b	1 ab	1.33 a	2.16 a	1.9 ab
0.2/0.2	1	1 b	4 b	3.5 b	3 b	3 b
0.2/2.0	1	1 b	3 b	2.33 ab	2 a	3 b
0.2/5.0	1	0 a	0 a	3.7 b	0 a	0 a
0.5/0.0	1	0 a	0 a	1.5 ab	0 a	0 a
0.5/0.2	1	0 a	0 a	3 b	0 a	0 a
0.5/2.0	1	0 a	0 a	2.8 ab	0 a	0 a
0.5/5.0	1	0 a	0 a	3.7 b	0 a	0 a
1.0/0.0	1	0 a	0 a	2.25 ab	2.33 a	5 b
1.0/0.2	1	0 a	0 a	3 b	0 a	0 a
1.0/2.0	1	0 a	0 a	2 ab	0 a	0 a
1.0/5.0	1	0 a	0 a	1 a	0 a	0 a
	F _{NAA} ^{NS} F _{BA} ^{NS} F _{NXB} ^{NS}	F _{NAA} [*] F _{BA} ^{NS} F _{NXB} [*]	F _{NAA} [*] F _{BA} [*] F _{NXB} [*]	F _{NAA} [*] F _{BA} [*] F _{NXB} [*]	F _{NAA} ^{NS} F _{BA} ^{NS} F _{NXB} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS} F _{BA} ^{NS} F _{NXB} [*]

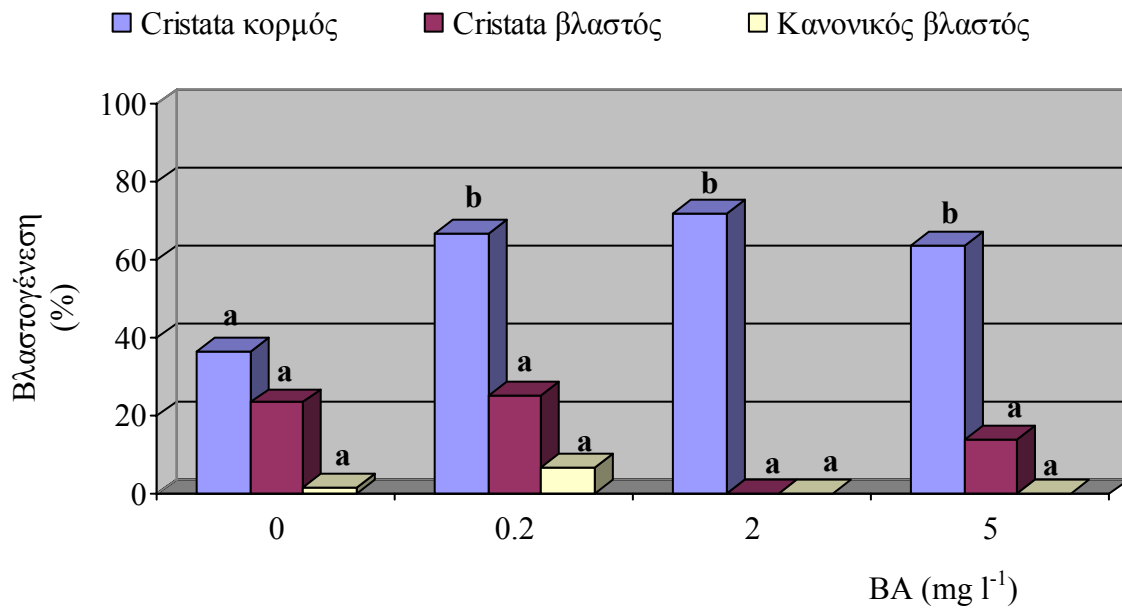
* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.



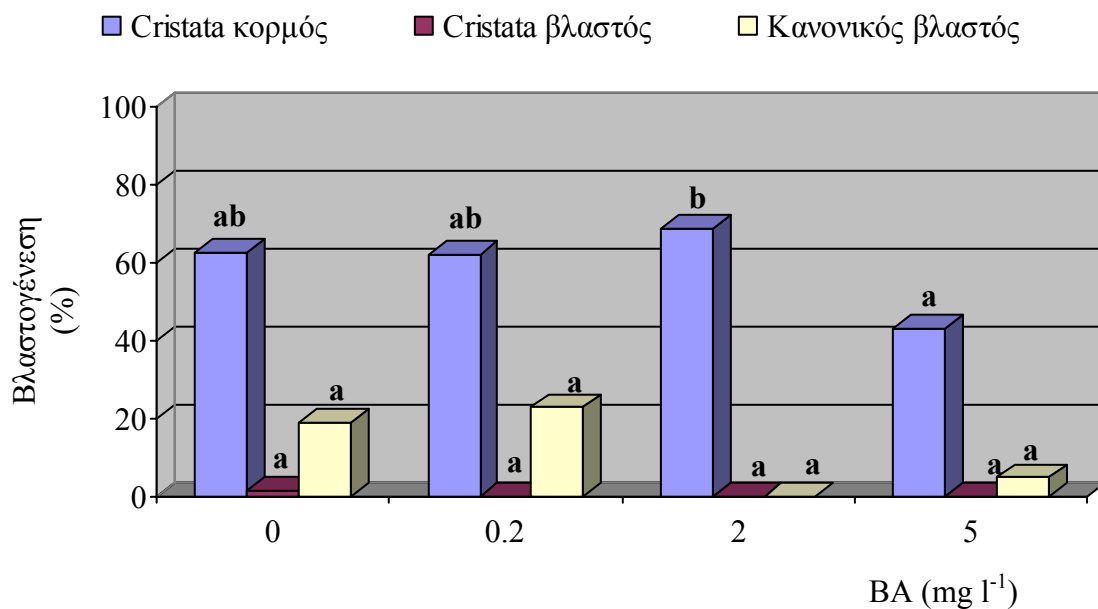
Σχ. 27. Επίδραση του NAA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. rugosiformis* var. *cristata*, μετά από 30 ημέρες καλλιέργειες σε MS. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



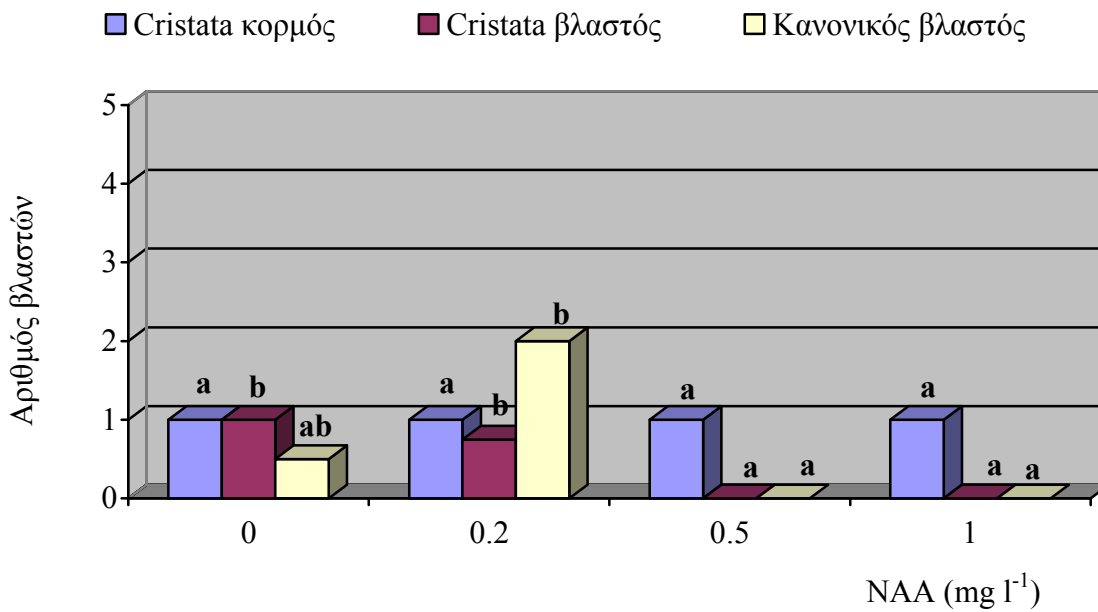
Σχ. 28. Επίδραση του NAA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. rugosiformis* var. *cristata*, μετά από 90 ημέρες καλλιέργειες σε MS. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



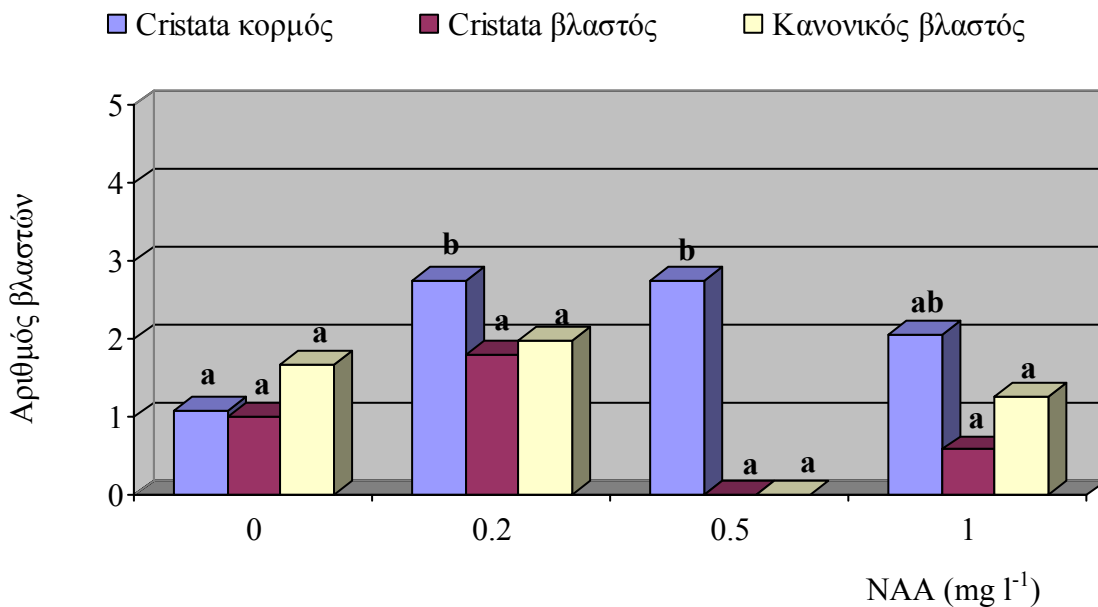
Σχ. 29. Επίδραση του BA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. pugniformis* var. *cristata*, μετά από 30 ημέρες καλλιέργειες σε MS. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



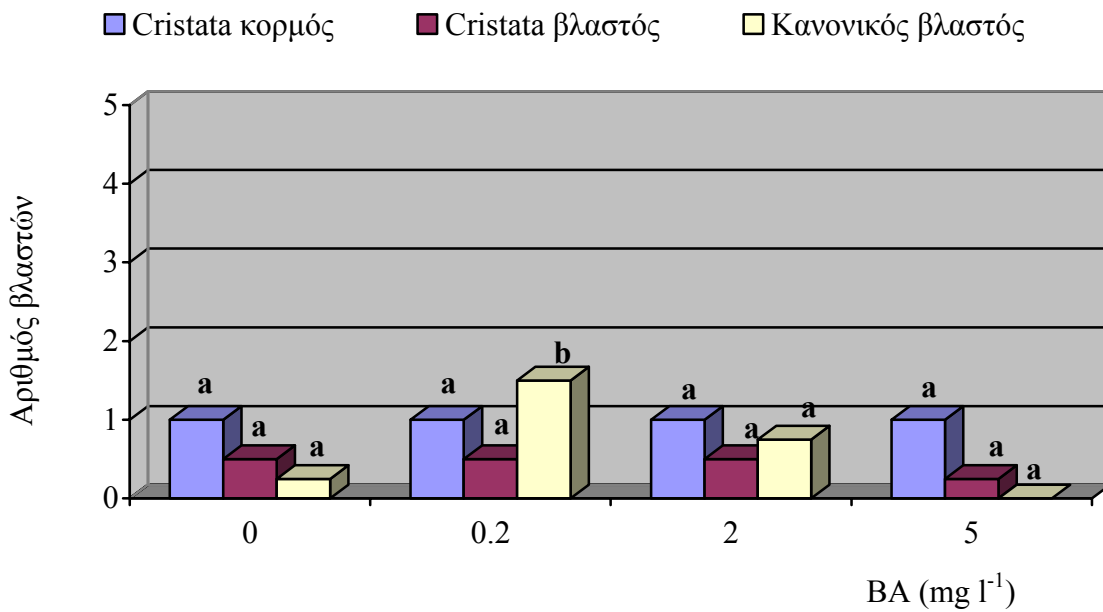
Σχ. 30. Επίδραση του BA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. pugniformis* var. *cristata*, μετά από 90 ημέρες καλλιέργειες σε MS. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



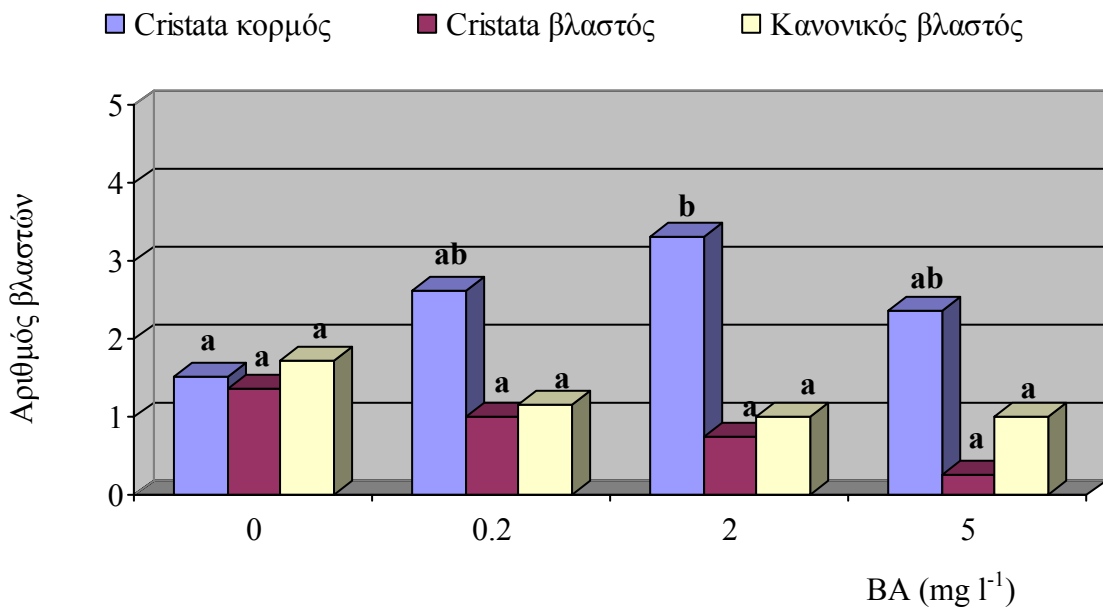
Σχ. 31. Επίδραση του NAA στο μέσο αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν από *E. pugniiformis* var. *cristata*, μετά από 30 ημέρες καλλιέργειες σε MS. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



Σχ. 32. Επίδραση του NAA στο μέσο αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν από *E. pugniiformis* var. *cristata*, μετά από 90 ημέρες καλλιέργειες σε MS. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



Σχ. 33. Επίδραση του BA στο μέσο αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν από έκφυτα *E. rugiformis* var. *cristata*, μετά από 30 ημέρες καλλιέργειες σε MS. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



Σχ. 34. Επίδραση του BA στο μέσο αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν από έκφυτα *E. rugiformis* var. *cristata*, μετά από 90 ημέρες καλλιέργειες σε MS. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



Εικ. 20. *In vitro* αναγεννημένος βλαστός (α) και αναγεννημένο φυτάριο (β) της *E. pugniformis* var. *cristata* από έκφυτα δεσμιωμένου δευτεροταγούς βλαστούς

2.3.4.1 Επίδραση υψηλότερων συγκεντρώσεων BA κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *Euphorbia pugniformis* var. *cristata*

Με βάση τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος (κεφ. 2.3.4), όπου οι υψηλές συγκεντρώσεις BA φάνηκε ότι συνετέλεσαν σε υψηλότερα ποσοστά παραγωγής *cristata* μορφής *in vitro*, δοκιμάστηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις BA στον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *E. pugniformis* var. *cristata*.

Έκφυτα κορυφής (κεφ. 2.2.4) *E. pugniformis* var. *cristata* κόπηκαν από το δεύτερο είδος της δεσμιωμένης μορφής (δεσμιωμένος δευτεροταγής βλαστός) και καλλιεργήθηκαν *in vitro* τον Ιούλιο σε υπόστρωμα MS με 0, 0.1 και 0.2 mg l⁻¹ NAA και 2.5, 5 και 10 mg l⁻¹ BA σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς.

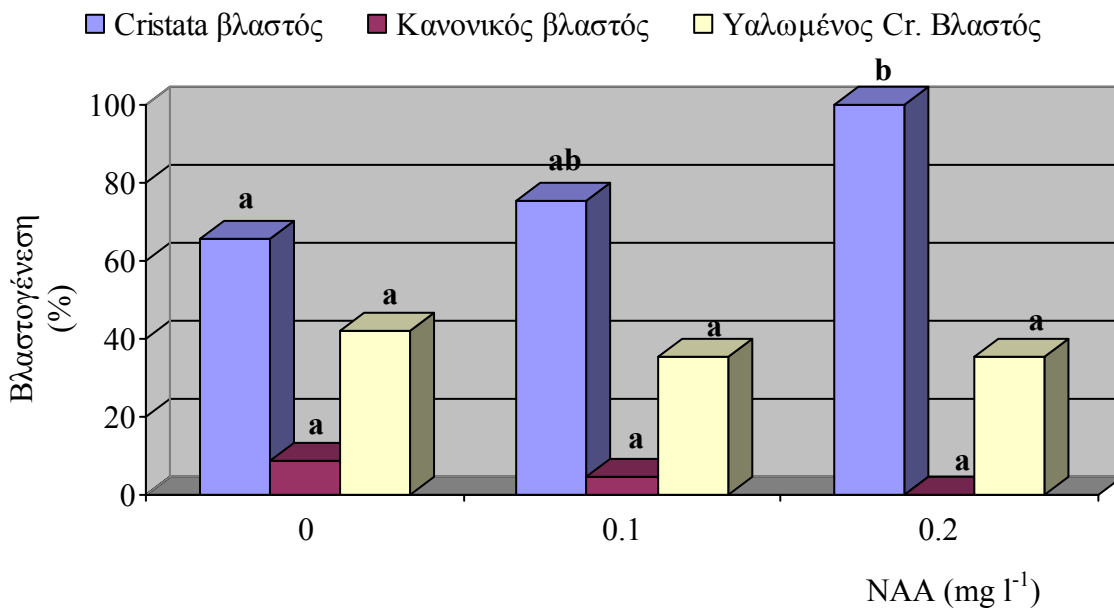
Η βλαστογένεση άρχισε να παρατηρείται 20 ημέρες από την εμφύτευση. Όπως φαίνεται στον πίνακα 23 η αύξηση του BA στο υπόστρωμα οδήγησε στην παραγωγή υαλωμένων *cristata* βλαστών. Στα υποστρώματα με 2.5 mg l⁻¹ BA το 26.6% από το σύνολο των *cristata* (70 %) βλαστών ήταν υαλωμένοι, ενώ στα υποστρώματα που περιείχαν 10 mg l⁻¹ BA το

100% των παραγόμενων *cristata* βλαστών ήταν υαλωμένοι. Η αύξηση του ΒΑ προκάλεσε μείωση των κανονικών βλαστών, καθώς και αντίστοιχη μείωση των *cristata* βλαστών (Σχ. 36). Η προσθήκη ΝΑΑ στο υπόστρωμα αύξησε το ποσοστό των *cristata* κορμών που σχηματίστηκαν, ενώ δεν επηρέασε τους κανονικούς βλαστούς και την υάλωση (Σχ. 35).

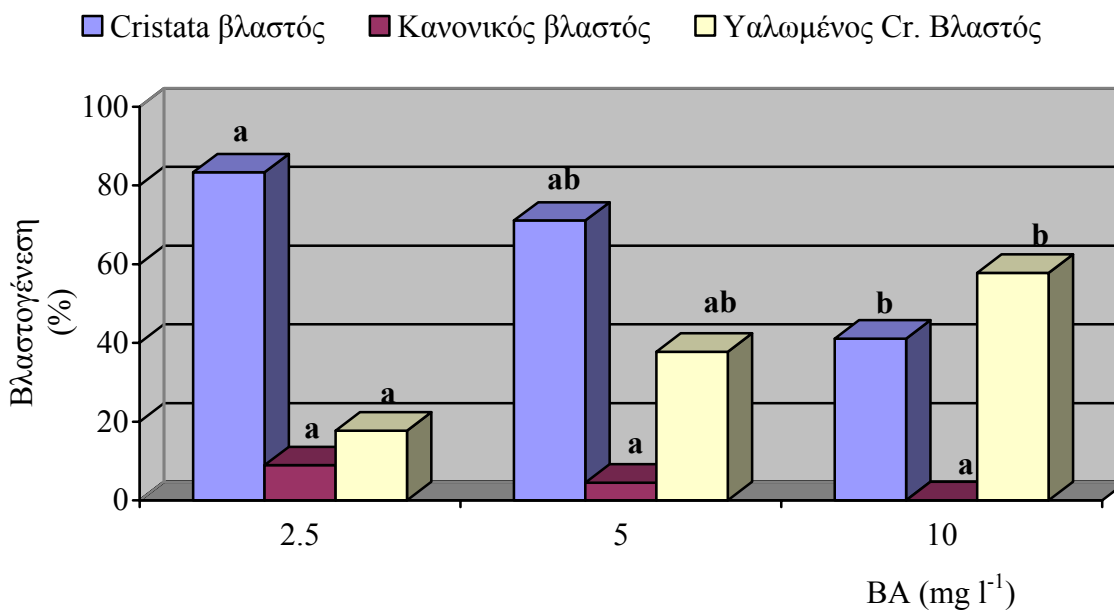
Πίν. 23. Ποσοστό σχηματισθέντων *cristata* και κανονικών βλαστών καθώς και των υαλωμένων *cristata* βλαστών και κάλου της *E. pugniformis* var. *cristata* ανά έκφυτο που αντέδρασε, μετά από 45 ημέρες καλλιέργειας σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς ΝΑΑ και ΒΑ. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n = 15$.

Συγκέντρωση ΝΑΑ / ΒΑ (mg l ⁻¹)	<i>Cristata</i> βλαστός (%)	Κανονικός βλαστός (%)	Υαλωμένοι <i>Cristata</i> βλαστοί (%)	Κάλος (%)
0.0/2.5	70.0 a	20.0 b	26.6 a	6.7 a
0.1/2.5	80.0 a	6.7 a	0.0 a	0.0 a
0.2/2.5	100 a	0.0 a	26.6 a	6.7 a
0.0/5.0	73.3 a	6.7 a	46.6 b	0.0 a
0.1/5.0	86.6 a	6.7 a	46.6 b	6.7 a
0.2/5.0	53.3 a	0.0 a	20.0 a	6.7 a
0.0/10.0	53.3 a	0.0 a	53.3 b	46.6 b
0.1/10.0	60.0 a	0.0 a	60.0 b	13.3 a
0.2/10.0	60.0 a	0.0 a	60.0 b	20.0 ab
	F _{ΝΑΑ} [*] F _{ΒΑ} [*] F _{ΝΧΒ} ^{NS}	F _{ΝΑΑ} ^{NS} F _{ΒΑ} ^{NS} F _{ΝΧΒ} [*]	F _{ΝΑΑ} ^{NS} F _{ΒΑ} [*] F _{ΝΧΒ} [*]	F _{ΝΑΑ} ^{NS} F _{ΒΑ} ^{NS} F _{ΝΧΒ} [*]

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.



Σχ. 35. Επίδραση του NAA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. pugniformis* var. *cristata*, και στην υάλωση των *cristata* βλαστών. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



Σχ. 36. Επίδραση του BA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. pugniformis* var. *cristata* και στην υάλωση των *cristata* βλαστών. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.

2.3.4.2 Επίδραση της εποχής λήψης εκφύτων της *Euphorbia. pugniformis* var. *cristata* στον *in vitro* πολλαπλασιασμό.

Η εποχιακή διακύμανση της ικανότητας βλαστογένεσης των εκφύτων, έχει μελετηθεί στην *M. elongata* (Paparotiou *et al.*, 2001) καθώς και σε άλλα φυτά που δεν είναι παχύφυτα όπως τα *Ceratonia siliqua*, *Viburnum odoratissimum*, *Vitex negundo* και *Quercus eboica* (Sahoo and Chand, 1998, Romano *et al.*, 2002, Schoene and Yeager, 2005, Kartsonas and Paparotiou, 2007). Στόχος ενός τέτοιου είδους πειράματος ήταν η διερεύνηση της συμπεριφοράς των *cristata* βλαστών όσο αφορά την ικανότητα βλαστογένεσης και τον τύπο των παραγόμενων βλαστών ανά εποχή κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *E. pugniformis* var. *cristata*.

Δεκαπέντε έκφυτα κορυφής (κεφ. 2.2.4) της *E. pugniformis* var. *cristata* κόπηκαν από το δεύτερο είδος της δεσμωμένης μορφής (δεσμωμένος δευτεροταγής βλαστός), τους μήνες Ιούλιο (Καλοκαίρι), Οκτώβριο (Φθινόπωρο), Φεβρουάριο (Χειμώνας) και Απρίλιο (Άνοιξη). Τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0.0 και 0.1 mg l⁻¹ NAA και BA σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς. Τα υποστρώματα αυτά επιλέγησαν ως ικανοποιητικά για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *E. pugniformis* var. *cristata* μετά από προκατακτικά πειράματα (Μπαλωτής, 2001).

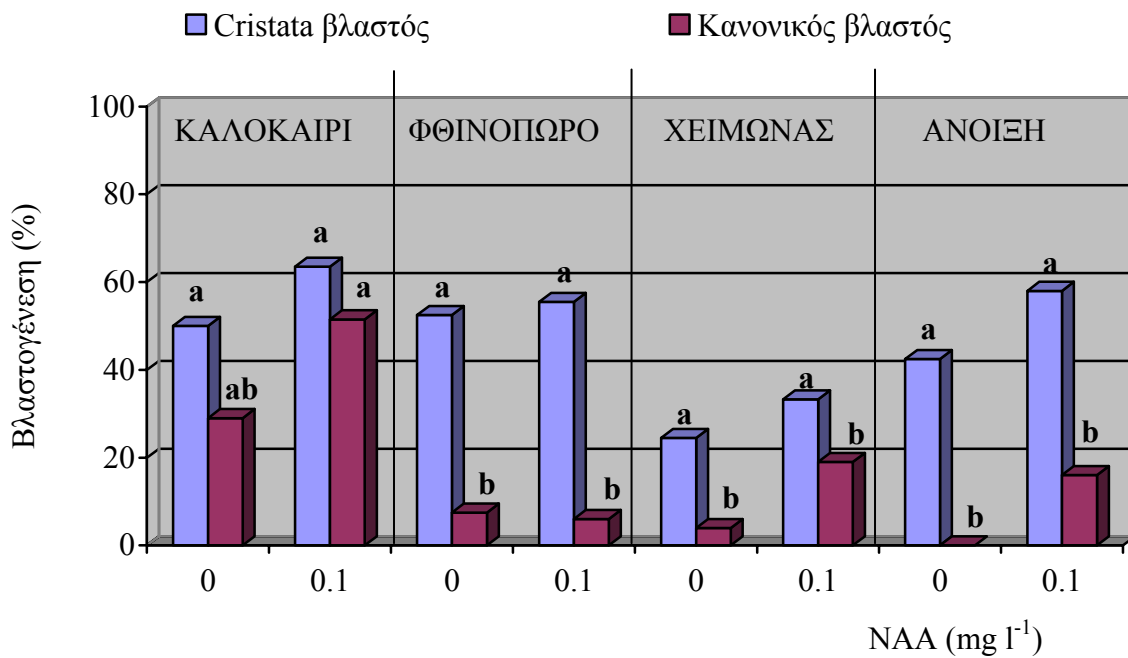
Η προσθήκη BA στο υπόστρωμα με ή χωρίς τη παρουσία NAA ευνόησε το σχηματισμό (ποσοστό και αριθμό) *cristata* βλαστών το καλοκαίρι (Πίν. 24). Παρόμοια αντίδραση παρατηρήθηκε το φθινόπωρο και την άνοιξη. Το χειμώνα δε φάνηκε να ξεχωρίζει κάποιο από τα εξεταζόμενα υποστρώματα. Υπό τη παρουσία αυξίνης η ύπαρξη κυτοκινίνης το φθινόπωρο ευνόησε τον αριθμό των σχηματισθέντων *cristata* βλαστών, ενώ δε φάνηκε να επηρέασε τον αριθμό των κανονικών βλαστών.

Καλύτερα υποστρώματα και για τις τέσσερις εποχές, όσον αφορά το ποσοστό εκφύτων που έδωσε *cristata* βλαστούς ήταν αυτά με 0.1 mg l⁻¹ BA και 0.1 mg l⁻¹ BA με 0.1 mg l⁻¹ NAA, ενώ το υπόστρωμα με 0.1 mg l⁻¹ BA και NAA ευνόησε και τον αριθμό *cristata* βλαστών ανά έκφυτο το καλοκαίρι και το φθινόπωρο (5.56 και 3.5, αντίστοιχα, Πίν. 25).

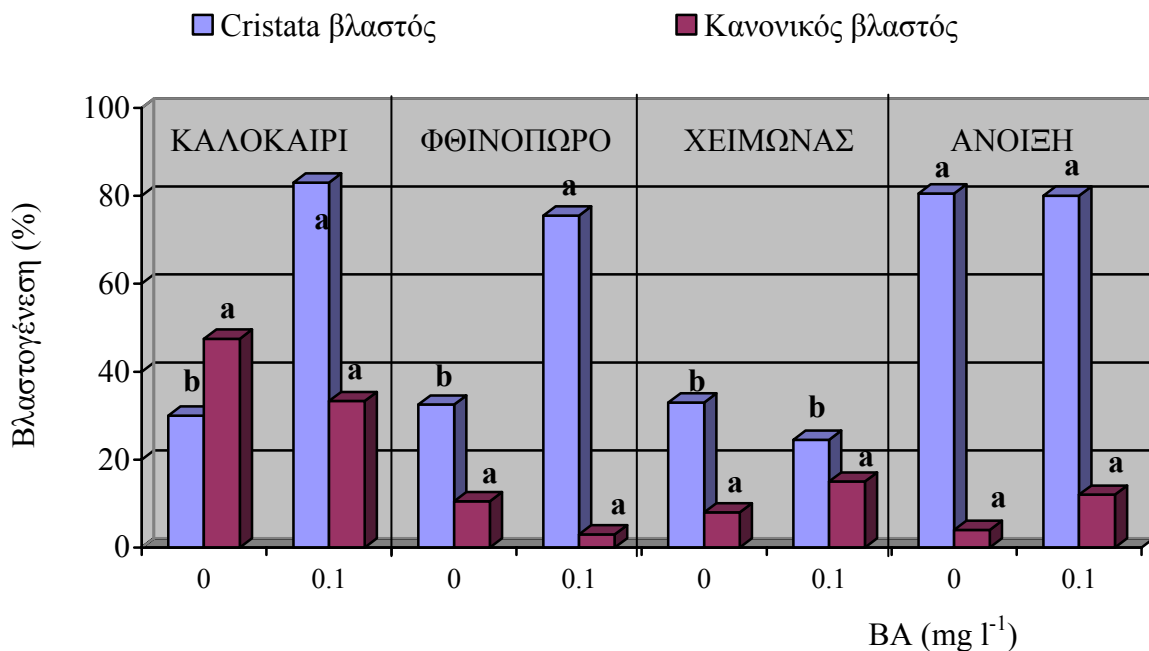
Πίν. 24. Ποσοστό και μέσος αριθμός σχηματισθέντων *cristata* και κανονικών βλαστών εκφύτων κορυφής *E. rugniformis* var. *cristata*, που καλλιεργήθηκαν σε MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις NAA και BA, το καλοκαίρι, φθινόπωρο, χειμώνα και άνοιξη. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$. $\eta=15$. Cr = *Cristata* βλαστός, Kan = κανονικός βλαστός.

		ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ				ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ				ΧΕΙΜΩΝΑΣ				ΑΝΟΙΞΗ			
NAA	BA	Βλαστογένεση (%)		Μ. αρ. Βλαστών / έκφυτο		Βλαστογένεση (%)		Μ. αρ. Βλαστών / έκφυτο		Βλαστογένεση (%)		Μ. αρ. Βλαστών / έκφυτο		Βλαστογένεση (%)		Μ. αρ. Βλαστών / έκφυτο	
(mg l ⁻¹)		Cr	Kan	Cr	Kan	Cr	Kan	Cr	Kan	Cr	Kan	Cr	Kan	Cr	Kan	Cr	Kan
0.0	0.0	33a	25 a	0.54 a	0.54a	20a	15 a	1.00a	1.00a	33 a	0 a	0.27a	0.00a	0a	0 a	0 a	0.00 a
0.0	0.1	66b	33a	5.67 a	1.50ab	85b	0 a	1.00a	1.00a	16 a	8 a	0.50a	0.40a	85b	0 a	1.00 a	0.14 a
0.1	0.1	100b	33a	5.56 a	0.56a	66b	6 a	3.5b	3.00b	33 a	22 a	0.44a	0.33a	75b	24 a	0.76 a	0.23 a
0.1	0.0	27a	70a	0.92 a	1.93b	45ab	6 a	1.33a	2.16b	33 a	16 a	0.62a	0.23a	41ab	8 a	0.85 a	0.14 a
		F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} [*]	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^{NS}	F _{NAA} ^N _S
		F _{BA} [*]	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} [*]	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} [*]	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}	F _{BA} ^{NS}
		F _{NXB} [*]	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} [*]	F _{NXB} [*]	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} [*]	F _{NXB} [*]	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} [*]	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^{NS}	F _{NXB} ^N _S

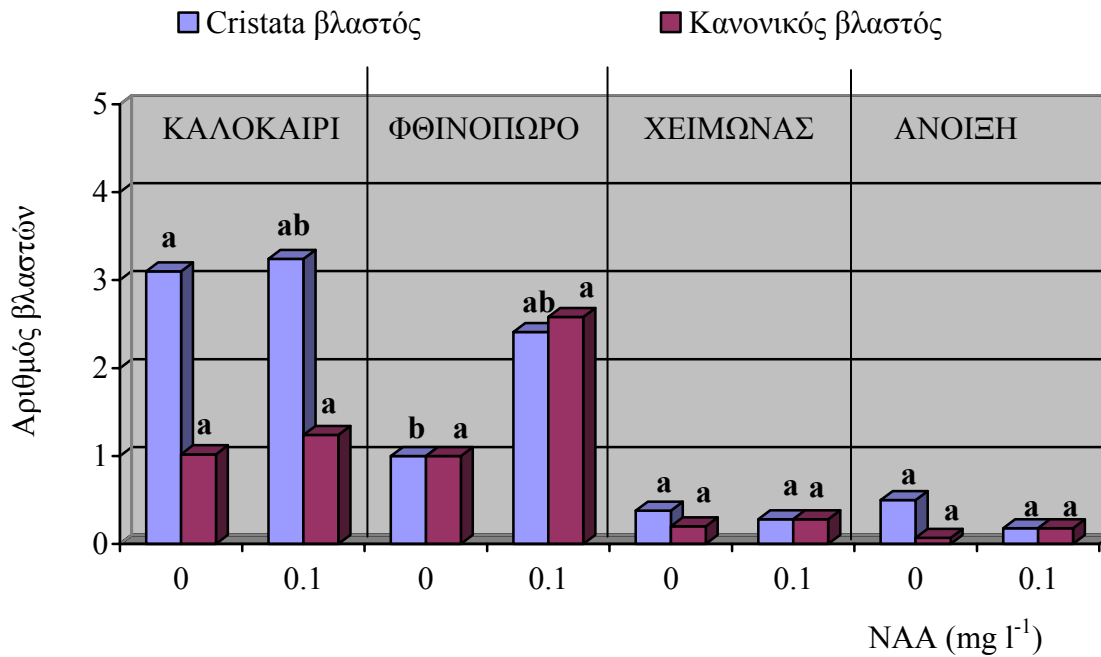
* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.



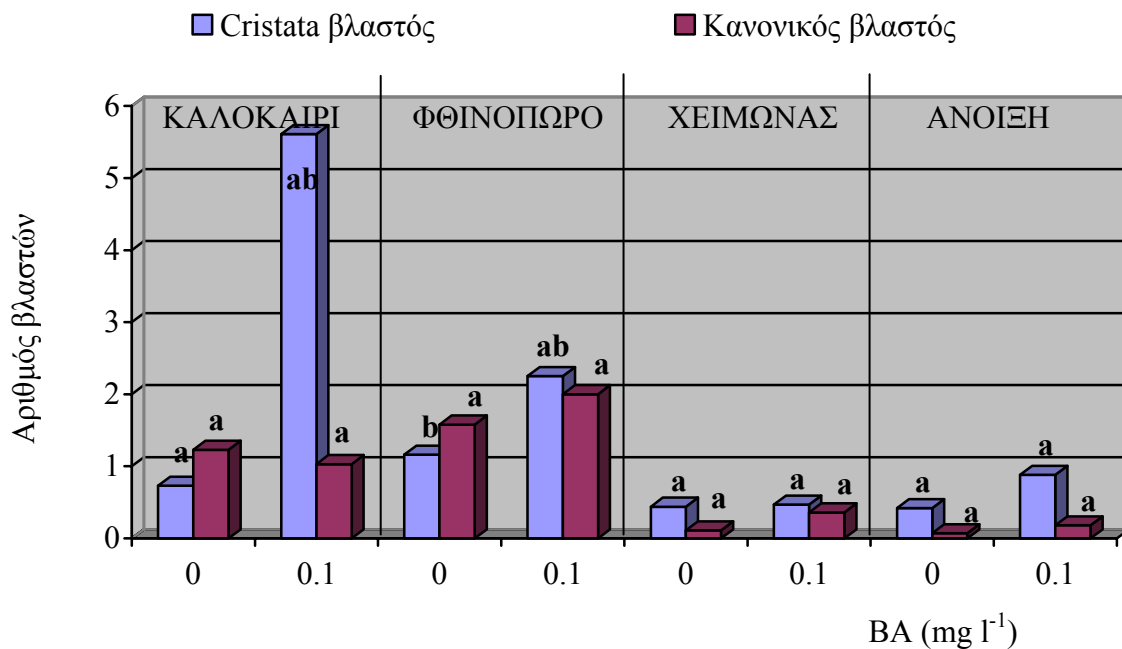
Σχ. 37. Επίδραση του NAA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. rugiformis* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



Σχ. 38. Επίδραση του BA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. rugiformis* var. *cristata* και στην υάλωση των *cristata* βλαστών. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



Σχ. 39. Επίδραση του NAA στο μέσο αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν από έκφυτα *E. pugniiformis* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



Σχ. 40. Επίδραση του BA στο μέσο αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν από έκφυτα *E. pugniiformis* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.

Πίν. 25. Γινόμενο πολλαπλασιασμού εκφύτων *E. rugniformis* var. *cristata* σχηματίζοντας *cristata* (Cr.) και κανονικούς (Καν.) βλαστούς όταν καλλιεργήθηκαν το καλοκαίρι, φθινόπωρο, χειμώνα και άνοιξη σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n = 15$.

Συγκέντρωση (mg l ⁻¹)		ΓΙΝΟΜΕΝΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ							
		ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ		ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ		ΧΕΙΜΩΝΑΣ		ΑΝΟΙΞΗ	
NAA	BA	Cr.	Καν.	Cr.	Καν.	Cr.	Καν.	Cr.	Καν.
0.0	0.0	0.18	0.13	0.20	0.15	0.9	0	0	0
0.0	0.1	3.74	0.50	0.85	0	0.08	0.03	0.85	0
0.1	0.1	5.56	0.18	2.31	0.18	0.14	0.07	0.57	0.05
0.1	0.0	0.24	1.35	0.60	0.08	0.20	0.03	0.35	0.01

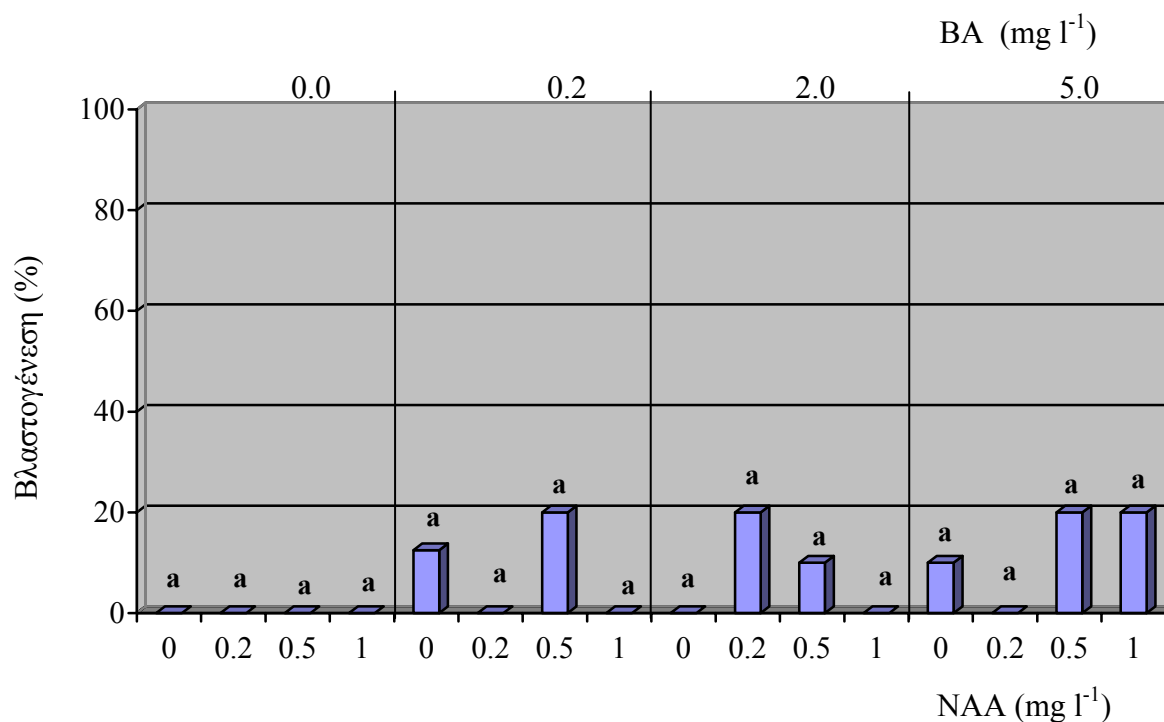
Η παρουσία NAA στο υπόστρωμα δεν επηρέασε τη βλαστογένεση και τις τέσσερις εποχές (Σχ. 37, 39). Αντίθετα η προσθήκη BA στο υπόστρωμα αύξησε τη βλαστογένεση *cristata* βλαστών το καλοκαίρι και το φθινόπωρο, ενώ μείωσε το ποσοστό των κανονικών βλαστών (Σχ. 38) καθώς και τον αριθμό των σχηματισθέντων βλαστών (Σχ. 40). Το χειμώνα και την άνοιξη τόσο το BA όσο και το NAA δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά τόσος στο ποσοστό βλαστογένεσης όσο και στον αριθμό σχηματισθέντων βλαστών. Από το γινόμενο πολλαπλασιασμού από τα τέσσερα υποστρώματα καλλίτερο φαίνεται να είναι το 0.1 mg l⁻¹ NAA και BA (Πίν. 25).

2.3.5 *In vitro* πολλαπλασιασμός της *Euphorbia lactea*

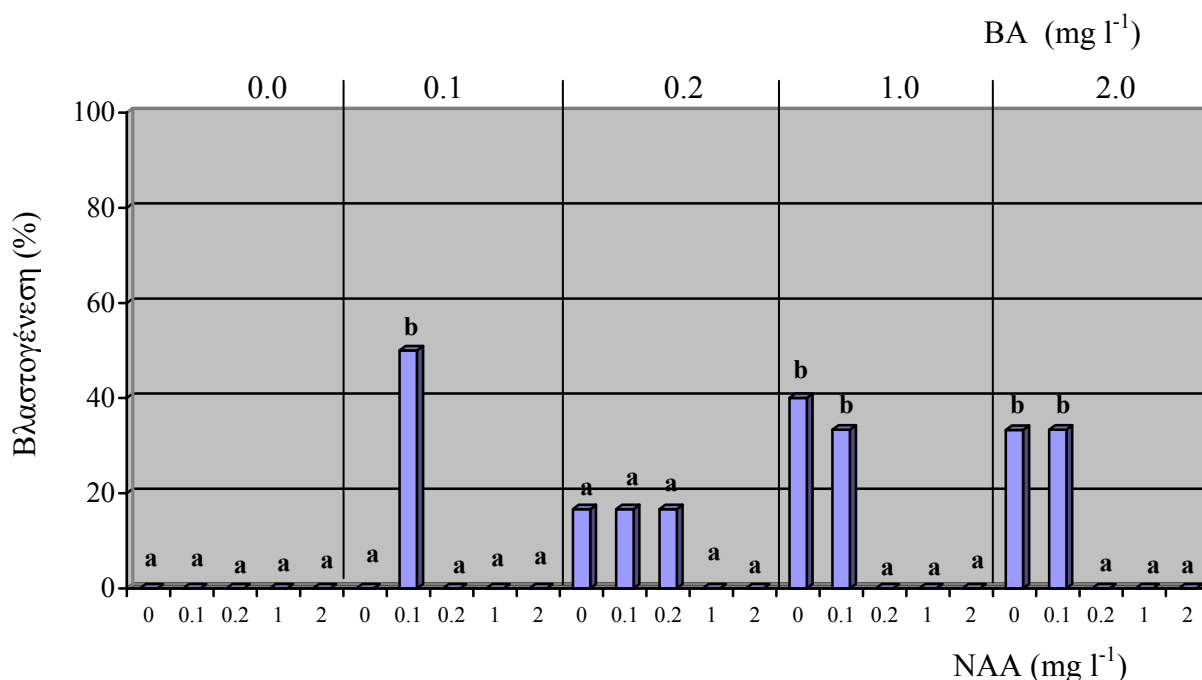
Σε ένα άλλο παχύφυτο βλαστού της οικογένειας των Εφορβιδών την *E. lactea* έγινε προσπάθεια *in vitro* πολλαπλασιασμού της, μιας και αυτή έχει μια πολύ όμορφη και μεγάλης εμπορικής αξίας δεσμιωμένη μορφή. Πρόκειται για ένα δενδρόμορφο θαμνώδες παχύφυτο που διαφέρει πολύ από την *E. rugniformis* (κεφ. 2.2.1.3). Και γι' αυτό το παχύφυτο δε βρέθηκε αναφορά στη βιβλιογραφία για *in vitro* πολλαπλασιασμό πέραν όσων προήλθαν από τη παρούσα μελέτη (Μπαλωτής και Παπαφωτίου, 2004β, Μπαλωτής και Παπαφωτίου, 2007). Έτσι, η διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού του παχύφυτου κανονικών και δεσμιωμένων μορφών αυτού αποσκοπεί αφενός σε μια αποδοτικότερη μέθοδο πολλαπλασιασμού, μιας και ο συνήθης τρόπος πολλαπλασιασμού είναι αυτός με μοσχεύματα και αφετέρου στη διερεύνηση του φαινομένου της δεσμίωσης.

Τα έκφυτα (κεφ. 2.2.4) της *E. lactea* ήταν τμήματα φυτικού ιστού, 3x5 mm, από την περιοχή μεταξύ δύο διαδοχικών αγκαθιών και καλλιεργήθηκαν τέλη Ιουνίου *in vitro* σε υπόστρωμα MS σε (α) 16 συνδυασμούς τεσσάρων συγκεντρώσεων NAA (0.0, 0.2, 0.5, 1.0 mg l⁻¹) και τεσσάρων BA (0.0, 0.2, 2.0, 5.0 mg l⁻¹) και (β) 16 συνδυασμούς τεσσάρων συγκεντρώσεων NAA και BA (0.0, 0.1, 0.2, 1.0 mg l⁻¹).

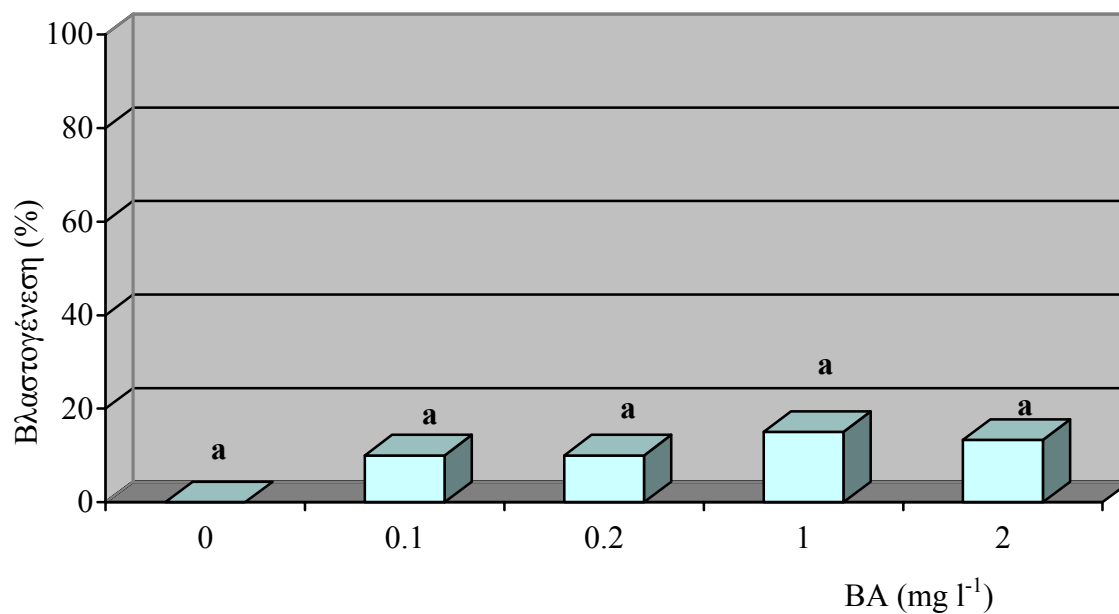
Η εμφάνιση βλαστών ξεκίνησε σε 60 ημέρες από την εμφύτευση. Στις υψηλές συγκεντρώσεις NAA και BA, το ποσοστό βλαστογέννεσης ήταν πολύ χαμηλό (μέχρι 20 %). Τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά και η βλαστογέννεση ήταν διάσπαρτη στα διάφορα υποστρώματα χωρίς να ξεχωρίζει κάποιο υπόστρωμα (Σχ. 41). Έτσι το πείραμα επαναλήφθηκε συμπεριλαμβάνοντας και χαμηλότερες συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών, γεγονός που βελτίωσε το ποσοστό αντίδρασης, το οποίο έφτασε στο 50 % στο υπόστρωμα με 0.1 mg l⁻¹ NAA και BA (Σχ. 42). Η προσθήκη BA στο υπόστρωμα καλλιέργειας δεν επηρέασε τη βλαστογέννεση (Σχ. 43). Αύξηση του NAA πέραν του 0.1 mg l⁻¹ επηρέασε αρνητικά τη βλαστογέννεση (Σχ. 44). Και στα δύο πειράματα το μήκος των βλαστών δε ξεπέρασε τα 0.5 cm. Η παραμονή στο ίδιο (αρχικό) υπόστρωμα για πάνω από τέσσερις μήνες προκάλεσε στα έκφυτα σποραδικά το σχηματισμό ριζών.



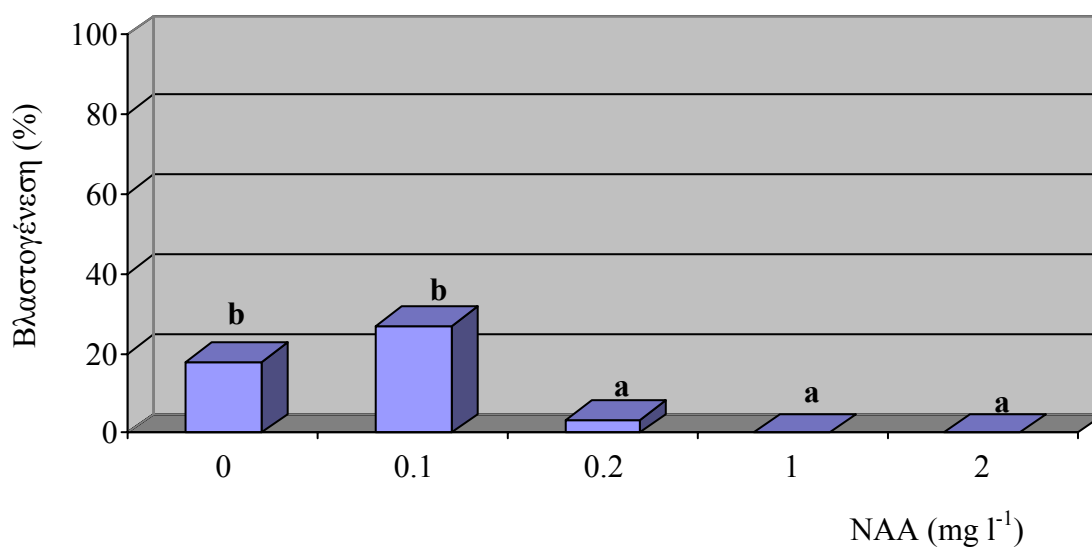
Σχ. 41. Ποσοστό βλαστογένεσης εκφύτων *E. lactea*, σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA, 3 μήνες μετά την εμφύτευση. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Σχ. 42. Ποσοστό βλαστογένεσης εκφύτων *E. lactea*, σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA, 3 μήνες μετά την εμφύτευση. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Σχ. 43. Επίδραση του BA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. lactea*, τρεις μήνες μετά την εμφύτευση. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



Σχ. 44. Επίδραση του NAA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. lactea*, τρεις μήνες μετά την εμφύτευση. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

2.3.5.1 Επίδραση των κυτοκινινών Zeatin και TDZ στον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *Euphorbia lactea*

Λόγω της χαμηλής βλαστογένεσης με τη χρήση του BA δοκιμάστηκε ο *in vitro* πολλαπλασιασμός της *E. lactea* με τη χρήση των κυτοκινινών Zeatin και Thidiazuron (TDZ). Πρόκειται για δύο κυτοκινίνες που ανήκουν σε διαφορετική ομάδα, η μεν Zeatin ανήκει στην ομάδα της αδενίνης η δε TDZ ανήκει στην ομάδα της φαινυλουρίας. Η πρώτη σχηματίζεται στο βλαστό, τα φύλλα και τις ρίζες του φυτού, ενώ η δεύτερη δεν έχει βρεθεί σε φυτικούς ιστούς. Η TDZ έχει αναφερθεί ότι προκαλεί βλαστογένεση σε πολλά ξυλώδη είδη (Preece *et al.*, 1991, Upreti and Dhar, 1996, Ravishankar Rai, 2002) προκαλώντας διαφοροποίηση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τις άλλες κυτοκινίνες (Murthy *et al.*, 1998).

Έκφυτα (κεφ. 2.2.4) της *E. lactea*, από την περιοχή μεταξύ δύο διαδοχικών αγκαθιών καλλιεργήθηκαν τέλη Οκτωβρίου *in vitro* σε υπόστρωμα MS με τους κάτωθι συνδυασμούς φυτορρυθμιστικών ουσιών: 0.0/0.1, 0.1/0.1, 0.2/5 και 0.2/10 mg l⁻¹ NAA και BA, 0.1/0.1, 0.1/0.5 mg l⁻¹ NAA και Zeatin, 0.0/0.1, 0.0/1.0, 0.1/0.1, 0.1/0.5 mg l⁻¹ NAA και TDZ.

Δύο μήνες μετά την εμφύτευση μετρήθηκε η αντίδραση των εκφύτων (Πίν. 26). Σε καμία από τις επεμβάσεις δεν σχηματίστηκαν βλαστοί. Τόσο η ζεατίνη όσο και η TDZ δεν προκάλεσαν αντίδραση στα έκφυτα που σε διάστημα ενός μήνα άρχισαν να καφετιάζουν και δεν έδειξαν καμία περαιτέρω ανάπτυξη, ενώ ούτε στο υπόστρωμα με 0.1 mg l⁻¹ NAA και BA που στο προηγούμενο πείραμα υπήρξε βλαστογένεση επαναλήφθηκε το αποτέλεσμα αυτό.

Πίν. 26. Αντίδραση εκφύτων *E. lactea* σε υποστρώματα MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA, BA, Zeatin και TDZ, δύο μήνες μετά την εμφύτευση, $n = 6$.

Φυτορρυθμιστικές ουσίες (mg l ⁻¹)				Αντίδραση
NAA	BA	Zeatin	TDZ	
0	0.1	-	-	Πράσινα έκφυτα
0	-	-	0.1	Καμία αντίδραση
0	-	-	1.0	Καμία αντίδραση
0.1	0.1	-	-	Πράσινα έκφυτα
0.1	-	-	0.1	Καμία αντίδραση
0.1	-	-	0.5	Καμία αντίδραση
0.1	-	0.1	-	Καμία αντίδραση
0.1	-	0.5	-	Καμία αντίδραση
0.2	5	-	-	Σχηματισμός Κάλου
0.2	10	-	-	Πράσινα έκφυτα, καμία ανάπτυξη

2.3.6 *In vitro* πολλαπλασιασμός της *Euphorbia lactea* var. *cristata*

Η δεσμιωμένη μορφή της *E. lactea* διαφέρει στη συμπεριφορά από τη δεσμιωμένη μορφή της *E. pugniformis* var. *cristata*, λόγω της σταθερότητά της, καθώς δεν παράγει εύκολα κανονικούς βλαστούς κατά την καλλιέργεια της, δηλαδή η επαναφορά της δεσμιωμένης στη κανονική μορφή είναι σπάνια (Rowley 2006). Η διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού της *E. lactea* var. *cristata* αποσκοπούσε στην εύρεση μιας αποτελεσματικότερης μεθόδου πολλαπλασιασμού πέραν από εκείνης των μοσχευμάτων (Rowley, 2006) και αφετέρου στη σύγκριση της *in vitro* συμπεριφοράς της τόσο με τη κανονική μορφή της όσο και με τις δεσμιωμένες μορφές της *M. elongata* και *E. pugniformis*. Έκφυτα κορυφής (κεφ. 2.2.4) της *E. lactea* var. *cristata* τοποθετήθηκαν *in vitro* τον Ιούλιο σε υπόστρωμα MS με 0.0, 0.2, 0.5 και 1 mg l⁻¹ NAA και 0.0, 0.2, 2.0 και 5 mg l⁻¹ BA σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς (16 συνδυασμοί).

Η βλαστογένεση άρχισε να παρατηρείται 30 ημέρες από την εμφύτευση. Τα έκφυτα έδιναν αρχικά μια διόγκωση και στη συνέχεια διαφοροποιούνταν *cristata* ή κανονικοί βλαστοί. Σχεδόν σε όλα τα υποστρώματα υπήρξε βλαστογένεση και παραγωγή κάλλου (Εικ. 21 α, β). Αρχικά, παρατηρήθηκαν *cristata* βλαστοί, όμοιοι με τη δεσμιωμένη μορφή, καθώς

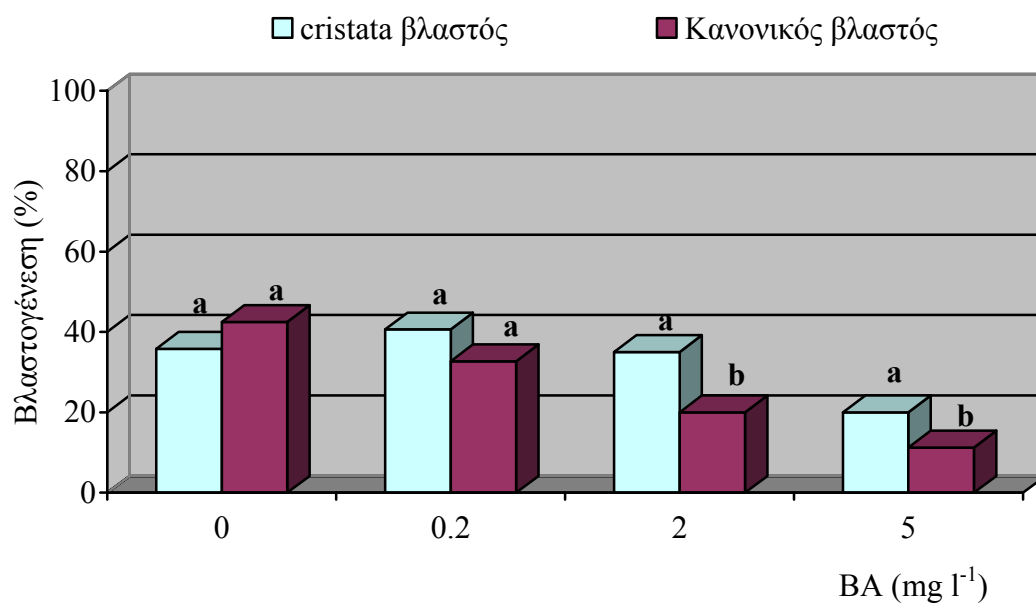
και βλαστοί ενδιάμεσου τύπου, που δεν είχαν ούτε την *cristata* ούτε την κανονική μορφή. Με τη πάροδο του χρόνου αυτοί οι βλαστοί που είχαν μια ενδιάμεση κατάσταση διαφοροποιούνταν σε κανονικούς (Εικ. 22) και στις μετρήσεις χαρακτηρίστηκαν ως κανονικοί.

Το υπόστρωμα επηρέασε το ποσοστό και τον αριθμό των *cristata* βλαστών, ενώ το ΒΑ επηρέασε το ποσοστό των κανονικών βλαστών που σχηματίστηκαν (Πίν. 27). Η σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του ΒΑ επέφερε ανάλογη μείωση του ποσοστού των εκφύτων που έδωσαν κανονικούς βλαστούς (Σχ. 45, 47). Το υψηλότερο ποσοστό *cristata* βλαστών σχηματίστηκε στα υποστρώματα με 0.2 ή 2.0 mg l⁻¹ ΒΑ χωρίς NAA, ενώ το υψηλότερο ποσοστό κανονικών βλαστών παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 0.5 mg l⁻¹ NAA χωρίς ΒΑ (Σχ. 46, 48).

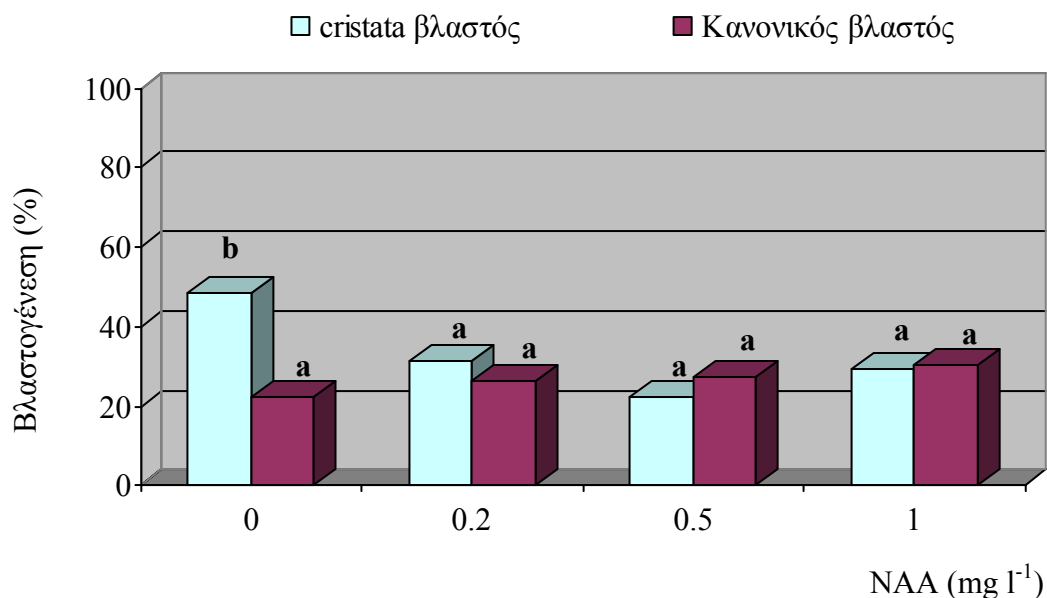
Πίν. 27. Ποσοστό εκφύτων *E. lactea* var. *cristata*, που σχημάτισαν *cristata* και κανονικούς βλαστούς, μέσος αριθμός *cristata* και κανονικών βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε και γινόμενο πολλαπλασιασμού, μετά από 60 ημέρες καλλιέργειας σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA, 2 μήνες μετά την εμφύτευση. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n = 15$.

Συγκέντρωση (mg l ⁻¹)		<i>Cristata</i> Βλαστός (%)	Κανονικός Βλαστός (%)	Μ. αρ. <i>Cristata</i> βλαστών	Μ. αρ. Κανον. βλαστών	Γινόμενο Πολλαπλασιασμού	
NAA	BA					<i>Cristata</i> βλαστών	Κανον. βλαστών
0	0	33.3 a	50 ab	1.33 a	1 ab	0.44	0.5
0.2	0	40 a	40 ab	1.88 a	0.9 ab	0.75	0.36
0.5	0	20 a	60 b	1 a	2.5 b	0.2	1.5
1	0	50 a	20 a	1 a	0.9 a	0.5	0.18
0	0.2	60 a	30 ab	1.8 a	2 b	1.08	0.6
0.2	0.2	25 a	25 ab	1 a	2.2 b	0.25	0.55
0.5	0.2	40 a	30 ab	2 a	1.8 b	0.8	0.54
1	0.2	37.5 a	45,83	1.5 a	1.9 b	0.56	0.87
0	2	60 a	10 a	1 a	1 ab	0.6	0.1
0.2	2	20 a	40 ab	1.1 a	0.9 ab	0.22	0.36
0.5	2	30 a	0 a	0.5 a	2 b	0.15	0
1	2	30 a	30 ab	0.5 a	1.5 b	0.15	0,45
0	5	40 a	0 a	1.5 a	0.3 a	0.6	0
0.2	5	40 a	0 a	1 a	0.3 a	0.4	0
0.5	5	0 b	20 a	0 a	0.9 ab	0	0.18
1	5	0 b	25 ab	0 a	0.5 a	0	0.12
		F _{NAA} ^{NS} F _{BA} [*] F _{NXB} [*]	F _{NAA} ^{NS} F _{BA} [*] F _{NXB} [*]	F _{NAA} [*] F _{BA} [*] F _{NXB} [*]	F _{NAA} ^{NS} F _{BA} [*] F _{NXB} [*]		

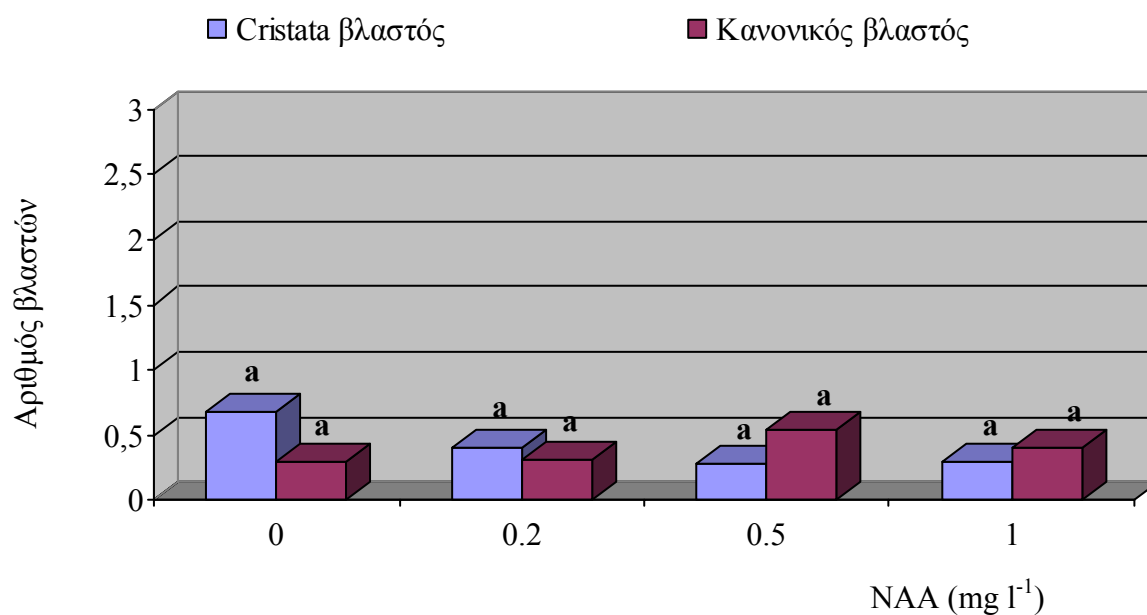
* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.



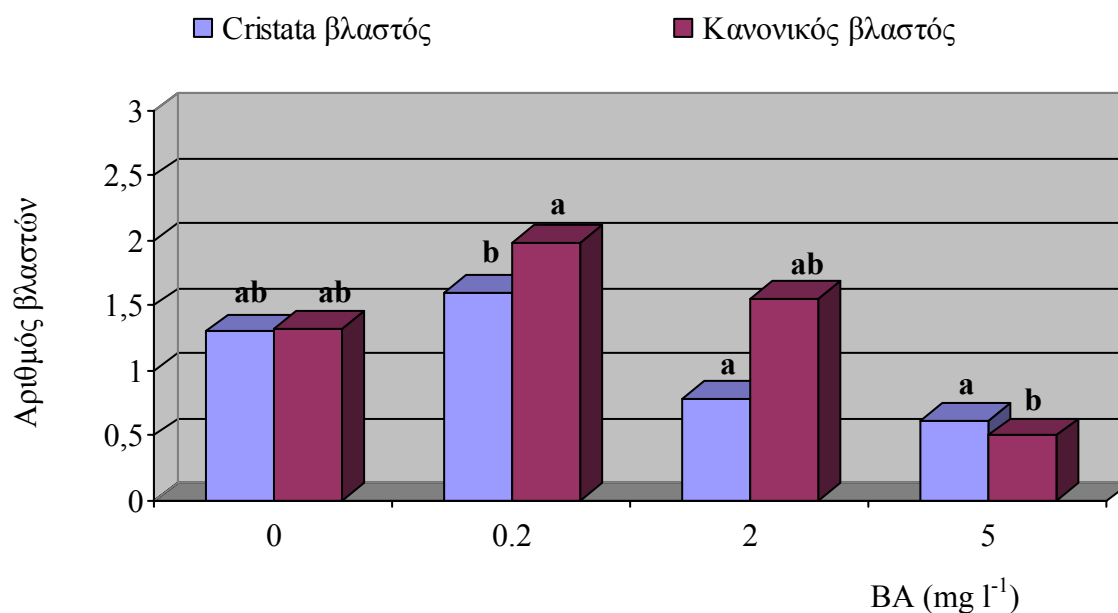
Σχ. 45. Επίδραση του BA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. lactea* var. *cristata*, τρεις μήνες μετά την εμφύτευση. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



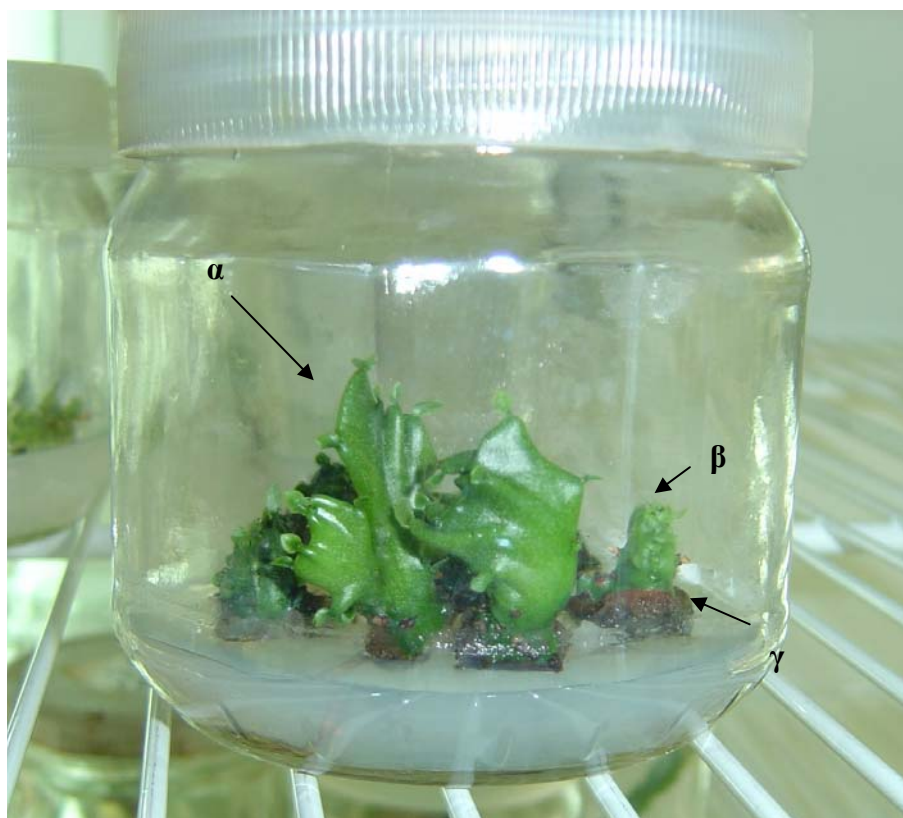
Σχ. 46. Επίδραση του NAA στη βλαστογένεση εκφύτων *E. lactea* var. *cristata*, τρεις μήνες μετά την εμφύτευση. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.



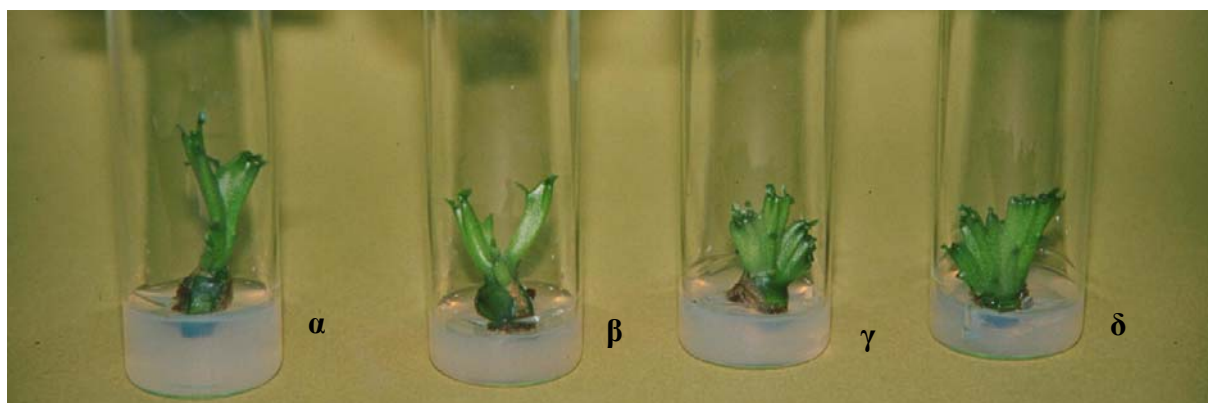
Σχ. 47. Επίδραση του NAA στο μέσο αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν από έκφυτα *E. lactea* var. *cristata*, μετά από 60 ημέρες καλλιέργειες σε MS. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



Σχ. 48. Επίδραση του BA στο μέσο αριθμό βλαστών που σχηματίστηκαν από έκφυτα *E. lactea* var. *cristata*, μετά από 60 ημέρες καλλιέργειες σε MS. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n = 15$.



Εικ. 21. *In vitro* καλλιέργεια *E. lactea* var. *cristata*, α) *cristata* βλαστός, β) κανονικός βλαστός, γ) κάλλος



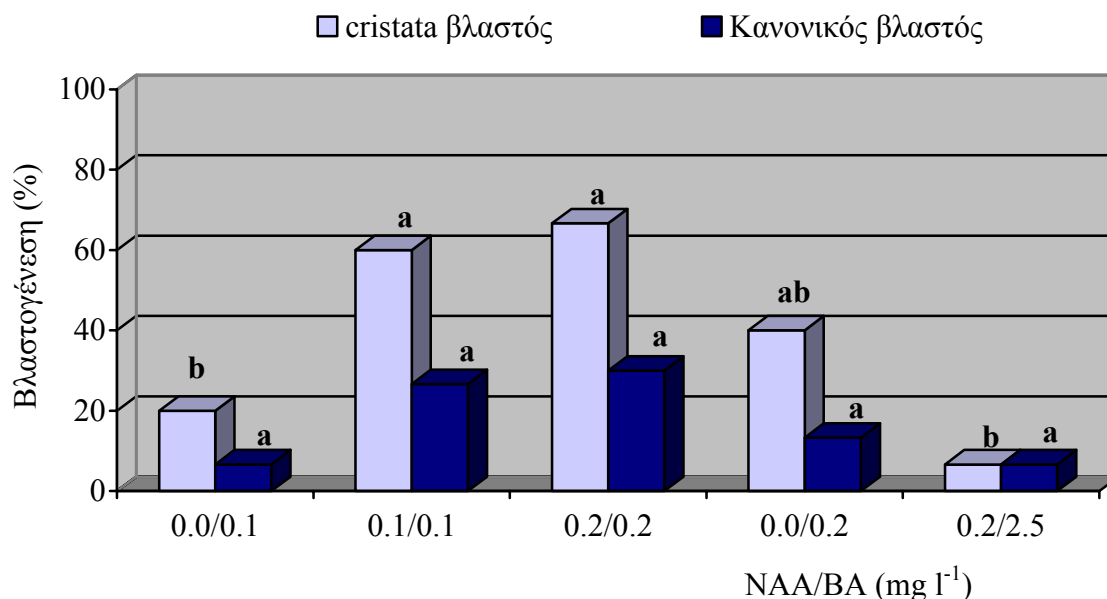
Εικ. 22. *In vitro* αναγεννημένοι κανονικοί (α, β) και δεσμιωμένοι (γ, δ) βλαστοί της *E. lactea* var. *cristata*

2.3.6.1 *In vitro* πολλαπλασιασμός της *Euphorbia lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”

Η *E. lactea* var. *cristata* έχει πάνω από 4 έγχρωμες ποικιλίες (άσπρη, κόκκινη, κίτρινη, λαχανί κ.α.) (κεφ. 2.2.1.3) που πολλαπλασιάζονται μόνο με εμβολιασμό. Μετά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *E. lactea* var. *cristata* δοκιμάστηκε ο πολλαπλασιασμός *in vitro* και μιας άσπρης ποικιλίας (“*Grey Ghost*”). Σκοπός ήταν η σύγκριση της συμπεριφοράς αυτής της ποικιλίας κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της τόσο με την πράσινη ποικιλία της *E. lactea* var. *cristata*, καθώς και με την κανονική μορφή.

Έκφυτα κορυφής (κεφ. 2.2.4) της *E. lactea* var. *cristata* “*Grey Ghost*” τοποθετήθηκαν *in vitro* τον Ιούλιο σε υπόστρωμα MS με τους ακόλουθους συνδυασμούς φυτορρυθμιστικών ουσιών NAA και BA : 0.0/0.1, 0.1/0.1, 0.2/0.2, 0.0/0.2 0.2/2.5 mg l⁻¹.

Η βλαστογένεση άρχισε να παρατηρείται 20 ημέρες από την εμφύτευση. Τα έκφυτα έδιναν αρχικά μια διόγκωση και στη συνέχεια διαφοροποιούνταν *cristata* ή κανονικοί βλαστοί. Στις 60 ημέρες σχεδόν σε όλα τα υποστρώματα παρατηρήθηκε βλαστογένεση και παραγωγή κάλου. Σχηματίστηκαν *cristata* βλαστοί όμοιοι με τη δεσμιωμένη μορφή και βλαστοί ενδιάμεσου τύπου, που δεν είχαν ούτε την *cristata* ούτε την κανονική μορφή. Με τη πάροδο του χρόνου και αυτοί διαφοροποιούνταν σε κανονικούς και έτσι στις μετρήσεις χαρακτηρίζονται ως κανονικοί βλαστοί. Το υψηλότερο ποσοστό *cristata* βλαστών (60 % και 67 %) παρατηρήθηκε στα υποστρώματα με 0.1 mg l⁻¹ NAA και BA ή 0.2 mg l⁻¹ NAA και BA, αντίστοιχα (Σχ. 49). Στο υπόστρωμα με 0.2 mg l⁻¹ NAA και BA παρατηρήθηκε σχηματισμός κάλου κατά μήκους του κορυφαίου μεριστώματος αλλοιώνοντας έτσι τη μορφή του εκφύτου. Αύξηση του BA από 0.1 σε 0.2 mg l⁻¹ διπλασίασε τον αριθμό των εκφύτων που έδωσαν βλαστούς, ενώ η υψηλή συγκέντρωση BA (2.5 mg l⁻¹) επέδρασε αρνητικά στη βλαστογένεση. Η προσθήκη NAA στο υπόστρωμα τριπλασίασε τον αριθμό των εκφύτων που έδωσαν βλαστούς, στις χαμηλές συγκεντρώσεις BA.

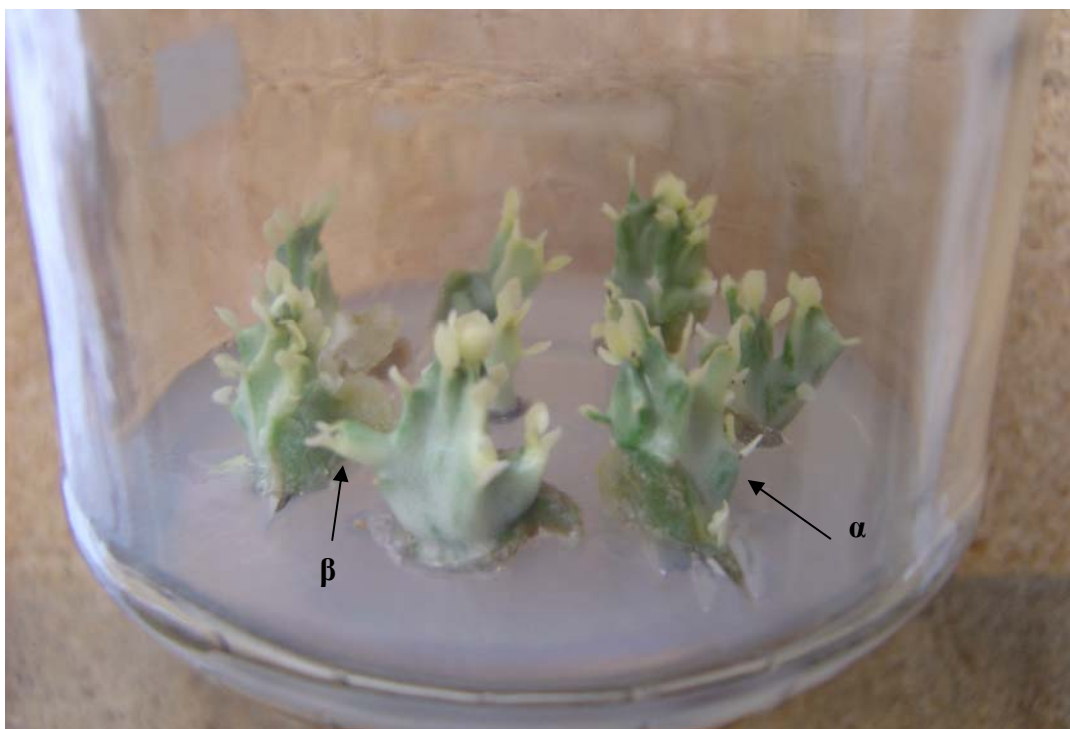


Σχ. 49. Ποσοστό εκφύτων *E. lactea* var. *cristata*, που σχημάτισαν *cristata* και κανονικούς βλαστούς, δύο μήνες μετά την εμφύτευση σε MS με τους αναγραφόμενους συνδυασμούς NAA και BA. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=15$.

2.3.6.2 Επίδραση των υποκαλιεργειών στην διατήρηση της δεσμιωμένης μορφής της *Euphorbia lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”

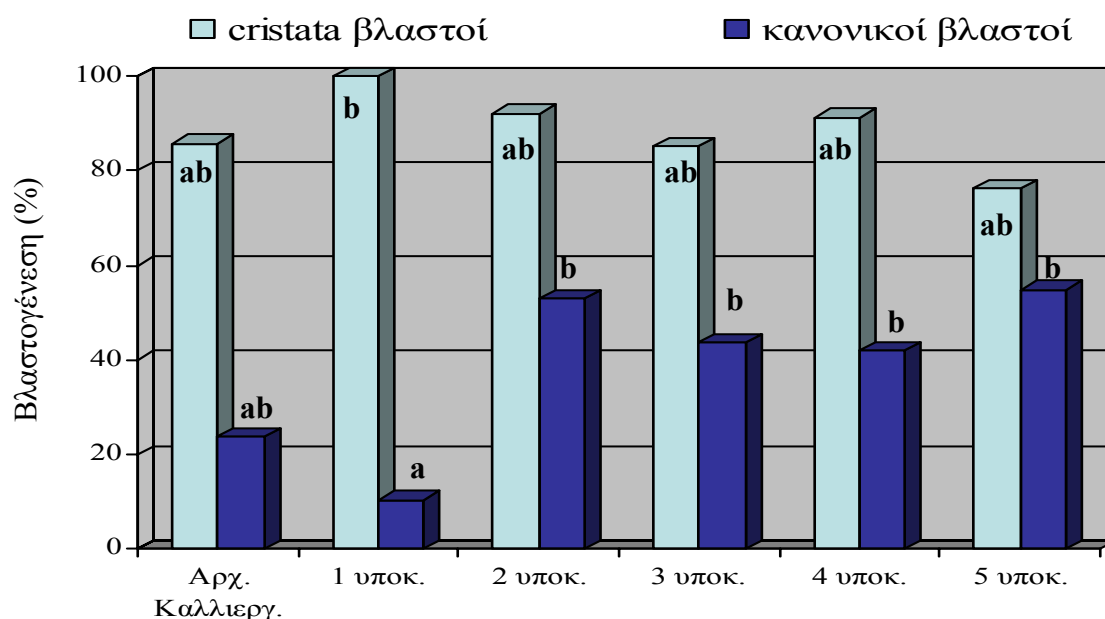
Πολλές φορές οι υποκαλλιέργειες μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό. Οι Norton and Norton (1986) υποκαλλίεργησαν για εννέα συνεχείς φορές, σε θρεπτικό υπόστρωμα με τη προσθήκη BA, έξι ανθοκομικά είδη της οικογένειας Rosaceae. Στις πρώτες υποκαλλιέργειες ο αριθμός των σχηματιζόμενων βλαστών αυξανόταν ενώ στις τελευταίες υποκαλλιέργειες βαθμιαία μειονόταν και αυξανόταν το ποσοστό του κάλου. Οι Hamad and Taha (2008) βρήκαν ότι μετά την τέταρτη υποκαλλιέργεια στον ανανά, ανεξαρτήτως του χρόνου κάθε υποκαλλιέργειας, τα έκφυτα έχασαν το 50% της ικανότητας να παράγουν βλαστούς.

Μικροβλαστοί της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” υποκαλλιεργήθηκαν (Εικ. 23) με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης των υποκαλιεργειών στη διατήρηση της δεσμιωμένης μορφής. Πέντε *cristata* βλαστοί διαλέγονταν σε κάθε υποκαλλιέργεια για να υποκαλλιεργηθούν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0.1 mg l^{-1} NAA και BA. Η καλλιέργεια ξεκίνησε Φεβρουάριο και η περίοδος κάθε υποκαλλιέργειας ήταν 60 ημέρες.



Εικ. 23. Υποκαλλιέργεια μικροβλαστών *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” 60 ημέρες από την εμφύτευση, (α) *cristata* και (β) κανονικός βλαστός

Τα αποτελέσματα μετά από 5 υποκαλλιέργειες (σύνολο 10 μηνών καλλιέργειας) φαίνονται στο σχήμα 50. Στην 1^η υποκαλλιέργεια παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό (100%) *cristata* βλαστών και το μικρότερο ποσοστό κανονικών βλαστών. Μετά, καθώς αυξάνονται οι υποκαλλιέργειες το ποσοστό των εκφύτων που έδωσε βλαστούς παραμένει σταθερό ή εμφανίζει μικρή μείωση, αυξάνεται όμως η παραγωγή κανονικών βλαστών.



Σχ. 50. Ποσοστό εκφύτων *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”, που έδωσαν *cristata* και κανονικούς βλαστούς, κατά την αρχική καλλιέργεια και σε πέντε συνεχείς υποκαλλιέργειες σε MS με 0.1 mg l^{-1} NAA και BA. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=15$.

2.3.6.3 Διατήρηση του ετεροχρωματισμού της *Euphorbia lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” στις υποκαλλιέργειες

Το μεγάλο ανθοκομικό ενδιαφέρον της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” βασίζεται στον γκρίζο άσπρο χρωματισμό της. Διερευνήθηκε εάν διατηρείται αυτό το χαρακτηριστικό κατά τις συνεχείς υποκαλλιέργειες. Έτσι επιλέχθηκαν τρεις δεσμιωμένοι βλαστοί, από τα έκφυτα που καλλιεργήθηκαν το Φεβρουάριο σε MS με 0.1 mg l^{-1} NAA και BA, που υποκαλλιεργούνταν ανά 60 ημέρες στο ίδιο υπόστρωμα.

Πραγματοποιήθηκε μια μέτρηση χρώματος ανά επιφάνεια του βλαστού (σύνολο δύο μετρήσεις ανά βλαστό) με τη βοήθεια χρωματόμετρου (Minolta CR-300). Μετρούνταν οι τιμές L^{mean} , a και b ώστε να αξιολογηθεί ο ετεροχρωματισμός των βλαστών μετά από συνεχείς υποκαλλιέργειες και υπολογίσθηκε η χρωματική χροιά (κεφ. 2.2.7).

Πίν. 28. Αξιολόγηση του ετεροχρωματισμού της *E. lactea* var. *crystata* “Grey Ghost” μετά από συνεχείς υποκαλλιέργειες *in vitro* σε MS με 0.1 mg l⁻¹ NAA και BA. Σύγκριση των μέσων με Tukey Kramer HSD, P=0.05, n=8.

	L*	-a*/b*	h*
Μητρικό φυτό	58.10 a	0.70 a	176.5 a
Αρχική καλλιέργεια	54.89 a	0.60 a	169.9 a
1 ^η υποκαλλιέργεια	56.76 a	0.67 a	173.4 a
2 ^η υποκαλλιέργεια	58.15 a	0.60 a	174.4 a
3 ^η υποκαλλιέργεια	57.72 a	0.59 a	183.5 a
4 ^η υποκαλλιέργεια	56.00 a	0.59 a	180.0 a
5 ^η υποκαλλιέργεια	57.50 a	0.60 a	179.8 a
	F ^{ns}	F ^{ns}	F ^{ns}

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε P=0.05, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε P=0.05.

Η σύγκριση των τιμών της παραμέτρου L* του χρώματος των φυτών ανάμεσα στο μητρικό φυτό, την αρχική καλλιέργεια και τις υποκαλλιέργειες (δηλαδή σε σύνολο 360 ημερών) δεν έδωσε στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίν. 28). Αντίστοιχα μη σημαντικές ήταν οι διαφορές του λόγου -a*/b* και του h* (χροιάς του χρώματος) ανάμεσα στο μάρτυρα, την αρχική καλλιέργεια και τις υποκαλλιέργειες. Η μη στατιστικά σημαντική μεταβολή στις τιμές της παραμέτρου L* (που δείχνουν τη φωτεινότητα), του λόγου -a*/b* (ο οποίος σχετίζεται με τη χλωροφύλλη), καθώς και της χροιάς του χρώματος (η οποία είναι κοντά στις 180° υποδηλώνοντας μια πράσινη-μπλε απόχρωση των φυτών), υποδεικνύουν μια σταθερότητα του χαρακτήρα του ετεροχρωματισμού στα φυτά ακόμα και μετά από πέντε υποκαλλιέργειες.

2.3.7 Επίδραση του TIBA στην *in vitro* καλλιέργεια κανονικών και δεσμιωμένων μορφών των παχυφύτων *Mammillaria elongata* και *Euphorbia pugniformis*

Το TIBA θεωρείται ανταγωνιστής της αυξίνης παρεμποδίζοντας την πολική βασιπεταλική μετακίνησή της στο φυτό (από το μερίστωμα προς τα κάτω). Αυτή η παρεμπόδιση συμβαίνει 1 min μετά την εφαρμογή του TIBA (Thomson *et al.*, 1973). Βάση της βιβλιογραφίας το TIBA μπορεί να προκαλέσει δεσμίωση μετά από ψεκάσμο. Τέτοια

παραδείγματα είναι η εμφάνιση δεσμώσης στην *Kalanchoe blossfeldiana* (Harder and Oppermann, 1952) και η σύμπτυξη του μίσχου και του ελάσματος του φύλλου στο *Codiaeum variegatum* f. *interruptum* (Wenck, 1952).

Η εφαρμογή του TIBA *in vitro* έχει δείξει μια παρεμπόδιση της οργανογένεσης σε έκφυτα φύλλου *Nicotiana tabacum*, παρεμβένοντας με την ενδογενή αυξίνη στην κυτταρική διαίρεση (Dhaliwal *et al.*, 2004), ενώ ο Kavyashree (2007) χρησιμοποίησε το TIBA για να πάρει περισσότερους πλάγιους βλαστούς κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της ποικιλίας S54 της *Morus alba*. Οι Nyman και Jarditty (1984) όταν πρόσθεσαν TIBA στο θρεπτικό υπόστρωμα μείωσαν την ανώμαλη δομή των φυταρίων της *Colocasia esculenta* var. *antiquorum*.

Με το σκεπτικό ότι η εφαρμογή TIBA στο φυτό μπορεί να προκαλέσει δεσμώση διερευνήθηκε *in vitro* η επίδρασή του τόσο κατά την βλάστηση σπόρων της *M. elongata*, όσο και κατά την υποκαλλιέργεια εκφύτων από βλαστούς, δεσμιωμένους και κανονικούς της *E. pugniformis* var. *cristata*.

2.3.7.1 Επίδραση του TIBA στην έκπτυξη και ανάπτυξη σποροφύτων της *Mammillaria elongata*

Σπόροι της *M. elongata* αφού απολυμάνθηκαν τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri, που περιείχαν στερεό υπόστρωμα MS ή MS με 0 και 0.1 mg l⁻¹ TIBA, για βλάστηση.

Μετά από 50 ημέρες καλλιέργειας παρατηρήθηκε επιμήκυνση των σποροφύτων στην επέμβαση με TIBA σε σχέση με τον μάρτυρα. Η υποκαλλιέργεια των σποροφύτων σε σκέτο MS μετά από 90 ημέρες, δεν έδειξε κάποια εμφανή μορφολογική διαφορά μεταξύ των σποροφύτων που προήλθαν από τις δύο επεμβάσεις.

2.3.7.2 Επίδραση του TIBA στην υποκαλλιέργεια βλαστών *Euphorbia pugniformis* var. *cristata*

Έκφυτα από *cristata* και κανονικούς βλαστούς της *E. pugniformis* var. *cristata* προερχόμενα από καλλιέργεια σε MS με 0.1 mg l⁻¹ NAA και BA, υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 10 ή 100 mg l⁻¹ TIBA. 60 ημέρες μετά την εμφύτευση εξετάστηκε η διατήρηση της δεσμιωμένης μορφής στους *cristata* βλαστούς και η τυχόν διαφοροποίηση της μορφολογίας των κανονικών βλαστών (Πίν. 29).

Πίν. 29. Υποκαλλιέργεια βλαστών *E. pugniformis* var. *cristata* σε MS με 10 ή 100 mg l⁻¹ TIBA μετά από 60 ημέρες, n=5.

Είδος Εκφύτου	10 mg l ⁻¹ TIBA	100 mg l ⁻¹ TIBA
<i>Cristata</i> βλαστός	Καμία ανάπτυξη	Καταστροφή
Κανονικός βλαστός	67% αναπτύχθηκαν	Καταστροφή
Βλαστός ρόπαλο	Αύξησε τον αριθμό πλάγιων βλαστών	Καταστροφή

Όπως παρατηρείται από τον Πίν. 28 η επέμβαση των 10 mg l⁻¹ TIBA σταμάτησε την ανάπτυξη των *cristata* βλαστών, ενώ το 67% των κανονικών βλαστών (βλαστοί δευτεροταγείς) επιμηκύνθηκαν χωρίς όμως να παρατηρηθεί κάποια μορφολογική διαφορά (ύπαρξη δεσμίωσης). Στους βλαστούς ρόπαλο παρατηρήθηκε αύξηση στον αριθμό πλάγιων βλαστών (δευτεροταγών) χωρίς επίσης να παρατηρηθεί κάποια μορφολογική διαφορά. Η επίδραση των 100 mg l⁻¹ ήταν καταστροφική για τα έκφυτα.

2.3.8 Επίδραση του αζώτου στη διατήρηση της *cristata* μορφής στον *in vitro* πολλαπλασιασμό

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας διαπιστώθηκε ότι καλή ανόργανη λίπανση ή ισχυρή οργανική συντελεί στην εμφάνιση δεσμίωσης (Hus, 1908) (κεφ. 1.3.4.2). Ο Houghton (1930) θεωρούσε ότι οι εξωτερικές συνθήκες, όπως ο τύπος του υποστρώματος και η θερμοκρασία, επηρεάζουν την ανάπτυξη *cristata* μορφών των παχυφύτων, και ότι κάτω από φτωχές συνθήκες εμφανίζουν μια τάση να επανέλθουν στον κανονικό τύπο ανάπτυξης. Από την άλλη μεριά, ο Butterfield (1962) υποστήριξε ότι η επιστροφή στην κανονική μορφή εμφανίζεται όταν οι συνθήκες ανάπτυξης είναι στο optimum ή σύμφωνα με τον Hunter (1984) όταν υπερλιπαίνονται.

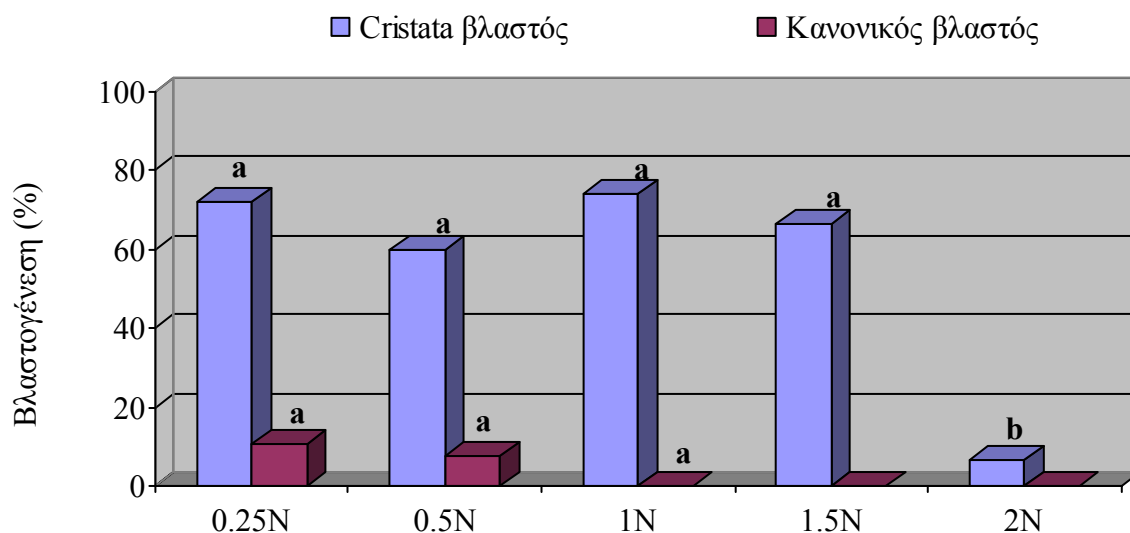
Στα μέχρι τώρα *in vitro* πειράματα παρατηρήσαμε ότι όλες οι δεσμιωμένες μορφές που καλλιεργήθηκαν δεν έδωσαν μόνο *cristata* βλαστούς αλλά και κανονικούς. Το θρεπτικό υπόστρωμα MS που χρησιμοποιήθηκε, που είναι το πιο κοινό υπόστρωμα μεριστωματικού πολλαπλασιασμού για τα περισσότερα φυτά, περιέχει NH₄ NO₃ και KNO₃ σε συγκέντρωση 1650 και 1900 mg l⁻¹, αντίστοιχα (Murashige and Skoog, 1962).

Για τη διερεύνηση της υπόθεσης ότι η υπερβολική ή η χαμηλή λίπανση μπορεί να επηρεάσει τη δεσμίωση των φυτών έκφυτα δεσμιωμένης μορφής της *E. pugniformis* και *E.*

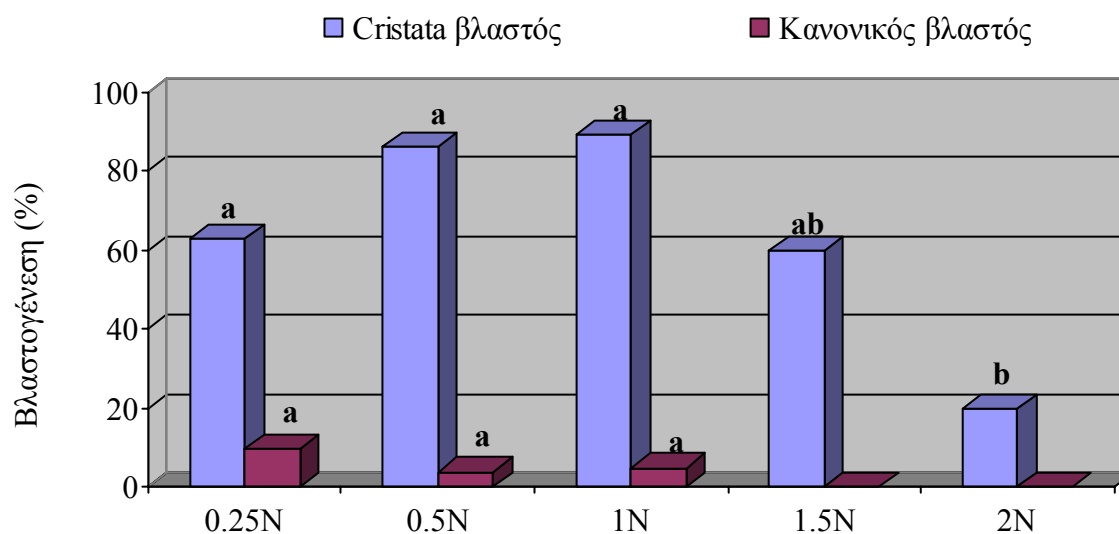
lactea καλλιεργήθηκαν σε MS με μείωση κατά 0.5 και 0.25 και αύξηση κατά 1.5 ή 2 φορές της συγκέντρωσης των μακροστοιχείων NH_4NO_3 και KNO_3 στο θρεπτικό υπόστρωμα.

2.3.8.1. Επίδραση του αζώτου στη διατήρηση της *cristata* μορφής στην *Euphorbia pugniformis* var. *cristata*

Έκφυτα (κεφ. 2.2.4) της *Euphorbia pugniformis* var. *cristata* καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε στερεό υπόστρωμα MS με 0.2 mg l^{-1} NAA και 0.1 mg l^{-1} NAA και BA. Μετά από έναν και τέσσερις μήνες καλλιέργειας παρατηρήθηκαν τα εξής: Η μείωση του N στο υπόστρωμα αύξησε το ποσοστό σχηματισμού *cristata*, ενώ μείωσε το ποσοστό των κανονικών βλαστών που παράχθηκαν. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε αλληλεπίδραση της συγκέντρωσης του αζώτου και των φυτορρυθμιστικών ουσιών. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι με τη μείωση της συγκέντρωσης των αζωτούχων ενώσεων του υποστρώματος ευνοήθηκε η διατήρηση της *cristata* μορφής τέσσερις μήνες μετά την εμφύτευση (Σχ. 51). Αντίθετα, η αύξηση του N μείωσε το ποσοστό των εκφύτων τα οποία σχημάτισαν *cristata* (Σχ. 52) και αύξησε το ποσοστό των νεκρών εκφύτων.



Σχ. 51. Ποσοστό εκφύτων *E. pugniformis* var. *cristata* που έδωσαν *cristata* ή κανονικούς βλαστούς ένα μήνα μετά την εμφύτευση, σε MS με 0.2 mg l^{-1} NAA και 0.25, 0.5, 1, 1.5 και 2 φορές την ποσότητα του αζώτου (N) που περιέχεται στο MS. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

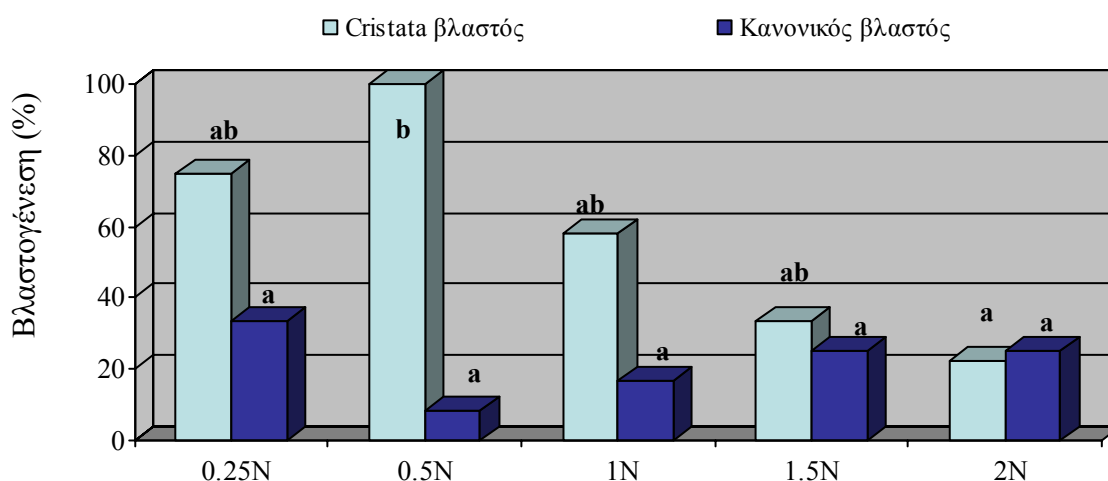


Σχ. 52. Ποσοστό εκφύτων *E. rugniformis* var. *cristata* που έδωσαν *cristata* ή κανονικούς βλαστούς ένα μήνα μετά την εμφύτευση, σε MS με 0.1 mg l^{-1} NAA και BA και 0.25, 0.5, 1, 1.5 και 2 φορές την ποσότητα του αζώτου (N) που περιέχεται στο MS. Σύγκριση των μέσων με το Tukey-Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

2.3.8.2 Επίδραση του αζώτου στη διατήρηση της *cristata* μορφής στην *Euphorbia lactea* var. *cristata*

Έκφυτα (κεφ. 2.2.4) της *Euphorbia lactea* var. *cristata* καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε MS με 0.1 mg l^{-1} NAA και BA. Μετά από τρεις μήνες καλλιέργειας μετρήθηκε το ποσοστό δεσμιωμένων και κανονικών βλαστών που δημιουργήθηκαν.

Η μείωση του αζώτου στο μισό αύξησε το ποσοστό σχηματισμού δεσμιωμένων βλαστών, ενώ μείωσε το ποσοστό των κανονικών βλαστών (Σχ. 53). Η περαιτέρω μείωσή του (1/4) προκάλεσε αύξηση τόσο των δεσμιωμένων όσο και των κανονικών βλαστών σε σχέση με τον μάρτυρα. Αντίθετα, η αύξηση του αζώτου μείωσε το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν *cristata* βλαστούς και αύξησε το ποσοστό των κανονικών βλαστών.



Σχ. 53. Ποσοστό εκφύτων που έδωσαν *cristata* ή κανονικούς βλαστούς τρεις μήνες μετά την εμφύτευση, σε στερεό υπόστρωμα MS με 0.1 mg l^{-1} NAA και BA και 0.25, 0.5, 1, 1.5 και 2 φορές την ποσότητα του αζώτου (N) που περιέχεται στο MS. Η σύγκριση των μέσων με Tukey – Kramer HSD σε $P=0.05$, $n=15$.

2.3.9 Ριζοβολία

Η ριζοβολία *in vitro* των αναγεννημένων βλαστών αποτελεί την επόμενη διαδικασία για την ολοκλήρωση του μικροπολλαπλασιασμού. Στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας βρέθηκε ότι η προσθήκη $0.5\text{--}1 \text{ mg l}^{-1}$ IBA ή $0.5\text{--}1 \text{ mg l}^{-1}$ IAA στο MS οδήγησε στην ανάπτυξη ριζών σε 21 είδη που ανήκουν στα γένη *Astrophytum*, *Cephalocereus*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Echinofossulocactus*, *Ferocactus*, *Mammillaria*, *Nyctocereus*, *Stenocactus* (Balch *et al.*, 1998). Υψηλότερες συγκεντρώσεις (5 mg l^{-1} IBA) πρότειναν οι Clayton *et al.* (1990) για 11 είδη της υποφυλής Cactinae. Τα φυτά *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* και *Stenocereus thurberi* ριζοβόλησαν ικανοποιητικά σε 1 mg l^{-1} IBA (Balch *et al.*, 1998).

Υπάρχουν και αναφορές που οι μικροβλαστοί ριζοβόλησαν σε σκέτο MS κανονικής ή μισής δύναμης χωρίς τη προσθήκη αυξίνης (Medeiros *et al.*, 2006, Clayton *et al.*, 1990).

Στη βιβλιογραφία για το γένος *Euphorbia sp.* βρέθηκε ότι βλαστοί της *Euphorbia milli* ριζοβόλησαν (75%) σε MS με 0.15 mg l^{-1} IAA (Airò *et al.*, 2003), ενώ στην *Euphorbia antisiphilitica* η ριζοβόληση έγινε σε μισής δύναμης MS με 0.1 mg l^{-1} IBA (Jakobek *et al.*, 1986).

2.3.9.1 *In vitro* ριζοβολία βλαστών των κανονικών και δεσμιωμένων μορφών των παχυφύτων *Mammillaria elongata*, *Euphorbia pugniformis*, *Euphorbia lactea*.

A. Επίδραση του IBA στη ριζοβολία

Δεσμιωμένοι και κανονικοί βλαστοί των παχυφύτων *M. elongata*, *E. pugniformis* και δεσμιωμένοι βλαστοί της *E. lactea* προερχόμενοι από διάφορα υποστρώματα, ύψους έως 1 cm, τοποθετήθηκαν για ριζοβολία *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0.5 ή 1 mg l⁻¹ IBA. Δοκιμάστηκαν δύο ειδών τομές (κωνικές και επίπεδες) στις κανονικές μορφές των *M. elongata* και *E. pugniformis*.

Ρίζες άρχισαν να παρατηρούνται σχεδόν από τον πρώτο μήνα εγκατάστασης, ενώ τα έκφυτα ολοκλήρωσαν τη ριζοβολία τους σε διάστημα δυο μηνών (Εικ. 24, 25). Στις κανονικές μορφές των *M. elongata* και *E. pugniformis* το ποσοστό ριζοβολίας και στα δύο είδη τομών ήταν σχεδόν παρόμοια με μόνη διαφορά ότι οι κωνικές τομές παρουσίασαν μεγαλύτερο αριθμό ριζών σε σχέση με τις επίπεδες (όχι στατιστική διαφορά). Στον πίνακα 30 φαίνεται το ποσοστό των φυταρίων που ριζοβόλησαν.

Πίν. 30. Ποσοστό κανονικών και δεσμιωμένων βλαστών των παχυφύτων *E. pugniformis*, *E. lactea* και *M. elongata* που ριζοβόλησαν *in vitro* σε MS με 0.5 ή 1 mg l⁻¹ IBA. Σύγκριση των μέσων με Tukey – Kramer HSD, σε $P=0.05$, $n=15$.

Κανονικές Μορφές			
IBA (mg l ⁻¹)	<i>E. pugniformis</i>	<i>E. lactea</i>	<i>M. elongata</i>
0.5	45 a	-	35 a
1.0	39 a	-	50 a
	F _{IBA} ^{NS}		F _{IBA} ^{NS}
Δεσμιωμένες Μορφές			
IBA (mg l ⁻¹)	<i>E. pugniformis</i>	<i>E. lactea</i>	<i>M. elongata</i>
0.5	46.6 a	60 a	50 a
1.0	33.3 a	53.3 a	20 a
	F _{IBA} ^{NS}	F _{IBA} ^{NS}	F _{IBA} ^{NS}

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.

Τα αποτελέσματα αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντικά έδειξαν ότι το καλύτερο υπόστρωμα ριζογέννησης ήταν αυτό με 0.5 mg l^{-1} IBA τόσο για τις τυπικές όσο και τις δεσμιωμένες μορφές των παχυφύτων με εξαίρεση την κανονική μορφή της *M. elongata*. Παρόμοια αντίδραση είχε η *E. fulgens* η οποία ριζοβόλησε σε 0.6 mg l^{-1} IBA (Zhang *et al.*, 1989).



Εικ. 24. Ριζοβλημένοι μικροβλαστοί δεσμιωμένης και κανονικής μορφής *E. pugniformis*



Εικ. 25. Ριζοβλημένοι μικροβλαστοί *E. lactea* var. *cristata*

B. Ριζοβολία στο υπόστρωμα βλαστογένεσης

Ποσοστό 60 – 85 % των φυταρίων τόσο των κανονικών όσο και των δεσμιωμένων μορφών των παχυφύτων *M. elongata*, *E. pugniformis*, *E. lactea* που παρέμειναν στο αρχικό υπόστρωμα καλλιέργειας μετά από τέσσερις μήνες σχημάτισαν ρίζες (τα πρώτα σημάδια σχηματισμού ριζών φαίνονταν μετά τον τρίτο μήνα). Οι ρίζες αυτές δεν ξεπερνούσαν τις 3-4 ανά φυτάριο και στις περισσότερες περιπτώσεις χαρακτηρίζονταν για το μεγάλο μήκος των, ειδικά στη δεσμιωμένη μορφή της *E. pugniformis*. Οι ρίζες αυτές διέφεραν από αυτές που αναπτύχθηκαν στα υποστρώματα που περιείχαν IBA, καθώς είχαν ελαφρώς σκουρότερο χρώμα και ήταν λεπτότερες.

2.3.9.2 Εγκλιματισμός φυταρίων των κανονικών και δεσμιωμένων μορφών των *Mammillaria elongata*, *Euphorbia pugniformis*, *Euphorbia lactea*

Έρριζα φυτάρια κανονικών και δεσμιωμένων μορφών των *M. elongata*, *E. pugniformis*, *E. lactea* εγκλιματίστηκαν *ex vitro* σε ποσοστό που κυμαινόταν στην *M. elongata* από 80 - 95% και στις *E. pugniformis* (Εικ. 26), *E. lactea* από 95-100%.

Παρατηρήθηκε ακόμη, πως έρριζα φυτάρια της *M. elongata* var. *cristata* (Εικ. 27) που ριζοβόλησαν σε 0.5 mg l^{-1} IBA σε σχέση με έρριζα φυτάρια που ριζοβόλησαν παραμένοντας στο υπόστρωμα βλαστογένεσης, μετά τον πρώτο χρόνο καλλιέργειάς τους *ex vitro* κράτησαν την εμφάνιση της δεσμωμένης μορφής.



Εικ. 26. Εγκλιματισμένα *ex vitro* φυτάρια της *E. pugniiformis* var. *cristata*



Εικ. 27. Εγκλιματισμένα *ex vitro* φυτάρια της *M. elongata* var. *cristata*

2.4 Συζήτηση –Συμπεράσματα

Αρκετά παχύφυτα μέχρι σήμερα έχουν πολλαπλασιαστεί *in vitro*. Σύμφωνα με την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας (κεφ. 2.1.2.4) η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε 314 είδη που ανήκουν σε 104 γένη των σημαντικότερων οικογενειών παχυφύτων. Ως έκφυτα έχουν χρησιμοποιηθεί κορυφαίο μερίστωμα, πλάγιος οφθαλμός, σπόρος, ιστοί σπορόφυτων, εντεριώνη, ωάρια και ταξιανθίες. Ο συνήθης τρόπος πολλαπλασιασμού των παχυφύτων είναι με σπόρο ή μοσχεύματα και η ανάπτυξη του *in vitro* πολλαπλασιασμού αποσκοπεί, πέραν των ερευνητικών σκοπών (που αφορούν π.χ. στον CAM μεταβολισμό των παχυφύτων), στον πολλαπλασιασμό ειδών που είναι προς εξαφάνιση ή δεν παράγουν σπόρο. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι δεσμιωμένες μορφές των παχυφύτων. Η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου πολλαπλασιασμού δεσμιωμένων μορφών θα μπορούσε αφενός να λύσει το πρόβλημα της μη ύπαρξης αρκετού πολλαπλασιαστικού υλικού, και αφετέρου να προσφέρει γνώση που να αφορά στο φαινόμενο της δεσμίωσης, καθώς μέχρι σήμερα δεν είναι ξεκάθαρη η αιτία που το προκαλεί.

Στο κεφάλαιο αυτό διερευνήθηκε ο *in vitro* πολλαπλασιασμός κανονικών και δεσμιωμένων μορφών των παχυφύτων *M. elongata*, *E. pugniformis* και *E. lactea* με σκοπό τη σύγκριση της συμπεριφοράς των δυο μορφών (*cristata* και κανονική). Για τη διερεύνηση του φαινομένου της δεσμίωσης, μελετήθηκε η επίδραση των φυτορρυθμιστικών ουσιών στο σχηματισμό βλαστών από έκφυτα κορυφαίου μεριστώματος και κάλου κανονικών και δεσμιωμένων μορφών, η επίδραση της εποχής λήψης των εκφύτων στις *M. elongata*, *E. pugniformis*, η επίδραση των υποκαλλιεργειών στη διατήρηση τόσο των δεσμιωμένων βλαστών όσο και του χρώματος της ποικιλίας *E. lactea* var. *cristata* ‘Grey Ghost’, η επίδραση του BA στο σχηματισμό βλαστών τόσο σε δεσμιωμένες όσο και σε κανονικές μορφές των τριών εξεταζόμενων ειδών παχυφύτων, η επίδραση του παρεμποδιστή της αυξίνης TIBA και τέλος η επίδραση του αζώτου του θρεπτικού υποστρώματος MS κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό, η ριζοβολία και ο εγκλιματισμός των φυταρίων σε *ex vitro* συνθήκες.

Ο σχηματισμός βλαστών στη *M. elongata* επιτεύχθηκε όταν τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0.2 mg l⁻¹ NAA και 2.5 ή 5 mg l⁻¹ BA (κεφ. 2.3.1). Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και προηγούμενα πειράματά μας (Παπαφωτίου *et al.*, 1998). Οι Johnson and Emimo (1979) πολλαπλασίασαν τη *M. elongata* σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις (10 mg l⁻¹ NAA και 60 mg l⁻¹ BA), που όταν δοκιμάστηκαν έδωσαν ανοιχτοπράσινο υδαρή κάλο (Papafoitiou *et al.*, 2001).

Ο παραγόμενος κάλος από τον *in vitro* πολλαπλασιασμό υποκαλλιεργήθηκε δύο φορές σε συγκεντρώσεις 0.2 mg l⁻¹ NAA και 2.5 ή 5 mg l⁻¹ BA και παρατηρήθηκε η έκπτυξη

βλαστών στο υπόστρωμα 0.2 mg l^{-1} NAA και 5 mg l^{-1} BA κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια, ενώ στη δεύτερη το BA δεν επηρέασε τη βλαστογένεση.

Κατά την *in vitro* καλλιέργεια της *M. elongata* var. *cristata* παρατηρήθηκε σχηματισμός δεσμιωμένων και κανονικών βλαστών. Το NAA σε συγκέντρωση 0.2 mg l^{-1} και ο συνδυασμός 0.1 mg l^{-1} NAA και BA προκάλεσαν το σχηματισμό *cristata* βλαστών σε υψηλό ποσοστό σε έκφυτα κορυφής (K). Η αύξηση του NAA σε 1 mg l^{-1} σε έκφυτα κάτω από την κορυφή (κΚ) προκάλεσε σημαντική αύξηση του ποσοστού διαφοροποίησης *cristata* βλαστών. Στα έκφυτα (κΚ) η αύξηση του BA από 0.5 σε 1 mg l^{-1} επέφερε σημαντική αύξηση των κανονικών βλαστών.

Σε ότι αφορά το είδος των εκφύτων βρέθηκε ότι έκφυτα κορυφής (K) αντέδρασαν και σχημάτισαν *cristata* βλαστούς σε υψηλότερα ποσοστά απ'ότι έκφυτα από την περιοχή κάτω από την κορυφή (κΚ).

Στην *M. elongata* var. *tenuis* βρέθηκε ότι η εποχή λήψης των εκφύτων (σε σχέση με την ανθοφορία) επηρέασε το σχηματισμό βλαστών (Mechra and Cheema, 1980). Στη δεσμιωμένη μορφή της *M. elongata* η εποχή δε φαίνεται να επηρέασε την αντίδραση των εκφύτων (100%), αν και τον Οκτώβριο ήταν υψηλότερο το ποσοστό εκφύτων που σχημάτισε *cristata* βλαστούς. Ανάλογα την εποχή και τη διαφορετική φυτορρυθμιστική ουσία επηρέασε την αντίδραση των εκφύτων αν και υπήρχαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις των NAA και BA. Τον Φεβρουάριο η αύξηση της συγκέντρωσης του BA έδειξε μια μείωση της βλαστογένεσης κανονικών βλαστών, ενώ το NAA δεν επηρέασε τη βλαστογένεση.

Στην *M. elongata* var. *cristata* παρατηρήθηκε η αναγέννηση κανονικών και δεσμιωμένων βλαστών από κάλο που παράχθηκε παρουσία *in vitro* NAA και BA, όταν υποκαλλιεργήθηκε σε MS χωρίς την ύπαρξη φυτορρυθμιστικών ουσιών. Για να ελεγχθεί περαιτέρω πως επηρεάζουν οι συγκεντρώσεις NAA και BA την αναγέννηση κανονικών και *cristata* βλαστών μέσω κάλου παρήχθη κάλος από πολύ υψηλές συγκεντρώσεις NAA και BA (1 mg l^{-1} NAA και 5 ή 10 mg l^{-1} BA) και ένα μήνα μετά υποκαλλιεργήθηκε σε 0.2 mg l^{-1} NAA και BA ή 0.2 mg l^{-1} NAA και 2.5 mg l^{-1} BA (υποστρώματα που είχαν δοκιμαστεί και στην *M. elongata*) και βρέθηκε ότι η αύξηση του BA οδήγησε σε μείωση δεσμιωμένων βλαστών και αύξηση κανονικών.

Η αναγέννηση βλαστών κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *E. pugniformis* επηρεάστηκε από το BA αυξάνοντας το ποσοστό και τον αριθμό των βλαστών. Καλλίτερο υπόστρωμα φάνηκε ότι ήταν το 0 ή 1 mg l^{-1} NAA και 5 mg l^{-1} BA.

Η βλαστογένεση των εκφύτων της *E. pugniformis* var. *cristata* παρατηρήθηκε σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στη κανονική μορφή. Τα

έκφυτα είχαν την ίδια αντίδραση με τα έκφυτα της *M. elongata* var. *cristata* σχηματίζοντας και κανονικούς βλαστούς. Υψηλότερες συγκεντρώσεις BA μείωσαν το ποσοστό *cristata* βλαστών.

Κατά τη διερεύνηση της εποχής λήψης των εκφύτων παρατηρήθηκε ότι η ύπαρξη κυτοκινίνης στο υπόστρωμα το Καλοκαίρι, το Φθινόπωρο και την Άνοιξη επηρέασε σημαντικά το σχηματισμό *cristata* βλαστών, ενώ το NAA επηρέασε θετικά το σχηματισμό κανονικών βλαστών.

Η *E. lactea* τόσο σε υψηλές όσο και σε χαμηλές συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών έδωσε πολύ μικρά ποσοστά βλαστογένεσης. Οι υψηλές συγκεντρώσεις αυξίνης στο υπόστρωμα έδειξε να επηρεάζει αρνητικά το σχηματισμό βλαστών. Η χρήση των κυτοκινινών Zeatin και TDZ δεν αύξησαν τη βλαστογένεση. Πολύ πιθανό η αιτία της χαμηλής βλαστογένεσης να είναι η επιλογή του εκφύτου. Η παρατήρηση της θέσης έκπτυξης των νέων βλαστών που παράγει η *E. lactea* έδειξε ότι εκπτύσσονται στο μέσο διάστημα δύο αγκαθιών (δύο φυματίων). Έτσι, τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η περιοχή ανάμεσα στα δύο αγκάθια, που πιθανόν όμως να μην περιείχε πάντα τον βλαστοφόρο οφθαλμό. Σε αυτό πιθανόν να οφείλεται η διάσπαρτη αναγέννηση βλαστών στα υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειας.

Στην δεσμιωμένη μορφή της *E. lactea* η αντίδραση των εκφύτων στο σχηματισμό δεσμιωμένων και κανονικών βλαστών ήταν σχεδόν όμοια με αυτή των άλλων δυο δεσμιωμένων μορφών που διερευνήθηκαν. Η σταδιακή αύξηση του BA επέφερε ανάλογη μείωση του ποσοστού των εκφύτων που έδωσαν τυπικούς βλαστούς. Το υψηλότερο ποσοστό *cristata* βλαστών σχηματίστηκε στα υποστρώματα με 0.2 ή 2 mg l⁻¹ BA χωρίς NAA. Παρόμοια αντίδραση είχε και η άσπρη ποικιλία της (*E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”). Οι υποκαλλιέργειες της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” οδήγησαν στο σπάσιμο της δεσμιωμένης μορφής αλλά δεν επηρέασαν το χρωματισμό της.

Συγκρίνοντας τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των τριών παχυφύτων κανονικών και δεσμιωμένων παρατηρήθηκε ότι:

- Οι κανονικές μορφές διαφοροποιούν βλαστούς σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών και ειδικά του BA, σε σχέση με τις δεσμιωμένες μορφές.

Η παρατήρηση ότι οι δεσμιωμένες μορφές πολλαπλασιάζονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να εξηγηθεί από τα ευρήματα των Nilsson *et al.* (1996), όπου οι δεσμιωμένοι βλαστοί έχουν αυξημένα επίπεδα κυτοκινινών. Βέβαια, πειράματα με στόχο την

πρόκληση δεσμίωσης με εφαρμογή εξωγενώς ΒΑ δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα (Albersten *et al.*, 1983). Ως αποτέλεσμα της εφαρμογής ήταν η ανώμαλη διαπλάτυνση των βλαστών, χωρίς να συνοδεύεται από διεύρυνση του κορυφαίου μεριστώματος που είναι χαρακτηριστικό του φαινομένου της δεσμίωσης.

- Η εποχή λήψης των εκφύτων τόσο στις δεσμωμένες μορφές της *M. elongata* και *E. rugniformis* όσο και στην κανονική μορφή *M. elongata* επηρέασε το σχηματισμό βλαστών και σχετίζεται με την περίοδο ανάπτυξης.

Η εποχιακή διακύμανση λήψης εκφύτων κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό έχει επηρεάσει τη βλαστογένεση και σε άλλα φυτά που δεν είναι παχύφυτα και σχετίζεται με την αυξητική περίοδο του είδους. Στα φυτά που έχει μελετηθεί είναι τα *Pinus silvestris*, *Ceratonia siliqua*, *Viburnum odoratissimum*, *Vitex negundo* και *Quercus eboica* (Hohtola 1988, Sahoo and Chand, 1998, Romano *et al.*, 2002, Schoene and Yeager, 2005, Kartsonas and Papafotiou, 2007). Στα δεσμωμένα παχύφυτα που μελετήθηκαν ο σχηματισμός δεσμωμένων βλαστών επηρεάζεται θετικά από την περίοδο ανάπτυξης των φυτών. Στη *M. elongata* η παραγωγή βλαστών τον Ιούνιο και Οκτώβριο ήταν μεγαλύτερη απ'ότι τον Φεβρουάριο.

- Το είδος των εκφύτων (κορυφής ή κάτω από τη κορυφή) στην *M. elongata* var. *cristata* επηρέασε τον τρόπο αντίδρασης στο σχηματισμό βλαστών.

Τα έκφυτα κορυφής της *M. elongata* var. *cristata* έδωσαν μεγαλύτερο αριθμό *cristata* βλαστών σε σχέση με έκφυτα κάτω από την κορυφή. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στις κανονικές μορφές της *M. elongata* (Παπαφωτίου *et al.*, 1998), και *M. haageana* και *M. san angelensis* (Martinez-Vasquez and Rubluo, 1989). Οι Giusti *et al.*, (2002) παρατήρησαν στη *M. pectinifera* ότι τα έκφυτα κάτω από την κορυφή είχαν καλλίτερη αντίδραση ως προς το μέσο αριθμό των παραγόμενων βλαστών, ενώ στη *Pelecyphora asseliformis* τα έκφυτα κορυφής σχημάτισαν μεγαλύτερο αριθμό βλαστών. Τα διαφορετικά αποτελέσματα σε σχέση με τα είδη εκφύτου στη *Mammillaria* δείχνουν τη διαφορετική αντίδραση στην *in vitro* καλλιέργεια (Johnson and Emino, 1979, Martinez-Vasquez and Rubluo, 1989).

- Ο παραγόμενος κάλος τόσο της κανονικής όσο και της δεσμωμένης μορφής της *M. elongata* αντιδρά παρόμοια στο σχηματισμό κανονικών και δεσμωμένων βλαστών αντίστοιχα. Στη δεσμωμένη μορφή αναγεννιούνται λιγότεροι *cristata* βλαστοί σε σχέση με τους κανονικούς βλαστούς.

Πολλές είναι οι αναφορές για ιστοκαλλιέργεια μελών της οικογένειας Cactaceae που συχνά συμπεριλαμβάνουν το στάδιο του κάλου κατά τη μέθοδο του πολλαπλασιασμού. Συχνότερα, οι ερευνητές προσπαθούν να ενεργοποιήσουν το υπάρχον μερίστωμα αποφεύγοντας το σχηματισμό βλαστών από κάλο για την αποφυγή σωμακλωνικής παραλλακτικότητας. Ωστόσο, ο σχηματισμός βλαστών διαμέσου κάλου επιτρέπει μεγαλύτερο βαθμό πολλαπλασιασμού και στις περιπτώσεις των απειλούμενων ειδών, η πιθανή γενετική παραλλακτικότητα που μπορεί να προκύψει μπορεί να καταστεί ωφέλιμη για τη διάσωση του είδους κατά την επαναφορά τους στο φυσικό περιβάλλον (Starling, 1985, Rubluon *et al.*, 1993). Η αναγέννηση και των δύο μορφών βλαστών στη *M. elongata* από *cristata* κάλο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η δεσμίωση δεν οφείλεται σε γενετικό παράγοντα αλλά στην επίδραση πιθανόν φυτορρυθμιστικών ουσιών.

- Η χρήση TIBA στο υπόστρωμα καλλιέργειας τόσο στη κανονική όσο και στη δεσμωμένη μορφή της *E. pugniformis* δεν επηρέασε τη δημιουργία ή το σχηματισμό *cristata* βλαστών.

Η επίδραση του TIBA σε *in vitro* καλλιέργεια της *E. pugniformis* var. *cristata* δε διατήρησε τη *cristata* μορφή και κατέληξε στην καταστροφή των ιστών. Παρόμοια παρεμπόδιση της οργανογένεσης προκάλεσε σε έκφυτα φύλλων *Nicotiana tabacum*, παρεμβαίνοντας με την ενδογενή αυξίνη στη κυτταρική διαίρεση (Dhaliwel *et al.*, 2004). Τα 10 mg l⁻¹ TIBA σε μικροβλαστούς ρόπαλα προκάλεσε το σχηματισμό περισσότερων δευτεροταγών βλαστών, μια αντίδραση όμοια με αυτή που παρατηρήθηκε κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *Morus alba* όπου παρατηρήθηκαν πολλοί πλάγιοι βλαστοί στο έκφυτο (Kanyashree, 2007). Με την εφαρμογή του στο θρεπτικό υπόστρωμα κατά την βλάστηση σπόρων της *M. elongata* δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή της δομής του κορυφαίου μεριστώματος των σποροφύτων.

- Η υψηλή συγκέντρωση N (1.5 ή 2) στο θρεπτικό υπόστρωμα στις *E. pugniformis* και *E. lactea* μείωσε το σχηματισμό *cristata* και κανονικών βλαστών, ενώ η χαμηλή συγκέντρωση (0.25 ή 0.5) οδήγησε σε μείωση των σχηματισθέντων κανονικών βλαστών.

Κατά τη διερεύνηση της επίδρασης του αζώτου του θρεπτικού υποστρώματος *in vitro* καλλιέργειας της *E. pugniformis* var. *cristata* και *E. lactea* var. *cristata* με συμμετοχή 0.1 mg l⁻¹ NAA και BA έδειξε ότι η αύξηση του αζώτου 1.5 ή 2 φορές σε σχέση με τη συγκέντρωση του MS μείωσε τους αναγεννημένους βλαστούς (δεσμωμένους και κανονικούς). Η μείωση

του N στο 0.5 ή 0.25 οδήγησε σε μείωση των κανονικών βλαστών που παράχθηκαν και διατήρησε τους *cristata* βλαστούς.

Η ποσότητα του αζώτου στο θρεπτικό υπόστρωμα έχει σημαντική επίδραση στο βαθμό της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης (Kirby *et al.*, 1987). Οι ‘φτωχές’ συνθήκες ανάπτυξης κατά την *in vitro* καλλιέργεια διατήρησαν τη *cristata* μορφή με το να μην παράγουν τα δεσμιωμένα έκφυτα κανονικούς βλαστούς. Παρόμοια αντίδραση παρατηρήθηκε από τον Butterfield (1962) σε *in vivo* καλλιέργεια δεσμιωμένων παχυφύτων που σε optimum συνθήκες επανέρχονται στη κανονική μορφή. Η μείωση των αζωτούχων ενώσεων του θρεπτικού υποστρώματος στο μισό ή στο $\frac{1}{4}$ μείωσε όλους τους παράγοντες ανάπτυξης σε καλλιέργεια *in vitro* της *Ceratonia siliqua* (Vinterhalter *et al.*, 2007). Παρόμοια μείωση των αζωτούχων ενώσεων στην *in vitro* καλλιέργεια της *Cymbidium kanran* δεν επηρέασε τη συγκέντρωση της ενδογενούς αυξίνης (IAA) και κυτοκινίνης (iPA) των βλαστών που σχηματίστηκαν (Ogura – Tsujita and Okubo, 2006).

Για τον έλεγχο της συμπεριφοράς *ex vitro* των αναγεννημένων μικροβλαστών, αλλά και για την ολοκλήρωση του μικροπολλαπλασιασμού διερευνήθηκε η ριζοβολία τους και ο εγκλιματισμός τους. Η ριζοβολία των αναγεννημένων μικροβλαστών πραγματοποιήθηκε τόσο σε 0.5 όσο και σε 1 mg l⁻¹ IBA με την τάση να ξεχωρίζει η συγκέντρωση 0.5 mg l⁻¹ IBA. Παρόμοια αντίδραση είχε η *E. fulgens* η οποία ριζοβόλησε 0.6 mg l⁻¹ IBA (Zhang *et al.*, 1989). Η παραμονή στο αρχικό υπόστρωμα καλλιέργειας των κανονικών και δεσμιωμένων βλαστών και των τριών παχυφύτων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα των τεσσάρων μηνών οδήγησε σε ριζοβολία. Οι ρίζες που δημιουργήθηκαν ήταν παχύτερες και ελαφρώς σκουρότερες από αυτές που παράγονταν κατά τη ριζοβόληση με IBA.

Τέλος, ο εγκλιματισμός *ex vitro* των φυταρίων κυμαινόταν από 80 - 100% τόσο στη κανονική όσο και στη δεμιομένη μορφή και των τριών παχυφύτων.



Διερεύνηση της συμπεριφοράς κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων σε *in vitro* καλλιέργεια

3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΝΟΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΔΕΣΜΙΩΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΠΑΧΥΦΥΤΩΝ ΣΕ *IN VIVO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

3.1 Εισαγωγή

3.1.1 Επίδραση της αζωτούχου λιπάνσεως στη δημιουργία και διατήρηση δεσμιωμένων μορφών

Η *Euphorbia pugniformis* είναι ένα μικρό παχύφυτο (κεφ. 2.2.1.2), το οποίο έχει δύο δεσμιωμένους τύπους: την «*cristata* ρόπαλο» με δεσμίωση του κεντρικού βλαστού και κανονικούς τους πλάγιους βλαστούς, και την «*cristata* βλαστό» με δεσμίωση των πλάγιων βλαστών (Werner, 1988). Πρόβλημα κατά την καλλιέργεια της δεσμιωμένης μορφής αποτελεί το ότι συχνά επανέρχεται στην κανονική μορφή του παχυφύτου (απόκτηση επιμήκων κυλινδρικών βλαστών).

Ο Houghton (1930) θεωρούσε ότι οι δεσμιωμένες μορφές των παχυφύτων κάτω από “φτωχές” συνθήκες εμφανίζουν μια τάση να επανέλθουν στον κανονικό τύπο ανάπτυξης. Από την άλλη μεριά, ο Butterfield (1958) ισχυρίσθηκε ότι η επιστροφή στην κανονική μορφή εμφανίζεται όταν οι συνθήκες ανάπτυξης είναι στο optimum. Επίσης, κατά τον Hus (1908) η καλή ανόργανη λίπανση ή ισχυρή οργανική συντελεί στην εμφάνιση δεσμίωσης (κεφ. 1.3.4.2).

Η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε N κατά την *in vitro* καλλιέργεια τόσο της *E. pugniformis* var. *cristata* (Balotis and Papafotiou, 2003) όσο και της *E. lactea* var. *cristata* επηρέασε τη σταθερότητά τους. Η υψηλή συγκέντρωση N (1.5 ή 2) στο θρεπτικό υπόστρωμα στις *E. pugniformis* και *E. lactea* μείωσε το σχηματισμό *cristata* και κανονικών βλαστών, ενώ η χαμηλή συγκέντρωση (0.25 ή 0.5) οδήγησε σε μείωση των σχηματισθέντων κανονικών βλαστών και ως εκ τούτου στη διατήρηση της *cristata* μορφής κατά το μικροπολλαπλασιασμό (κεφ. 2.3.9.1 και 2.3.9.2). Επίσης, κατά την *in vitro* καλλιέργεια εκφύτων δεσμιωμένων βλαστών βρέθηκε ότι το BA επηρεάζει τη παραγωγή δεσμιωμένων βλαστών (Papafotiou *et al.*, 2001) (κεφ. 2.3.7).

Οι Nilsson *et al.* (1996) βρήκαν ότι η συγκέντρωση ιστών δεσμιωμένων φυτών σε κυτοκινίνες (ZR) ήταν ως και οκτώ φορές αυξημένη. Υπάρχουν αρκετές αναφορές όπου η συσσώρευση των επιπέδων κυτοκινινών μέσα στο φυτό σχετίζεται με τη θρεπτική κατάσταση του φυτού και ειδικότερα με τα επίπεδα του N (Takei *et al.*, 2001, Sakakibara *et al.*, 1998, Wagner and Beck, 1993, Samuelson and Larsson, 1993).

Οι Takei *et al.* (2001) σε πειράματα που έκαναν με αζωτούχο λίπανση στο καλαμπόκι βρήκαν ότι η αύξηση της συσσώρευσης των κυτοκινινών στο φυτό εξαρτάται από την αζωτούχο λίπανση και υποθέτουν ότι ο τύπος Z των κυτοκινινών (*trans* - Zeatin, Z riboside και *trans*- Zeatin riboside-5'-monophosphate) παίζει ρόλο, τουλάχιστον μερικώς, ως μόριο σήματος της μετατροπής της αζωτούχου κατάστασης της ρίζας στους βλαστούς. Ειδικότερα, όταν η ρίζα αντιλαμβάνεται το σήμα της διαθεσιμότητας αζώτου συνθέτει τον τύπο Z των κυτοκινινών που μετατρέπονται σε Z riboside και μεταφέρεται στους βλαστούς μέσω του ηθμού, όπου μετατρέπεται σε *trans* – Zeatin, έναν ενεργό τύπο κυτοκινίνης, επάγοντας την έκφραση του γονιδίου *ZmRRs*, το υπεύθυνο γονίδιο αζώτου στο καλαμπόκι (Sakakibara *et al.*, 1998, Sakakibara *et al.*, 1999).

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε ο ρόλος της αζωτούχου λίπανσης στη συμπεριφορά (διατήρηση της μορφής) της *E. pugniformis* var. *cristata in vivo*.

3.1.2 Επίδραση εξωγενών φυτορρυθμιστικών ουσιών στην ανάπτυξη κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων

Πρόκληση δεσμώσης σε φυτά, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή (κεφ. 1.3.4.2), μπορεί να επιτευχθεί με την σκόπιμη ή μη εφαρμογή φυτορρυθμιστικών ουσιών. Η φυτορρυθμιστική ουσία 2,4-D (αυξίνη), που χρησιμοποιούνταν και ως ζιζανιοκτόνο, έχει παρατηρηθεί ότι μετά από ψεκασμό της προκαλεί διάφορες δεσμώσεις (Linser *et al.*, 1953).

Στη σκόπιμη εφαρμογή των ουσιών αυτών έχουν γίνει πειράματα με άλλες αυξίνες όπως NAA, IAA (Laibach and Mai, 1936, Schoibe and Wohrmann-Hillmann, 1957) σε διάφορα φυτά και παρατηρήθηκε κάποιο είδος δεσμώσης. Επίσης η εφαρμογή TIBA, που είναι παρεμποδιστής της βασιπεταλικής μεταφοράς της αυξίνης, έχει προκαλέσει δεσμώση (Wenck, 1952, Harder and Oppermann, 1952, Gorter, 1951) προφανώς λόγω συγκέντρωσης της αυξίνης στο κορυφαίο μερίστωμα. Στις περισσότερες επεμβάσεις παρατηρήθηκαν δεσμώσεις σχήματος ταινίας και κωνοποιήσεις ή παρόμοιες ανωμαλίες.

Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκε η επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών, μιας αυξίνης (2,4-D), μιας κυτοκινίνης (BA), καθώς και του παρεμποδιστή της βασιπεταλικής μεταφοράς της αυξίνης TIBA στα παχύφυτα (*M. elongata*, *E. pugniformis*) για τη διερεύνηση της συμπεριφοράς δεσμιωμένων και κανονικών μορφών και την πρόκληση τυχόν συμπτωμάτων δεσμώσης.

3.1.3 Επίδραση της *ex vitro* καλλιέργειας αναγεννημένων *in vitro* φυταρίων δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με την καλλιέργεια δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων όπου παρατηρείται ανάπτυξη και κανονικών βλαστών όπως στα φυτά *Stapelia* (Johnson, 1969), *Armeria* και *Plantago* (Johnson and Gorenflot, 1970) και *Echinocereus reichenbachii* (Boke and Ross, 1979).

Έτσι, σε φυτά δεσμιωμένων μορφών των παχυφύτων *M. elongata*, *E. pugniformis* και *E. lactea*, που παράχθηκαν *in vitro* και εγκλιματίστηκαν επιτυχώς *ex vitro*, συνεχίστηκε η παρατήρησή τους κατά την καλλιέργεια τους σε συνθήκες θερμοκηπίου (κεφ. 2.2.5.1) για 60 μήνες. Στόχος ήταν να διερευνηθεί η συμπεριφορά της δεσμιωμένης μορφής κατά την καλλιέργεια και συγκεκριμένα να παρατηρηθεί εάν διατηρείται η δεσμιωμένη μορφή η «σπάει» σχηματίζοντας και κανονικούς βλαστούς όπως συχνά συμβαίνει σε φυτά που προέρχονται από άλλες μεθόδους πολλαπλασιασμού.

3.2. Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1. Φυτικό υλικό

Η προμήθεια των φυτών της *E. pugniformis* var. *cristata* (κεφ. 2.2.1.2) που χρησιμοποιήθηκαν έγιναν από τα φυτώρια Πουλημένου, ήταν ηλικίας 3 ετών και αναπτύσσονταν σε γλάστρα 8.5 cm στο γυάλινο θερμαινόμενο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. Τα φυτά της κανονικής μορφής της *E. pugniformis* είχαν ηλικία 4 ετών και προήλθαν από έρριζα μοσχεύματα κανονικών βλαστών που αποκόπηκαν από την *E. pugniformis* var. *cristata* και ριζοβόλησαν. Τα φυτά *Mammillaria elongata* (κεφ. 2.2.1.1) ήταν σπορόφυτα 3 ετών, τα οποία σπάρθηκαν και μεγάλωναν στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου. Ο σπόρος αγοράστηκε από την εταιρεία παραγωγής σπόρων IMZAADEX (Holland).

Τα φυτά των πειραμάτων επιλέχθηκαν έτσι ώστε να είναι υγιή και διατηρήθηκαν στο θερμοκήπιο με ελαφρά σκίαση το καλοκαίρι. Δινόταν μεγάλη προσοχή στο πότισμα, ώστε να περιοριστεί η ανάπτυξη παθογόνων εδάφους και η μόλυνση των φυτών.

3.2.2 Υποστρώματα *in vivo* καλλιέργειας παχυφύτων

Τα φυτά *E. pugniformis* var. *cristata*, *E. pugniformis* και *Mammillaria elongata* μεταφυτεύτηκαν σε φυτοδοχεία διαμέτρου 8.5 cm. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα εδαφικού υποστρώματος της εταιρείας Klashman τύπου MAX Multi purpose

compost (Klasmann-Deilmann GmbH-P.O., Germany) με pH 5.5-6.5 και θρεπτικά στοιχεία N-P-K : 14-16-18 σε ποσότητα 1.5 kg/m³: περλίτη (Perloflor) σε αναλογία 2:1 (v/v).

3.2.3 Αζωτούχος λίπανση

Σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια της *E. pugniformis* var. *cristata* χρησιμοποιήθηκαν 32 φυτά εμπορίου (κεφ. 3.2.1), τα οποία λιπαίνονταν, ανά δεκαπενθήμερο με διαφορετικά επίπεδα αζώτου ήτοι 0, 50, 100, 150, 200 mg l⁻¹ και με 300 mg l⁻¹ P και 500 mg l⁻¹ K, σε μία καλλιεργητική περίοδο, Μάιος – Σεπτέμβριος 2002. Τα λιπάσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Νιτρική Αμμωνία (35% N), το Υπερφωσφορικό οξύ (46% P) και το Θεϊκό Κάλιο (50% K). Γίνονταν υδρολιπάνσεις με 140 ml διαλύματος ανά φυτό (pH= 5.5–6). Το πείραμα επαναλήφθηκε και την επόμενη καλλιεργητική περίοδο, Μάιος – Σεπτέμβριος 2003, σε νέα φυτά (32φυτά, οκτώ ανά επέμβαση) με 0, 100, 200 300 mg l⁻¹ και με 300 mg l⁻¹ P και 500 mg l⁻¹ K.

Δημιουργήθηκαν stock διαλύματα του 1l, τα οποία διατηρούνταν σε ψυγείο για 30 ημέρες.

1. Διάλυμα Α (0-300-500): σε 1l απεσταγμένου νερού προστέθηκε 652.17 mg Πυκνό υπερφωσφορικό και 1000 mg Θεϊκό Κάλιο, αφού αναδεύτηκαν ώστε να διαλυθεί το ίζημα διορθώθηκε το pH του διαλύματος.
2. Διάλυμα Β (50-300-500): σε 1l απεσταγμένου νερού προστέθηκε 142.85mg Νιτρικής Αμμωνίας, 652.17 mg Πυκνό υπερφωσφορικό και 1000 mg Θεϊκό Κάλιο, αφού αναδεύτηκαν ώστε να διαλυθεί το ίζημα διορθώθηκε το pH.
3. Διάλυμα Γ (100-300-500): σε 1l απεσταγμένου νερού προστέθηκε 285.71 mg Νιτρικής Αμμωνίας, 652.17 mg Πυκνό υπερφωσφορικό και 1000 mg Θεϊκό Κάλιο, αφού αναδεύτηκαν ώστε να διαλυθεί το ίζημα διορθώθηκε το pH.
4. Διάλυμα Δ (150-300-500): σε 1l απεσταγμένου νερού προστέθηκε 428,56 mg Νιτρικής Αμμωνίας, 652.17 mg Πυκνό υπερφωσφορικό και 1000 mg Θεϊκό Κάλιο, αφού αναδεύτηκαν ώστε να διαλυθεί το ίζημα διορθώθηκε το pH.
5. Διάλυμα Ε (200-300-500): σε 1l απεσταγμένου νερού προστέθηκε 571.42 mg Νιτρικής Αμμωνίας, 652.17 mg Πυκνό υπερφωσφορικό και 1000 mg Θεϊκό Κάλιο, αφού αναδεύτηκαν ώστε να διαλυθεί το ίζημα διορθώθηκε το pH.
6. Διάλυμα ΣΤ (300-300-500): σε 1l απεσταγμένου νερού προστέθηκε 857.13 mg Νιτρικής Αμμωνίας, 652,17 mg Πυκνό υπερφωσφορικό και 1000 mg Θεϊκό Κάλιο, αφού αναδεύτηκαν ώστε να διαλυθεί το ίζημα διορθώθηκε το pH.

3.2.4 Εφαρμογή φυτορυθμιστικών ουσιών σε δεσμιωμένες και κανονικές μορφές παχυφύτων

Φυτά *E. pugniformis* var. *cristata*, *E. pugniformis* και *Mammillaria elongata* μεταχειρίστηκαν με υδατικά διαλύματα των φυτορυθμιστικών ουσιών BA (6-Benzylaminopurine), 2,4 D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) και TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid). Οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν από αρχές Μαΐου μέχρι τέλη Σεπτεμβρίου (μια φορά την εβδομάδα με εξαίρεση το TIBA στη *M. elongata* που εφαρμόζονταν τρεις φορές την εβδομάδα) στις συγκεντρώσεις που αναγράφονται στον Πίν. 31. Τα stock διαλύματα των φυτορυθμιστικών ουσιών αποθηκεύονταν σε ψυγείο στους 6 °C μέχρι ένα μήνα και παρασκευάστηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως τα stock για την *in vitro* καλλιέργεια (κεφ. 2.2.2.1.3). Το 2,4 D παρασκευάστηκε όπως το NAA (κεφ. 2.2.2.1.3).

Πίν. 31. Επεμβάσεις φυτορυθμιστικών ουσιών σε δεσμιωμένες και τυπικές μορφές παχυφύτων.

Α/Α	Επεμβάσεις	Φυτό
1	Μάρτυρας	<i>E. pugniformis</i> var. <i>cristata</i> , <i>E. pugniformis</i> και <i>Mammillaria elongata</i>
2	100 mg l ⁻¹ BA	<i>E. pugniformis</i> var. <i>cristata</i> και <i>E. pugniformis</i>
3	200 mg l ⁻¹ BA	<i>E. pugniformis</i> var. <i>cristata</i> και <i>E. pugniformis</i>
4	50 mg l ⁻¹ 2,4-D	<i>E. pugniformis</i> var. <i>cristata</i> , <i>E. pugniformis</i> και <i>Mammillaria elongata</i>
5	100 mg l ⁻¹ 2,4D	<i>E. pugniformis</i> var. <i>cristata</i> , <i>E. pugniformis</i> και <i>Mammillaria elongata</i>
6	100 mg l ⁻¹ TIBA	<i>E. pugniformis</i> var. <i>cristata</i> και <i>Mammillaria elongata</i>
7	200 mg l ⁻¹ TIBA	<i>E. pugniformis</i> var. <i>cristata</i>

Στην *E. pugniformis* var. *cristata* γινόταν ψεκασμός με τα διαλύματα των φυτορυθμιστικών ουσιών, με ψεκαστήρια, ψεκάζοντας στην κορυφή μέχρι τη πλήρη κάλυψη όλου του φυτού (περίπου 15 ml διαλύματος φυτορυθμιστικής ουσίας / φυτό), ενώ στις κανονικές μορφές των παχυφύτων η εφαρμογή γινόταν με τη βοήθεια σύριγγας και

επικεντρωνόταν στο κορυφαίο μερίστωμα του φυτού (περίπου 2-3 ml διαλύματος φυτορυθμιστικής ουσίας / φυτό).

Στη *M. elongata* πέραν της εφαρμογής υδατικού διαλύματος TIBA, δοκιμάστηκε η εφαρμογή του ως διάλυμα λανολίνης σε ένα δακτύλιο 1cm κάτω από το κορυφαίο μερίστωμα και η επέμβαση ανανεωνόταν όταν στέγνωσε η λανολίνη. Για να είναι εφικτό κλαδεύτηκαν όλα τα αγκάθια του βλαστού σε ένα δακτύλιο πάχους 0.5 cm στο 1 cm κάτω από το κορυφαίο μερίστωμα. Σε αυτόν τον δακτύλιο με τη βοήθεια πινέλου επαλειφόταν η λανολίνη με το TIBA. Σκοπός του πειράματος ήταν η διατήρηση της ποσότητας του TIBA ακριβώς κάτω από το κορυφαίο μερίστωμα για να εμποδιστεί η κατακόρυφη κίνηση της ενδογενούς αυξίνης του φυτού. Για το λόγο αυτό διαλέχτηκαν οκτώ φυτά των οποίων ο κεντρικός βλαστός δεχόταν την επέμβαση.

3.2.5 Καταγραφή - Εκτίμηση αποτελεσμάτων

3.2.5.1 Πειράματα αζωτούχου λίπανσης

Ανά δεκαπενθήμερο καταγράφονταν το ύψος του φυτού, από το χείλος της γλάστρας έως το ανώτερο σημείο της κόμης, το πλάτος του, μετρώντας προς δύο κατευθύνσεις κάθετες μεταξύ τους (d1 και d2), ο όγκος του (μετρώντας τον όγκο του εκτοπιζόμενου νερού μετά τη βύθιση της κόμης σε δοχείο με νερό), καθώς και ο αριθμός των παραγόμενων κανονικών βλαστών.

Επίσης, μετρήθηκε το εμβαδόν βλαστών στην αρχή και το τέλος του πειράματος. Στην αρχή του πειράματος σημάνθηκαν και μετρήθηκαν δύο *cristata* βλαστοί σε κάθε φυτό του πειράματος. Με τη βοήθεια πλαστελίνης σχηματίστηκε το εκμαγείο του βλαστού το οποίο μεταφέρθηκε (με τη βοήθεια μελανιού) με τη μορφή στάμπας σε χαρτί. Στη συνέχεια καταγράφηκε με σάρωση η ασπρόμαυρη ψηφιακή τους εικόνα, σε υψηλή ανάλυση (600 dpi) και με προκαθορισμένη κλίμακα στο 100%. Η ανάλυση των εικόνων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού ανάλυσης εικόνας DT-Scan (Delta T-Devices, Ltd.) και υπολογίστηκε η μέση συνολική επιφάνεια των βλαστών ανά φυτό μέσω του Length analysis. Στο τέλος του πειράματος επαναλήφθηκε η διαδικασία για τους σημασμένους βλαστούς.

Στο τέλος του πειράματος μετρήθηκε επίσης, το νωπό και ξηρό βάρος των βλαστών που παρέμειναν *cristata*, καθώς και των κανονικών βλαστών που σχηματίστηκαν στη διάρκεια του πειράματος. Κοβόταν το φυτό στο λαιμό χωρίζονταν δεσμιωμένοι από κανονικοί βλαστοί, μετριόνταν το νωπό βάρος έκαστης κατηγορίας και τοποθετούνταν σε χάρτινα σακουλάκια οι δεσμιωμένοι και οι κανονικοί βλαστοί. Ακολουθούσε ξήρανση των βλαστών

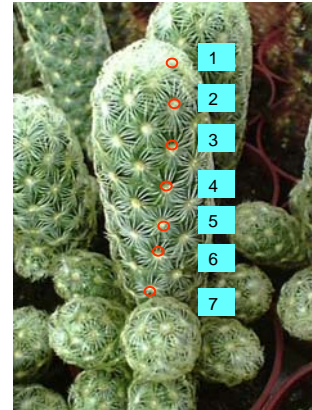
(τα χάρτινα σακουλάκια τοποθετούνταν σε ξηραντήριο) στους 75° C για τρεις ημέρες. Στη συνέχεια μετριόνταν το ξηρό βάρος των βλαστών.

3.2.5.2 Πειράματα με φυτορυθμιστικές ουσίες

Σε όλες τις επεμβάσεις με φυτορυθμιστικές ουσίες (BA, 2,4-D και TIBA) στην *E. pugniformis* var. *cristata*, στο τέλος του πειράματος που συνέπιπτε με το τέλος της περιόδου ανάπτυξης (Σεπτέμβριος), μετριόνταν το μήκος και το πάχος του βλαστού, ο αριθμός των φύλλων, καθώς και η ποσότητα και το μήκος των κανονικών βλαστών. Υπολογίστηκε επίσης, ο αναμενόμενος αριθμός φύλλων ανά cm σε κάθε επέμβαση με βάση τον τύπο:

$$\text{Αναμενόμενος αρ. φύλλων} = (L / L_0) \times \varphi ,$$

όπου L είναι το μήκος κορυφαίου μεριστώματος της επέμβασης, L₀ το μήκος κορυφαίου μεριστώματος του μάρτυρα και φ ο αριθμός φύλλων του μάρτυρα.



Εικ. 28. Φυμάτια της *M. elongata* που ορίζουν μια ευθεία γραμμή.

Στα πειράματα εφαρμογής TIBA σε βλαστούς της *M. elongata* πέραν των μακροσκοπικών παρατηρήσεων, μετά το τέλος των εφαρμογών μετρήθηκε ο αριθμός των αγκαθιών που έφερε κάθε φυμάτιο που βρίσκονταν σε μια ευθεία γραμμή (Εικ. 28) για έλεγχο της φυλλοταξίας του φυτού. Σε κάθε βλαστό μετρήθηκαν δύο τέτοιες γραμμές. Ενώ στα πειράματα ψεκασμού βλαστών με 2,4-D της *M. elongata*, καταγράφηκαν μορφολογικές αλλαγές στην όψη του φυτού.

3.2.5.3 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Σε όλα τα πειράματα *in vivo* χρησιμοποιήθηκε το Εντελώς Τυχαίοποιημένο Σχέδιο (η τοποθέτηση των γλαστρών στο θερμοκήπιο έγινε τυχαία), με εξεταζόμενο παράγοντα τα επίπεδα αζώτου ή τη συγκέντρωση της φυτορυθμιστικής ουσίας. Ο αριθμός επαναλήψεων σε όλες τις επεμβάσεις ήταν οκτώ. Η σημαντικότητα των πειραμάτων έγινε με Anova και στη περίπτωση της αζωτούχο λίπανσης και με Regression (Γραμμική Συσχέτιση), βάση του συντελεστή συσχέτισης r² (με τιμές 0 – 0.3: δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση, 0.3-0.5: ύπαρξη ασθενής γραμμικής συσχέτισης, 0.5-0.7: μέση γραμμική συσχέτιση, 0.7-0.8: ισχυρή, 0.8-1: πολύ ισχυρή και 1: τέλεια γραμμή).

Τέλος, έγινε σύγκριση των μέσων όλων των επεμβάσεων με την μέθοδο των Tukey-Kramer (HSD), σε $P=0.05$. Το “*” δίπλα στη τιμή του F δηλώνει ότι η τιμή του F είναι σημαντική σε επίπεδο 5%, ενώ η ένδειξη “NS” δηλώνει ότι η τιμή του F δεν είναι σημαντική. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε επίπεδο 5%.

3.3 Αποτελέσματα διερεύνησης της συμπεριφοράς κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων σε *in vivo* καλλιέργεια

3.3.1 Επίδραση του αζώτου στη διατήρηση της *cristata* μορφής στην *Euphorbia pugniformis* var. *cristata* σε *in vivo* καλλιέργεια

1^η καλλιεργητική περίοδος (2002)

Η επίδραση του αζώτου σε έκφυτα *E. pugniformis* var. *cristata* κατά την *in vitro* καλλιέργεια βρέθηκε να επηρεάζει τη παραγωγή κανονικών βλαστών οδηγώντας ειδικά οι χαμηλές συγκεντρώσεις σε μείωση των κανονικών βλαστών που σχηματίζονταν (κεφ. 2.3.9.1).

Έτσι φυτά της *E. pugniformis* var. *cristata* (τα οποία δεν έφεραν κανονικούς βλαστούς) λιπαίνονταν ανά δεκαπενθήμερο με διαφορετικά επίπεδα αζώτου, 0, 50, 100, 150, ή 200 mg l⁻¹ N, 300 mg l⁻¹ P και 500 mg l⁻¹ K, από το Μαΐο έως το Σεπτέμβριο. Στόχος του πειράματος ήταν η διερεύνηση της υπόθεσης ότι η υψηλή ή optimum λίπανση επηρεάζει τη διατήρηση *cristata* μορφών.

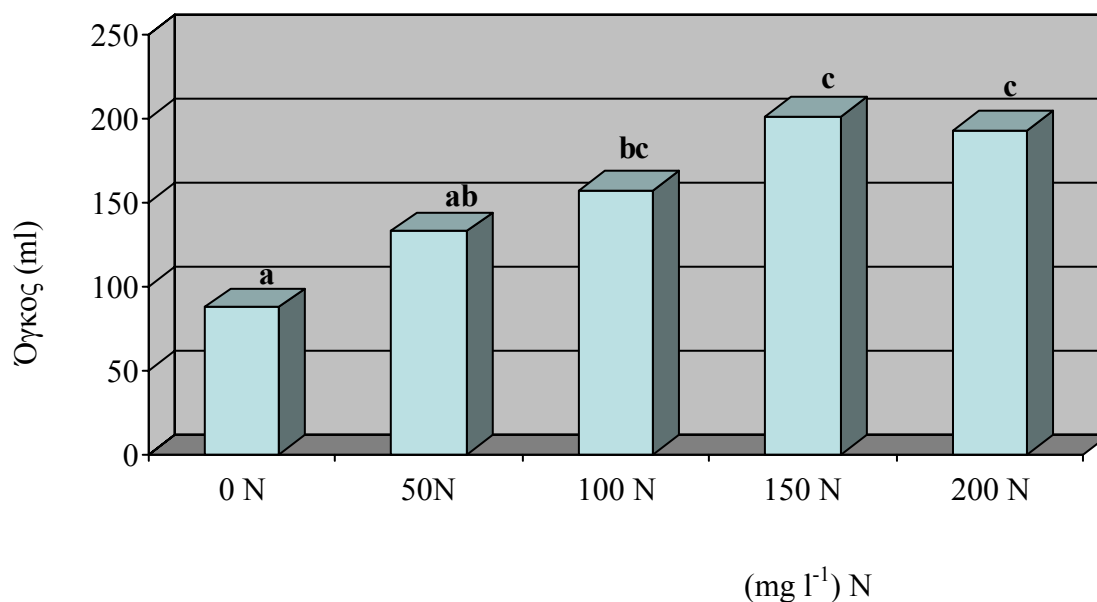
Η σταδιακή αύξηση του N προκάλεσε αύξηση του νωπού και ξηρού βάρους (Πίν. 32), του όγκου (Σχ. 54 και 58) και του πλάτους των φυτών (Σχ. 56). Αντίθετα, προκάλεσε μείωση του ύψους (Σχ. 55), αλλά αυτό οφείλετο στην κάμψη των βλαστών προς τα κάτω λόγω βάρους με αποτέλεσμα την αύξηση του μέσου όρου των δύο διαμέτρων του φυτού (Σχ. 59). Η αύξηση του αζώτου σε 150 και 200 mg l⁻¹ οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των κανονικών βλαστών που σχηματίστηκαν (Πίν. 32) και στο σχήμα 60 φαίνεται ότι τα 150 και 200 mg l⁻¹ οδήγησαν σε αύξηση του αριθμού των κανονικών βλαστών σχεδόν από το δεύτερο μήνα του πειράματος.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων για εύρεση πιθανής συσχέτισης (Σχ. 61), έδωσε μια ασθενή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των μονάδων του αζώτου του όγκου και του βάρους των φυτών της *E. pugniformis* var. *cristata*, ενώ δεν διαπιστώθηκε τέτοια συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των κανονικών βλαστών που σχηματίστηκαν, του ύψους και των δύο διαμέτρων του φυτού.

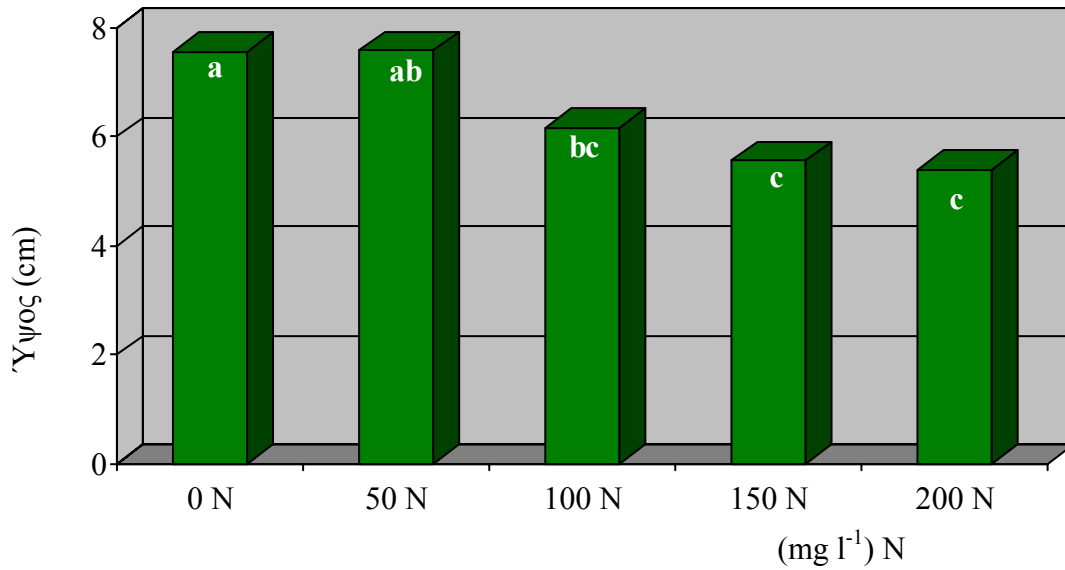
Πίν. 32. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχου λίπανσης (0, 50, 100, 150, 200 mg l⁻¹ N) στο νωπό και ξηρό βάρος καθώς και αριθμό των κανονικών βλαστών που παράχθηκαν. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer, HSD, $P=0.05$, $n=8$.

Συγκέντρωση N (mg l ⁻¹)	Νωπό βάρος (g)	Ξηρό βάρος (g)	Μ. αρ. κανονικών βλαστών	Αρ. κανονικών βλαστών / Νωπό βάρος (%)	Αρ. κανονικών βλαστών / Ξηρό βάρος (%)
0	116.07 a	13.01 a	3.85 ab	3.31	29.60
50	156.68 b	16.52 b	3.37 a	2.15	20.30
100	173.86 b	17.62 bc	3.25 a	1.87	18.44
150	207.82 c	18.76 c	4.25 b	2.04	22.65
200	208.16 c	19.45 c	4.5 b	2.16	21.61
	F *	F *	F *		

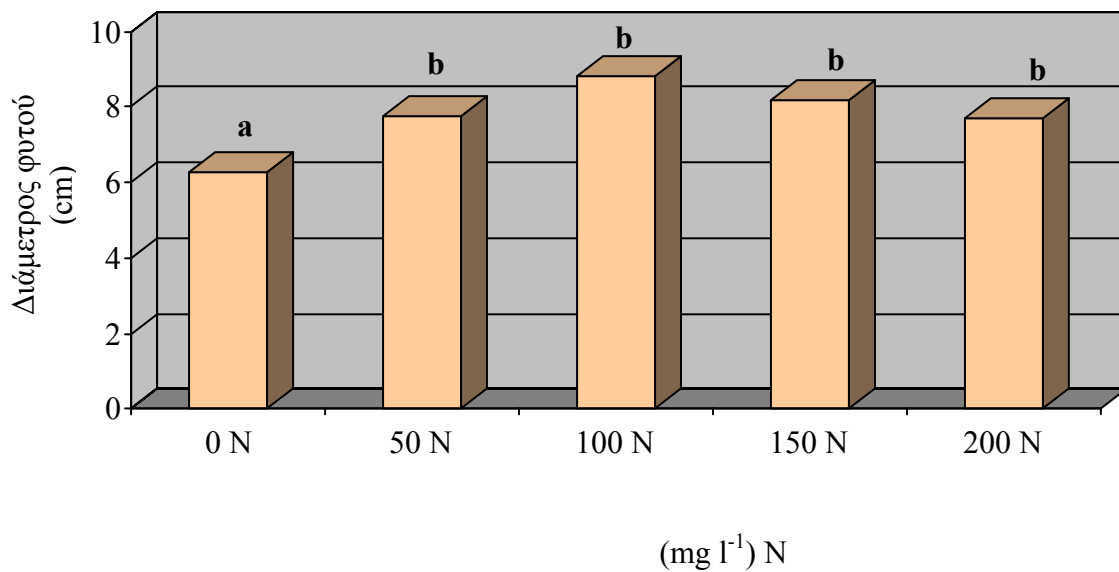
* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι σημαντική. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.



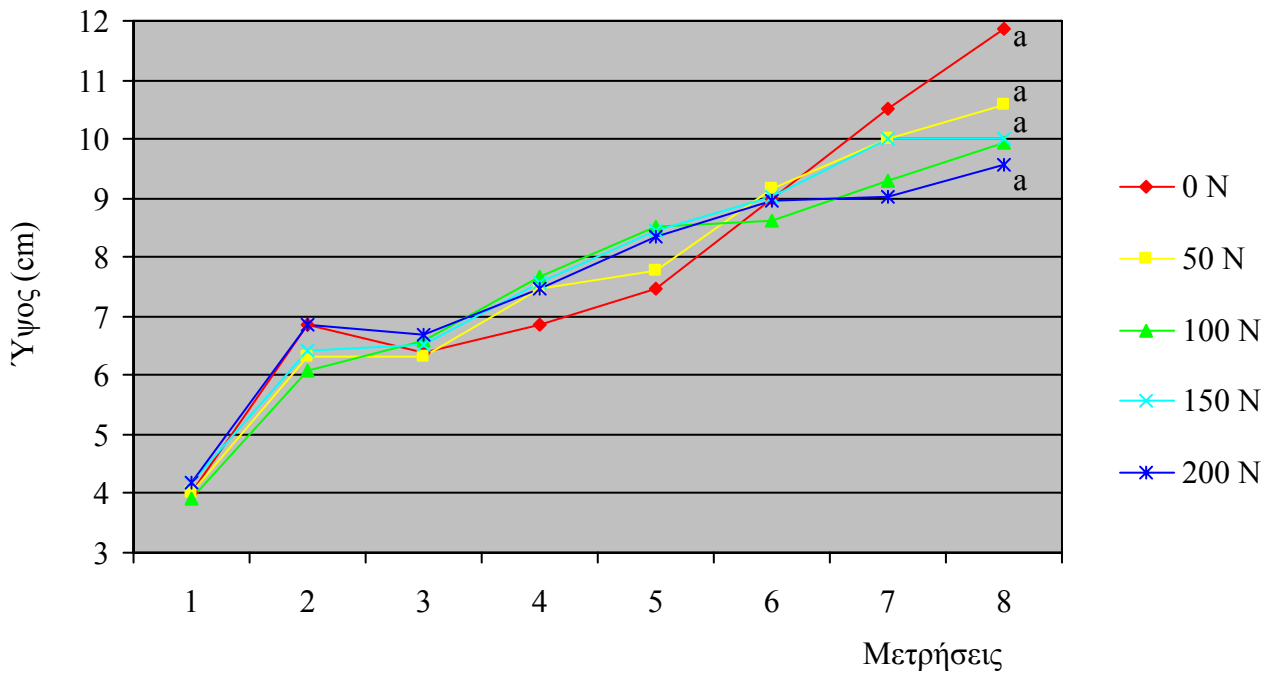
Σχ. 54. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχου λίπανσης στον όγκο φυτών της *E. rugifolmis* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer, HSD $P=0.05$, $n=8$.



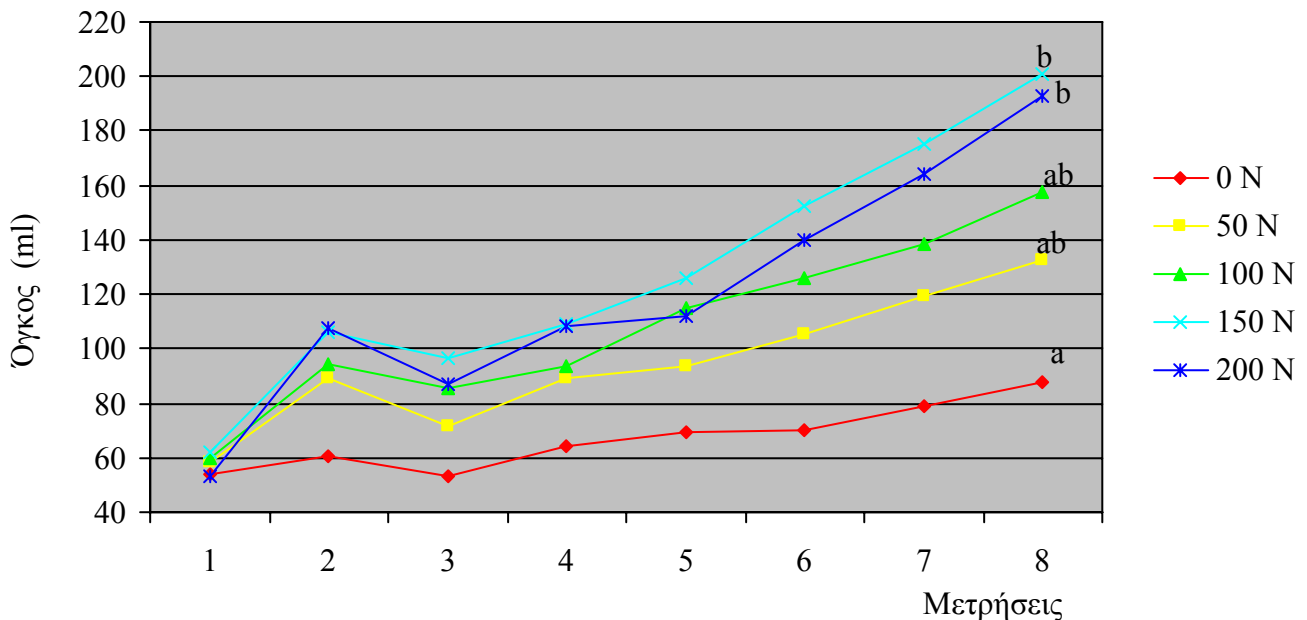
Σχ. 55. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχο λίπανσης στο ύψος φυτών *E. pugniformis* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer, HSD $P=0.05$, $n=8$.



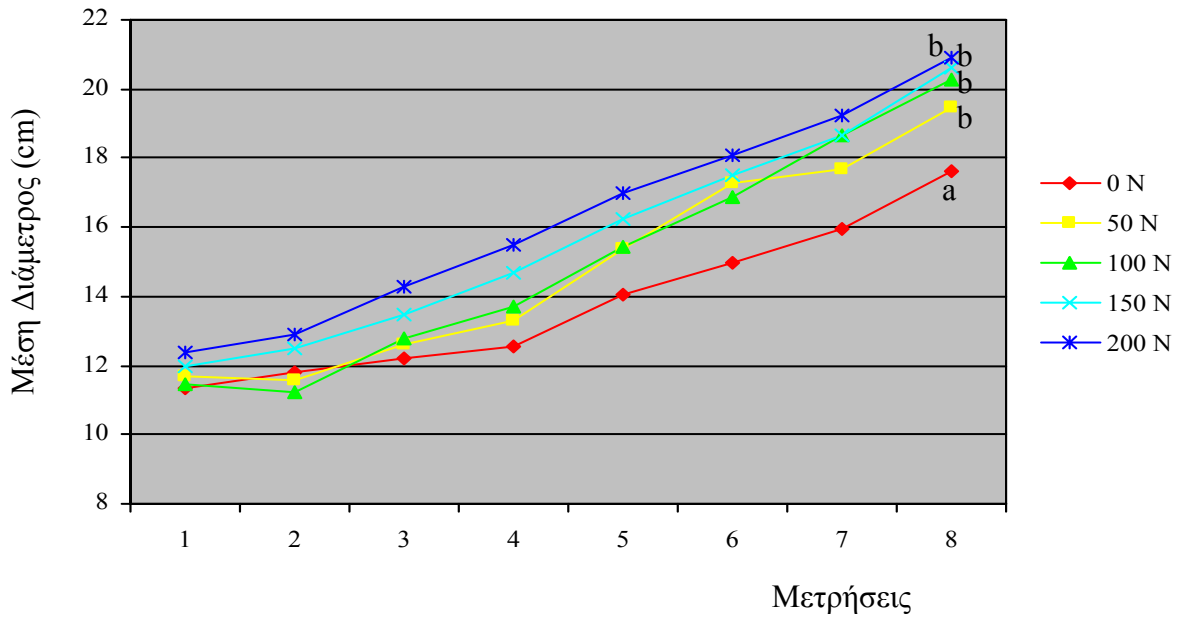
Σχ. 56. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχο λίπανσης στο μέσο όρο των δύο διαμέτρων των φυτών *E. pugniformis* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer, HSD $P=0.05$, $n=8$.



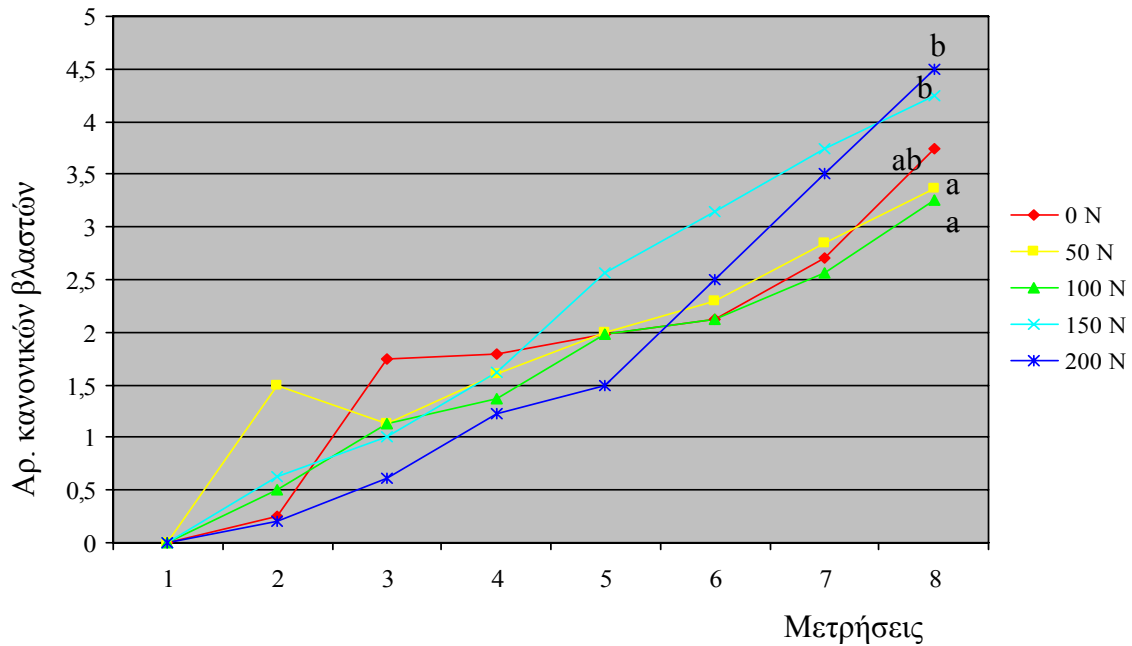
Σχ. 57. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχο λίπανσης (0, 50, 100, 150 και 200 mg l⁻¹) στο ύψος φυτών *E. pugniformis* var. *cristata* κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=8$.



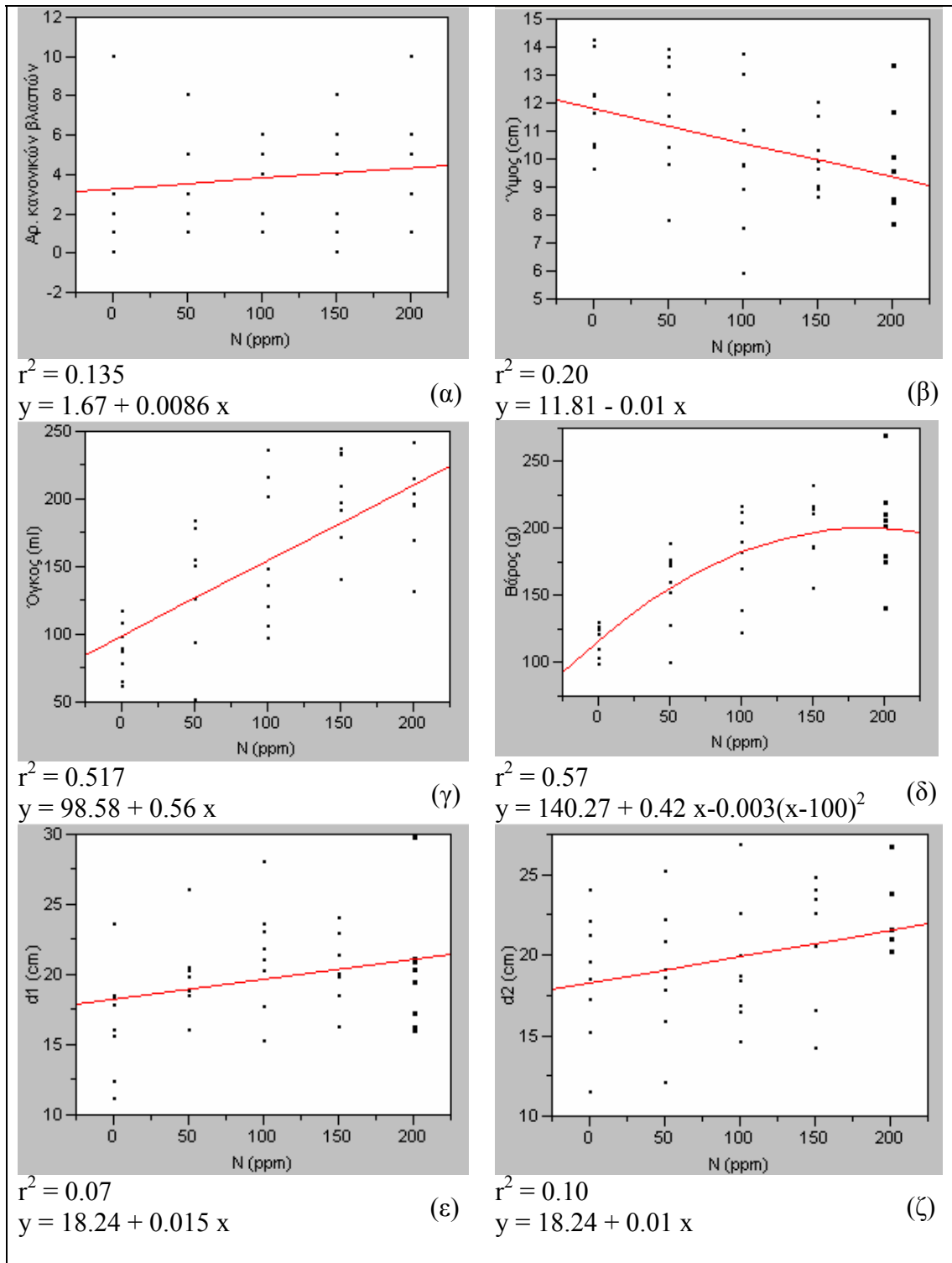
Σχ. 58. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχο λίπανσης (0, 50, 100, 150 και 200 mg l⁻¹) στον όγκο των φυτών *E. pugniformis* var. *cristata* κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=8$.



Σχ. 59. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχο λίπανσης (0, 50, 100, 150 και 200 mg l⁻¹) στη μέση διάμετρο των φυτών *E. pugniformis* var. *cristata* κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=8$.



Σχ. 60. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχο λίπανσης (0, 50, 100, 150 και 200 mg l⁻¹) στον αριθμό των κανονικών βλαστών που σχημάτισαν φυτά *E. pugniformis* var. *cristata* κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer, HSD $P=0.05$, $n=8$.



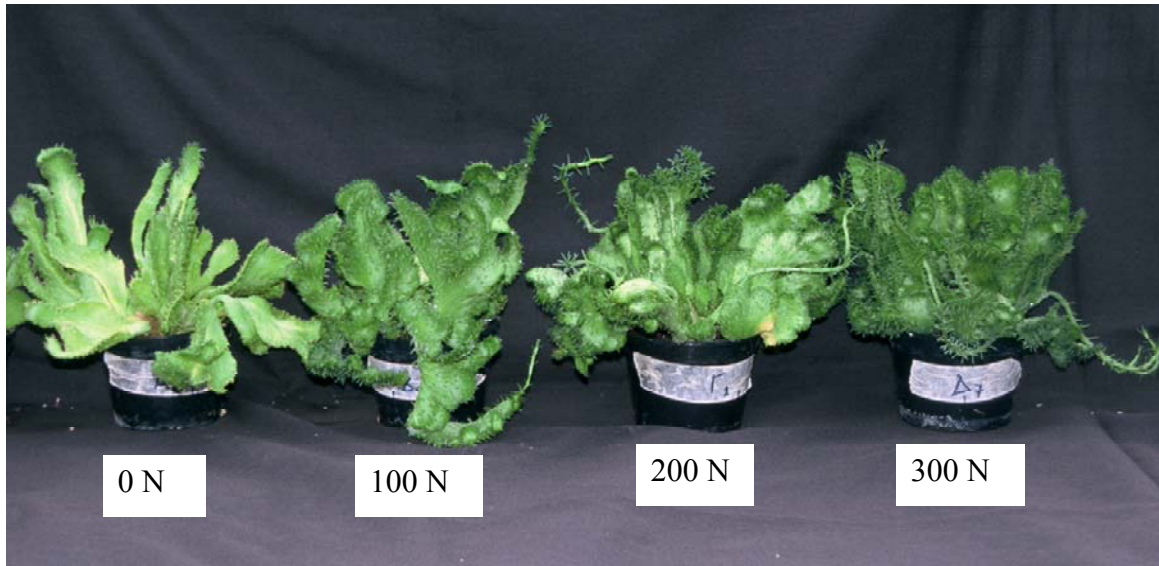
Σχ. 61. Γραμμική συσχέτιση των μονάδων αζώτου με (α) τον αριθμό κανονικών βλαστών που σχηματίστηκαν, (β) το ύψος, (γ) τον όγκο, (δ) το βάρος και (ε, ζ) τις δύο διαμέτρους φυτών της *E. pugniformis* var. *cristata*, n =40.

2^η καλλιεργητική περίοδος (2003)

Την επόμενη καλλιεργητική περίοδο (Μάιος – Σεπτέμβριος) επαναλήφθηκε το πείραμα λίπανσης φυτών *E. rugniformis* var. *cristata* (κεφ. 3.2.3) και με βάση τα αποτελέσματα της προηγούμενης περιόδου, οι επεμβάσεις τροποποιήθηκαν ως εξής 0, 100, 200 ή 300 mg l⁻¹ N, 300 mg l⁻¹ P και 500 mg l⁻¹ K.

Μετά από 4.5 μήνες (Εικ. 29) καλλιέργειας η σταδιακή αύξηση του αζώτου στη λίπανση προκάλεσε αύξηση του όγκου (Σχ. 64), του νωπού, του ξηρού βάρους και του εμβαδού του φυτού (Πίν. 33, Σχ. 66). Παρόμοια αύξηση φαινομενικά δεν παρατηρήθηκε στο ύψος (Σχ. 62) ενώ ο μέσος όρος των δύο διαμέτρων των φυτών που μετρήθηκε φάνηκε με τη προσθήκη αζώτου να αυξάνεται σε σχέση με το μάρτυρα (Σχ. 63). Σημαντική ήταν η διαφορά όγκου, βάρους και εμβαδού φυτών που λιπαίνονταν με άζωτο σε σχέση με αυτά που δεν δέχονταν άζωτο. Αυξανόμενου του αζώτου της λιπάνσεως μέχρι 200 mg l⁻¹, αυξήθηκε και ο αριθμός των κανονικών βλαστών ανά φυτό (Πίν. 33, Σχ. 64). Μετά από 3.5 μήνες από την έναρξη των πειραμάτων (8^η παρατήρηση, Σχ. 64) άρχισε να σταθεροποιείται ο αριθμός κανονικών βλαστών στο μάρτυρα ενώ στα φυτά που δέχονταν άζωτο υπήρξε τάση αύξησης. Επίσης, ο λόγος του αριθμού των κανονικών βλαστών προς το βάρος του φυτού αν και αυξήθηκε το αποτέλεσμα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό (Πίν. 33).

Η ανάλυση γραμμικής συσχέτισης έδωσε μια ασθενή γραμμική συσχέτιση (Σχ. 66) του βάρους των φυτών με τις μονάδες του αζώτου, ενώ δε βρέθηκε αντίστοιχη συσχέτιση με τον αριθμό των κανονικών βλαστών που σχηματίστηκαν, του όγκου, του ύψους και των δύο διαμέτρων (Σχ. 67 α, γ, δ, ε, ζ).

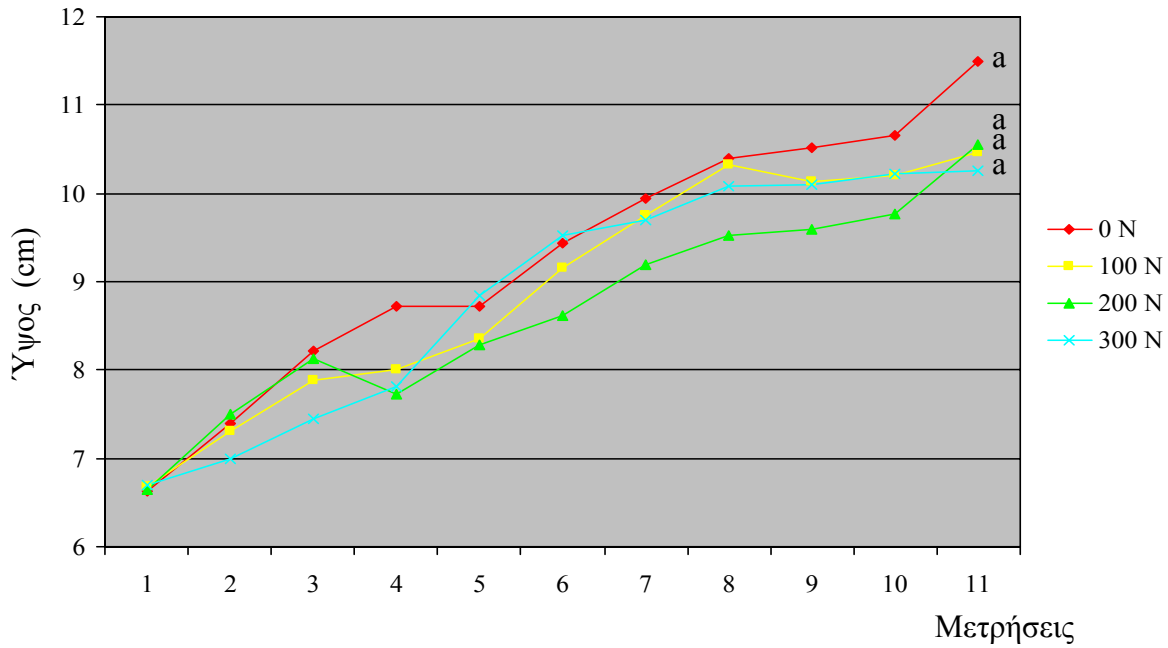


Εικ. 29. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχου λίπανσης (0, 100, 200, 300 mg Γ^{-1}) σε φυτά *E. rugniformis* var. *cristata* 4 μήνες μετά την έναρξη των λιπάνσεων.

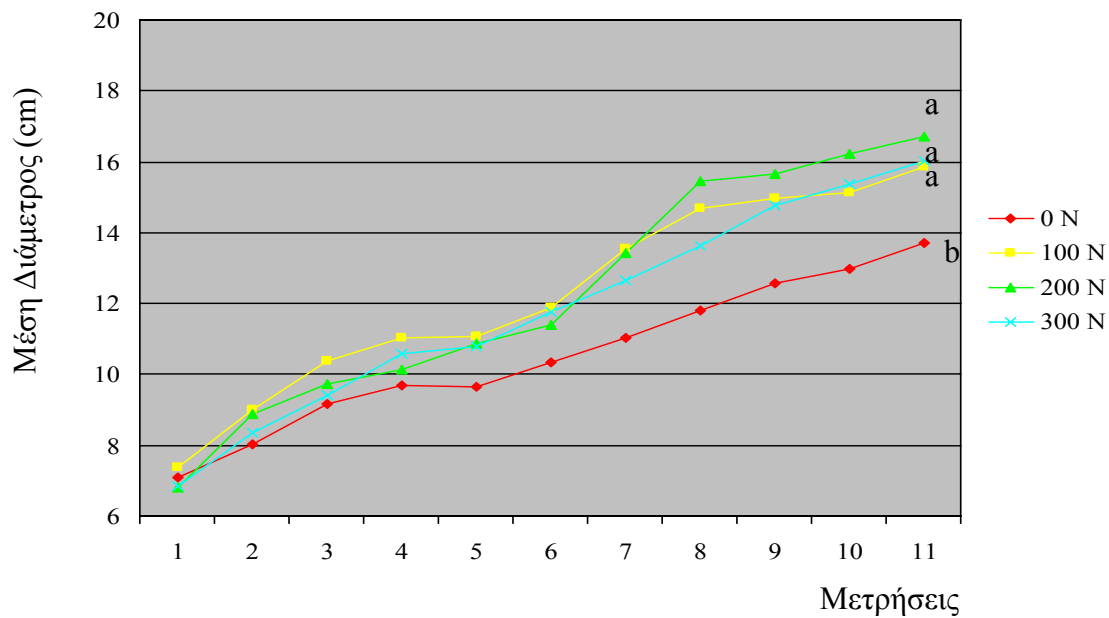
Πίν. 33. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχου λίπανσης στο νωπό και ξηρό βάρος καθώς και τον αριθμό των κανονικών βλαστών που παράχθηκαν σε φυτά *E. rugniformis* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=8$.

Συγκέντρωση N (mg Γ^{-1})	Νωπό Βάρος (g)	Ξηρό Βάρος (g)	Μ. Αρ. κανονικών βλαστών	Αρ. κανονικών βλαστών / Νωπό βάρος (%)	Αρ. κανονικών βλαστών / Ξηρό βάρος (%)
0	75.99 b	8.27 b	2 a	2.63	24.18
100	116.28 a	10.6 a	5.75 ab	4.94	54.24
200	112.05 a	9.27 a	6.375 b	5.69	65.51
300	113.57 a	9.89 a	4.375 ab	3.85	44.23
	F *	F *	F *		

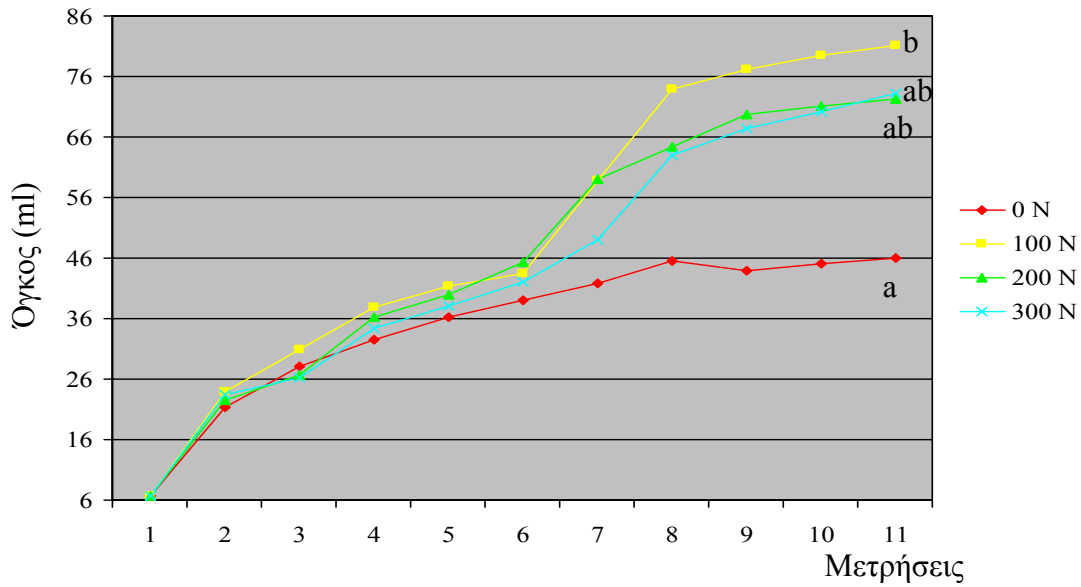
* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι σημαντική. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.



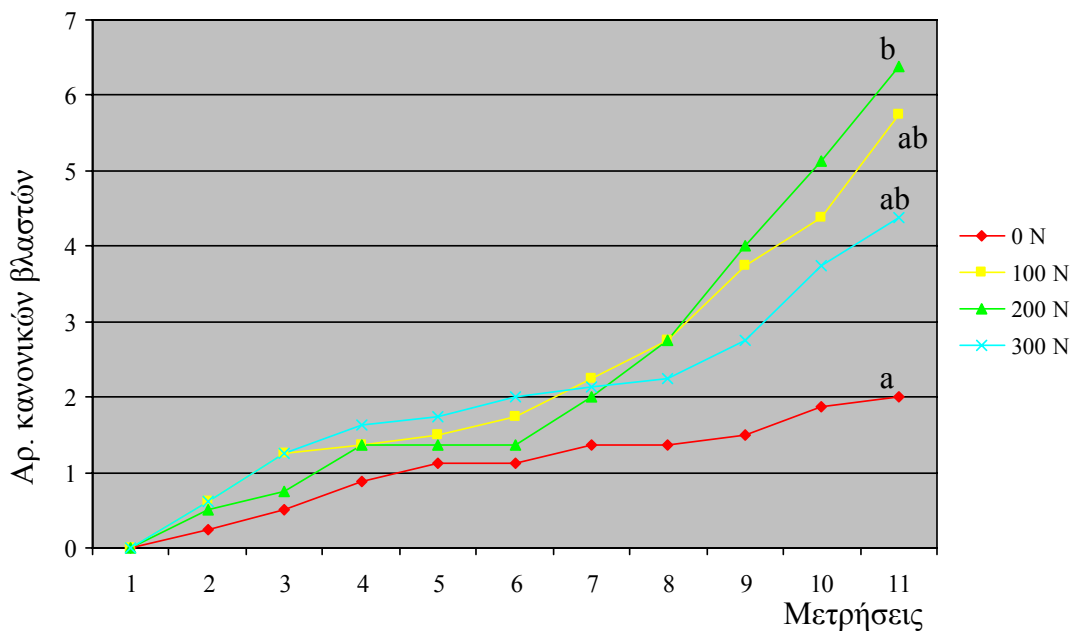
Σχ. 62. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχου λίπανσης (0, 100, 200 και 300 mg l⁻¹) στο ύψος φυτών *E. rugniformis* var. *cristata* κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=8$.



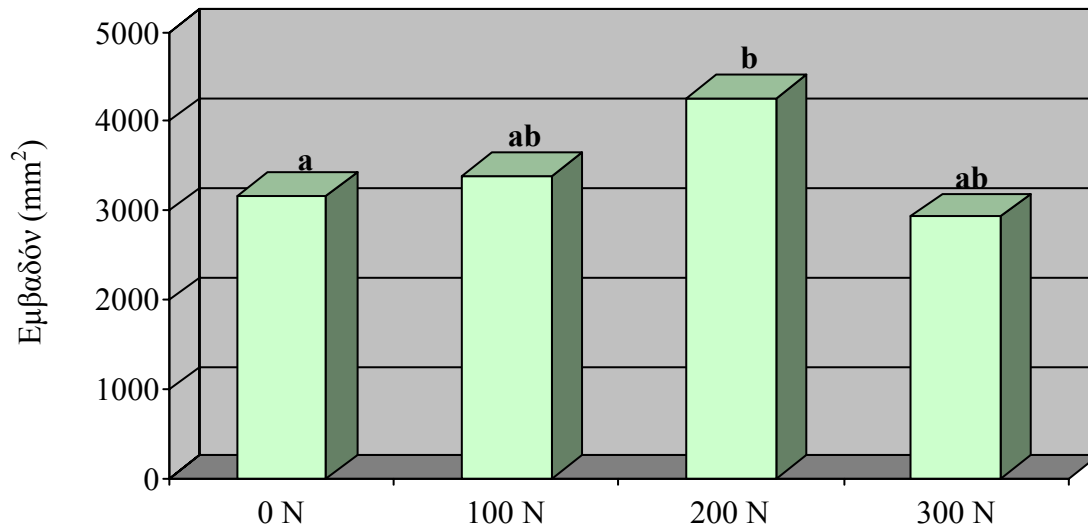
Σχ. 63. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχου λίπανσης (0, 100, 200 και 300 mg l⁻¹) στο μέσο όρο των δύο διαμέτρων των φυτών *E. rugniformis* var. *cristata* κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=8$.



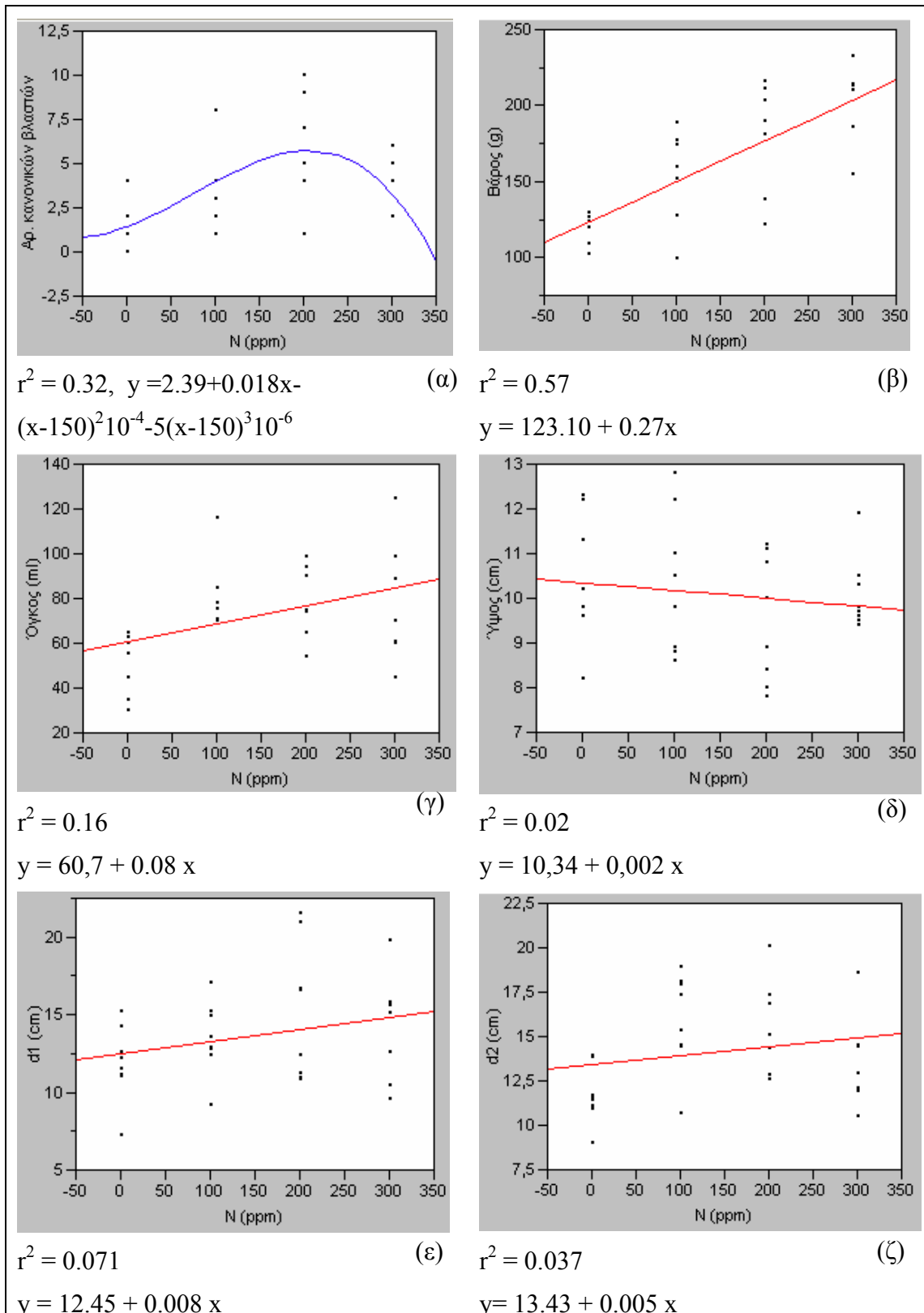
Σχ. 64. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχου λίπανσης (0, 100, 200 και 300 mg l⁻¹) στον όγκο των φυτών *E. pugniformis* var. *cristata* κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=8$.



Σχ. 65. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχου λίπανσης (0, 100, 200 και 300 mg l⁻¹) στον αριθμό των κανονικών βλαστών που σχημάτισαν φυτά *E. pugniformis* var. *cristata* κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=8$.



Σχ. 66. Επίδραση των επιπέδων της αζωτούχου λίπανσης (0, 100, 200, 300 mg l⁻¹ N) στο εμβαδόν των βλαστών *E. rugiformis* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=8$.



Σχ. 67. Γραμμική συσχέτιση των μονάδων αζώτου με (α) τον αριθμό κανονικών βλαστών που σχηματίστηκαν, (β) το ύψος, (γ) τον όγκο, (δ) το βάρος και (ε, ζ) τις δύο διαμέτρους φυτών *E. pugniformis* var. *cristata*, n =40.

3.3.2 Επίδραση εξωγενών φυτορρυθμιστικών ουσιών 2,4-D, TIBA, BA στην ανάπτυξη κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων

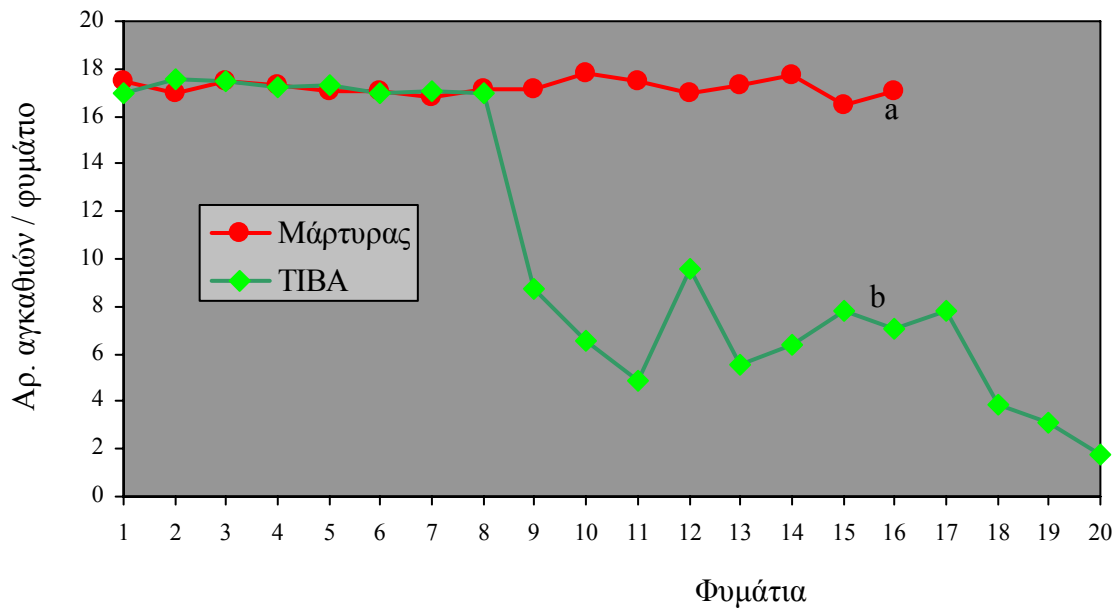
Οι αυξίνες και ιδιαίτερα το 2,4-D έχει δειχθεί ότι προκαλούν συμπτώματα δεσμίωσης (κεφ. 1.3.4.1). Το 2,4-D είναι μια ισχυρή αυξίνη που χρησιμοποιούταν ως και ζιζανιοκτόνο. Το TIBA εμποδίζει τη βασιπεταλική μεταφορά της ενδογενούς αυξίνης και συντελεί στη συγκέντρωσή της στο κορυφαίο μερίστωμα και συγχρόνως σταματάει την κυριαρχία της κορυφής με συνέπεια να υπερισχύει η κυτοκινίνη στα πλάγια μεριστώματα κατά μήκος του βλαστού. Η εφαρμογή του BA δοκιμάστηκε αποσκοπώντας στην αλλαγή του λόγου των αυξινών - κυτοκινινών στο κορυφαίο μερίστωμα.

3.3.2.1 Επίδραση του TIBA σε βλαστούς *Mammillaria elongata*

Βλαστοί φυτών *M. elongata* από το Μάιο μέχρι και το Σεπτέμβριο ψεκάζονταν με υδατικό διάλυμα 100 mg l^{-1} TIBA τρεις φορές την εβδομάδα. Επίσης, δοκιμάστηκε η τοποθέτηση TIBA (100 mg l^{-1}) 1 cm κάτω από το κορυφαίο μερίστωμα του βλαστού (κεφ. 3.2.4). Στόχος του πειράματος ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας του TIBA, που παρεμποδίζει τη βασιπεταλική μεταφορά της αυξίνης εντός του φυτού, να προκαλέσει δεσμίωση. Ανά εβδομάδα ελέγχονταν τα φυτά για τυχόν συμπτώματα δεσμίωσης.

Σχεδόν το πρώτο μήνα του πειράματος στα φυτά που είχε εφαρμοστεί το TIBA με τη λανολίνη παρατηρήθηκαν εγκαύματα και τελικά ξήρανση του τμήματος του βλαστού στο οποίο έγινε η εφαρμογή. Τα εγκαύματα αυτά πιθανόν να οφείλονται στη λανολίνη, ή στην έλλειψη σκίασης του τμήματος του βλαστού λόγω αφαίρεσης των αγκαθιών, ή στο συνδυασμό τους.

Ένα μήνα μετά την έναρξη του πειράματος, στα φυτά που ψεκάστηκαν με TIBA, παρατηρήθηκε ελαφρά επιμήκυνση των βλαστών και μείωση του αριθμού των αγκαθιών ανά φυμάτιο. Στο τέλος του πειράματος παρατηρήθηκε επιμήκυνση βλαστού και αλλαγή στη φυλλοταξία των φυματίων, καθώς και στον αριθμό των αγκαθιών κάθε φυματίου. Έτσι, για την παρακολούθηση της επίδρασης του TIBA μετρήθηκε ο αριθμός των αγκαθιών που έφερε κάθε φυμάτιο που βρισκόταν σε ευθεία γραμμή από τη κορυφή έως το λαιμό του φυτού (κεφ. 3.2.5).



Σχ. 68. Επίδραση του TIBA (100 mg l^{-1}) στον αριθμό αγκαθιών των νέων σχηματισθέντων φυματίων βλαστών της *M. elongata*. 1= 1ο φυμάτιο λαιμού, n=8.

Στο σχήμα 68 φαίνεται ότι το TIBA επηρέασε το σχηματισμό αγκαθιών ανά φυμάτιο της *M. elongata*. Στους βλαστούς που δέχθηκαν TIBA τα νέα φυμάτια δε σχημάτισαν πάνω από 10 αγκάθια ανά φυμάτιο ενώ κάθε φυμάτιο του μάρτυρα φέρει από 16-18 αγκάθια. Σύμφωνα με τον Pilbeam (1999), ο αριθμός αγκαθιών ανά φυμάτιο της *M. elongata* ποικίλει ανάλογα με τη ποικιλία και κυμαίνεται από 15 – 20. Τα φυμάτια που μετρήθηκαν είχαν ολοκληρώσει τον σχηματισμό των αγκαθιών τους. Αυτό επιβεβαιώνεται με βάση το πως δημιουργούνται τα αγκάθια στην *M. elongata*. Σύμφωνα με τους Johnson και Emimo (1982), οι καταβολές των αγκαθιών της *M. elongata* αναπτύσσονται σε μια ακροπέταλη αλληλουχία από την αντίθετη πλευρά του βλαστού όπου βρίσκεται το νεαρό φυμάτιο. Η ανάπτυξη των αγκαθιών συνεχίζεται έως ότου συμπληρωθεί ένας κύκλος, ενώ η δημιουργία αγκαθιών ολοκληρώνεται με την εμφάνιση τριχών στο φυμάτιο. Εάν υπάρχει κεντρικό αγκάθι είναι το τελευταίο που αναπτύσσεται και το πρώτο που επιμηκύνεται. Η επιμήκυνση γίνεται με μια βασιπέταλη αλληλουχία αντίστροφα από τις καταβολές.

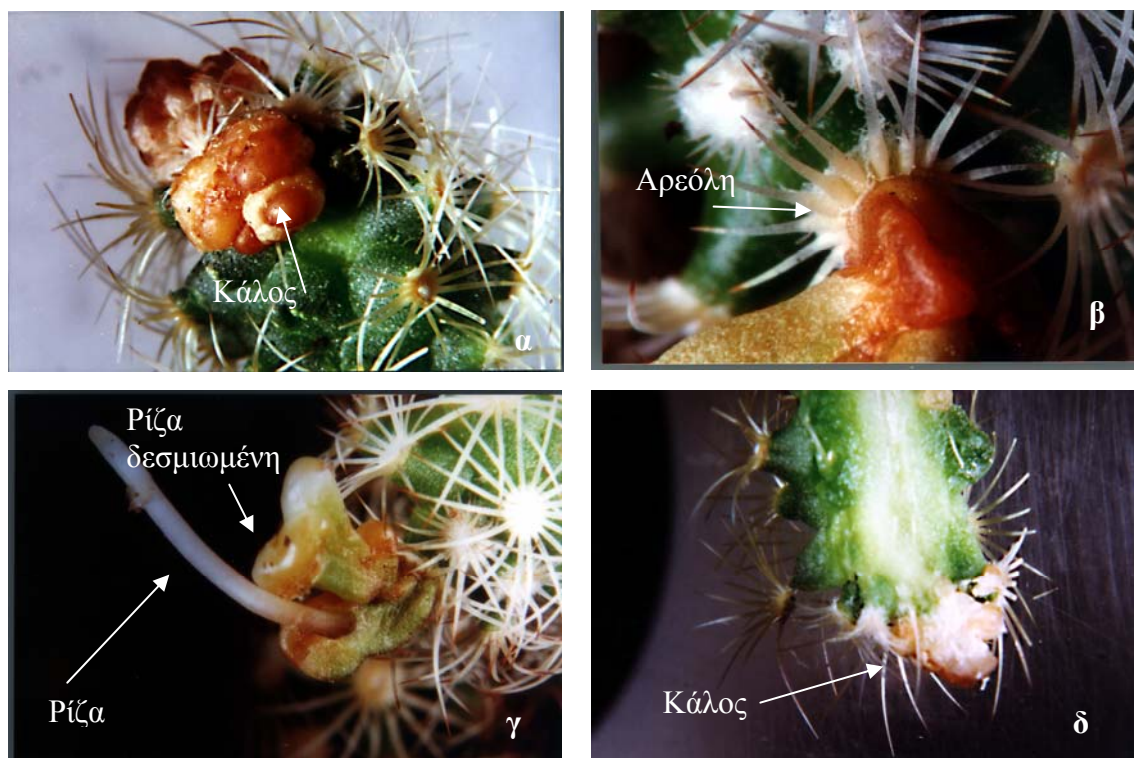
Αυτή η μεταβολή συνδυάστηκε με επιμήκυνση του βλαστού και αλλαγή της φυλλοταξίας του, αφού τα φυτά που δέχθηκαν την επίδραση του TIBA σχημάτισαν περισσότερα φυμάτια (4 νέα φυμάτια) σε σχέση με τον μάρτυρα σε δεδομένο μήκος βλαστού.

3.3.2.2 Επίδραση του 2,4-D στην ανάπτυξη της *M. elongata*

Η εφαρμογή 2,4-D στα φυτά *in vivo* έχει βρεθεί να προκαλεί συμπτώματα δεσμίωσης (Stevenick, 1956, Linser *et al.*, 1953, Βυζαντινόπουλος, 1992).

Βλαστοί φυτών *M. elongata* από το Μάιο μέχρι και το Σεπτέμβριο ψεκάζονταν με υδατικό διάλυμα 50 και 100 mg l⁻¹ 2,4-D τρεις φορές την εβδομάδα. Στόχος του πειράματος ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας της αυξίνης να προκαλέσει δεσμίωση.

Μετά το τέλος του πειράματος παρατηρήθηκε σχηματισμός κάλου πάνω στα φυμάτια που είχαν δεχθεί την επίδραση των 100 mg l⁻¹. Και πιο συγκεκριμένα ακριβώς πάνω από την αρεόλη (Εικ. 30 α,β, δ). Ο κάλος αυτός άρχισε να γίνεται εμφανής 1.5 μήνα μετά τον πρώτο ψεκασμό. Στο τέλος του πειράματος είχαν εμφανιστεί και ρίζες πάνω σε αυτόν τον κάλο (Εικ. 30 γ). Κάποιες ρίζες ήταν δεσμιομένες. Την επόμενη καλλιεργητική περίοδο ο κάλος ξεράθηκε και δεν αναπτύχθηκαν περαιτέρω οι ρίζες που είχαν σχηματιστεί. Στην επέμβαση των 50 mg l⁻¹ δε διαπιστώθηκε μακροσκοπικά κάποια αλλαγή στα φυτά.



Εικ. 30. Βλαστοί *M. elongata* μετά από ψεκασμό με 100 mg l⁻¹ 2,4-D (α) σχηματισμός κάλου (β) κάλος πάνω στην αρεόλη (γ) σχηματισμός κανονικών και δεσμιομένων ριζών από τον κάλο και (δ) επιμήκης τομή βλαστού *M. elongata* και σχηματισμένου κάλου

3.3.2.3 Επίδραση των TIBA, 2,4-D και BA στην ανάπτυξη της κανονικής και δεσμιωμένης μορφής της *Euphorbia pugniformis*

Μετά την εφαρμογή του TIBA και του 2,4-D στη *M. elongata* που είναι κάκτος αργής ανάπτυξης επαναλήφθηκαν τα πειράματα με την *E. pugniformis*, ένα παχύφυτο που είναι πιο γρήγορης ανάπτυξης και η δεσμιωμένη μορφή του ‘σπάει’ (δίνει κανονικούς βλαστούς) πιο εύκολα. Στόχος του πειράματος ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας πρόκλησης δεσμίωσης στην κανονική μορφή και η διατήρηση της δεσμιωμένης μορφής, με την εφαρμογή φυτορρυθμιστικών ουσιών.

Φυτά *E. pugniformis* τόσο της δεσμιωμένης όσο και της κανονικής μορφής δέχθηκαν επεμβάσεις με 100 και 200 mg l⁻¹ TIBA και BA καθώς και με 50 και 100 mg l⁻¹ 2,4-D. Οι ψεκασμοί ήταν εβδομαδιαίοι, άρχισαν το Μάιο και ολοκληρώθηκαν στο τέλος του Σεπτεμβρίου (κεφ. 3.2.4).

Οι επεμβάσεις με TIBA επηρέασαν το πάχος του βλαστού στη δεσμιωμένη μορφή (Πίν. 34). Το TIBA (100, 200 mg l⁻¹) οδήγησε σε αύξηση του πάχους των βλαστών της *Euphorbia pugniformis* var. *cristata* και παρατηρήθηκε τάση αύξησης του αριθμού των φύλλων στους βλαστούς. Το TIBA δεν επηρέασε τον αριθμό των κανονικών βλαστών αν και φάνηκε τάση μείωσης του αριθμού κανονικών βλαστών.

Στη *E. pugniformis* οι επεμβάσεις με TIBA δεν επηρέασαν την ποσότητα και το μήκος των κανονικών βλαστών που σχηματίστηκαν, καθώς και τον αριθμό των φύλλων που είχαν οι βλαστοί (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται).

Οι ψεκασμοί με BA στην *Euphorbia pugniformis* var. *cristata* επηρέασαν τον αριθμό φύλλων ανά cm, που βρέθηκε να είναι σχεδόν τριπλάσιος στα 100 mg l⁻¹ και διπλάσιος στα 200 mg l⁻¹ BA (Εικ. 31 α, β) σε σύγκριση με το μάρτυρα. Το πάχος των δεσμιωμένων βλαστών όσο και η ποσότητα και το μήκος των κανονικών βλαστών που παράχθηκαν δεν επηρεάστηκαν από το BA (Πίν. 34).

Ο ψεκασμός με BA (100 και 200 mg l⁻¹) μείωσε το μήκος των κανονικών βλαστών (δευτεροταγείς βλαστοί), αύξησε το πάχος και μείωσε τον αριθμό των φύλλων σε κάθε βλαστό (Πίν. 35). Επίσης στα 200 mg l⁻¹ BA φάνηκε η τάση μείωσης των σχηματισθέντων κανονικών βλαστών. Τέλος, τα 50 mg l⁻¹ 2,4-D δεν φάνηκε να επηρέασαν τον αριθμό και το μήκος των κανονικών βλαστών που παράχθηκαν. Στα 100 mg l⁻¹ παρατηρήθηκε μια μείωση η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Πίν. 34. Επίδραση του TIBA, 2,4-D και BA στο μήκος, πάχος, τον αριθμό των φύλλων, τον αναμενόμενο αριθμό φύλλων ανά cm δεσμιωμένων βλαστών, καθώς στον αριθμό και το μήκος των κανονικών βλαστών της *Euphorbia rugniformis* var. *cristata*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=8$.

Επεμβάσεις (mg l ⁻¹)	Δεσμιωμένος Βλαστός				Κανονικός Βλαστός	
	Μήκος (cm)	Πάχος (cm)	Αρ. φύλλων / cm	Αναμενόμενος αρ. φύλλων/ cm	Μ. αρ. κανονικών βλαστών	Μήκος (cm)
Μάρτυρας	92.72 a	0.25a	33.82 a	33.82 a	2.75 a	3.02 a
100 TIBA	90.01 a	0.35b	37.00 a	32.83 a	1.75 a	7.9 b
200 TIBA	91.22 a	0.42ab	35.80 a	33.27 a	1.50 a	3.4 a
	F ^{NS}	F*	F ^{NS}	F ^{NS}	F ^{NS}	F*
Μάρτυρας	92.72 a	0.25 a	33.82a	33.82 a	2.75 a	3.02 a
100 BA	214.5 b	0.22a	116.5b	41.53 a	0 a	-
200 BA	225.4 b	0.28 a	103.9b	40.70 a	2 a	2.3 a
	F*	F ^{NS}	F*	F ^{NS}	F ^{NS}	F ^{NS}
Μάρτυρας	92.72 a	0.25 a	33.82 a	33.82 a	2.75 a	3.02 a
50 2,4-D	89.79 a	0.29 a	40.01 a	32.79 a	2.25 a	3.25 a
100 2,4-D	93.00 a	0.28 a	37.00 a	33.92 a	1.25 a	1.02 a
	F ^{NS}	F ^{NS}	F ^{NS}	F ^{NS}	F ^{NS}	F ^{NS}

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι σημαντική. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.



Εικ. 31. *Euphorbia rugniformis* var. *cristata* που δέχθηκε επεμβάσεις με 100 mg l⁻¹ BA (α) και ο μάρτυρας (β). Διακρίνεται ο μεγαλύτερος αριθμός φύλλων στο (α).

Πίν. 35. Επίδραση του BA στο μήκος, πάχος, τον αριθμό των φύλλων ανά βλαστό και αριθμό βλαστών *Euphorbia rugniformis*. Σύγκριση των μέσων με Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=8$.

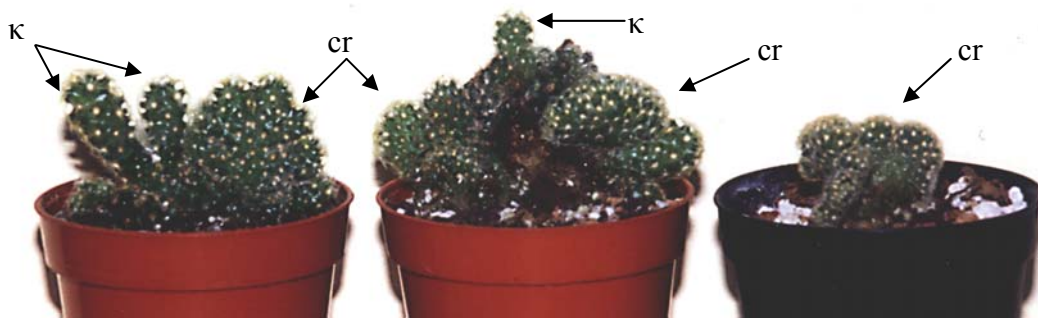
Επεμβάσεις (mg l ⁻¹)	Μήκος (cm)	Πάχος (cm)	Αρ. Φύλλων / βλαστό	Αρ. κανονικών βλαστών
Μάρτυρας	16.9a	0.219a	41.0a	29.0 a
100 BA	5.06b	0.355b	29.6b	31.5 a
200 BA	4.72b	0.353b	30.4ab	25.3 a
	F *	F *	F *	F ^{NS}

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι σημαντική. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.

3.3.3 *In vivo* καλλιέργεια αναγεννημένων *in vitro* φυταρίων δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων

Έρριζα φυτάρια της δεσμιωμένης μορφής των παχυφύτων *M. elongata*, *E. pugniformis* και *E. lactea* αφού εγκλιματίστηκαν *ex vitro* μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα Klashman τύπου MAX Multi purpose compost : περλίτη (2:1 v/v) με σκοπό την παρατήρηση της ανάπτυξης τους στο χρόνο για τυχόν μεταβολές στη δεσμιωμένη μορφή. Το πρώτο εξάμηνο δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή ως προς το σχηματισμό κανονικών βλαστών και στις τρεις δεσμιωμένες μορφές, οι οποίες αναπτύσσονταν αναλλοίωτες.

Στην *M. elongata* var. *cristata* η εμφάνιση κανονικών βλαστών παρατηρήθηκε από τον δωδέκατο μήνα καλλιέργειας και μετά (Εικ. 32).



Εικ. 32. Φυτάρια της *Mammillaria elongata* var. *cristata* 15 μήνες μετά τον εγκλιματισμό, κ: κανονικός βλαστός, cr: δεσμιωμένος βλαστός.

Στην *E. pugniformis* var. *cristata* από τον έκτο μήνα άρχισαν να παρατηρούνται κανονικοί βλαστοί στα φυτά. Η αφαίρεση των κανονικών βλαστών οδήγησε σε περαιτέρω ανάπτυξη της δεσμιωμένης μορφής. Στον όγδοο μήνα καλλιέργειας σχηματίστηκαν πάλι νέοι κανονικοί βλαστοί.

Στην *E. lactea* var. *cristata* δεσμιωμένα φυτά μετά τους 12 μήνες καλλιέργειας στο υπόστρωμα σχημάτισαν και κανονικούς βλαστούς. Σε φυτάριο που είχε και τις δύο μορφές, 10 μήνες μετά τον εγκλιματισμό φαίνεται καθαρά ο σχηματισμός του κανονικού βλαστού (Εικ. 33 α). Αφαιρέθηκε ο κανονικός βλαστός και αφού προκλήθηκε ριζοβολία φυτεύθηκε στο ίδιο εδαφικό υπόστρωμα και παρακολουθούνταν. Τρία χρόνια μετά (Εικ. 33 β) το κορυφαίο μερίστωμα του κεντρικού κανονικού βλαστού μετατράπηκε σε *cristata*. Η ηλικία του βλαστού φαίνεται χαρακτηριστικά από τις τρεις διογκώσεις του βλαστού. Στον τρίτο χρόνο παρατηρείται και χαρακτηριστική αλλαγή της φυλλοταξίας του.

Πέντε χρόνια μετά ο κανονικός βλαστός δεν αναπτύχθηκε σε ύψος αλλά το κορυφαίο μερίστωμα μεγάλωσε σε πλάτος (Εικ. 33δ). Η δεσμιωμένη μορφή (Εικ. 33γ) απλώς συνέχισε την ανάπτυξή της χωρίς να παρατηρηθεί ο σχηματισμός νέου κανονικού βλαστού μέχρι πέντε χρόνια μετά.

Παρόμοια ανάπτυξη με τον *ex vitro* “κανονικό βλαστό” παρατηρήθηκε και *in vitro* σε κανονικό βλαστό που προερχόταν από έκφυτο της *E. lactea* var. *cristata*, που ριζοβόλησε σε υπόστρωμα MS με 0.2 mg l⁻¹ IBA. Η αλλαγή του κορυφαίου μεριστώματος από σημειακό σε γραμμικό έγινε πολύ νωρίτερα (Εικ. 34 α), δύο χρόνια μετά την αρχική εμφύτευση. Εντυπωσιακό είναι το ότι το φυτάριο επιβίωσε στο βάζο καλλιέργειας για τέσσερα χρόνια χωρίς αλλαγή υποστρώματος (Εικ. 34 β, γ).



Εικ. 33. Φυτόριο *E. lactea* var. *cristata* 7 μήνες μετά τον εγκλιματισμό (α), δεσμωμένη μορφή (δ) και η κανονική (β, γ) μετά από 3 και 5 χρόνια αντίστοιχα.



Εικ. 34. Κανονικός βλαστός της *E. lactea* var. *cristata* που ριζοβόλησε *in vitro* δύο χρόνια μετά την αρχική εμφύτευση και παρουσιάζει συμπτώματα δεσμώσης (α), και ο ίδιος βλαστός μετά από 4 χρόνια από την αρχική εμφύτευση (β, γ).

3.4 Συζήτηση – Συμπεράσματα

Κατά την *in vivo* καλλιέργεια δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων παρατηρείται συχνά ο σχηματισμός και κανονικών βλαστών (Johnson 1969, Johnson and Gorenflot, 1970, Boke and Ross, 1979). Σύμφωνα με τον Rowley (2006) οι δεσμιωμένες μορφές εμφανίζουν διάφορα πρότυπα συμπεριφοράς. Κάποιες δεσμιωμένες μορφές δεν επανέρχονται ποτέ στην κανονική μορφή. Άλλες, πάλι επανέρχονται στη κανονική μορφή όταν είναι σε μεγάλη ηλικία ή “πεινάνε” και άλλες “γυρνάνε” τόσο εύκολα που πρέπει συχνά να αφαιρούνται – κλαδεύονται οι κανονικοί βλαστοί.

Το ερώτημα με βάση τη βιβλιογραφία, εάν η δεσμίωση μπορεί να οφείλεται σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως η φτωχή ή υπερβολική λίπανση (Houghton, 1930, Butterfield, 1958), ή η εξωγενώς εφαρμογή φυτορυθμιστικών ουσιών (Linser *et al.*, 1953 Laibach and Mai, 1936; Schoibe and Wohrmann-Hillmann, 1957), ήταν ο στόχος των πειραμάτων του κεφαλαίου. Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε και η *in vivo* συμπεριφορά δεσμιωμένων μορφών των παχυφυτών *M. elongata*, *E. pugniformis* και *E. lactea* που προέρχονταν από φυτάρια *in vitro* καλλιέργειας δεσμιωμένων μορφών και είχαν εγκλιματιστεί επιτυχώς σε *ex vitro* συνθήκες.

Η εφαρμογή αζώτου ανεξαρτήτου συγκέντρωσης στη λίπανση φυτών *E. pugniformis* var. *crinata* προκάλεσε αύξηση του όγκου, του νωπού, του ξηρού βάρους και του εμβαδού του φυτού. Παρόμοια αύξηση φαινομενικά δεν παρατηρήθηκε στο ύψος και στο πλάτος, δεδομένου ότι λόγω του βάρους των βλαστών υπήρξε κάμψη τους. Παρότι με το N αυξήθηκε ο αριθμός των κανονικών βλαστών, ο λόγος του αριθμού των κανονικών βλαστών προς το βάρος του φυτού αν και αυξήθηκε το αποτέλεσμα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό.

Επομένως η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στη διάσπαση της *crinata* μορφής δεν φάνηκε να είναι άμεση αλλά έμμεση λόγω της θετικής επίδρασης του N στη βλαστική ανάπτυξη. Έτσι επαληθεύεται η άποψη ότι η λίπανση (Houghton, 1930, Butterfield, 1962), τουλάχιστον η αζωτούχος, που εξετάσαμε στο πείραμα, επηρεάζει την επαναφορά της *crinata* στη κανονική μορφή, αλλά το φαινόμενο οφείλεται στην έντονη ανάπτυξη.

Η πρόκληση δεσμίωσης στα φυτά με τη χρήση εξωγενώς φυτορυθμιστικών ουσιών έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές τόσο για τις αυξίνες (Linser *et al.*, 1953, Laibach and Mai, 1936; Schoibe and Wohrmann-Hillmann, 1957), όσο για το παρεμποδιστή τους, το TIBA (Wenck, 1952, Harder and Oppermann, 1952, Gorter, 1951).

Η εφαρμογή 100 mg l⁻¹ 2,4-D στην *M. elongata* είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κάλου τόσο στη κορυφή του βλαστού όσο και στα φυμάτια που βρίσκονταν κάτω από το κορυφαίο μερίστωμα. Στον παραγόμενο κάλο σχηματίστηκαν ρίζες που κάποιες ήταν δεσμιωμένες. Παρόμοια αντίδραση είχε και η εφαρμογή του 2,4-D στον αραβόσιτο (Βυζαντινόπουλος, 1992). Σε κάποια φυτά *in vitro* η χρήση του 2,4-D οδήγησε σε παραγωγή κάλου (Johnson and Emimo, 1979, Minocha and Mechra, 1974, Wakhlu and Bhau, 2000, Sidik *et al.*, 2008 κ.α.). Η εφαρμογή 100 mg l⁻¹ 2,4-D στην *E. pugniformis* var. *crystata* καθώς και η μικρότερη δόση των 50 mg l⁻¹ φάνηκε να μειώνει το σχηματισμό κανονικών βλαστών, καθώς και του μήκους αυτών. Όμως, σε κανένα από τα ανωτέρω πειράματα δε μετατράπηκε κανονικός βλαστός σε δεσμιωμένο. Η εφαρμογή μεγαλύτερης δόσης 2,4-D χρήζει δοκιμής.

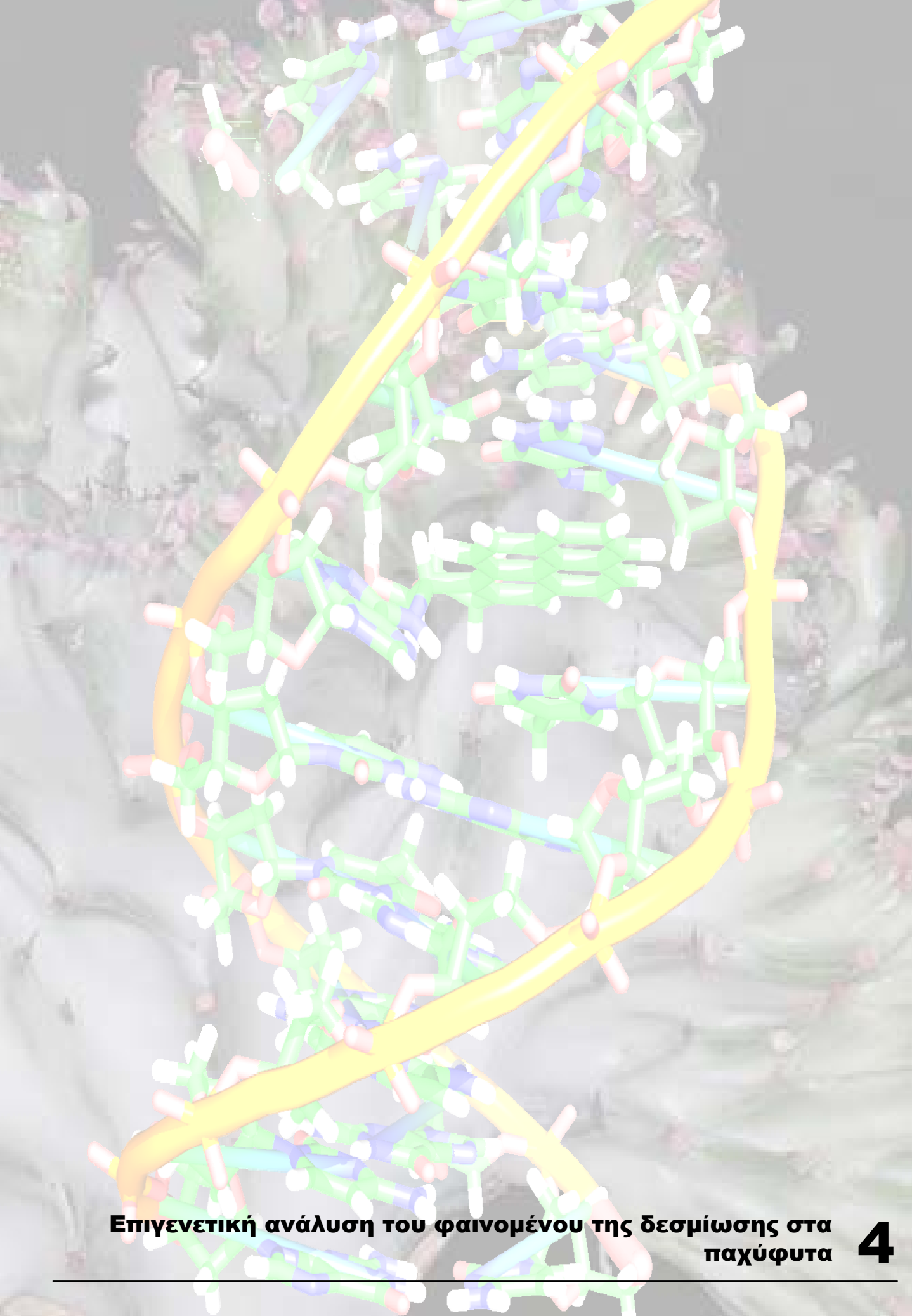
Η εφαρμογή κυτοκινίνης (BA) σε δεσμιωμένους βλαστούς της *E. pugniformis* προκάλεσε αύξηση του μήκους αυτών και σχεδόν τριπλασίασε τον αριθμό φύλλων ανά cm σε σχέση με τον αναμενόμενο αριθμό φύλλων βάσει του μάρτυρα. Αυτή η αύξηση των φύλλων κατά πάσα πιθανότητα σημαίνει δημιουργία μεριστωμάτων, αφού το φύλλο συνοδεύει μερίστωμα. Τα 100 mg l⁻¹ διατήρησαν τη δεσμιωμένη μορφή αφού δε σχηματίστηκαν κανονικοί βλαστοί, ενώ τα 200 mg l⁻¹ έδωσαν πολλούς αλλά μικρού μεγέθους κανονικούς βλαστούς όμως το αποτέλεσμα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό. Στην *E. lathyris* (Mingo-Castel, 1984) παρατηρήθηκε μετά από ψεκασμό 100 mg l⁻¹ BA επίσης αλλαγή στην φυλλοταξία και αύξηση το κορυφαίου μεριστώματος κατά 72.8%. Έχει αναφερθεί επίσης, ότι ψεκασμός 1mM της κυτοκινίνης BAP (6-(benzylamino)-9-(2-tetrahydropyrany1)-9H-purine) προκάλεσε αλλαγή της φυλλοταξίας στο *Vitis vinifera* (Srinivasan and Mullins, 1981).

Η παρατήρηση ότι η κυτοκινίνη προκαλεί αλλαγή στη φυλλοταξία έρχεται σε συμφωνία με το συμπέρασμα των Lee *et al.* (2009) ότι η αυξίνη και η κυτοκινίνη αλληλεπιδρούν στη φυλλοταξία βάσει των παρατηρήσεων στο γονίδιο *ABPH1* στο καλαμπόκι (Giulini *et al.*, 2004, Reinhardt *et al.*, 2000 and 2003).

Η εφαρμογή 100 mg l⁻¹ του παρεμποδιστή της πολικής κίνησης της αυξίνης (TIBA) στη *M. elongata* μείωσε τον αριθμό των αγκαθιών στα φυμάτια σε σχέση με τον μάρτυρα και παρουσίασε επιμήκυνση του βλαστού. Στην δεσμιωμένη μορφή της *E. pugniformis* επηρέασε το πάχος των *crystata* βλαστών και φάνηκε η τάση μείωσης του μέσου αριθμού των σχηματισθέντων κανονικών βλαστών, δηλαδή τάση διατήρησης της *crystata* μορφής.

Το TIBA προκάλεσε μια αλλαγή στη φυλλοταξία των κανονικών βλαστών και στα δύο παχύφυτα που εφαρμόστηκε, και διαφάνηκε τάση μείωσης της διάσπασης της *cristata* μορφής της *E. pugniformis* πιθανόν λόγω παρεμπόδισης της πολικής κίνησης της ενδογενούς αυξίνης του φυτού και αύξηση της συγκέντρωσης αυτής στο μερίστωμα (Thomson *et al.*, 1973). Σύμφωνα με τους Kuhlemeier and Reinhardt (2001) η αυξίνη είναι η υπεύθυνη ορμόνη που ρυθμίζει τη φυλλοταξία του βλαστού. Σύμφωνα με τους Reinhardt *et al.* (2003), η αυξίνη έχει μια ακροπέταλη μεταφορά στο μερίστωμα. Οι καταβολές εμφανίζονται σε περιοχές του κορυφαίου μεριστώματος οι οποίες έχουν υψηλές συγκεντρώσεις αυξινών. Όταν σχηματιστεί η καταβολή λειτουργεί ως συλλέκτης αυξίνης και δεν επιτρέπει η συσσωρευμένη αυξίνη τη δημιουργία νέας καταβολής. Η επόμενη καταβολή μπορεί να εμφανιστεί μόνον σε συγκεκριμένη απόσταση και ειδικότερα σε θέση στην οποία η αυξίνη επανασυσσωρεύεται (Reinhardt *et al.*, 2003).

Φυτάρια των δεσμιωμένων παχυφύτων που προήλθαν από μικροπολλαπλασιασμό αντέδρασαν σχεδόν όμοια σε *ex vitro* καλλιέργεια. Και τα τρία παχύφυτα σχημάτισαν κανονικούς βλαστούς με τη διαφορά ότι η *E. pugniformis* var. *cristata* ήταν η πιο ασταθής, όπως συμβαίνει και στη φύση. Επομένως, ο μικροπολοπλασιασμός και η συμμετοχή αυξινών και κυτοκινινών για την επίτευξή του δε φάνηκε να επηρεάζει τη συμπεριφορά ανάπτυξης των τριών αυτών παχυφύτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ένας κανονικός βλαστός της *E. lactea* var. *cristata* που αποκόπηκε τον 10^ο μήνα καλλιέργειας από τη δεσμιωμένη μορφή, τα δύο πρώτα χρόνια παρέμεινε κανονικός, αλλά τον τρίτο σχημάτισε δεσμίωση η οποία διατηρείται έως σήμερα (πέντε χρόνια αργότερα). Στη συγκεκριμένη περίπτωση αυτή η παλινδρόμηση των δύο μορφών (*cristata* σε κανονικό και ο κανονικός σε *cristata* βλαστό) δείχνει ότι η *cristata* μορφή η οποία υπερίσχυσε ελέγχεται πιθανόν από κάποιο γενετικό παράγοντα ο οποίος εκφράζεται αναλόγως των συνθηκών.



4. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΔΕΣΜΙΩΣΗΣ ΣΤΑ ΠΑΧΥΦΥΤΑ

4.1 Εισαγωγή

Από της εως σήμερα επισκόπηση της βιβλιογραφίας (βλ. Κεφάλαιο 1) προέκυψε ότι το φαινόμενο της δεσμίωσης παρατηρείται μετά από έντονη καταπόνηση του φυτού. Ως παράγοντες καταπόνησης αναφέρθηκαν το περιβάλλον, οι συνθήκες καλλιέργειας, η χρήση εξωγενώς φυτορρυθμιστικών ουσιών και η επίδραση εντόμων ή ασθενειών. Στο κεφάλαιο 2 εξετάστηκε η συμπεριφορά δεσμωμένων και κανονικών μορφών σε *in vitro* καλλιέργεια που αποσκοπούσε στον πολλαπλασιασμό και παρατηρήθηκε ο σχηματισμός και κανονικών βλαστών και από τις τρεις δεσμωμένες μορφές που χρησιμοποιήθηκαν. Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός είναι μια μέθοδος έντονης καταπόνησης και πολλές φορές χρησιμοποιείται στη βελτίωση φυτών ως μια πηγή σωμακλωνικής παραλλακτικότητας. Στα πειράματα του τρίτου κεφαλαίου διερευνήθηκε η επίδραση καταπονήσεων (αζωτούχο λίπανση, φυτορρυθμιστικές ουσίες, κάποιες εκ των οποίων είχαν χρησιμοποιηθεί και *in vitro*, σε *in vivo* συνθήκες ως προς τη διατήρηση ή την πρόκληση του φαινομένου της δεσμίωσης. Αξιοπρόσεκτο ήταν το γεγονός ότι κανονικός βλαστός που παράχθηκε *in vitro* από καλλιέργεια δεσμωμένης *E. lactea*, όταν καλλιεργήθηκε *ex vitro* για τα πρώτα δύο έτη διατήρησε την κανονική του μορφή αλλά το τρίτο χρόνο έσπασε δημιουργώντας ένα δεσμωμένο κορυφαίο μερίστωμα.

Στοχεύοντας στην ανάλυση του φαινομένου της δεσμίωσης και συγκεκριμένα πως το σημειακό μερίστωμα καταλήγει σε γραμμικό (και το αντίστροφο) εξετάστηκε το φαινόμενο της δεσμίωσης ως ένα επιγενετικό φαινόμενο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, που αναφέρεται εκτενέστερα στις επόμενες παραγράφους, δυο τέτοια επιγενετικά φαινόμενα είναι η μεθυλίωση και τα ρετρομεταθετά στοιχεία. Και τα δυο φαινόμενα επιδρούν στην έκφραση – σίγαση γονιδίων κάτω από καταπόνηση.

Σκοπός των πειραμάτων του κεφαλαίου ήταν ο έλεγχος της μεθυλίωσης με τη μέθοδο της πέψης ζεύγους περιοριστικών ενζύμων και της τυχαίας ενίσχυσης γονιδιωματικού DNA (CRED-RA), καθώς και με τη χρήση της χημικής ουσίας 5-Azacytidine, η οποία προκαλεί απομεθυλίωση, κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”. Τέλος, όσον αφορά τα ρετρομεταθετά στοιχεία έγινε μελέτη της έκφρασής τους στο γονιδίωμα (Σχ. 69).



Σχ. 69. Σχηματική απεικόνιση της διερεύνησης της δεσμίωσης ως ένα επιγενετικό φαινόμενο.

4.1.1 Μεθυλίωση – Ορισμός

Η μεθυλίωση είναι ένας επιγενετικός μηχανισμός των βάσεων της κυτοσίνης του DNA. Τυπικά, αυτή η διαδικασία στα φυτά αφορά τη μεθυλίωση της βάσης της κυτοσίνης στο δινουκλεοτίδιο CpG και στο τρινουκλεοτίδιο CpNpG (όπου N μπορεί να είναι οποιαδήποτε από τις 4 νουκλεοτιδικές βάσεις). Και οι δύο έλικες του DNA μπορούν να μεθυλιωθούν, επειδή η μεθυλιωμένη ακολουθία είναι παλινδρομική. Η διαδικασία αυτή είναι επιγενετικά κληρονομούμενη εξαιτίας της ύπαρξης ενός συστήματος το οποίο αναγνωρίζει ημιμεθυλιωμένες ακολουθίες (με έναν έλικα μεθυλιωμένο), που τις μετατρέπει σε πλήρη μεθυλιωμένη κατάσταση (και τις 2 έλικες μεθυλιωμένες). Η επιγενετική αυτή κατάσταση μπορεί να επανέλθει (να αναστραφεί), όταν απομακρυνθεί η ομάδα του μεθυλίου.

Η μεθυλίωση είναι ένα παράδοξο της συμβατικής γενετικής, μιας και δύο αλληλόμορφοι (που έχουν την ίδια γενετική αλληλουχία) μπορούν να παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα κληρονομικότητας. Μια μεθυλιωμένη αλληλουχία συνήθως δεν εκφράζεται, ενώ η ίδια αλληλουχία εκφράζεται όταν είναι απομεθυλιωμένη. Αυτό πολλές φορές οδηγεί σε επιγενετική παραλλακτικότητα που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της οντογένεσης (Tsaftaris and Polidiros, 2000).

4.1.2 Η μεθυλίωση στα φυτά

4.1.2.1 Εμφάνιση

Στα περισσότερα σπονδυλωτά λιγότερο από 10% όλων των βάσεων της κυτοσίνης είναι μεθυλιωμένες, ενώ στα φυτά έχουμε έως και 30% των βάσεων της 5 Μέθυλο – κυτοσίνης (5mC) (Vanyushin *et al.*, 1970). Το υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης στα φυτά ενισχύει το γεγονός ότι η μεθυλιωμένη βάση βρίσκεται και στο τρινουκλεοτίδιο CpNpG (Gruenbaum *et al.*, 1981). Η 5 Μέθυλο – κυτοσίνη έχει επίσης βρεθεί σε μη συμμετρική αλληλουχία στα γενετικά τροποποιημένα διαγονιδιακά φυτά (Meyer *et al.*, 1994), αλλά δεν υπάρχει απόδειξη ότι στα φυτά υπάρχει η N-4 μέθυλο κυτοσίνη, η οποία έχει βρεθεί σε μερικούς προκαρυωτικούς οργανισμούς (Pradham and Adams, 1995).

Ωστόσο, και τα δυο συστήματα μεθυλίωσης βρίσκονται σε πολλά ανώτερα είδη φυτών, ενώ τα κατώτερα φυτικά είδη εμφανίζουν μόνο τη CpNpG μεθυλίωση (και αυτή σε μικρά ποσοστά). Οι αναφορές υποστηρίζουν ότι τα δυο συστήματα μπορεί να εμφανίζονται ταυτόχρονα και ότι η εξειδίκευση εμπλέκεται στο χάσιμο του ενός ή του άλλου συστήματος μεθυλίωσης ή εμπλέκεται κατά τη διάρκεια ενός συγκεκριμένου σταδίου της διαφοροποίησης. Έτσι η μεθυλιωμένη CpNpG αλληλουχία βρέθηκε μόνο στα φυτά (Belanger and Herburn, 1990).

Επίσης, το υψηλό ποσοστό μεθυλιωμένης κυτοσίνης στα φυτά σε σύγκριση με τα ζώα, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το γονιδίωμα των αγγειόσπερμων περιέχει υψηλό ποσοστό CpG διουκλεοτιδίων, την πιο κοινή αναγνωρίσιμη αλληλουχία για μεθυλιωμένο DNA στα φυτά και στα ζώα. Το μεγαλύτερο ποσοστό CpG διουκλεοτιδίων στα φυτά είναι πιθανόν να οφείλεται σε διαφορετικό βαθμό ξεπλύματος της νησίδας CpG. Σύμφωνα με τη θεωρία της απαμίνωσης (deamination), η μεθυλιωμένη κυτοσίνη μπορεί να μετατραπεί μέσω της απαμίνωσης σε θυμίνη (T), η οποία οδηγεί σε σημειακή μετάλλαξη και τη μείωση των CpG διουκλεοτιδίων, που οδηγούν σε αύξηση των TpG και CpA διουκλεοτιδίων (Coulondre *et al.*, 1978). Τα μειωμένα επίπεδα (CpG διουκλεοτιδίων) στα ζώα ποικίλουν ανάμεσα στο 0.15% και 0.35% (Josse *et al.*, 1961, Russel *et al.*, 1976), ενώ στα γονιδιώματα των δικότυλων και μονοκότυλων ποικίλουν μεταξύ 0.68% και 0.79% (Gardiner – Gardey *et al.*, 1992).

Ο βαθμός της μεθυλίωσης του DNA ποικίλει ακόμη και στα διάφορα φυτικά είδη (Πιν. 36). Η *Arabidopsis thaliana* περιέχει μόνο 6.3% μεθυλιωμένη κυτοσίνη, ένα τέταρτο του επιπέδου μεθυλίωσης των περισσότερων αγγειόσπερμων (Leutwiler *et al.*, 1984). Αυτή η διαφορά, ωστόσο, δεν αντανακλά μια μειωμένη ικανότητα μεθυλίωσης, αλλά το χαμηλό

ποσοστό του υψηλά μεθυλιωμένου επαναλαμβανόμενου DNA στην Αραβίδοψη (Antequera and Bird, 1993).

Πίν. 36. Ποσοστό G+C και 5mC περιεχόμενα του DNA του πυρήνα από διάφορα φυτικά είδη. Πηγή Tsaftaris and Polidoros (2000).

Είδη	G+C (%)	5mC
		(5mC+G)
Δικότυλα φυτά		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	41.4	4.6
<i>Lycopersicon esculentum</i>	37.7	25.0
<i>Solanum tuberosum</i>	38.0	24.6
<i>Nicotiana tabacum</i>	40.7	27.8
<i>Pisum sativum</i>	41.9	23.2
<i>Solanum alba</i>	39.3	12.2
<i>Vicia faba</i>	39.1	30.5
<i>Gossypium hirsutum</i>	34.2	26.6
<i>Helianthus annuus</i>	37.6	37.2
Μονοκότυλα φυτά		
<i>Zea mays</i>	46.0	26.7
<i>Triticum aestivum</i>	48.0	22.4
<i>Oryza sativa</i>	42.1	18.6

4.1.2.2 Μέθοδοι προσδιορισμού μεθυλίωσης

Μια μη ευαίσθητη μέθοδος προσδιορισμού της μεθυλίωσης είναι η χρήση ισοσχιζομερών ενζύμων, που αναγνωρίζουν και περιορίζουν κοινές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες DNA και διαφέρουν στο περιορισμό μεθυλιωμένης κυτοσίνης (Steele-Scott *et al.*, 1984). Το αποτέλεσμα είναι μια Δικόρυφη κατανομή των περιορισμένων τμημάτων (fragment) που δημιουργούνται από ένζυμα ευαίσθητα στη μεθυλίωση. Το μικρό μοριακό βάρος των κλασμάτων παρουσιάζουν μη μεθυλιωμένες περιοχές (στις οποίες το ένζυμο κόβει), ενώ το μεγάλο μοριακό βάρος ανταποκρίνεται σε μεγάλη έκταση του DNA, το οποίο είναι μεθυλιωμένο (Antequera and Bird, 1993, Messeguer *et al.*, 1991).

Όμως, το πιο συχνά επαναλαμβανόμενο DNA είναι διαρκώς μεθυλιωμένο και βρίσκεται σε όλους τους φυτικούς ιστούς. Γι' αυτό χρειάζονται πιο ακριβείς μέθοδοι για να αναγνωρίσουν αλλαγές μικρής έκτασης της μεθυλίωσης σε μικρό αριθμό αντιγράφων DNA, σε διαφορετικούς ιστούς ή ακόμη και σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυτού. Έτσι, για να μετρηθεί η μεθυλίωση στο DNA, διάφοροι τύποι της Υψηλής Ανάλυσης Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC) και της Φασματοσκοπίας Μάζας (Wagner and Capesius, 1981, Citti *et al.*, 1983, Kubis *et al.*, 2003) έχουν χρησιμοποιηθεί για μικρά μεγέθη (όπως 5-10 μg DNA) (Vilpo *et al.*, 1986) χρησιμοποιώντας ανοσολογικές τεχνικές, δημιουργώντας ειδικά αντισώματα κατά της 5mC. Δυστυχώς όμως, καμία από τις παραπάνω τεχνικές δε μπορεί να παρέχει πληροφορίες γύρω από τη περιοχή των μεθυλιωμένων νουκλεοτιδίων στο γονιδίωμα.

Η Southern blot ανάλυση της πέψης του DNA με τα ισοχιζομερή περιοριστικά ένζυμα είναι μια άλλη μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί, για να προσδιορίσει τη μεθυλίωση στο γονιδίωμα. Αυτή η τεχνική επιτρέπει να αναγνωρίσει τη μεθυλιωμένη κυτοσίνη σε συνεργασία με τα ειδικά (specific) γονίδια ή τις συγκεκριμένες περιοχές όπως σε μια επαναλαμβανόμενη ακολουθία. Ωστόσο, απαιτείται ανιχνευτής (probe), με μειονέκτημα ότι δεν αναγνωρίζει πάντα μεθυλιωμένο DNA ή πολυμορφισμούς, διότι μερικές φορές δε μπορεί να διακρίνει μεταξύ της μεθυλιωμένης κυτοσίνης σε ένα συγκεκριμένο τμήμα και το «χάσιμο» του τμήματος λόγω της νουκλεοτιδικής μετάλλαξης.

Με την ανάπτυξη της τεχνικής της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) όμως, έχουν αναπτυχθεί πρωτότυπες τεχνικές, για να αναγνωρίσουν τη μεθυλίωση και να χαρτογραφήσουν τον μεθυλιωμένο πολυμορφισμό. Μια τέτοια τεχνική βασίζεται πάνω στη πέψη ζευγαριού περιοριστικών ενζύμων και της Τυχαίας Ενύσχισης (Coupled Restriction Enzyme Digestion Random Amplification, CRED-RA) του γονιδιωματικού DNA (Cai *et al.*, 1996). Η αρχή της τεχνικής είναι ότι το μεθυλιωμένο DNA, ανθεκτικό στο κόψιμο με ένζυμο ευαίσθητο στη μεθυλίωση, πολλαπλασιάζεται και παρουσιάζεται σαν πολυμορφική ζώνη. Επειδή αυτό το προϊόν της PCR δεν είναι μεθυλιωμένο, μπορεί να κοπεί με το ίδιο ένζυμο και έτσι χάνεται η ζώνη που είχε παρουσιαστεί επιβεβαιώνοντας ότι η ζώνη αυτή ήταν πολυμορφική. Η τεχνική αυτή ανιχνεύει σημαντικό επίπεδο πολυμορφισμού και είναι αρκετά εύκολη.

Έτσι, μεθυλιωμένο DNA μπορεί να αναγνωριστεί συγκρίνοντας τα κομμένα τμήματα του DNA στα ηλεκτροφορήματα που έχουν διαχωριστεί χωρίς περιοριστικό ένζυμο, με DNA μετά τον περιορισμό και τα προϊόντα του περιορισμένου DNA μετά το διαχωρισμό. Η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί από τους Bedford και VanHelden (1990) για να αναγνωρίσουν αλληλομορφικές διαφορές μεθυλίωσης και από τους Tsafaris *et al.* (1997, 1999) για να

μελετήσουν την ποικιλομορφία στο πρότυπο του μεθυλιωμένου DNA ανάμεσα στις ποικιλίες αραβόσιτου και μεταξύ ποικιλιών αραβόσιτου και υβριδίων από φυτά που μεγάλωναν σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας (καταπόνηση).

Μια άλλη μέθοδος συνδυάζει τη PCR με αλληλούχιση χρησιμοποιώντας μεταχειρίσεις με δισουλφίδιο, για να μετατρέψουν τη κυτοσίνη του DNA σε ουρακίλη. Όλες οι κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλη, εκτός από αυτές οι οποίες είναι μεθυλιωμένες, οι οποίες είναι ανθεκτικές στην μετατροπή και παραμένουν ως μεθυλιωμένη κυτοσίνη (Church and Gilbert, 1984). Κάθε διαφορετικό DNA δείγμα μετά πρέπει να διαχωριστεί, να κλωνοποιηθεί και να αλληλουχηθεί. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι πως πρόκειται για μια σύνθετη εργαστηριακή τεχνική. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μπορεί να εφοδιάσει έναν πλήρη χάρτη των μεθυλιωμένων θέσεων για ένα απλής δομής γονίδιο μερικών χιλιάδων νουκλεοτιδικών βάσεων. Μια πρόσφατη τροποποίηση αυτής της διαδικασίας κρατάει το πλεονέκτημα της μετατροπής της κυτοσίνης σε ουρακίλη μέσω του δισουλφιδίου, ακολουθούμενη από PCR, χρησιμοποιώντας σχεδιασμένους εκκινητές που αναγνωρίζουν (διαχωρίζουν) μεθυλιωμένο από μη μεθυλιωμένο DNA. Το κύριο πλεονέκτημα είναι ότι η μέθοδος αποφεύγει τη χρήση περιοριστικών ενζύμων και σχετικών προβλημάτων που σχετίζονται με ελλιπή πέψη.

Για γρήγορη ανάλυση της μεθυλιωμένης κατάστασης χιλιάδων γονιδίων ταυτόχρονα, πρόσφατα έχει αναπτυχθεί μια νέα δυναμική τεχνική ονομαζόμενη Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) (Hayashizaki and Watanabe, 1997). Η RLGS είναι μια πολύπλοκη μέθοδος, η οποία επιτρέπει ταυτόχρονη ανάλυση πάνω από 13.000 γενετικών τόπων (loci). Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει το *NotI* περιοριστικό ένζυμο, διότι η θέση περιορισμού φτιάχνει καλά ορόσημα (landmarks) για γενετική ανάλυση. Το *NotI* κόβει το GCGGCC5mC και μπλοκάρεται από τη CpG μεθυλίωση (ενώ δεν κόβει στο GCGG5mCCGC ούτε στο GCGGC5mCGC). Η τεχνική χρησιμοποιεί υψηλής ανάλυσης 2-D ηλεκτροφόρηση, για να σχηματίσουν ραδιενεργά DNA τμήματα που παράγονται από τη πέψη περιορισμού (Tsaftaris and Polidoros, 2000).

4.1.2.3 Μηχανισμοί μεθυλίωσης – απομεθυλίωσης

Η κατανομή της μεθυλοκυτοσίνης εντός του γονιδιώματος ποικίλει ανάλογα με τον ιστό ή το στάδιο ανάπτυξης του φυτού (Bernacchia *et al.*, 1998). Το επίπεδο μεθυλίωσης των ώριμων ιστών στην τομάτα ήταν σημαντικά υψηλότερο απ'ότι αυτό σε ανώριμους ιστούς και πρωτοπλάστες (Messegueur *et al.*, 1991). Έτσι, όπως συμβαίνει στα θηλαστικά (Razin and Kafri, 1994), ένας κύκλος της απομεθυλίωσης και της *de novo* μεθυλίωσης εμφανίζεται να λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης του φυτού.

Η λειτουργία των προγραμματισμένων αλλαγών στο πρότυπο της μεθυλίωσης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και διαφοροποίησης περιλαμβάνει διαδικασίες της *de novo* μεθυλίωσης, διατήρηση της μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης. Το ένζυμο κλειδί που περιλαμβάνεται στις δυο πρώτες διαδικασίες είναι η DNA μεθυλοτρανσφεράση (MTases), που καταλύει τη μεταφορά της μεθυλομάδας από τον δότη S-Αδενόσυλο-Μεθειονίνη (S-adenosyl-methionine) στην 5^η θέση της κυτοσίνης εντός συγκεκριμένων ακολουθιών DNA. Το συγκεκριμένο ένζυμο περιέχει 10 διατηρήσιμα αμινοξέα της καταλυτικής περιοχής της MTase (Lauster *et al.*, 1989, Kumar *et al.*, 1994). Αυτές οι ευκαριωτικές MTases διαφέρουν από τις προκαρυωτικές MTases εξαιτίας της παρουσίας μιας μεγάλης N-τελικής περιοχής. Σε αντίθεση με τον προκαρυωτικό τύπο II μεθυλοτρανσφεράσης, η οποία δεν ξεχωρίζει μη μεθυλιωμένα και ημιμεθυλιωμένα τμήματα DNA, οι ευκαρυωτικές MTases προτιμούν καλύτερα υποστρώματα ημιμεθυλιωμένων DNA. Η απομάκρυνση των κατά προσέγγιση 1.000 αμινοξέων της N-τελικής περιοχής με πρωτεολυτικό χάρισμα ενθαρρύνει τη *de novo* δραστηριότητα της murine MTase *in vitro* (Bestor, 1992), υπονοώντας ότι εκτός της διατήρησης της μεθυλίωσης, αυτό το ένζυμο μπορεί να είναι υπεύθυνο για κάποια *in vivo, de novo* μεθυλίωση. Στα θηλαστικά η *de novo* δραστηριότητα της μεθυλίωσης καταλύεται από μια διαφορετική MTase που κωδικοποιείται από άλλο γονίδιο όπως συμβαίνει στο γονίδιο *Dumt* (Lei *et al.*, 1996). Όμως, ένας δεύτερος τύπος MTase, υπεύθυνος για *de novo* μεθυλίωση, έχει αναγνωριστεί στους νηματοειδείς ασκομύκητες, λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής αναπαραγωγής και απαιτεί ζεύγη μεταξύ των ομόλογων επαναλαμβανόμενων DNA ακολουθιών. Αυτή η διαδικασία έχει ονομαστεί «μεθυλίωση προκαλούμενη προμειωτικά» (MIP) (Rhounim *et al.*, 1992) και τα πρότυπα μεθυλίωσης διαιωνίζονται στα διαιρούμενα κύτταρα από μια διαδικασία διατήρησης. Και τα δύο στοιχεία της αντιγραφής είναι μεθυλιωμένα από την MIP και ως αποτέλεσμα τα γονίδια που φέρονται κατά την αντιγραφή είναι σιγασμένα. Παράδειγμα της βιολογικής αντίδρασης κατά την *de novo* μεθυλίωση έχει αναφερθεί με το χαρακτηρισμό ενός γονιδίου (*musk 1*) του *Ascobolus*, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με την αρχική δομή της MTase (Malagnac *et al.*, 1997).

Στα φυτά, οι MTases έχουν απομονωθεί από σπόρο σιταριού (Theiss *et al.*, 1987), βλαστούς μπιζελιού (Yesufu *et al.*, 1991), καλλιεργούμενα κύτταρα ρυζιού (Giordano *et al.*, 1991), αραβίδωσης (Finnegan and Dennis, 1993) και στο καρότο (Bernacchia *et al.*, 1998), με μοριακές μάζες των ενζύμων να κυμαίνονται από 50-55 KDa (σιτάρι και ρύζι) έως 160 KDa ή 200 KDa (μπιζέλι και καρότο αντίστοιχα). Ωστόσο, τα ένζυμα ήταν ασταθή και παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία διατηρούν την ενζυματική δραστηριότητα. Επίσης, δύο διαφορετικά κλάσματα MTase από πυρήνες νεαρών βλαστών μπιζελιού βρέθηκε να είναι

υπεύθυνα για τη διαφορετική εξειδίκευση της μεθυλίωσης (CpG έναντι CpNpG) (Pradhan and Adams, 1995). Στο καρότο βρέθηκε ότι οι MTases κωδικοποιούνται από μια οικογένεια γονιδίων. Αλλά αυτό που ακόμη παραμένει ασαφές είναι εάν οι MTases έχουν εξειδίκευση και για τις δυο CpG και CpNpG μεθυλώσεις ή εάν υπάρχουν στα φυτά διαφορετικά ένζυμα μεθυλοτρανσφεράσης (Tsaftaris and Polidoros, 2000).

Η διαδικασία της απομεθυλίωσης μπορεί να είναι είτε παθητική είτε ενεργητική. Στην πρώτη περίπτωση, δεν απαιτείται εξειδικευμένος μηχανισμός και πρωτεΐνες. Το μεθυλιωμένο DNA και στις δυο έλικες θα είναι ημιμεθυλιωμένο ακριβώς μετά τον πρώτο κύκλο της αντιγραφής. Η μη μεθυλιωμένη αλυσίδα DNA θα χάσει τα σημάδια της μεθυλίωσης (ύπαρξη ομάδων μεθυλίου στην συμπληρωματική αλυσίδα DNA), εάν η ημιμεθυλιωμένη DNA αλυσίδα προχωρεί σε έναν δεύτερο γύρο διπλασιασμού, που προηγείται στην ολοκλήρωση της μεθυλίωσης και των δυο αλυσίδων από τη διατήρηση της μεθυλοτρανσφεράσης. Έτσι, στην ενεργή διαίρεση κυττάρων (κορυφαίο μερίστωμα, κύτταρα σε κυτταροκαλλιέργεια ή κάλο), εάν η διατήρηση της MTase ξεμείνει πίσω στον ρυθμό αντιγραφής DNA για διαφορετικούς λόγους (όπως η διαθεσιμότητα της S-adenosyl-methionine και η παρουσία παρεμποδιστών), προηγούμενα μεθυλιωμένα γονίδια μπορούν κάτω από αυτές τις συνθήκες να γίνουν μη μεθυλιωμένα σε συγκεκριμένα κύτταρα απογόνων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση των σιγασμένων γονιδίων και/ή στην υψηλή τους έκφραση εξαιτίας της μερικής απομεθυλίωσης.

Στην ενεργητική απομεθυλίωση προβλέπεται η συμμετοχή ελεγχόμενων πρωτεϊνών που απομεθυλιώνουν συγκεκριμένη μεθυλιωμένη ακολουθία DNA. Όμως, λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες γι' αυτόν τον μηχανισμό. Μια πρωτεΐνη που ονομάζεται *ThpA*, έχει ταυτοποιηθεί να εμπλέκεται σε αυτόν τον μηχανισμό και κωδικοποιείται από ένα από τα τέσσερα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια του *spm* μεταφερόμενου στοιχείου (transposable elements) στο καλαμπόκι (Schlappi *et al.*, 1993, Fedoroff, 1995). Όπως άλλα μεταφερόμενα στοιχεία στο καλαμπόκι, τα ενεργά *spm* στοιχεία προωθούν την ενεργοποίηση ανενεργών στοιχείων. Η υπεύθυνη πρωτεΐνη για την ενεργοποίηση στοιχείων ταυτοποιήθηκε εισάγοντας καθένα από τα 4 πιθανά στοιχεία της σε γενετικά τροποποιημένα (transgenic) φυτά καπνού με ένα μεθυλιωμένο ανενεργό *spm* στοιχείο. Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες πλευρές της αλληλεπίδρασης της *ThpA* με τον μεθυλιωμένο *spm* υποκινητή (promoter) ήταν η ικανότητα επαγωγής απομεθυλίωσης των ακολουθιών έξω από τα τμήματα πρόσδεσης (binding site), υπονοώντας ότι ο μηχανισμός που επηρεάζει την επαγωγή της απομεθυλίωσης δεν είναι απλός συναγωνισμός με την μεθυλοτρανσφεράση για δέσμευση της αναγνωρίσιμης πλευράς (Raina *et al.*, 1998).

4.1.2.4 Μεθυλίωση και έκφραση γονιδίων

Οι μελέτες σε πολυάριθμα εξειδικευμένα γονίδια έχουν δείξει καθαρή αλληλεπίδραση μεταξύ της κατάστασης μεθυλίωσης των ενεργών και ανενεργών γονιδίων. Έτσι, τα περισσότερα γονίδια είναι υπομεθυλιωμένα (undermethylated) στους ιστούς στους οποίους εκφράζονται, ενώ αυτά που είναι ισχυρά μεθυλιωμένα βρίσκονται σε μη εκφραζόμενους ιστούς (Jost and Saluz, 1993). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι αλλαγές στο πρότυπο της μεθυλίωσης κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης μπορεί να επηρεάζουν τη δραστηριότητα των γονιδίων. Στα φυτά διάφορα ενδογενή γονίδια κατά τη μεταγραφή τους σε συγκεκριμένους ιστούς έχουν συνδεθεί με το χάσιμο της μεθυλιωμένης κυτοσίνης (Spina *et al.*, 1983, Bianchi and Viotti, 1988, Ngernprasirtsini *et al.*, 1989), σχετίζοντάς τα με την υπομεθυλίωση αυτών των γονιδίων, με αποτέλεσμα η μεθυλίωση να εμπλέκεται κύρια στον τρόπο ενεργοποίησης δραστηριοτήτων (Nick *et al.*, 1986, Langdale *et al.*, 1991).

Η *in vitro* μεθυλίωση μερικών εξειδικευμένων γονιδίων παρεμποδίζει την ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων, όταν εισέρχονται σε κύτταρα ζώων *in vivo* (Adams and Burdon, 1985). Στα φυτά οι Weber *et al.* (1990) έδειξαν ότι *in vitro* ημιμεθυλίωση του υποκινητή CaMV 35S παρεμποδίζει την έκφραση των γονιδίων μετά από «επιμόλυνση» πρωτοπλαστών, ενώ η μεθυλιωμένη κατάσταση διατηρήθηκε και κληρονομήθηκε κατά τη διάρκεια της αναγέννησης των φυτών και συσχετίζεται με την παρεμπόδιση της μεταλλαγμένης έκφρασης.

Η απόδειξη στα φυτά ότι η μεθυλίωση παρεμποδίζει την έκφραση των γονιδίων προέρχεται από τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων μέσω των μεταφερόμενων στοιχείων (Spm). Τα μεταφερόμενα στοιχεία των φυτών (τα οποία μπορεί να θεωρηθούν, κατά κάποιο τρόπο, ειδικές περιπτώσεις μεταλλαγμένων) ήταν γνωστό για πολλά χρόνια. Η αρχική δουλειά της Barbara McClintock (McClintock, 1957, 1958) και του Peter Peterson (Peterson, 1965, 1986) με τον αραβόσιτο αποκαλύπτουν ότι τα μεταφερόμενα στοιχεία υφίστανται κληρονομήσιμη επανεργοποίηση και είτε περιστρέφονται μεταξύ ανενεργών και ενεργών φάσεων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είτε πρόκειται για ένα απενεργοποιημένο γεγονός μεγαλύτερης διάρκειας και επαρκούς σταθερότητας που είναι κληρονομήσιμο, αλλά το οποίο δεν είναι περιστασιακά αναστρέψιμο (McClintock, 1957, 1958). Σε επόμενες μελέτες, η McClintock ανέπτυξε τους τρόπους με τους οποίους το Spm στοιχείο εναλλάσσεται μεταξύ ενεργών και ανενεργών φάσεων (McClintock, 1959).

Έτσι, σε κάποιες περιπτώσεις το στοιχείο εναλλάσσεται ανάμεσα σε ενεργές και ανενεργές φάσεις συχνά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών, δίνοντας ένα φυτό το οποίο παρουσιάζει ένα καλό μωσαϊκό για την έκφραση των στοιχείων (cycling Spm). Άλλα στοιχεία παρουσιάζουν κληρονομικότητα των προτύπων ενεργής και ανενεργής ανάπτυξης

στην οποία το στοιχείο είναι ενεργό σε συγκεκριμένα φυτικά τμήματα ή μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές του ιστού. Ακόμη, άλλα στοιχεία παραμένουν εκτεταμένα ανενεργά κατά την ανάπτυξη, γυρίζοντας στην ενεργή φάση πολύ αργότερα.

Αλλαγές στη μεθυλίωση της κυτοσίνης κατά μήκος του *Spm* στοιχείου έχουν ερευνηθεί χρησιμοποιώντας περιορισμένες ενδονουκλεάσες (Banks *et al.*, 1988, Banks and Fedoroff, 1989) και οδηγούν στην υπόθεση ότι η μεθυλίωση σε μια περιορισμένη περιοχή του γονιδίου (περιοχή UCR) είναι συσχετισμένη με την ενεργότητα του στοιχείου, ενώ αυξάνοντας τη μεθυλίωση σε μια εκτεταμένη περιοχή του γονιδίου (περιοχή DCR) συσχετίζονται με την προοδευτική αύξηση στην κληρονομικότητα της ανενεργής κατάστασης. Αυτό το φαινόμενο είναι ιδιαίτερης σημασίας, εάν επαληθεύεται για τη ρύθμιση και κωδικοποίηση τμημάτων άλλων φυτικών γονιδίων (Jacobsen and Meyerowitz, 1997). Η ανάλυση των *Spm* μεταφερόμενων στοιχείων και της λειτουργίας του γονιδίου οδήγησε στην απομόνωση μιας επιγενετικής πρωτεΐνης ενεργοποίησης, της *ThpA*, που αλληλεπιδρά ειδικά με το *Spm* και προωθεί απομεθυλίωση γειτονικών συγκεκριμένων DNA ακολουθιών εκτός των ορίων των περιοχών.

Παρ' όμοια αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί από τη μελέτη του μεταφερόμενου στοιχείου *Ac* στον αραβόσιτο, το οποίο περιστρέφεται ανάμεσα σε ενεργές και ανενεργές φάσεις, κατά τη διάρκεια ανάπτυξης φυτών και πυρήνα (McClintock, 1963). Όπως έδειξε ο Bennetzen (1987), αυτές οι αλλαγές στην φάση συνεργάζονται με την μεθυλίωση. Συγκρίνοντας την ενεργότητα των *Ac* στοιχείων αποκαλύπτεται ότι η ανενεργή *Ac* ακολουθία δεν ήταν ευπαθής στην πέψη ενώ αντίθετα η ενεργή ακολουθία ήταν ευπαθής. Περαιτέρω αναλύσεις με ένζυμα ευαίσθητα στη μεθυλίωση ή μη έδειξαν ότι η ανενεργή *Ac* ακολουθία ήταν μεθυλιωμένη σε αυτές τις περιοχές ενώ η ενεργή ήταν υπομεθυλιωμένη (Chomet *et al.*, 1987). Τα ευρήματα ήταν τα ίδια για το γονίδιο *waxy* των Schwartz and Dennis (1986). Ενώ οι Chandler and Walbot (1986) πήραν παρόμοια αποτελέσματα, συσχετίζοντας τη μεθυλίωση με ανενεργότητα.

Οι μελέτες πάνω στον έλεγχο της ενεργό δράσης των γονιδίων, βάση των μεταφερόμενων στοιχείων, υποστηρίζουν ισχυρά την εμπλοκή της μεθυλίωσης στον έλεγχο των γονιδίων (Fedoroff, 1996, Martienssen, 1996, Yoder *et al.*, 1997, Bestor, 1998). Κάθε μεταγραφή του μεταφερόμενου στοιχείου αφήνει πίσω της μερικά ίχνη νουκλεοτιδίων, μεταλλάσσοντας το ξενιστή DNA στο συγκεκριμένο σημείο. Έτσι, κρατώντας πολυάριθμα στοιχεία σε μια κατάσταση καταστολής θα μπορούσε να είναι προς όφελος του φυτού ξενιστή καθώς και του μεταφερόμενου στοιχείου (Fedoroff, 1996). Αλλά, όπως σημειώθηκε από τον Bird (1997), εάν η μεθυλίωση ρυθμίζει την εξάπλωση των στοιχείων αυτών, τότε έχει

μοναδική αποτυχία, καθώς μεγάλες απομονώσεις των μεταφερόμενων στοιχείων (transposons) έχουν εμφανιστεί στην εξέλιξη των σπονδυλωτών και φυτών, τόσο καλά όσο στα έντομα όπως στη *Drosophila* η οποία δεν έχει μεθυσίωση. Ο Bird έχει αναφέρει την αντίληψη ότι ο αρχικός ρόλος της μεθυσίωσης είναι η αποτροπή επέκτασης της γονιδιωματικής μεταγραφικής διεύρυνσης πολλών γονιδίων συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής των μεταφερόμενων στοιχείων, και με αυτόν τον τρόπο να περιορίσουν το υπόβαθρο του μεταγραφικού θορύβου (transcriptional noise). Ο Martienssen (1998) επικεντρώνοντας στη σπουδαιότητα της μεθυσίωσης στη φυτική ρύθμιση γονιδίων, παρουσίασε την άποψη ότι ένας τρόπος για να μειώσει τα μεταλλαξιογόνα αποτελέσματα της μετακίνησης των μεταφερόμενων στοιχείων στα γονίδια, είναι η δυνατότητα που έχουν να «πηδάνε» κατά προτίμηση σε άλλες θέσεις ή σε περιοχές ενός γονιδίου όπου η εισαγωγή τους δε μπορεί να είναι τόσο επιζήμια (π.χ. introns, μη μεταφραζόμενες περιοχές κ.α.). Πρόσφατα δεδομένα πάνω στη βιολογία των μεταφερόμενων στοιχείων υποστηρίζουν αυτήν την πρόταση (Kidwell and Lisch, 1998, Waugh O'Neill *et al.*, 1998).

Τέλος, ισχυρή απόδειξη για το ρόλο της μεθυσίωσης στην έκφραση των τροποποιημένων φυτικά γονιδίων έχει αποκτηθεί και από τις μελέτες των μεταλλαγμένων φυτών (Flavell, 1994, Jorgensen, 1995, Matzke and Matzke, 1995).

4.1.2.5 Η μεθυσίωση ως παράγοντας γενετικής, επιγενετικής και σωμακλωνικής παραλλακτικότητας

Στα βελτιωτικά προγράμματα του παρελθόντος η βάση της επιλογή βασιζόταν πάνω στη γενετική παραλλακτικότητα που προέκυπτε από αλληλομορφικούς και επιστατικούς συνδυασμούς (που οφείλονταν στην τροποποίηση της αρχικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των αντίστοιχων γονιδίων), καθώς και σε σπάνιες ή προκαλούμενες τυχαίες μεταλλάξεις με το ανακάτεμά τους μέσω της μείωσης και της γονιμοποίησης. Σήμερα, η μεθυσίωση, μπορεί να παράγει επιγενετική παραλλακτικότητα η οποία δεν είχε μελετηθεί στη βελτίωση των φυτών ως μια επιπλέον πηγή φαινοτυπικής παραλλακτικότητας. Όπως αναφέρουν οι Jablonka and Lamb (1995), αυτή η κληρονομήσιμη επιγενετική παραλλακτικότητα παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών και κατά συνέπεια στη βελτίωση των φυτών. Ένα τέτοιο παράδειγμα, είναι τα διαγονιδιακά φυτά που καλλιεργούνται για ένα ειδικό χαρακτηριστικό μπορεί να χάσουν τον ειδικό φαινότυπο όταν το κλωνοποιημένο DNA έχει επιγενετικά σιγάσει λόγω μεθυσίωσης. Έτσι, ο πολυμορφισμός στη μεθυσίωση οφείλεται σε *de novo* μεθυσίωση των συγκεκριμένων τόπων που μπορούν να οδηγήσουν σε τροποποιημένη

έκφραση στις κληρονομούμενες ποικιλίες. Επιπλέον, οι αλλαγές στην διαγονιδιακή μεθυλίωση έχουν δείξει να επιβάλλονται από περιβαλλοντικές συνθήκες.

Επιπρόσθετη απόδειξη ότι οι επιγενετικές αλλαγές στην δράση του γονιδίου μπορούν να οδηγήσουν σε παραλλακτικότητα προέρχεται από το φαινόμενο των αποτυπωμάτων των γονέων (Surami, 1998, Martienssen and Richards, 1995), αλλά εμφανίζεται περισσότερο σπάνια στα φυτά (Lin, 1975, 1982, 1984, Heslop-Harrison and Bennet, 1990). Η καλλίτερη τεκμηριωμένη περίπτωση είναι στον αραβόσιτο ένα γονίδιο ή γονίδια που ελέγχουν την ανάπτυξη του ενδοσπερμίου στον πυρήνα και τοποθετείται στο μεγάλο άκρο (long arm) του 10^{ου} χρωμοσώματος (Lin, 1975, 1982, 1984).

Ο πολυμορφισμός της μεθυλίωσης είναι εκτεταμένος όχι μόνο ανάμεσα στα είδη αλλά ανάμεσα στους γονότυπους του ίδιου είδους, σε άτομα που ανήκουν στον ίδιο γονότυπο, σε διαφορετικά όργανα και ιστούς ενός ατόμου και ακόμη ανάμεσα σε μιτωτικά προερχόμενα από σωματικά κύτταρα του ίδιου ιστού. Αυτός ο πολυμορφισμός στο μεθυλιωμένο DNA επηρεάζεται από την έκφραση των γονιδίων και επομένως συνεργάζεται με την φαινοτυπική παραλλακτικότητα. Έχει δειχθεί ότι η επιγενετική παραλλακτικότητα δεν είναι μιτωτικά σταθερή αλλά μπορεί να επιμένει διαμέσου της μείωσης στην επόμενη γενιά (μιμητική γενετική παραλλακτικότητα) (Jablonka and Lamb, 1995, Klar, 1998). Αυτή η κατάσταση ανακλάται στην ονομαζόμενη σωμακλωνική παραλλακτικότητα, μέσω μη σεξουαλικού πολλαπλασιασμού μιας φυτικής *in vitro* γενιάς από σωματικά κύτταρα (Buss, 1987).

Η μεθυλίωση, εκτός του να είναι η αιτία επιγενετικής, είναι επίσης αιτία γενετικής παραλλακτικότητας οφειλόμενη στο ρόλο της γένεσης νέων μεταλλάξεων. Οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες είναι “hot spots” για μετάλλαξη, υπό την προϋπόθεση μιας διασύνδεσης μεταξύ επιγενετικής και γενετικής παραλλακτικότητας (Coulondre *et al.*, 1978, Jones *et al.*, 1992). Η απαμίνωση της 5mC θεωρείται να είναι ένα τυχαίο εμφανιζόμενο γεγονός, αλλά με βαθύτερη εξέταση του φαινομένου αποκαλύπτεται διαφορετικά. Στην *Neurospora*, για παράδειγμα, έχει βρεθεί ένα φαινόμενο, ονομαζόμενο RIP (Repeat Induced Point mutation), που αναφέρεται σε μια διαδικασία όπου ακολουθίες με C-G μεταγράφονται σε A-T κατά τη διάρκεια του σεξουαλικού κύκλου αναπαραγωγής του μύκητα, επισπεύδοντας τη *de novo* μεθυλίωση της κυτοσίνης (Selker, 1997). Η RIP επισπεύδει το ρυθμό μετάλλαξης, εξηγώντας την υψηλή συχνότητα της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας μέσω της RIP διαδικασίας κατά τη διάρκεια της καταπόνησης κατά την ιστοκαλλιέργεια (Phillips *et al.*, 1994). Έχει υπάρξει αρκετή συζήτηση, γύρω από το εάν η RIP ή μια παρόμοια διαδικασία λειτουργεί στα σπονδυλωτά (Krickler *et al.*, 1992) ή τα φυτά (Matzke *et al.*, 1994).

Η μεθυλίωση επιδρά στη σωμακλωνική παραλλακτικότητα που αποδίδεται στην επαγόμενη ιστοκαλλιέργεια (KucKuck *et al.*, 1991, Phillips *et al.*, 1994). Η πρώτη απόδειξη περιλαμβάνει τη μεθυλίωση που προέρχεται από μελέτες των αναγεννημένων φυτών από όγκους (crown gall tumor), όπου οι αλλαγές στη μεθυλίωση αποτυπώνονται με φαινοτυπική παραλλακτικότητα (John and Amasino, 1989), μέσω της απομεθυλίωσης, άρα ενεργοποίηση του σιγασμένου στοιχείου Ac λόγω ιστοκαλλιέργειας (Brettel and Dennis, 1991, Peschke *et al.*, 1991). Αλλά η πιο ακαταμάχητη απόδειξη δείχνει ότι ένα σημαντικό ποσοστό σωμακλωνικής παραλλακτικότητας μπορεί να οφείλεται στην ανομοιογένεια, προϋπάρχουσα επιγενετική κατάσταση η οποία είναι μιτωτικά και μειωτικά σταθερή στα αναγεννημένα φυτά από ξεχωριστά σωματικά κύτταρα η οποία παράχθηκε από τους Neuhuber *et al.* (1994).

4.1.3 Η επίδραση της 5-Azacytidine στη μεθυλίωση

4.1.3.1 Εισαγωγή

Πολλά επιγενετικά φαινόμενα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς έχουν βρεθεί να σχετίζονται με τη μεθυλίωση του DNA. Η έκφραση ή η σίγαση γονιδίων μπορεί να οφείλεται στη μεθυλίωση ή στην απομεθυλίωση ενός γονιδίου. Ένας παράγοντας απομεθυλίωσης είναι η ουσία 5-Azacytidine (5-Azct). Πρόκειται για ένα ανάλογο της κυτοσίνης που συνεργάζεται με το DNA και πιθανά δένει την ύπαρξη της μεθυλάσης με έναν μη αναστρέψιμο τρόπο. Η χρήση της στην πρώτη γενιά δημιουργεί ημιμεθυλίωση, ενώ παρατηρείται τροποποίηση στην διπλή έλικα του DNA στην επόμενη διαίρεση. Η χρήση της 5-Azct σε φυτικά και ζωικά κύτταρα προκαλεί μείωση της μεθυλιωμένης κυτοσίνης στο DNA (Jones, 1984, 1985).

Οι Razin και Cedar (1991) υποθέτουν ότι η 5-Azacytidine δουλεύει σε μερικές διακριτές θέσεις, ίσως σε έναν μικρό αριθμό κύριων γονιδίων, τα οποία επιδρούν έμμεσα στην ανάπτυξη με το να ενεργοποιούν άλλα ειδικά γονίδια με έναν διαδοχικό τρόπο. Τα αποτελέσματα της χρήσης της 5-Azct σε ιστούς μπορεί να εξηγηθούν με την απομάκρυνση της «τεχνητής» μεθυλίωσης από τα γονίδια όπου η έκφρασή τους πυροδοτεί την διαφοροποίηση (Bird, 1992). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το γονίδιο *MyoD1* το οποίο έχει βρεθεί να έχει ένα CpG «νησί» το οποίο είναι μεθυλιωμένο στα 10T1/2 κύτταρα αλλά απομεθυλιώνεται κατά τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων μέσα στον μυ κάτω από την επίδραση της 5-Azct (Jones *et al.*, 1990). Δεν υπάρχουν αποδείξεις όμως, όπου η 5-Azct μπορεί απευθείας να ενεργοποιήσει ένα φυσικώς μεθυλιωμένο CpG «νησί» (Bird, 1992, Weih *et al.*, 1991).

Οι Shikari *et al.* (1998) χρησιμοποίησαν την 5-Azct σε υδατικό διάλυμα (0.3 mM) για την εμφάνιση σπόρων ρυζιού για τρεις ημέρες πριν την βλάστησή τους. Η εμφάνιση αυτή

αύξησε το ποσοστό των χίμαιρα φυτών και οδήγησε σε αρχική μελέτη του μηχανισμού ελέγχου των χίμαιρα φυτών.

Η μεταχείριση με 5-Azct προκαλεί αναπτυξιακές αλλαγές σε διάφορα είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένου του ρυζιού (Sano *et al.*, 1990), του Triticale (Heslop-Harrison and Bennett, 1990), του λιναριού (Fields, 1994) και του καπνού (Vyskot *et al.*, 1995).

4.1.3.2 Ο ρόλος της 5-Azacytidine κατά την *in vitro* καλλιέργεια

Η χρήση της 5-Azct στην ιστοκαλλιέργεια δεν είναι νέα ανακάλυψη. Πολλά αναγεννημένα φυτά που προέκυπταν μετά από αναγέννηση δεν έμοιαζαν με το μητρικό φυτό. Αυτό αρχικά αποδίδονταν στη λεγόμενη σωμακλωνική παραλλακτικότητα, ενώ σήμερα τα περισσότερα από αυτά αποδίδονται σε επιγενετικά φαινόμενα όπως η μεθυλίωση.

Επεμβάσεις με την 5-Azct σε φυτικά και ζωϊκά κύτταρα είχαν ως αποτέλεσμα την απομεθυλίωση του DNA, άμεσα με την συνεργασία του ανάλογου στη θέση της κυτοσίνης κατά τη διάρκεια του αναδιπλασιασμού του DNA (Jones, 1984, 1985), και με έμμεσο τρόπο με την παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου της μεθυλοτρανσφεράσης (Bouchard and Momparler, 1983). Απομεθυλίωση του DNA από την 5-Azct έχει συσχετιστεί με τη μεταγραφή ενός αριθμού γονιδίων στα φυτά και τα ζώα (Jones *et al.*, 1990, Langridge and Griffing, 1959).

Οι Durante *et al.* (2005) για να εξηγήσουν το φαινόμενο του «habituation», πρόσθεσαν την 5-Azct στο υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας του υβριδίου *Nicotiana glauca* X *N. langsdorffii* με σκοπό να επάγουν τον συνηθισμένο φαινότυπο. Οι αλληλουχίες του επαναλαμβανόμενου DNA έδειξαν ένα σημαντικό χαμηλό επίπεδο ενδογενούς μεθυλίωσης στα κύτταρα που δέχθηκαν την επέμβαση σε σχέση με τον μάρτυρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ήταν αδύνατον να προκαλέσουν το φαινόμενο αυτό στα αναγεννημένα φυτά με τις συμβατικές μεθόδους (διάφορες άλλες χημικές ουσίες). Οι επεμβάσεις με την 5-Azct ήταν αποτελεσματικές μόνον μέσα στις πρώτες 5 ημέρες της υποκαλλιέργειας, όπου κυτολογικές και βιοχημικές παρατηρήσεις έδειξαν πολλαπλασιασμό DNA, που συμβαίνει αυτήν την περίοδο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η απομεθυλίωση μπορεί να δρα ως ένας διακόπτης που εξαρτάται από τις ορμόνες σε αυτόνομο πολλαπλασιασμό με την ενεργοποίηση κωδικοποιημένων γονιδίων που ελέγχουν τη σύνθεση των παραγόντων ανάπτυξης.

Ο ρόλος της δράσης της 5-Azct στην ιστοκαλλιέργεια ήταν άγνωστος, έτσι, οι Brown *et al.* (1989) προσπάθησαν να δουν αν τη χρησιμοποιήσουν σε υπόστρωμα *in vitro* σε καλλιέργεια πρωτοπλαστών, κάλου και βλαστών θα παρατηρούσαν απομεθυλίωση. Το πρώτο σημαντικό αποτέλεσμα ήταν ότι η προσθήκη στο υπόστρωμα πάνω από 25 μ M οδηγούσε στο

θάνατο των αποικιών του καπνού. Το «κλειδί» για αυτή την παρεμπόδιση στην ανάπτυξη μπορεί να είναι ότι ενεργοποιούνται γονίδια από την 5-Azct που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη. Σε πειράματα με σπόρο αραβόσιτου βρέθηκε ότι υψηλή συγκέντρωση της 5-Azct οδήγησε σε ανώμαλη μορφολογία φύλλου.

Η 5-Azct προκάλεσε μεταχρωματισμό σε κίτρινα κύτταρα του *Beta vulgaris* που καλλιεργήθηκαν *in vitro*. Οι Girod and Zryd (1991) παρατήρησαν ότι η προσθήκη της 5-Azct στο υπόστρωμα οδήγησε σε αλλαγή του φαινοτύπου των κυττάρων (κόκκινα κύτταρα).

Στα πειράματα εαρινοποίησης των Burn *et al.* (1993) με διάφορους οικότυπους της *Arabidopsis thaliana* που ανθίζουν όψιμα, παρατηρήθηκε ότι η χρήση της 5-Azct στο υπόστρωμα καλλιέργειας προκάλεσε προώθηση της άνθησης και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η προώθηση της άνθησης με την παραπάνω ουσία είναι ένα επιγενετικό φαινόμενο. Βασιζόμενοι στο ότι η εαρινοποίηση μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση γιββερελλικού οξέος (GA) και δεδομένου ότι, στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης του GA, ένζυμο μετατρέπει το kaurenoic acid σε 7β-OH kaurenoic acid με τις χαμηλές θερμοκρασίες, οι Burn *et al.* (1993) υποθέτουν ότι, όταν γίνεται χρήση της 5-Azct, το ένζυμο αυτό ελέγχεται από συγκεκριμένο γονίδιο (kaurenoic acid hydroxylase) που απενεργοποιείται από τη μεθυλίωση. Η εαρινοποίηση ή η χρήση της 5-Azct απομακρύνει τις μεθυλοομάδες, απομεθυλιώνει και έχουμε προαγωγή της άνθησης.

4.1.4 Ρετρομεταθετά στοιχεία

4.1.4.1 Εισαγωγή

Το γονιδίωμα των ανώτερων φυτών αποτελείται σε ένα μεγάλο ποσοστό από επαναλαμβανόμενες ακολουθίες DNA, οργανωμένες είτε σε σειρά ή κατά διάσπαρτο τρόπο, που ποικίλλουν σε μήκος από δύο έως και μερικές χιλιάδες βάσεις και αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό κλάσμα στα φυτικά γονιδιώματα από 40% (σε είδη με μικρό γονιδίωμα *Arabidopsis thaliana*, αγριοκαστανιά) έως και πάνω από 90% (σε είδη όπως το σιτάρι ή το πεύκο).

Οι περισσότερες διάσπαρτες ακολουθίες είναι μεταθετά γενετικά στοιχεία που μπορούν να μετακινούνται και να πολλαπλασιάζονται με τη μορφή DNA ή ενός ενδιάμεσου μορίου RNA. Τα δεύτερα είναι γνωστά ως ρετρομεταθετά στοιχεία και είναι η πιο διαδεδομένη τάξη ευκαρυωτικών γενετικών στοιχείων. Στο φυτικό βασίλειο απαντώνται ως ετερογενείς πληθυσμοί σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων, ενώ ο τρόπος αντιγραφής τους αυξάνει τόσο τον αριθμό τους όσο και το μέγεθος του γονιδιώματος του ξενιστή τους. Η ικανότητα τους για μετάθεση και ενσωμάτωση επιφέρει αλλαγή στη λειτουργία των γονιδίων και τη δομή των

γονιδιωμάτων, προκαλώντας συχνά μεταλλάξεις (Brandes *et al.*, 1997, Griffiths *et al.*, 1997, Heslop-Harrison *et al.*, 1997, Kumar and Bennetzen, 1999, Kumar *et al.*, 1997).

4.1.4.2 Κατηγορίες και δομή των ρετρομεταθετών στοιχείων

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι επαναλαμβανόμενων ακολουθιών στα άκρα τους (Long Terminal Repeats - LTRs). Τα LTR ρετρομεταθετά στοιχεία περιλαμβάνουν την ομάδα των *Ty1-copia* και την ομάδα των *Ty3-gypsy* που διαφέρουν μεταξύ τους στη σειρά των γονιδίων για τα προϊόντα που κωδικοποιούν. Ονομάστηκαν έτσι από τα χαρακτηρισμένα στοιχεία που έχουν βρεθεί και μελετηθεί στον *Saccharomyces cerevisiae* (*Ty1*, *Ty3*) και στη *Drosophila melanogaster* (*copia*, *gypsy*). Στα ρετρομεταθετά στοιχεία που στερούνται LTRs ανήκουν τα Long Interspersed Nuclear Elements (LINEs) και τα Short Interspersed Nuclear Elements (SINEs) (Brandes *et al.*, 1997, Flavel *et al.*, 1997, Kumar and Bennetzen, 1999).

α) *Ty1-copia* ρετρομεταθετά στοιχεία

Η ομάδα των *Ty1-copia* ρετρομεταθετών στοιχείων βρίσκεται στα γονιδιώματα όλων των φυτικών ειδών, από μονοκύτταρα φύκη και βρυόφυτα έως γυμνόσπερμα και αγγειόσπερμα, με αριθμό αντιγράφων που κυμαίνεται από ορισμένες εκατοντάδες έως κάποια εκατομμύρια για φυτά με μεγάλο γονιδίωμα (Kumar and Bennetzen, 1999, Kumar *et al.*, 1997, Voytas *et al.*, 1992). Το μήκος τους μπορεί να φθάσει τα 15 kb. Στο Σχ. 70 περιγράφονται τα γενικά χαρακτηριστικά της δομής τους που περιλαμβάνει ακολουθίες LTR στα άκρα που ποικίλλουν σε μέγεθος (από 100 bp έως πάνω από 5 kb) και περιέχουν τις ακολουθίες U3 (unique 3'-RNA), R (repeated RNA) και U5 (unique 5'-RNA) που σηματοδοτούν την έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II, τον τερματισμό της και την έναρξη της αναστροφής μεταγραφής (Kumar and Bennetzen, 1999, Lucas *et al.*, 1992, Manninen and Schulman, 1993). Έχουν μια περιοχή πρόσδεσης του εκκινήτη (Primer Binding Site - PBS) αμέσως μετά το 3' άκρο του 5'-LTR (Kumar and Bennetzen, 1999, Manninen and Schulman, 1993) και μια εσωτερική περιοχή κωδικοποίησης που περιλαμβάνει τα γονίδια *gag* και *pol* (Kumar and Bennetzen, 1999, Murphy *et al.*, 1992).

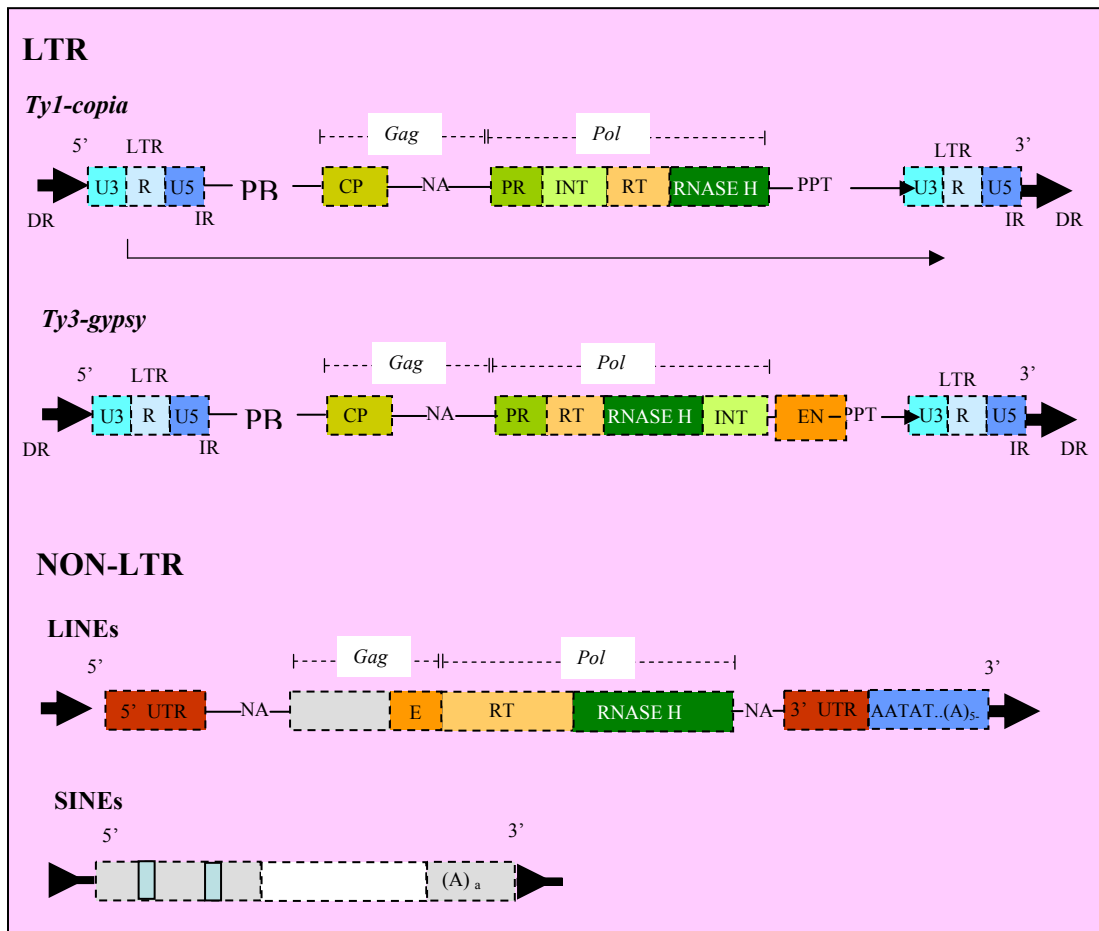
Το γονίδιο *gag* κωδικοποιεί καψιδιακές πρωτεΐνες (CP) που εμπλέκονται στην ωρίμανση και τη συσκευασία του RNA μορίου και των πρωτεϊνών σε μια μορφή κατάλληλη για ενσωμάτωση στο γονιδίωμα. Τέτοιες δομές (VLPs, virus-like proteins) δεν έχουν βρεθεί σε φυτά, σε αντίθεση με τη δροσόφιλα και τον σακχαρομύκητα (Kumar and Bennetzen, 1999, Manninen and Schulman, 1993).

Το γονίδιο *pol* περιλαμβάνει τα γονίδια *PR*, *INT*, *RT* και *RNAaseH*. Για την πρωτεολυτική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης που σχηματίζεται κατά τη μετάφραση του ενιαίου μορίου mRNA του ρετρομεταθετού στοιχείου στις διάφορες λειτουργικές μονάδες, είναι απαραίτητο το προϊόν του γονιδίου *PR*, μια ασπαρτική πρωτεάση.

Για την ενσωμάτωση του ρετρομεταθετού στοιχείου με τη μορφή δίκλωνου DNA σε νέα θέση στο χρωματόσωμα είναι υπεύθυνο το προϊόν του γονιδίου *INT* (μια ενσωματάση). Το ένζυμο αυτό κόβει τόσο το ρετρομεταθετό στοιχείο όσο και την περιοχή-στόχο σε κολλώδη άκρα των 3-5 βάσεων. Για την αντιγραφή/μετάθεση του στοιχείου υπεύθυνες είναι οι δράσεις της ανάστροφης μεταγραφάσης (*RT*) και της ριβονουκλεάσης-*H* (*RNaseH*), που η τελευταία καταστρέφει εκλεκτικά το μόριο του RNA στο υβρίδιο DNA:RNA, ελευθερώνοντας έτσι μια μονόκλωνη περιοχή DNA με ομολογία προς την R ακολουθία του 3'-LTR στο mRNA του στοιχείου ενώ η *RT* σε πολλά φυτικά είδη και ιούς υπάρχει σε μια αρκετά συντηρημένη περιοχή ~300 βάσεων, η οποία περιέχει τα μοτίβα TAFLxG και YVDDxx στα άκρα της (Kumar and Bennetzen, 1999, Manninen and Schulman, 1993, Murphy *et al.*, 1992).

β) Ty3-gypsy ρετρομεταθετά στοιχεία

Τα Ty3-gypsy ρετρομεταθετά στοιχεία είναι επίσης διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο συμπεριλαμβανομένων των γυμνοσπέρμων και των αγγειοσπέρμων, σε έναν αριθμό αντιγράφων ανάλογο με αυτό των Ty1-copia στοιχείων. Αν και κωδικοποιούν τις ίδιες πρωτεΐνες με τα Ty1-copia στοιχεία, παρουσιάζουν διαφορά στη θέση του γονιδίου της *INT* και στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της *RT*. Επιπλέον στη δομή τους ανήκει το γονίδιο ENV που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη για την παραγωγή φακέλου, λειτουργία απαραίτητη για τη συσκευασία των ιών σε σωματίδια και την δυνατότητα επιμόλυνσης κυττάρων (Σχ. 70). Πιθανολογείται ότι τα στοιχεία αυτά είναι πρόγονοι των ζωϊκών ρετροϊών (Chavanne *et al.*, 1998, Kumar, 1996, Kumar and Bennetzen, 1999, Wright and Voytas, 1998).



Σχ. 70. Γενικά χαρακτηριστικά των δομών των *Ty1-copia*, *Ty3-gypsy*, LINEs και SINEs ρετρομεταθετών στοιχείων. LTR (long terminal repeats) επαναλαμβανόμενες ακολουθίες των άκρων, DR (direct repeats) επαναλήψεις σε ευθύ προσανατολισμό, IR (inverted repeats) ανάστροφες επαναλήψεις, U3 (unique 3'-RNA), R (repeated RNA), U5 (unique 5'-RNA), PBS (primer binding site) περιοχή πρόσδεσης του εκκινητή, PPT (polyurine tract) περιοχή πουρινών, NA (nucleic acid binding) περιοχή πλούσια σε Cys, CP (capsid-like protein) καψιδιακή πρωτεΐνη, PR ασπαρτική πρωτεάση, RT (reverse transcriptase) ανάστροφη μεταγραφή, INT ενσωμάτωση, env (envelope protein) γονίδιο για παραγωγή πρωτεϊνικού φακέλου.

Πρόσφατες μελέτες, ωστόσο, έχουν δείξει την ύπαρξη ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου που αντιστοιχεί στο γονίδιο ENV στο στοιχείο SIRE-1 της σόγιας, ένα στοιχείο που ανήκει στην τάξη των *Ty1-copia*. Η διατήρηση αυτού του χαρακτηριστικού οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κάποια μέλη της οικογένειας αυτής, πέραν των *Ty3-gypsy*, να είναι ενδογενείς ρετροϊοί (Laten, 1999, Laten *et al.*, 1998).

γ) LINES

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία LINES, μήκους 6-7kb, είναι πιο απλά στη δομή τους σε σχέση με τα LTRs και θεωρούνται ως η πιο παλιά τάξη ευκαρυωτικών ρετρομεταθετών στοιχείων. Περιέχουν τα γονίδια *gag* και *pol*, αλλά στερούνται του γονιδίου της ενσωμάτωσης. Αν και στα φυτά έχουν βρεθεί σε αντίγραφα έως και 250.000, λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς αντιγραφής, μεταγραφής και ενσωμάτωσης (Kumar and Bennetzen, 1999, Laten, 1999).

δ) SINEs

Τα στοιχεία αυτά, μεγέθους 100-500 bp, διαφέρουν πολύ από τις υπόλοιπες τάξεις ρετρομεταθετών στοιχείων, μια και δεν κωδικοποιούν προϊόντα για το μηχανισμό της μετάθεσης τους (Σχ. 70). Έχουν προέλθει από προϊόντα δράσης της RNA πολυμεράσης III (π.χ. tRNAs), τα οποία έχουν αποκτήσει τη δυνατότητα να αντιγράφονται και να ενσωματώνονται με τη βοήθεια πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα LINES και/ή τα LTR ρετρομεταθετά στοιχεία. SINEs έχουν βρεθεί σε αρκετά αγγειόσπερμα και πιθανά να είναι παρόντα σε όλα τα φυτά (Kumar and Bennetzen, 1999).

Διασπορά και οργάνωση της ομάδας των *Ty1-copia* ρετρομεταθετών στοιχείων

Πειράματα με *in situ* υβριδισμούς σε μεταφασικά χρωματοσώματα και πυρήνες σε πρόφαση έχουν δώσει πληροφορίες για τη φυσική οργάνωση και κατανομή των ρετρομεταθετών στοιχείων στα φυτά.

Τα *Ty1-copia* παρουσιάζονται διάσπαρτα σε ευχρωματικές περιοχές, άλλοτε ομοιόμορφα και άλλοτε όχι, ανάλογα με το φυτικό είδος και το στοιχείο που εξετάζεται. Ωστόσο, πολλά από αυτά είναι λιγότερο συγκεντρωμένα ή μπορεί και να εκλείπουν από συγκεκριμένες περιοχές. Τέτοιες περιοχές στα χρωματοσώματα είναι τα κεντρομερή, τα τελομερή, οι θέσεις των rRNA γονιδίων (NORs, περιοχές οργάνωσης πυρηνίσκων) και ορισμένες εσωτερικές ετεροχρωματικές περιοχές. Στο γενικό αυτό κανόνα υπάρχουν και εξαιρέσεις. Έτσι, τα στοιχεία αυτά καταλαμβάνουν τις ετεροχρωματικές περιοχές των

τελομερών στο κρεμμύδι (*Allium cepa*) και στο καλαμπόκι (*Zea mays*), τις παρακεντρομερικές περιοχές στην *Arabidopsis thaliana* και στο ρεβύθι (*Cicer arietinum*) και τις NORs στα κουκιά (*Vicia faba*) (Brandes *et al.*, 1997, Kumar and Bennetzen, 1999).

Ακολουθίες ρετρομεταθετών στοιχείων έχουν βρεθεί πολύ κοντά ή ανάμεσα σε γονίδια, ή στις περιοχές των υποκινητών. Στην περίπτωση του καλαμποκιού παρουσιάζονται πεπλεγμένες πολλές τέτοιες οικογένειες στις περιοχές μεταξύ γονιδίων, ενώ στο ρύζι και στο φασόλι διακόπτουν λειτουργικά γονίδια. Σε άλλες περιπτώσεις, όπως στο καλαμπόκι και στο κριθάρι, έχουν βρεθεί τμήματα των στοιχείων αυτών (solo LTRs) σε περιοχές πλούσιες σε γονίδια (Flavel and Moore, 1996, Kumar and Bennetzen, 1999, SanMiguel *et al.*, 1996, Voytas, 1996). Φαίνεται λοιπόν ότι το κάθε ρετρομεταθετό στοιχείο έχει αναπτύξει το δικό του πρότυπο ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα του ξενιστή.

Το 4% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος της *Arabidopsis*, για παράδειγμα, αποτελείται από τμήματα LTR. Πιθανά η συσσώρευση αυτών στα μεγάλα μεγέθους και πλούσιων σε επαναλαμβανόμενες ακολουθίες γονιδιώματα να είναι το αποτέλεσμα μεταφοράς τους από τους πυρήνες (Kumar and Bennetzen, 1999, Schuster and Brennicke, 1987).

Αριθμός αντιγράφων της ομάδας των *Ty1-copia* ρετρομεταθετών στοιχείων

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία (*Ty1-copia*) είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση με έναν αριθμό αντιγράφων που παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση, ιδιαίτερα στα φυτικά είδη. Άμεση συσχέτιση μεταξύ του αριθμού αντιγράφων και του μεγέθους του γονιδιώματος δεν υπάρχει, ενώ αυτός μπορεί να διαφέρει και μεταξύ συγγενών ειδών στο ίδιο γένος.

Το *BARE-1* στοιχείο, μήκους 12.1 kb, στο κριθάρι συναντάται σε 70.000 περίπου αντίγραφα, ενώ στην *Arabidopsis thaliana*, με γονιδίωμα μόλις ~150Mbp, ο αριθμός των *Ty1-copia* στοιχείων είναι περίπου 200. Στο καλαμπόκι αποτελεί το 50% του πυρηνικού γονιδιώματος. Στο γένος *Vicia* το οποίο περιέχει διπλοειδή είδη με αρκετά διαφορετικό μέγεθος γονιδιώματος, η *V. faba* περιέχει περίπου 1.000.000, η *V. melanops* περίπου 1.000 και η *V. sativa* περίπου 5.000 αντίγραφα (Flavell *et al.*, 1997, Kumar, 1996, Kumar *et al.*, 1997, SanMiguel *et al.*, 1996, Voytas, 1996).

4.1.4.3 Ετερογένεια στην αλληλουχία της ομάδας των *Ty1-copia* ρετρομεταθετών στοιχείων

Στα φυτά τα *Ty1-copia* στοιχεία εμφανίζουν αρκετά ετερογενείς πληθυσμούς στα γονιδιώματα πολλών μονοκότυλων και δικότυλων φυτών. Η ετερογένεια αυτή συναντάται σε μεγάλο βαθμό στο γονίδιο *RT*. Η προβλεπόμενη αμινοξική ακολουθία, για παράδειγμα, 31

τέτοιων κλώνων στην πατάτα, όπου αρχικά παρατηρήθηκε το φαινόμενο, έδειξε 5-75% ομοιότητα μεταξύ τους (Flavell *et al.*, 1992, Vershinin and Ellis, 1999).

Οι αιτίες του μεγάλου βαθμού ετερογένειας είναι: 1^ο ο τρόπος πολλαπλασιασμού των στοιχείων βασιζόμενος στη μετάθεση μέσω αντιγραφής, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελαττωματικών στοιχείων, 2^ο η παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων σε μικρά χρονικά διαστήματα της εξελικτικής πορείας και η συσσώρευση μεταλλαγών η οποία αύξησε και διαφοροποίησε τα αρχικά αντίγραφα, και 3^ο ο τρόπος δημιουργίας των αναπαραγωγικών κυττάρων των φυτών από σωματικά κύτταρα που έχουν ενδεχομένως αποκτήσει μεταλλαγές κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού (Flavell *et al.*, 1997, Flavell *et al.*, 1992, Kumar and Bennetzen, 1999).

4.1.4.4 Ρύθμιση της έκφρασης και της μετάθεσης της ομάδας των *Ty1-copia* ρετρομεταθετών στοιχείων

Η έκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων στα φυτά υπόκειται σε μηχανισμούς ρύθμισης, ώστε να ελέγχεται και η συχνότητα της μετακίνησης τους στο γονιδίωμα του ξενιστή. Με τον τρόπο αυτό ελαχιστοποιείται η πιθανότητα πρόκλησης μεταλλαγής. Έτσι εξηγείται και το γεγονός ότι στους περισσότερους φυτικούς ιστούς τα ρετρομεταθετά στοιχεία παραμένουν μεταγραφικά ανενεργά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους.

Ο πιο απλός τρόπος ρύθμισης της ενεργότητας των ρετρομεταθετών στοιχείων είναι μέσω ελέγχου της έναρξης της μεταγραφής τους. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να είναι σε επίπεδο ανάπτυξης ή να σχετίζεται με το περιβάλλον ή σε ορμονικούς παράγοντες όπως συμβαίνει στο σακχαρομυκητα και στη δροσόφιλα.

Αν και υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ της μεταγραφής και της μετάθεσης των ρετρομεταθετών στοιχείων, με την πρώτη να αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη δεύτερη, η μετάθεση απαιτεί συνήθως κι άλλα στάδια ελέγχου για να πραγματοποιηθεί. Έτσι, σε αντίθεση με τα *Tto1* του καπνού και *Tos17* του ρυζιού, η αύξηση στα επίπεδα του RNA του *BARE-1* δεν ακολουθείται από αντίστοιχη αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του (Vicent *et al.*, 1999).

Η ρύθμιση των LTR ρετρομεταθετών στοιχείων ελέγχεται από cis-αλληλουχίες στα 5'-LTR και στις γειτονικές μη μεταφραζόμενες περιοχές. Για παράδειγμα στο *Tht1*, υπάρχουν μεταγραφικοί ενεργοποιητές στην περιοχή U3 του 5'-LTR όπου περιέχει μια μικρή παλινδρομική ακολουθία, τη BI, και ένα επαναλαμβανόμενο 3-4 φορές σε σειρά τμήμα 31 bp, το BII (Kumar and Bennetzen, 1999, Kumar *et al.*, 1997).

Η μεταγραφική ενεργότητα πολλών ρετρομεταθετών στοιχείων επάγεται από διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Η έκφραση των *Tht1* και *Tto1* αυξάνεται κατά τη διάρκεια απομόνωσης πρωτοπλαστών, κυτταροκαλλιέργειας, κατά τον τραυματισμό, την επίδραση μεθυλεστέρα του ιασμονικού οξέος, CuCl_2 και σαλικυλικού οξέος. Η επώαση με ιούς, βακτήρια και μύκητες μπορεί να επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα. Η επαγωγή της έκφρασης επιτυγχάνεται ύστερα από τη δράση trans-στοιχείων (τα οποία έχει βρεθεί ότι δρουν σε 'γονίδια άμυνας' των φυτών) στην περιοχή των 5'-LTR (Kumar *et al.* 1997).

Φαίνεται ότι κατά τη διάρκεια της κανονικής αύξησης και ανάπτυξης του φυτού τα ρετρομεταθετά στοιχεία παραμένουν ανενεργά και ενεργοποιούνται μόνο σε “κατάσταση έκτακτης ανάγκης”. Συνέπεια αυτού είναι η αύξηση της συχνότητας μεταλλαγών και η αλλαγή στη δομή του γονιδιώματος. Οργανισμοί που είναι ικανοί να τροποποιήσουν τα γονιδιώματά τους κατά αυτόν τον τρόπο είναι πιο πιθανό να επιβιώσουν και να δώσουν απογόνους (Kumar and Bennetzen, 1999, Wessler, 1996).

Στους ανώτερους οργανισμούς η μεθυλίωση του DNA στις ακολουθίες 5'-CG-3' και 5'-CNG-3' έχει συσχετιστεί με απενεργοποίηση γονιδίων και ετεροχρωματικές περιοχές DNA. Στα LTR ρετρομεταθετά στοιχεία η μεθυλίωση αυτή σε κατάλοιπα κυτοσίνης συνδέεται με μεταγραφική απενεργοποίηση και έναν υψηλό ρυθμό μεταπτώσεων / μεταλλαγών της C σε T. Δεν είναι, ωστόσο, απόλυτα γνωστό αν η μεθυλίωση καθιστά το στοιχείο ανενεργό ή αν είναι το αποτέλεσμα της κατάστασης αυτής, που αρχικά δημιουργήθηκε με κάποια αλλαγή στη δομή της χρωματίνης.

Αν και δεν είναι ξεκάθαρο πώς αρχικά εμφανίζεται και διατηρείται ένα επιγενετικό φαινόμενο στα ρετρομεταθετά στοιχεία, είναι πιθανό να ευθύνεται η ενσωμάτωση τους σε περιοχές ετεροχρωματίνης, όπως στην περίπτωση των μεθυλιωμένων περιοχών μεταξύ των γονιδίων του καλαμποκιού (Finnegan *et al.*, 1998, Kumar and Bennetzen, 1999, Kumar *et al.*, 1997).

Σημειώνεται, επίσης, ότι η ενσωμάτωση ρετρομεταθετών στοιχείων σε αλληλουχίες άλλων στοιχείων είναι ακόμα ένας τρόπος απενεργοποίησης τους και ελέγχου του αριθμού των αντιγράφων τους (Kumar *et al.*, 1997).

4.1.4.5 Ο ρόλος των ρετρομεταθετών στοιχείων στην εξέλιξη των γονιδιωμάτων

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία εμπλέκονται στη δημιουργία μεταλλαγών με την ενσωμάτωση τους κοντά ή μέσα σε γονίδια. Εναλλακτικά, επηρεάζουν αρνητικά την έκφραση αυτών με το να μειώνουν ή να καταστέλλουν τη μεταγραφή, ή επιφέροντας αλλαγές στην επεξεργασία και τη σταθερότητα του μεταγραφήματος. Σε άλλες περιπτώσεις οι

επιδράσεις είναι πιο σύνθετες, με αλλαγές στα χρονικά και χωρικά δεδομένα της μεταγραφής των γονιδίων ή στη δομή της πρωτεΐνης που προκύπτει. Στη διαδικασία ενσωμάτωσης η παρουσία τους στις περιοχές των γονιδίων μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία μιας πρωτεΐνης διαφορετικής από αυτή του αγρίου τύπου, συνήθως μειωμένης λειτουργικότητας. Επειδή οι περισσότερες από αυτές τις αλληλουχίες ρετρομεταθετών στοιχείων είναι ελαττωματικές ή απλώς υπολείμματα στοιχείων, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η σταθερή παρουσία τους στις θέσεις αυτές έχει γίνει κάτω από πίεση επιλογής (selective pressure) για ρυθμιστικούς λόγους.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι και το γεγονός ότι τα στοιχεία που προκαλούν τέτοιες μεταλλαγές βρίσκονται σε μικρό αριθμό αντιγράφων (π.χ. 1-5 αντίγραφα του *BsI* στο γονίδιο της αλκοολικής αφυδρογονάσης του καλαμποκιού). Τα περισσότερα τείνουν να καταλάβουν περιοχές ανάμεσα σε γονίδια ή σε ήδη υπάρχοντα στοιχεία για την αποφυγή πρόκλησης μεταλλαγών σε υψηλή συχνότητα. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να πολλαπλασιάζονται χωρίς να αποτελούν “απειλή” για τον ξενιστή (Bennetzen, 2000, Kumar and Bennetzen, 1999, Kumar *et al.*, 1997).

Ο ρόλος των ρετρομεταθετών στοιχείων στον καθορισμό του μεγέθους των γονιδιωμάτων των φυτών είναι σημαντικός. Με μια μείωση στην πίεση επιλογής κάποιες οικογένειες ρετρομεταθετών στοιχείων πολλαπλασιάζονται - πολλές φορές με διαφορετικούς μηχανισμούς, όπως άνισο ανασυνδιασμό, διπλασιασμό ή μετάθεση χωρίς την παρουσία ενδιάμεσου μορίου RNA - επιτρέποντας σε ένα γονιδίωμα να αυξηθεί. Αντίθετα, κατά τη συστολή ενός γονιδιώματος παρατηρείται απώλεια στοιχείων μέσω άνισων ανασυνδιασμών μεταξύ των LTR ή ελλείψεων. Επιπλέον, η μη δυνατότητα των ρετρομεταθετών να εδράσουν αρχικά και να πολλαπλασιαστούν στο γονιδίωμα ενός ξενιστή, πιθανά λόγω διαμόρφωσης του DNA ή αυξημένου ρυθμού ομογενοποίησης (sequence homogenization) και εξέλιξης του γονιδιώματος, δικαιολογεί την περιορισμένη παρουσία τους σε κάποια από αυτά (Bennetzen, 2000, Flavell and Moore, 1996, Flavell *et al.*, 1997, Heslop-Harrison *et al.*, 1997, Kumar and Bennetzen, 1999, Kumar *et al.*, 1997, Voytas and Naylor, 1998).

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία έχουν την ικανότητα να αναδιατάσσουν τα γονιδιώματα, συμβάλλοντας, έτσι, στον πολλαπλασιασμό των γονιδίων ή μέρους αυτών και στη διασπορά τους. Ομοίως, η σπάνια μεν δράση της ανάστροφης μεταγραφάσης και της ενσωμάτωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων σε κυτταρικά mRNAs, έχει δημιουργήσει ψευδογονίδια που στερούνται ιντρονίων στα φυτά (Kumar and Bennetzen, 1999).

Επιπλέον, ο άνισος ή εκτοπικός ανασυνδιασμός μεταξύ των LTR στοιχείων του ίδιου χρωματοσώματος μπορεί να δημιουργήσει διπλασιασμούς, ελλείψεις και αναστροφές στις

αλληλουχίες ανάμεσα τους, ή μετατοπίσεις για στοιχεία σε διαφορετικά χρωματοσώματα. Αν και τέτοια φαινόμενα έχουν παρατηρηθεί στη δροσόφιλα και το σακχαρομύκητα, στα φυτά δεν έχουν πλήρως μελετηθεί, οπότε δεν είναι γνωστός και ο βαθμός συμμετοχής των ρετρομεταθετών στοιχείων σε αυτά (Kumar and Bennetzen, 1999).

4.1.4.6 Άλλοι πιθανοί ρόλοι των ρετρομεταθετών στοιχείων

Το γεγονός ότι στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς τα κεντρομερή, τα τελομερή και άλλες ετεροχρωματικές περιοχές των χρωματοσωμάτων περιέχουν ρετρομεταθετά στοιχεία, αποκαλύπτει πιθανούς δομικούς ή/και λειτουργικούς ρόλους γι' αυτά.

Ομοίως η παρουσία τμημάτων ρετρομεταθετών στοιχείων στις ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων φανερώνει το ρόλο τους στη ρύθμιση της έκφρασης. Αναμφίβολα δε, τα ρετρομεταθετά στοιχεία συμβάλλουν στη γενετική ποικιλομορφία και την εξέλιξη των ευκαρυωτικών οργανισμών (Kumar and Bennetzen, 1999, Miller *et al.*, 1998).

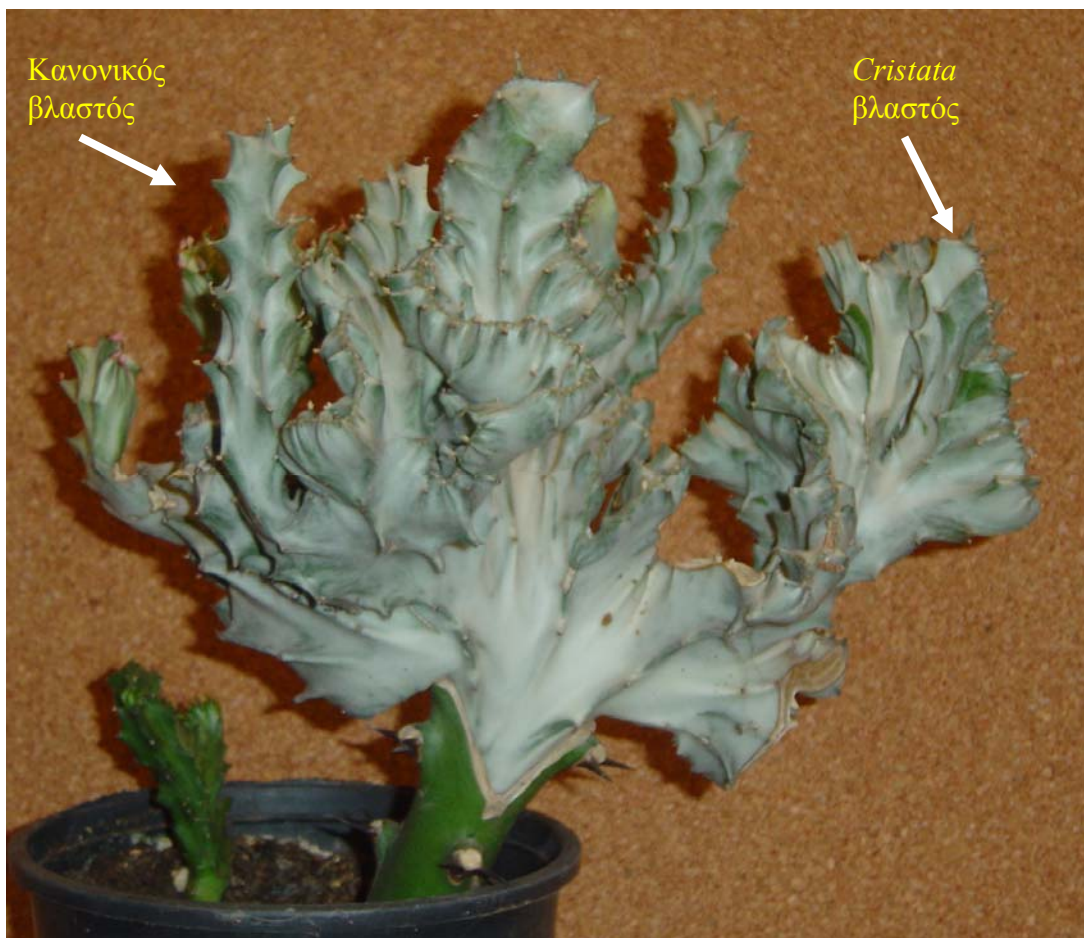
Τα *Ty1*-copia ρετρομεταθετά στοιχεία στα φυτά μπορούν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο σύστημα DNA μοριακών δεικτών για μελέτες φυλογένειας, βιοποικιλότητας και σύνδεσης γονιδίων εξαιτίας των ιδιοτήτων που έχουν, ενώ ορισμένα ρετρομεταθετά στοιχεία έχουν ιδιότητες που τα καθιστούν ιδανικά εργαλεία για τη σήμανση των γονιδίων στα φυτά (Hirochika, 1997, Kumar *et al.*, 1997, Kumar and Bennetzen, 1999).

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Φυτικό υλικό

Το μητρικό φυτό *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” ήταν ηλικίας 3 ετών και προήλθε από εμβολιασμό. Χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα *in vitro* πολλαπλασιασμού (Κεφάλαιο 2) και μετά την κοπή μεγάλου τμήματος κορυφαίου μεριστώματος σχημάτισε κανονικούς βλαστούς (Εικ. 35).

Διατηρήθηκε σε θερμοκήπιο (κεφ. 2.2.1) με ελαφρά σκίαση το καλοκαίρι. Δινόταν μεγάλη προσοχή στο πότισμα, ώστε να περιοριστεί η ανάπτυξη παθογόνων εδάφους και η μόλυνση των φυτών.



Εικ. 35. Μητρικό φυτό *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” με κανονικούς και δεσμωμένους (*cristata*) βλαστούς.

4.2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το Dneasy (της εταιρείας Qiagen).

Διαδικασία απομόνωσης

1. Λειοτριβείται ο ιστός με υγρό άζωτο μέσα σε γουδί πορσελάνης.

2. Προστίθεται η λειοτριβημένη μάζα (περίπου 100 mg) σε πλαστικό φιαλίδιο και προστίθενται 400 μ l του Buffer AP1 (προθερμασμένο στους 65 °C) και 4 μ l του RNase A στοκ διάλυμα και ανακινείται ζωηρά.
3. Επώαση του μίγματος για 10 min στους 65 °C. Ανάμιξη 2-3 φορές κατά τη διάρκεια της επώασης.
4. Προσθήκη 130 μ l του Buffer AP2 στο ίζημα, ανάμιξη, και επώαση για 5 min σε πάγο.
5. Φυγοκέντριση στις 14.000 στροφές για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Εφαρμογή του QIAshredder Maxi Spin Column (λιλά) σε πλαστικό φιαλίδιο (όγκου 2 ml) και τοποθέτηση του ιζήματος στη Maxi Spin Column και φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφορά της Maxi Spin Column (λιλά) σε νέο πλαστικό φιαλίδιο (2 ml), χωρίς να πειραχθεί το ίζημα.
7. Προσθήκη 1.5 φορά τον όγκο του Buffer AP3/E κατευθείαν στο καθαρό ίζημα και ανάμιξη με την πιπέτα.
8. Τοποθέτηση του δείγματος στη Dneasy Maxi Spin Column (έγχρωμη κολώνα) συμπεριλαμβανομένου και οτιδήποτε έχει σχηματιστεί. Φυγοκέντρωση στις 5.000 στροφές για 1 min. Απόρριψη του καταβυθιζόμενου και επαναχρησιμοποίηση του πλαστικού φιαλιδίου συλλογής.
9. Επανάληψη του βήματος 8. Απόρριψη του καταβυθιζόμενου επαναχρησιμοποίηση του πλαστικού φιαλιδίου συλλογής.
10. Τοποθέτηση του Dneasy Maxi Spin Column σε νέο πλαστικό φιαλίδιο (2 ml), προσθήκη 500 μ l Buffer AW και φυγοκέντρωση για 1 min στις 5.000 στροφές. Απόρριψη του καταβυθιζόμενου και επαναχρησιμοποίηση του πλαστικού φιαλιδίου συλλογής.
11. Προσθήκη 500 μ l Buffer AW στο Dneasy Maxi Spin Column και φυγοκέντρωση για 2 min στις 14.000 στροφές για να στεγνώσει η μεμβράνη.
12. Μεταφορά της κολώνας (Dneasy Maxi Spin Column) σε φιαλίδιο (2 ml) και προσθήκη με πιπέτα 100 μ l του Buffer AE κατευθείαν στην μεμβράνη. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά φυγοκέντρωση για 1 min στις 10.000 στροφές.
13. Επανάληψη του βήματος 12.

4.2.3 Απομόνωση ολικού RNA και παραγωγή συμπληρωματικού DNA (cDNA)

α) Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA έγινε με τη βοήθεια του RNase KIT (PROMEGA)

1. Λειοτρίβηση του ιστού με υγρό άζωτο μέσα σε γουδί πορσελάνης (~ 100 mg).

2. Προσθήκη της λειοτριβημένης μάζας σε πλαστικό φιαλίδιο και προσθήκη 450 μ l του Buffer RLT* και επώαση για 1-3 min στους 56 °C.
3. Τοποθέτηση στο μωβ κολωνάκι και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 2 min και μεταφορά του διαλύματος σε νέο φιαλίδιο.
4. Προσθήκη 0.5 όγκου αιθανόλης στο δείγμα και δεν γίνεται φυγοκέντρηση.
5. Φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Μεταφορά στο ροζ κολωνάκι και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 15 sec και απόρριψη του διαλύματος.
7. Προσθήκη 700 μ l RW1 και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 15 sec και απόρριψη του διαλύματος.
8. Μεταφορά της στήλης σε νέο φιαλίδιο. Προσθήκη 500 μ l RPE. Φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 15 sec.
9. Προσθήκη 500 μ l RPE. Φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 2 min.
10. Απόρριψη του καταβυθιζόμενου και επαναχρησιμοποίηση του πλαστικού φιαλιδίου συλλογής. Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 1 min.
11. Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 1 min.
12. Προσθήκη 40 μ l νερό, αναμονή για 1 min και φυγοκέντρηση για 1 min στις 10.000 rpm.

β) Δημιουργία cDNA

Το συμπληρωματικό cDNA είναι ένα συνθετικό μόριο DNA, αντίγραφο κάποιου συγκεκριμένου μορίου RNA που στερείται των ιντρονίων που παρατηρούνται στο γονιδιωματικό DNA.

Από το RNA δείγμα παίρνουμε 3 μ l που μεταγράφεται ανάστροφα σε μονόκλωνο cDNA. Η διαδικασία γίνεται σε δύο βήματα - αντιδράσεις.

1^ο) Το ολικό RNA ελεύθερο από DNA και ο εκκινητής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης αποδιατάσσονται στους 70 °C για 5 min και τοποθετούνται για 5 min σε πάγο. Τα συστατικά σε αυτό το βήμα δίδονται από τον πίνακα 37:

Πίν. 37. Συστατικά πρώτης αντίδρασης δημιουργίας cDNA

Συστατικά Πρώτης Αντίδρασης	Όγκος (μl)
Ολικό RNA ελεύθερο από DNA (20 ng)	3
Εκκινητής για ανάστροφη μεταγραφή (10 μM)	1
Νερό	1
Τελικός όγκος 5 μl	

2^ο) Προστίθενται τα ακόλουθα συστατικά με την εξής σειρά (Πίνακας 38) :

Πίν. 38. Συστατικά δεύτερης αντίδρασης δημιουργίας cDNA

Συστατικά Δεύτερης Αντίδρασης	Όγκος (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα (x10)	4
MgCl ₂ (1μM)	4.8
dNTP (10μM)	1
RNase αναστολέας (10u)	0.5
RTase (1μl)	1
Δείγμα 1 ^ο βήματος	5
Νερό	3.7
Τελικός όγκος 20 μl	

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 25 °C για 5 min, στους 42 °C για 60 min και στους 70 °C για 15 min.

γ) PCR για την ενίσχυση της αλληλουχίας του ρετρομεταθετού στοιχείου

Από το μίγμα των παραπάνω αντιδράσεων μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο 3 μl για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του cDNA με τη μέθοδο του PCR. Χρησιμοποιήθηκαν το ζεύγος εκφυλισμένων εκκινητών C190/C191, (οπότε από το σύνολο των RNA μορίων που είχαν παραχθεί επιλέχθηκαν να πολλαπλασιαστούν μόνο τα RT RNA μόρια). Πρόκειται για έναν 17-μερές και ενός 15-μερές ολιγονουκλεοτιδίου που πολλαπλασιάζουν μια συντηρημένη εσωτερική περιοχή του γονιδίου της ανάστροφης μεταγραφάσης (RT) των ρετρομεταθετών στοιχείων, μήκους 260 bp περίπου βάσεων.

Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

C190: 5' - AC(AGCT) GC(AGCT)TT(CT)T(AGCT)CA(CT)GG - 3'

C191: 5' - A(AG)CAT(AG)TC(AG)TC(AGTC)AC(AG) - 3'

Τα συστατικά της αντίδρασης ήταν:

I) 4 μ l ρυθμιστικό διάλυμα (x10), II) 1 μ l MgCl₂ (1 μ M), III) 0.5 μ l DNTP (10 μ M), IV) 0.5 μ l εκκινητής C190 (10 pmol), V) 0.5 μ l εκκινητής C191 (10 pmol), VI) 0.5 u Taq, VII) 11 μ l νερό VIII) 20 ng DNA .

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 94 °C για 3 min, 35 κύκλοι στους 94 °C για 30 sec, στους 44 °C για 15 sec, στους 42 °C για 15 sec, στους 40 ° για 15 sec, στους 38 °C για 15 sec, στους 72 °C για 1 min, και τελειώνοντας στους 72 °C για 5 min και διατήρηση στους 16 °C.

δ) Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων δίκλωνου cDNA

Στα προϊόντα των αντιδράσεων προστέθηκε 1 μ l διάλυμα φόρτωσης και ακολούθως αυτά ανιχνεύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αгарόζης 1.6%, σε διάλυμα 1xTAE και παρουσία 0.5 μ g/ml βρωμιούχου αιθιδίου. Το μέγεθος του προϊόντος επιβεβαιώθηκε με τη χρήση μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους..

4.2.4 Μέτρηση συγκέντρωσης DNA και RNA

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των διαλυμάτων των δειγμάτων DNA και RNA που απομονώνονταν κάθε φορά, γινόταν μέτρηση της απορρόφησης (OD) στα 260 nm. Προετοιμαζόταν, έτσι, ένα διάλυμα 5 μ l του δείγματος σε 495 μ l δ/τος 1xTE και μέσα σε κυψελίδες χαλαζία γινόταν η μέτρηση με φασματοφωτόμετρο της Perkin-Elmer, Lambda Bio. Με δεδομένο ότι η απορροφητικότητα δίκλωνου μορίου DNA είναι 50 μ l μ g⁻¹ cm⁻¹ ενώ η αντίστοιχη μορίου RNA είναι 40 μ l μ g⁻¹ cm⁻¹, πολλαπλασιαζόμενη η OD₂₆₀ με τον συντελεστή 5 ή 4 προκύπτει η συγκέντρωση των διαλυμάτων DNA και RNA αντίστοιχα σε μ g/ μ l.

Συγκέντρωση DNA (μ g/ μ l) = [(A₂₆₀/OD) X 50 X παράγοντας διαλύσεων (500/5)]/1000

Συγκέντρωση RNA (μ g/ μ l) = [(A₂₆₀/OD) X 40 X παράγοντας διαλύσεων (500/5)]/1000

Για να ελεγχθεί η καθαρότητα των δειγμάτων DNA γινόταν επίσης μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm. Τιμές του λόγου OD₂₆₀/OD₂₈₀ μικρότερες του 1.7 φανερώνουν

παρουσία πρωτεϊνών ή φαινόλης στο δείγμα, ενώ μεγαλύτερες του 2.0 παρουσία RNA σε δείγματα DNA.

4.2.5 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

Τα προϊόντα των αντιδράσεων, μετά από προσθήκη 1 μ l διαλύματος φόρτωσης (gel loading buffer: μπλε της βρωμοφαινόλης 1%, κυανού του ξυλενίου, γλυκερόλη 50%, 1xTAE) διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης 0.8-1% σε διάλυμα 1xTAE¹ και παρουσία 0.5 μ g/ml βρωμιούχου αιθιδίου. Η τάση τροφοδοσίας της ηλεκτροφόρησης ήταν 90 volt, ενώ ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε το 1xTAE.

Παράλληλα με τα δείγματα, στην πηκτή αγαρόζης φορτώθηκε 1 ng μάρτυρα (λ -φάγος που έχει υποστεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Hind*III), για την εύρεση των μοριακών βαρών των ανιχνευθέντων μορίων DNA.

4.2.6 Μέθοδοι προσδιορισμού της μεθυλίωσης με ένζυμα περιορισμού

Μια από τις μεθόδους αναγνώρισης της μεθυλίωσης σε έναν ιστό (κεφ. 4.1.2.2) γίνεται με τη βοήθεια ενζύμων περιορισμού που εισάγονται κατά τη πέψη του DNA και έλεγχο του πολυμορφισμού κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε ένα μεγάλο αριθμό αναφορών που γίνεται έλεγχος της ύπαρξης μεθυλίωσης στα φυτά (Kubis *et al.*, 2003, Stergiou *et al.*, 2002, Kaeppler and Phillips, 1993).

Τα ένζυμα περιορισμού (restriction enzymes) είναι ένζυμα που απομονώθηκαν από διάφορους προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια και έχουν την ιδιότητα να πέπτουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Τέτοια ένζυμα είναι τα *Msp*I, *Hpa*II, *Sau*3AI και *Mbo*I.

Το *Msp*I είναι ισοσχιζομερές του *Hpa*II (Πίν. 39). Έτσι όταν η εξωτερική κυτοσίνη (C) στην ακολουθία CCGG είναι μεθυλιωμένη, τα *Msp*I και *Hpa*II δεν μπορούν να το κόψουν (διασπάσουν). Ωστόσο, αντίθετα από το *Hpa*II, το *Msp*I μπορεί να διασπάσει την ακολουθία όταν μεθυλιώνεται η εσωτερική κυτοσίνη (Stergiou *et al.*, 2002, Quemada *et al.*, 1987). Το αδύνατο σημείο κατά τη πέψη αυτή είναι ότι δεν κόβει όλα τα CG που βρίσκονται στις CCGG ακολουθίες, που σημαίνει ότι πολλές ενδεχόμενες μεθυλιωμένες περιοχές θα παραβλεφθούν.

Το *Sau*3AI είναι ισοσχιζομερές του *Mbo*I (Πίν. 39). Και τα δύο αναγνωρίζουν την ίδια ακολουθία αλλά έχουν διαφορετική ευαισθησία στη μεθυλίωση. Το *Mbo*I εμποδίζεται από

¹ 1xTAE: 20 ml διαλύματος (2M Tris, 0.5M EDTA, 1M CH₃COOH, pH=8) και προσθήκη 980 ml καθαρού νερού.

την πλήρη μεθυλίωση και πιθανώς από την ημιμεθυλίωση. Το *Sau3AI* κόβει (διασπά) όλες τις περιοχές ανεξάρτητα από την αδενομεθυλίωση αλλά εμποδίζεται από τη μεθυλιωμένη κυτοσίνη μέσα στην ακολουθία. Επομένως το *Sau3AI* κόβει GATC περιοχές ανεξαρτήτως της κατάστασης της μεθυλίωσης, ενώ το *MboI* κόβει μόνο μη μεθυλιωμένες GATC περιοχές (Chen *et al.*, 2003, Stergiou *et al.*, 2002).

Πίν. 39. Περιοριστικά ισοσχιζομερή ένζυμα και θέσεις αναγνώρισης κατά τη πέψη (Πηγή BioLabs).

Ισοσχιζομερές Ένζυμο	Θέση Αναγνώρισης
MspI / HpaII	5'...C*CGG...3' 3'...GGC*C...5'
Sau3AI / MboI	5'...*GATC...3' 3'...CTAG*...5'

4.2.6.1 Διαδικασία Πέψης

Ποσότητα DNA και από τις δύο μορφές (*cristata* και κανονική) χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία της πέψης με τα ισοσχιζομερή ένζυμα περιορισμού *MspI* – *HpaII* και *Sau3AI* – *MboI* (εταιρείες: Biolab και GIBCO-BRL).

Μέσα σε ένα φιαλίδιο (erpeddorff) τοποθετήθηκαν 10 ng δείγματος DNA, Ρυθμιστικό διάλυμα (10x), 7 μ l νερό και 10 unit ένζυμο (Πίν. 40). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 1 h στους 37 °C για να πραγματοποιηθεί η πέψη.

Πίν. 40. Δείγματα DNA (κανονικού και *cristata* βλαστού) για την πέψη με τα ισοσχιζομερή ένζυμα περιορισμού *MspI* – *HpaII* και *Sau3AI* – *MboI*,

DNA <i>cristata</i> βλαστού				DNA κανονικού βλαστού			
<i>Sau3AI</i>	<i>MboI</i>	<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>MboI</i>	<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>
1	2	3	4	5	6	7	8

4.2.6.2 Έλεγχος πολυμορφισμού με RAPD εκκινητές

α) RAPD εκκινητές

Τα προϊόντα της πέψης χρησιμοποιήθηκαν σε αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με 10-μερείς RAPD εκκινητές (RAPD-PCR). Δοκιμάστηκαν 51 τυχαίοι 10-μερείς εκκινητές της εταιρείας OPERON (Πίν. 41).

Πίν. 41. Πίνακας 10-μερών εκκινητών της εταιρείας OPERON που δοκιμάστηκαν για τον έλεγχο πολυμορφισμού.

EKKINHTEΣ OPERON
A1, A2, A3, A4, A9, A11
B1, B3, B5, B6, B7, B8, B10, B11, B13, B14, B15, B16, B18
E2
M4, M5, M6, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18, M19, M20
N2, N5, N7, N8, N9, N20
O1, O7
P3
L4, L8, L12, L14, L15, L19

β) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Το μίγμα της αντίδρασης συνολικού όγκου 25 μ l περιείχε τις εξής ποσότητες:

I) 20 μ mol εκκινητή, II) 2.5 μ l Ρυθμιστικό διάλυμα (10x), III) 0.15 u Taq IV) 1 μ mol MgCl₂ V) 240 μ mol DNTPs VI) 6.85 μ l νερό VII) 1 μ l της πέψη του DNA με το αντίστοιχο ένζυμο περιορισμού.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 94 °C για 2', 35 κύκλοι για 1' στους 94 °C, για 30'' στους 37 °C, για 1' στους 72 °C και ένα τελευταίο βήμα στους 72 °C για 5'.

4.2.6.3 Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Τα ηλεκτροφορήματα των RAPD προϊόντων των αντιδράσεων πέψης με τους 10-μερείς εκκινητές εξετάστηκαν ως προς τον πολυμορφισμό τους μεταξύ των ζευγαριών των ισοσχιζομερών ενζύμων. Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων μετρήθηκαν οι ζώνες DNA που δημιουργήθηκαν ανά εκκινητή για τη κάθε πέψη.

4.2.7 Προσδιορισμός της μεθυλίωσης με τη χρήση της 5-Azacytidine κατά την *in vitro* καλλιέργεια της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”

4.2.7.1 Υλικά θρεπτικού υποστρώματος

1. Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) σε σκόνη χωρίς IAA, KINETIN και σακχαρόζη της εταιρίας SIGMA.
2. Σακχαρόζη εμπορίου
3. Φυτορυθμιστικές ουσίες: Ναφθαλινοξικό οξύ (NAA), MB= 186.2 της εταιρίας SIGMA, N-6-Βενζυλαδενίνη (BA), MB= 225.25 της εταιρίας MERCK
4. Άγαρ, της εταιρίας Ρουμπουλάκης ΑΕ.
5. 5-Azacytidine (C₈H₁₂N₄O₅): MB= 244.2 της εταιρείας SIGMA.

Το προϊόν αυτό είναι ένα ανάλογο νουκλεοτιδίου, το οποίο μπορεί επιλεκτικά να ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Είναι ένας πυριμιδινικός δακτύλιος ανάλογος της κυτιδίνης. Ενεργοποιεί γονίδια αλλάζοντας την κατάσταση της μεθυλίωσης τους, αλλά μπορεί ακόμη να δρα και σαν κυτοτοξίνη. Επίσης, δρα με την παρεμπόδιση ενζύμων τα οποία μεθυλιώνουν τα κατάλοιπα της κυτοσίνης στο DNA των ευκαρυωτικών οργανισμών. Ακόμη έχει χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας χημειοθεραπείας για τον καρκίνο (Jones, 1985, Taylor *et al.*, 1984, Jones *et al.*, 1983). Είναι ένα ισχυρό βακτηριοστατικό καθώς και παράγοντας μετάλλαξης (Constantinides *et al.*, 1977). Διαλύεται σε διαλύμα οξικού οξέος : νερό (1:1 v/v) ή σε σκέτο νερό. Η διάλυση σε υδατικά διαλύματα της 5-Azacytidine είναι πολύ ασταθής, με ένα 10% απώλεια δράσης του προϊόντος μέσα σε 2-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η διατήρηση του αρχικού (stock) διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες χάνει την ικανότητα να προκαλεί κυτοτοξικότητα και πολυπυρήνωση. Τα αρχικά διαλύματα πρέπει να παρασκευάζονται φρέσκα για το κάθε πείραμα, να αποστειρώνονται με φιλτράρισμα, και να διατηρούνται στους 0 °C (Constantinides *et al.*, 1977).

4.2.7.2 Θρεπτικό υπόστρωμα – έκφυτα – εγκατάσταση εκφύτων

Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το MS (SIGMA) (Murashige and Skoog, 1965) σε συγκέντρωση 4.4 g l⁻¹ και προστέθηκαν σουκρόζη εμπορίου 20 g l⁻¹, 0.1 mg l⁻¹ NAA και BA και στερεοποιήθηκε με 8 g l⁻¹ άγαρ (pH=5.6). Μετά την αποστείρωση και ενώ ήταν υγρό ακόμη στο υπόστρωμα προστέθηκε με τη βοήθεια φίλτρου 0, 1, 5, 10, 25, 50, και 100 μM 5-Azacytidine.

Τα έκφυτα της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” ήταν τμήματα φυτικού ιστού 5x5 mm, όπου κόβονταν κατά μήκος της ζώνης που αποτελεί το κορυφαίο μερίστωμα, κάθετα

προς αυτό, έτσι ώστε κάθε έκφυτο να περιλαμβάνει 4-5 φυμάτια Όλα τα έκφυτα επωάζονταν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με ένταση φωτός 2.000 lux, φωτοπερίοδο 16 h και θερμοκρασία 25 °C, ενώ η υγρασία του θαλάμου ήταν γύρω στο 50%.

4.2.7.3 Εκτίμηση αποτελεσμάτων – Στατιστική επεξεργασία

Τα αποτελέσματα στα πειράματα βλαστογένεσης καταγράφησαν 2 και 3 μήνες μετά την εμφύτευση των εκφύτων.

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στα πειράματα βλαστογένεσης χρησιμοποιήθηκε το μονοπαραγοντικό σχέδιο, με βάση το Εντελώς Τυχοποιημένο Σχέδιο (η τοποθέτηση των εκφύτων έγινε τυχαία στα διάφορα βάζα καλλιέργειας, καθώς τυχαία ήταν και η τοποθέτηση των βάζων καλλιέργειας στο θάλαμο επώασης). Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων δημιουργήθηκε ένας πίνακας για κάθε πείραμα που περιέχει τον μέσο όρο βλαστών ανά επέμβαση, καθώς και τη τιμή του F για την επίδραση του παράγοντα της 5-Azacytidine.

Τέλος, έγινε σύγκριση των μέσων όλων των επεμβάσεων με την μέθοδο των Tukey-Kramer (HSD). Οι μέσοι που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σημειώνονται με διαφορετικά γράμματα του λατινικού αλφάβητου στον πίνακα των αποτελεσμάτων.

4.2.8 Μέθοδοι προσδιορισμού *Ty1-copia* ρετρομεταθετών στοιχείων

4.2.8.1 Απομόνωση ρετρομεταθετών στοιχείων τύπου *Ty1-copia*

α) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την απομόνωση ρετρομεταθετών στοιχείων τύπου *Ty1-copia* από γονιδιωματικό DNA και cDNA στην *Euphorbia lactea* var. *crystata* “Grey Ghost” χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η τεχνική αφορά στον *in vitro* πολλαπλασιασμό αλληλουχιών DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους εναλλαγής θερμοκρασιών αποδιάταξης της ακολουθίας στόχου, υβριδισμού των εκκινητών σε αυτή και επιμήκυνσης με τη βοήθεια του ενζύμου της πολυμεράσης.

Με τη χρήση ενός 17-μερούς και ενός 15-μερούς ολιγονουκλεοτιδίου ως εκφυλισμένοι εκκινητές πολλαπλασιάστηκε μια συντηρημένη εσωτερική περιοχή του γονιδίου της ανάστροφης μεταγραφάσης (RT) των ρετρομεταθετών στοιχείων, μήκους 260 bp περίπου βάσεων.

Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

C190: 5' - AC(AGCT) GC(AGCT)TT(CT)T(AGCT)CA(CT)GG - 3'

C191: 5' - A(AG)CAT(AG)TC(AG)TC(AGTC)AC(AG) - 3'

Ο πολυμερισμός έγινε με τη βοήθεια της Taq DNA πολυμεράσης (GIBCO-BRL). Το ένζυμο έχει 5'→3' δραστηριότητα πολυμεράσης και εξωνουκλεάσης, ενώ είναι απαλλαγμένο από την 3'→5' δράση εξωνουκλεάσης.

Το μίγμα της αντίδρασης συνολικού όγκου 50 μ l περιείχε τις εξής ποσότητες / τελικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων:

I) 5 μ l ρυθμιστικό διάλυμα (x10), II) 1.5 μ l MgCl₂ (1 μ M), III) 0.5 μ l DNTPs (10 μ M), IV) 1.5 μ l εκκινητής C190 (10 pmol), V) 1.5 μ l εκκινητής C191 (10 pmol), VI) 0.25 u Taq, VII) 13.75 μ l νερό VIII) 20 ng DNA .

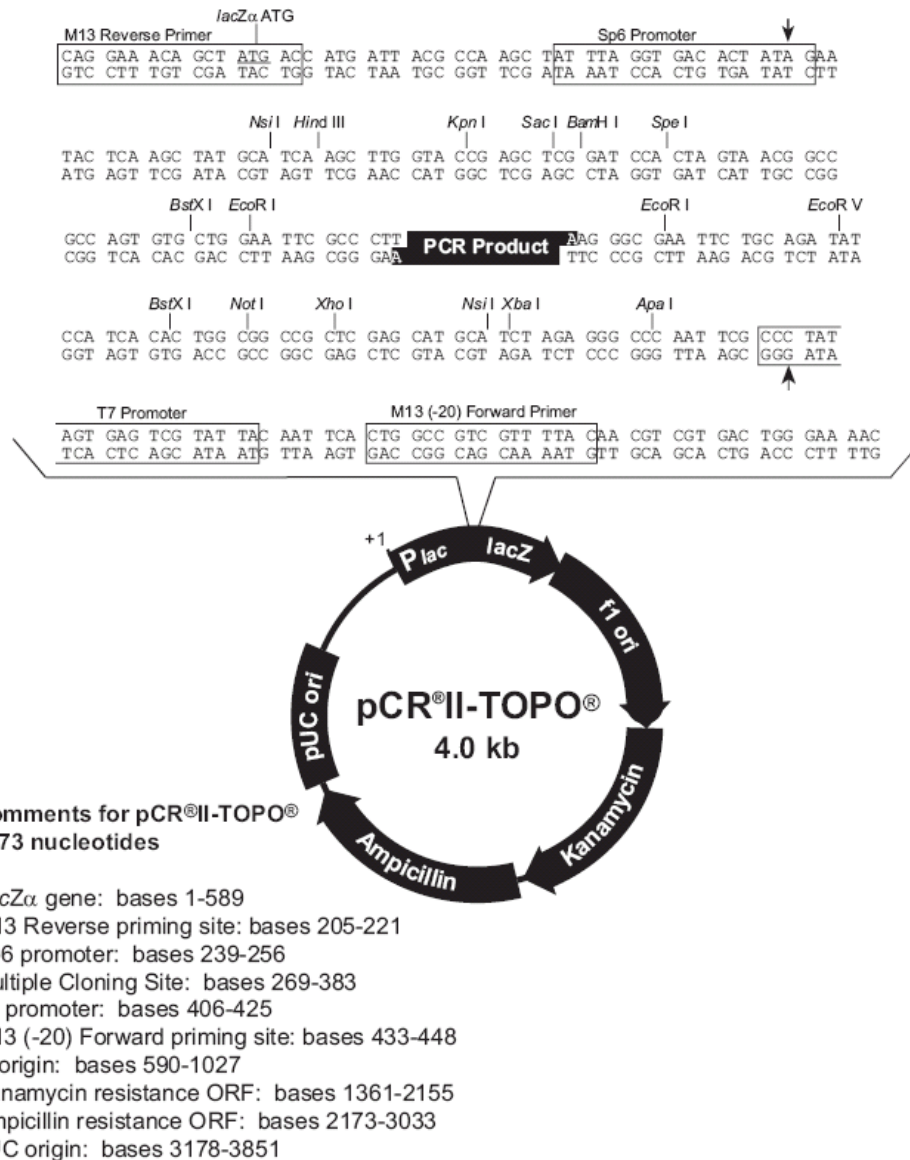
Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 94 °C για 3 min, 35 κύκλοι στους 94 °C για 30 sec, στους 44 °C για 15 sec, στους 42 °C για 15 sec, στους 40 °C για 15 sec, στους 38 °C για 15 sec, στους 72 °C για 1 min, και τελειώνοντας στους 72 °C για 5 min και διατήρηση στους 16 °C.

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονταν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης 1%.

4.2.8.2 Κλωνοποίηση *Ty1-copia* ρετρομεταθετών στοιχείων σε πλασμιδιακό φορέα

α) Φορέας κλωνοποίησης

Η ακολουθία των ρετρομεταθετών στοιχείων που απομονώθηκε με την τεχνική της PCR ήταν απαραίτητο να ενσωματωθεί σε ένα φορέα κλωνοποίησης πριν την τελική εισαγωγή της σε κάποιο ξενιστή. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε το υψηλού αριθμού αντιγράφων πλασμίδιο PCRII -TOPO. Πρόκειται για έναν προκαρυωτικό φορέα κλωνοποίησης που περιέχει μια περιοχή με 14 μοναδικές θέσεις περιορισμού (πολυσυνδετήρας) που βρίσκεται στο εσωτερικό α - τμήμα του γόνου lacZ (Σχ. 71).



Σχ. 71. Ο χάρτης δείχνει τα χαρακτηριστικά του pCR 2.1 – TOPO και την ακολουθία που περιβάλλει την TOPO περιοχή κλωνοποίησης. Οι θέσεις περιοριστικών ενζύμων έχουν τοποθετηθεί ως ταμπέλες για να δηλώσουν την ενεργή περιοχή όπου κόβουν.

β) Διαδικασία κλωνοποίησης

1. Προϊόν της PCR (DNA *crystata*)
2. Τοποθέτηση για 5 min στους 95 °C.
3. Προσθήκη 10 mM dATP και 1 unit Taq.
4. Τοποθέτηση για 15 min στους 70 °C.
5. Χρήση του ΚΙΤ TOPOTA (Invitrogen)

Μέσα σε ένα eppendorf τοποθετείται 0.5 μl το προϊόν του βήματος 4, 1 μl άλας του ΚΙΤ, 1 μl Τορον και νερό 3.5 μl.

6. Επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.

7. Προσθήκη βακτηρίων DH5A (*E. coli*).

Για την παραγωγή του ανασυνδιασμένου με την ένθεση πλασμίδιο σε μεγάλες ποσότητες και τη δημιουργία σταθερών κλώνων, ήταν απαραίτητη η εισαγωγή του σε κάποιο κύτταρο ξενιστή. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ικανά προς μετασχηματισμό DH5A βακτηριακά κύτταρα (GIBCO-BRL), ένα τροποποιημένο στέλεχος του (*E. coli*) που παρέχει την αντίδραση της α-συμπληρωματικότητας με το α-τμήμα του γονιδίου *lacZ* που προέρχεται από το πλασμίδιο.

8. Επώαση για 30 min σε πάγο.

9. Επώαση για 2 min στους 42 °C (θερμικό σοκ).

10. Τοποθέτηση σε πάγο.

11. Προσθήκη 1 μl LB*².

13. Επώαση για 1h στους 37 °C.

14. Φυγοκέντρωση ~ 20 sec για να συγκεντρωθούν τα κύτταρα.

15. Προσθήκη μικρής ποσότητας στο κέντρο του τρυβλίου που περιείχε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB³ που περιέχει (ανά ml μέσου) αμικικιλίνη σε συγκέντρωση 0.1 μg/ml, 2 μl X-GAL⁴ και 2.5 μl IPTG⁵ 200 μg/ml και στρώνουμε με πιπέτρα παστέρ.

16. Τα τρυβλία τοποθετούνται στους 37 °C όλη νύχτα.

γ) Επιλογή μετασχηματισμένων κυττάρων

Βακτηριακά κύτταρα τα οποία έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο αναπτύσσονται στο μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό, μια και το πρώτο φέρει στην κατασκευή του γονιδίου ανθεκτικότητας. Αν το πλασμίδιο δε φέρει την ένθεση και επομένως δε διακόπτεται η δράση του α-τμήματος του γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης, με βάση την αντίδραση α-συμπληρωματικότητας το ένζυμο διασπά το χρωμογόνο υπόστρωμα X-GAL και παράγεται ένωση που χρωματίζει μπλε τις αποικίες, (Το IPTG απενεργοποιεί τον καταστολέα του γονιδίου *lacZ* για την περαιτέρω επαγωγή της μεταγραφής του). Αν υπάρχει η ένθεση οι αποικίες είναι λευκές.

² LB(υγρό) θρεπτικό υπόστρωμα: Πεπτόνη 10 g/l, εκχύλισμα ζύμης 5 g/l, NaCl 10 g/l.

³ LB(στερεό) θρεπτικό υπόστρωμα: Πεπτόνη 10 g/l, εκχύλισμα ζύμης 5 g/l, NaCl 10 g/l, άγαρ 14g/l.

⁴ X-GAL: (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλο-β-D-γαλακτοζιτής) 2% (w/v) σε N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο

⁵ IPTG: (ισοπρόπυλο-θείο-β-D-γαλακτοζιτής) υδατικό διάλυμα 200 μg/ml.

Επιλέχθησαν, έτσι, οι αποικίες που ήταν λευκές και έγινε έλεγχος της ύπαρξης ένθεσης στον πλασμιδιακό φορέα. Μονές αποικίες μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας σε γυάλινο μπουκάλι με 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB στο οποίο είχε προστεθεί αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C υπό ανακίνηση (~200 rpm) για μια νύχτα.

δ) Απομόνωση πλασμιδίου από βακτηριακά κύτταρα - Αλκαλική λύση

1.5 ml καλλιέργειας βακτηρίων της προηγούμενης παραγράφου φυγοκεντρήθηκαν σε σωλήνες erpendorf στις 13000 rpm για 2 min για την καταβύθιση των κυττάρων. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου ακολούθησαν τα ακόλουθα βήματα:

- α. Προσθήκη 100 μl δ/τος S1⁶, αναδιάλυση με τη βοήθεια πιπέτας, Προσθήκη 1 μl RNaseA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, προσθήκη 100 μl δ/τος S2⁷ και ανακίνηση.
- β. Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 100 μl δ/τος S3⁸, ανάδευση και διατήρηση σε πάγο για 10-20 min.
- γ. φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 15 min, παραλαβή και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf.
- δ. Προσθήκη 2 όγκων παγωμένης αιθυλικής αλκοόλης (100%) και αναδεύουμε.
- ε. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
- ζ. Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 10 min.
- η. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 30 μl νερού.
- θ. Αποθήκευση στους -20 °C.

ε) Έλεγχος ύπαρξης της ένθεσης στον πλασμιδιακό φορέα

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα πλασμίδια που απομονώθηκαν από τα βακτηριακά κύτταρα έφεραν ως ένθεση κάποια αλληλουχία ρετρομεταθετού στοιχείου χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω τεχνική:

Διπλή πέψη πλασμιδίου

Σε όγκο αντίδρασης 20 μl και παρουσία 2 μl κατάλληλου διαλύματος πέψης (10xNEB₂) ώστε τα δύο περιοριστικά ένζυμα να παρουσιάζουν τη μέγιστη δραστηριότητα τους, προστέθηκαν 4 μl δείγματος πλασμιδίου, 0.25 μl για καθένα από τα *EcoRI* και *HindIII*

⁶ S1: 50 mM glucose, 25 mM Tris (ph=8), 10 mM EDTA (ph=8)

⁷ S2: 0.2 N NaOH, 1% SDS

⁸ S3: 3M CH₃COOK, 5M CH₃COOK

(BioLabs) και συμπληρώθηκε ο όγκος με νερό. Ακολούθησε επώαση για ~1 h στους 37 °C. Τα δύο αυτά ένζυμα αναγνωρίζουν και κόβουν τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες 5'-G[^]AATTC-3' και 5'-A[^]AGCTT-3' αντίστοιχα, οι οποίες βρίσκονται αριστερά και δεξιά της θέσης κλωνοποίησης του *SmaI* στο πλασμίδιο, ελευθερώνοντας έτσι την πιθανή ένθεση. 2 μl της πένης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αгарόζης 0.8%.

4.2.8.3 Εύρεση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε κλώνους *Ty1-copia* ρετρομεταθετών στοιχείων

Μετά την επιβεβαίωση ότι το πλασμίδιο έφερε το ένθεμα, απομονώθηκε «καθαρό» πλασμιδιακό DNA από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* και στάλθηκε για αλληλούχιση στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (Ηράκλειο, Κρήτη).

Μετά την αποστολή της αλληλουχίας συγκρίθηκε με άλλες γνωστές κατατεθειμένες αλληλουχίες ρετρομεταθετών στη βάση δεδομένων της NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) για την επιβεβαίωση ότι το ένθεμα ήταν της μορφής *Ty1-copia*.

4.2.9 Προσδιορισμός αριθμού αντιγράφων των *Ty1-copia* ρετρομεταθετών στοιχείων με τη μέθοδο της ημιποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (semi-quantitative PCR)

Ο έλεγχος των αριθμών αντιγράφων των ρετρομεταθετών στοιχείων μεταξύ της *cristata* και κανονικής μορφής έγινε με τη βοήθεια της ημιποσοτικής PCR. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση πρέπει να ξεκινάμε από ισοποσότητα DNA ή cDNA και να καθορίσουμε τους κύκλους της αντίδρασης πριν αυτή πιάσει το σημείο κορεσμού. Είναι μια τεχνική όπου πρέπει να υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, για να εμφανιστεί στην ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.

α) Προσδιορισμός ισοποσοτήτων DNA και cDNA

Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις DNA και cDNA από τα δείγματα και χρησιμοποιήθηκαν σε PCR με τους εκκινητές του γονιδίου της ακτίνης. Η αλληλουχία των εκκινητών ήταν:

G-actin-R: 5'...GTAGATGGGGACGGTGTGAG...3'

G-actin-L: 5'...ATTGTGAGCAACTGGGATGA...3'

Τα συστατικά της αντίδρασης ήταν:

I) 10 μ l ρυθμιστικό διάλυμα (10x), II) 3 μ l MgCl₂ (15 mM), III) 1 μ l DNTP (10 μ M), IV) 1.5 μ l εκκινητής G-actin-R (50 mM), V) 1.5 μ l εκκινητής G-actin-L (50 mM), VI) 0.2 u Taq, VII) 30,8 μ l νερό VIII) 20 ng DNA .

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 94 °C για 2 min, 44 κύκλοι στους 94 °C για 30 sec, στους 50 °C για 30 sec, στους 72 °C για 1 min, και τελειώνοντας στους 72 °C για 10 min.

Για να βρεθεί η κατάλληλη αραιώση τα προϊόντα της αντίδρασης ανιχνεύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης 1.2%.

β) Προσδιορισμός των κύκλων της αντίδρασης

Με ισοποσότητες DNA πραγματοποιήθηκε PCR με τους εκκινητές του γονιδίου της ακτίνης με σκοπό να λαμβάνονται 5 μ l δείγματος μετά τον 28, 31, 34, 37, 40, 43 κύκλο καθώς και μετά το τέλος της αντίδρασης. Τα συστατικά της αντίδρασης ήταν ίδια με την προηγούμενη παράγραφο.

Τα προϊόντα της αντίδρασης ανιχνεύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης 1.2% με σκοπό να καθοριστεί ο κατάλληλος κύκλος στον οποίο η αντίδραση δεν έχει φτάσει σε κορεσμό.

γ) PCR με τους εκκινητές για το RT γονίδιο

Μετά το καθορισμό του κατάλληλου κύκλου και των ισοποσοτήτων του DNA και cDNA, πραγματοποιήθηκε νέα PCR με τους εκκινητές για το RT γονίδιο (C190/C191). Τα συστατικά της αντίδρασης ήταν:

I) 10 μ l ρυθμιστικό διάλυμα (10x), II) 3 μ l MgCl₂ (15 mM), III) 1 μ l DNTP (10 μ M), IV) 1.5 μ l εκκινητής C190 (10 pmol), V) 1.5 μ l εκκινητής C191 (10 pmol), VI) 0.2 u Taq, VII) 30,8 μ l νερό VIII) 20 ng DNA .

Τα προϊόντα της αντίδρασης ανιχνεύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης 1.2% με σκοπό να προσδιοριστεί η σχέση στον αριθμό αντιγράφων των ρετρομεταθετών στοιχείων μεταξύ των δύο μορφών (*cristata* και κανονικής) ανάλογα με τη διαφορά της έντασης της ζώνης στο ηλεκτροφόρημα.

4.3 Αποτελέσματα επιγενετικής ανάλυσης του φαινομένου της δεσμίωσης στα παχύφυτα

4.3.1 Μέτρηση συγκέντρωσης DNA και RNA

Για να προσδιοριστεί η ποσότητα DNA που προέκυψε από την απομόνωση από δείγματα της δεσμιομένης (*cristata*) και κανονικής μορφής των παχυφύτων *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”, *Euphorbia pugniformis*, *Mammillaria elongata* χρησιμοποιήθηκε ο τύπος της παραγράφου 4.2.4. Έτσι στον πίνακα 42 αναφέρεται η ποσότητα του DNA τόσο της *cristata* όσο και της κανονικής μορφής των παχυφύτων.

Πίν. 42. Ποσοτικοποίηση του DNA *cristata* και κανονικής μορφής των παχυφύτων *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”, *Euphorbia pugniformis*, *Mammillaria elongata*.

	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	Ποσότητα DNA (μg/μl)
<i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i> “Grey Ghost”			
<i>cristata</i>	0.011	0.007	75
κανονική	0.006	0.003	137.5
<i>Euphorbia pugniformis</i>			
<i>cristata</i>	0.004	0.002	20
κανονική	0.005	0.003	25
<i>Mammillaria elongata</i>			
<i>cristata</i>	0.002	0.001	10
κανονική	0.004	0.001	20

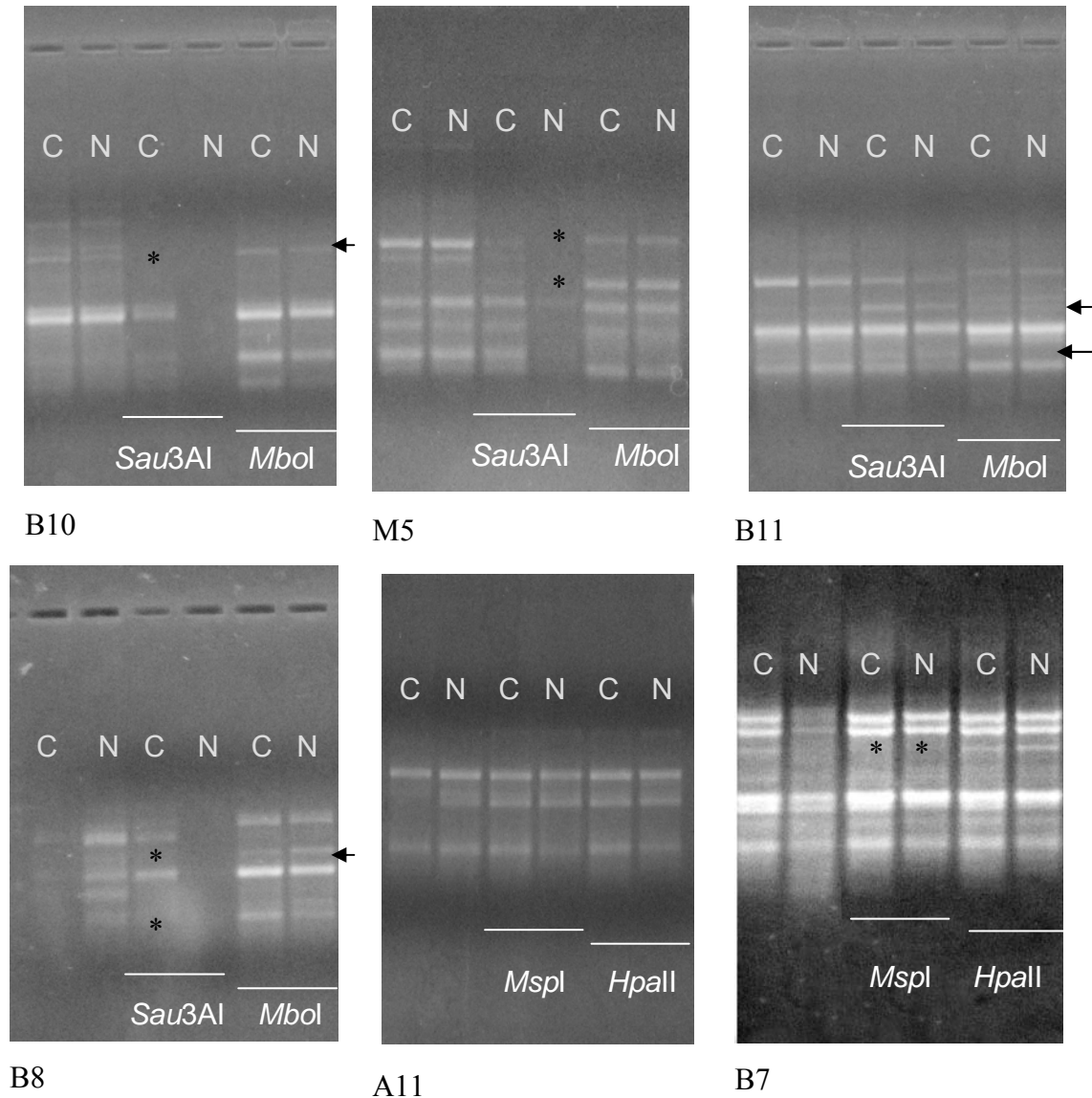
Αντίστοιχα για τον προσδιορισμό της ποσότητας RNA που προέκυψε από την απομόνωση από δείγματα της δεσμιομένης και κανονικής μορφής των παχυφύτων *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”, *E. pugniformis* και *Mammillaria elongata* στα πειράματα ύπαρξης ρετρομεταθετών στοιχείων, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος της παραγράφου 4.2.4. για το RNA. Έτσι στον πίνακα 43 αναφέρεται η ποσότητα του RNA τόσο της *cristata* όσο και της κανονικής μορφής των παχυφύτων.

Πίν. 43. Ποσοτικοποίηση του RNA δεσμιωμένης και κανονικής μορφής των παχυφύτων *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”, *Euphorbia pugniformis*, *Mammillaria elongata*.

	OD₂₆₀	OD₂₈₀	Ποσότητα RNA (μg/μl)
<i>Euphorbia lactea</i> var. <i>cristata</i> “Grey Ghost”			
<i>cristata</i>	0.004	0.003	32
κανονική	0.001	0.000	8
<i>Euphorbia pugniformis</i>			
<i>cristata</i>	0.002	0.001	8
κανονική	0.004	0.002	16
<i>Mammillaria elongata</i>			
<i>cristata</i>	0.004	0.002	16
κανονική	0.004	0.002	16

4.3.2 Ύπαρξη μεθυλίωσης στο γονιδίωμα της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”

Ο έλεγχος της ύπαρξης μεθυλίωσης (εύρεση μεθυλιωμένων περιοχών) στο γονιδίωμα της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” έγινε με τη χρήση δύο ζευγών ισοσχιζομερών ενζύμων, *Sau3AI* – *MboI* και *HpaII* – *MspI*. Τα δύο ζεύγη αναγνωρίζουν τις ακολουθίες GATC και CCGG, αντίστοιχα. Τα ένζυμα *MboI* και *MspI* έχουν την ικανότητα να κόβουν στις θέσεις αναγνώρισης ακόμη και όταν αυτές είναι μεθυλιωμένες.



Εικ. 36. Ηλεκτροφορήματα πέψης με ένζυμα περιορισμού (*Sau3AI* – *MboI* και *HpaII* – *MspI*) δεσμιωμένης (C) και κανονικής (N) μορφής της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” και προϊόντα PCR με 6 τυχαίους εκκινητές.

Τα αποτελέσματα της πέψης με το γονιδιωματικό DNA κανονικών και δεσμιωμένων μορφών, μετά το καθαρισμό τους, χρησιμοποιήθηκαν σε αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με 51 τυχαίους δεκαμερείς εκκινητές (RAPD-PCR) (κεφ. 4.2.6.2) και τα προϊόντα τους διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

Μετά τον έλεγχο όλων των προτύπων της πέψης με τους 51 RAPD εκκινητές (Πίν. 44, Σχ. 72) βρέθηκε ότι το 47% των εκκινητών έδωσαν 4 με 8 ζώνες, ενώ το 25% αυτών έδωσε από μια έως 3 ζώνες. Τέλος, το 21% των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν δεν έδωσαν καμία ζώνη. Σε έξι εκκινητές παρατηρήθηκε διαφορά στο πρότυπο της μεθυλίωσης με τα ένζυμα *Sau3AI* – *MboI*. Στους εκκινητές B10, M5, B11, B8 και B7 (Εικ. 36) παρατηρήθηκαν διαφορές στο πρότυπο της πέψης τόσο της δεσμιωμένης όσο και της κανονικής μορφής, που σημαίνει ότι το φυτό παρουσιάζει μεθυλίωση. Η σύγκριση των προτύπων της πέψης μεταξύ των δύο μορφών (*cristata* και κανονική) δεν έδειξε διαφορές μεταξύ των, που πιθανόν να σημαίνει ότι το φαινόμενο της δεσμίωσης δεν οφείλεται σε εκτεταμένες αλλαγές στο πρότυπο της μεθυλίωσης (Tsaftaris and Polidoros, 2000).

Επίσης, η μη ύπαρξη διαφορών στα πρότυπα της πέψης μεταξύ των δύο μορφών δεν συνεπάγεται και μη ύπαρξη μεθυλίωσης γιατί η μεθυλίωση μπορεί να βρίσκεται σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο που μεταπίπτει μεταξύ ενεργών και ανενεργών φάσεων όπως συμβαίνει με το στοιχείο Ac στο wx-m7 στο καλαμπόκι (McClintock, 1963). Η ανενεργή Ac ακολουθία δεν ήταν ευπαθής στην πέψη με ένζυμα ευαίσθητα ή μη στη μεθυλίωση (Bennetzen, 1987), ενώ χρησιμοποιώντας διαφορετικά ένζυμα οι Chomet *et al.* (1987) βρήκαν ότι η ανενεργή Ac ακολουθία ήταν μεθυλιωμένη ενώ η ενεργή Ac υπομεθυλιωμένη.

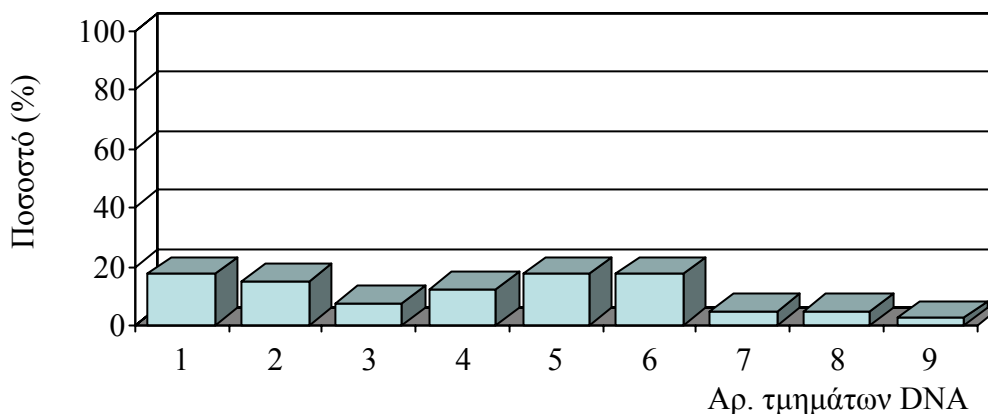
Πίν. 44. Αριθμός τμημάτων DNA δεσμωμένης (C) και κανονικής (N) μορφής της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”, ύστερα από την πέψη τους με τα ένζυμα περιορισμού *Sau3AI*, *MboI*, *MspI*, *HpaII* και την τυχαία ενίσχυση με 51 εκκινητές (CRED-RA).

A/A	Εκκινητής	RAPD		CRED-RA							
		DNA		Ένζυμα Περιορισμού							
		C	N	<i>Sau3AI</i>		<i>MboI</i>		<i>MspI</i>		<i>HpaII</i>	
		C	N	C	N	C	N	C	N	C	N
1	A1	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-
2	A2	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-
3	A3	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-
4	A4	5	5	5	5	5	5	3	3	4	4
5	A9	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-
6	A11	8	8	6	6	6	6	8	8	8	8
7	B1	6	6	6	6	6	6	-	-	-	-
8	B3	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-
9	B5	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-
10	B6	4	4	4	4	3	3	-	-	-	-
11	B7	7	7	3	3	6	6	6	6	6	6
12	B8	5	5	5	5	5	5	-	-	-	-
13	B10	3	3	2	2	5	5	-	-	-	-
14	B11	3	3	3	3	4	4	3	3	2	2
15	B13	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
16	B14	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
17	B15	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-
18	B16	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
19	B18	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
20	C13	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
21	E2	6	6	6	6	6	6	-	-	-	-

22	L4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	L8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	L12	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
25	L14	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
26	L15	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
27	L19	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
28	M4	5	5	4	4	4	4	-	-	-	-
29	M5	5	5	4	4	5	5	-	-	-	-
30	M6	8	8	8	8	8	8	-	-	-	-
31	M8	5	5	5	5	5	5	-	-	-	-
32	M9	7	7	6	6	5	5	-	-	-	-
33	M10	5	5	2	2	2	2	-	-	-	-
34	M11	5	5	5	5	5	5	-	-	-	-
35	M12	8	8	6	6	6	6	-	-	-	-
36	M13	5	5	5	5	5	5	-	-	-	-
37	M14	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-
38	M15	4	4	5	5	5	5	-	-	-	-
39	M16	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-
40	M17	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-
41	M18	7	7	7	7	7	7	-	-	-	-
42	M19	8	8	9	9	9	9	-	-	-	-
43	M20	7	7	6	6	6	6	-	-	-	-
44	N2	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
45	N5	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
46	N7	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
47	N8	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
48	N9	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
49	N20	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-

50	O1	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
51	O7	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
52	P3	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-

- δεν έγινε η πέψη



Σχ. 72. Ποσοστό εκκινητών που έδωσαν μετά από την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *Sau3AI*, *MboI*, *MspI*, *HpaII* από 1εώς 9 τμήματα DNA.

4.3.3 Επίδραση της 5-Azacytidine στο υπόστρωμα καλλιέργειας εκφύτων της *Euphorbia lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”

Εκτός από τις άμεσες μεθόδους προσδιορισμού της μεθυλίωσης (π.χ. Ένζυμα περιορισμού, CRED-RA κ.α.) στο γονιδίωμα της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” χρησιμοποιήθηκε και ένας έμμεσος τρόπος, όπως η χρήση της 5-Azacytidine, που όπως αναφέρθηκε προκαλεί τη μείωση της μεθυλιωμένης κυτοσίνης. Η εφαρμογή της, προκαλεί την ενεργοποίηση γονιδίων που εξαιτίας της μεθυλίωσης είχαν σιγήσει (Razin *et al.*, 1984). Στόχος του πειράματος ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της 5-Azct κατά την *in vitro* καλλιέργεια εκφύτων δεσμιωμένων βλαστών της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” στη διατήρηση της δεσμίωσης κατά τη βλαστογέννηση.

Έκφυτα κορυφής της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” τοποθετήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS (0.1 mg l⁻¹ NAA και BA) με 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 μM της 5-Azacytidine (κεφ. 4.2.7.2). Ο αριθμός των εκφύτων ανά επέμβαση ήταν 18 (3 έκφυτα ανά βάζο καλλιέργειας) και χρησιμοποιήθηκαν μόνο έκφυτα κορυφής.

Μετά τον πρώτο μήνα καλλιέργειας διαφοροποιήθηκαν δύο είδη βλαστών. Οι μεν πρώτοι έμοιαζαν από την αρχή με τη δεσμωμένη μορφή ενώ οι άλλοι έδειχναν μακρόστενοι και ταυτόχρονα πεπλατυσμένοι. Οι πρώτοι μετρήθηκαν ως *cristata* (C) (Εικ. 37α), ενώ οι άλλοι ως κανονικοί βλαστοί (N) (Εικ. 37β). Οι παραγόμενοι βλαστοί (*cristata* και κανονικοί) σχηματίστηκαν κατευθείαν πάνω στα έκφυτα χωρίς τη μεσολάβηση κάλου. Σε μερικά έκφυτα ο κάλος συνυπήρχε με τους εκπυσσόμενους αναγεννημένους βλαστούς. Επίσης, παρατηρήθηκαν έκφυτα που σχημάτισαν *cristata* και κανονικούς βλαστούς (C+N) (Εικ. 37γ).



Εικ. 37. *In vitro* αναγεννημένος *cristata* βλαστός (α), κανονικοί βλαστοί (β), ανάμεικτος βλαστός (γ), της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” τρεις μήνες μετά την καλλιέργεια σε MS με 0.1 mg l^{-1} NAA και BA και 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 μM της 5-Azacytidine.

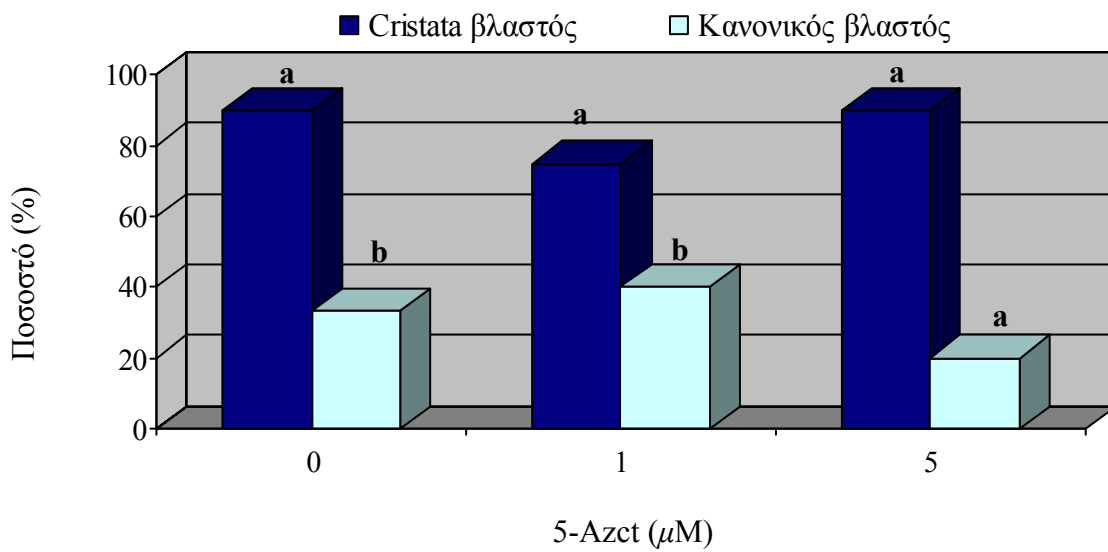
Η χρήση της 5-Azct στο υπόστρωμα τόσο στις 60 όσο και στις 90 ημέρες προκάλεσε μείωση των σχηματισθέντων *cristata* βλαστών στο υπόστρωμα (Πιν. 45), ενώ δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τη παραγωγή κανονικών και ανάμεικτων βλαστών. Η προσθήκη 100 μM 5-Azct στο υπόστρωμα καλλιέργειας, μείωσε την παραγωγή *cristata* βλαστών μετά από 90 ημέρες καλλιέργειας. Παρατηρήθηκε επίσης, μείωση στο ποσοστό των *cristata* βλαστών και στο 1 μM της 5-Azct. Για το λόγω αυτό το πείραμα επαναλήφθηκε για τα υποστρώματα 0, 1 και 5 μM της 5-Azct και βρέθηκε ότι η προσθήκη 5 μM 5-Azct μείωσε τους αναγεννημένους κανονικούς βλαστούς ενώ δεν επηρέασε το σχηματισμό *cristata* βλαστών (Σχ. 73). Το πείραμα δεν έγινε για όλες τις επεμβάσεις με 5-Azct, λόγω του περιορισμένου μητρικού υλικού. Αντίστοιχη μείωση των *cristata* βλαστών παρατηρήθηκε και στη δοκιμή που έγινε με έκφυτα της *E. pugniformis* var. *cristata* (Σχ. 74).

Στις 90 ημέρες επίσης, μετρήθηκε και το ύψος των μικροβλαστών και παρατηρήθηκε ότι στα 100 μM της 5-Azct οι μικροβλαστοί ήταν κοντύτεροι (0.85 έναντι 1.85 cm σε σχέση με το μάρτυρα) (Πίν. 45).

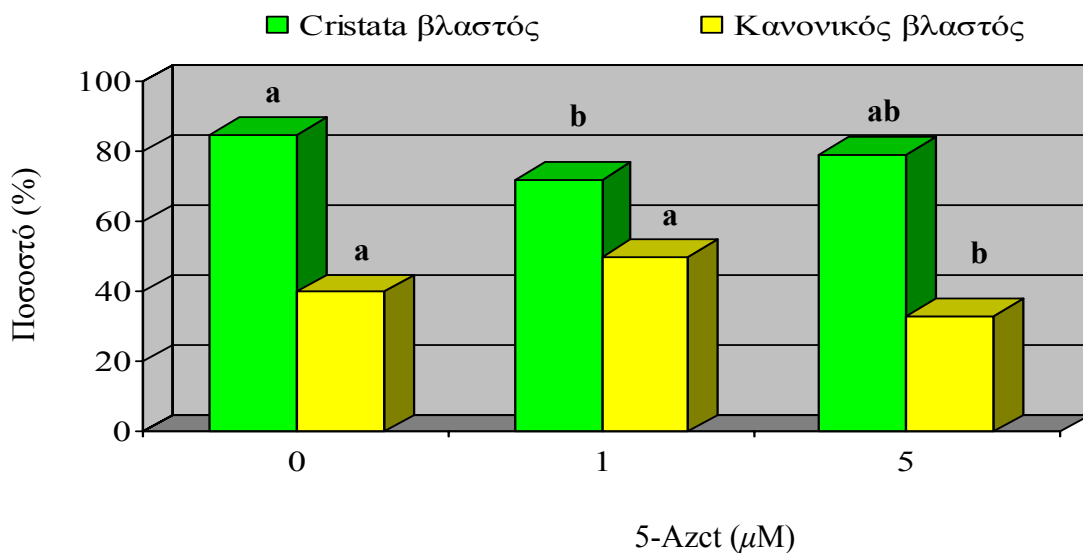
Πίν. 45. Ποσοστό εκφύτων κορυφής της *E. lactea cristata* var. *cristata* “Grey Ghost” που αντέδρασαν σχηματίζοντας *cristata* (C), κανονικούς (N) και ανάμεικτους βλαστούς (C+N), μετά από 60 και 90 ημέρες καλλιέργειας σε MS (0.1 mg l^{-1} NAA και BA) και 0, 1, 5, 10, 25, 50 ή 100 μM 5-Azacytidine. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=18$.

5-Azct (μM)	60 ημέρες			90 ημέρες			Ύψος μικροβλαστών (cm)
	C (%)	N (%)	C+N (%)	C (%)	N (%)	C+N (%)	
0	100 a	33	33	89 a	33	33	1.85 a
1	55 ab	50	67	55 b	44	67	2.13 a
5	78 ab	27	33	83 ab	28	39	1.99 a
10	93 ab	40	40	93 ab	33	40	2.09 a
25	86 ab	33	33	93 ab	40	40	1.57 ab
50	77 ab	22	28	80 ab	67	33	1.54 ab
100	67 b	22	22	67 b	22	22	0.85 b
	F*	F ^{ns}	F ^{ns}	F*	F ^{ns}	F ^{ns}	F*

* : η τιμή του F είναι σημαντική σε $P=0.05$, NS : η τιμή του F δεν είναι. Μέσοι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα του λατινικού αλφάβητου δε διαφέρουν σε $P=0.05$.



Σχ. 73. Ποσοστό εκφύτων της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” που αντέδρασαν σχηματίζοντας *cristata* και κανονικούς βλαστούς, όταν καλλιεργήθηκαν σε MS (0.1 mg l⁻¹ NAA και BA) με 0, 1 ή 5 μM 5-Azct, μετά από 90 ημέρες καλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=18$.



Σχ. 74. Ποσοστό εκφύτων της *E. rugiformis* var. *cristata* που αντέδρασαν σχηματίζοντας *cristata* και κανονικούς βλαστούς, όταν καλλιεργήθηκαν σε MS (0.1 mg l⁻¹ NAA και BA) με 0, 1 ή 5 μM 5-Azct, μετά από 90 ημέρες καλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Tukey-Kramer HSD, $P=0.05$, $n=18$.

4.3.4 Απομόνωση και χαρακτηρισμός *TyI*-coria ρετρομεταθετών στοιχείων στην *Euphorbia lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”

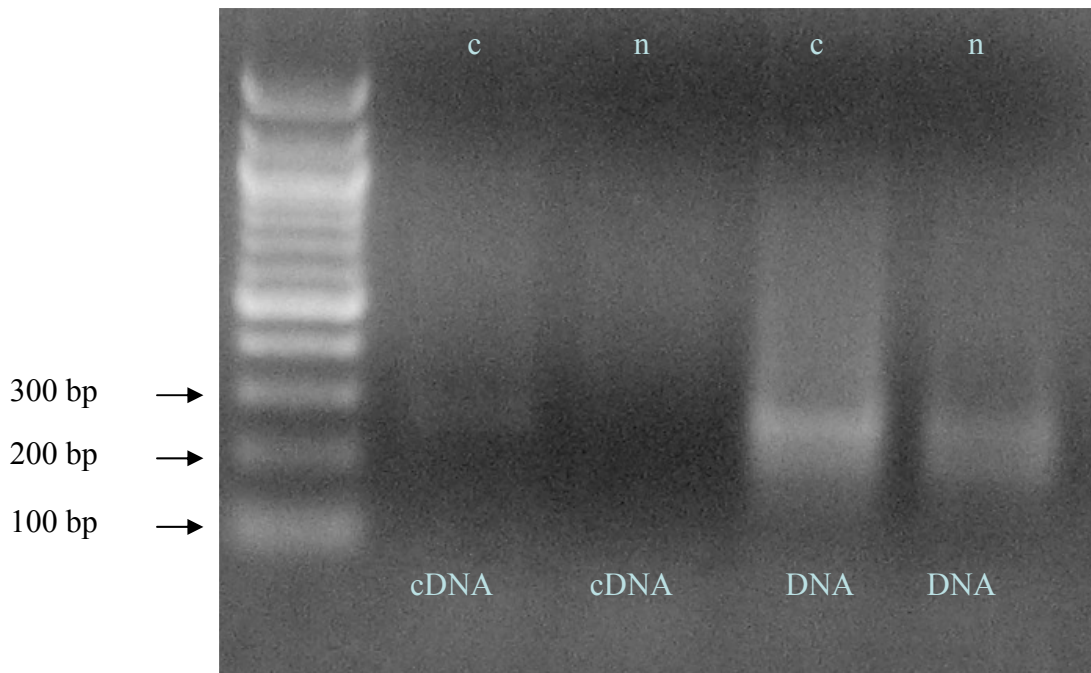
Τα ρετρομεταθετά στοιχεία στα φυτά επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων που παραμένουν ανενεργά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών, ενώ ενεργοποιούνται μετά από έντονη καταπόνηση του.

Στόχος των πειραμάτων ήταν η απομόνωση της ομάδας *TyI*-coria ρετρομεταθετών στοιχείων από το γονιδίωμα της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”, μιας ομάδας που είναι ευρέως διαδεδομένη στο γονιδίωμα των φυτικών ειδών με τη βοήθεια του γονιδίου *RT* που περιέχει το ρετρομεταθετό και είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση DNA μορίου από RNA. Για την επιβεβαίωση ύπαρξής του έγινε κλωνοποίηση και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και τέλος προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων *TyI*-coria της δεσμιωμένης και κανονικής μορφής της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”.

4.3.4.1 Απομόνωση *TyI*-coria ρετρομεταθετών στοιχείων με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και κλωνοποίηση των προϊόντων

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ρετρομεταθετών στοιχείων του τύπου *TyI*-coria από γονιδιωματικό DNA και cDNA της δεσμιωμένης και κανονικής μορφής της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”. Επιλέχθηκαν δύο εκκινητές των οποίων η νουκλεοτιδική αλληλουχία αντιστοιχεί στα συντηρημένα αμινοξικά άκρα TAFLHG και YVDDML μιας εσωτερικής περιοχής του γονιδίου της ανάστροφης μεταγραφάσης (*RT*) των στοιχείων αυτών (κεφ. 4.2.8.1).

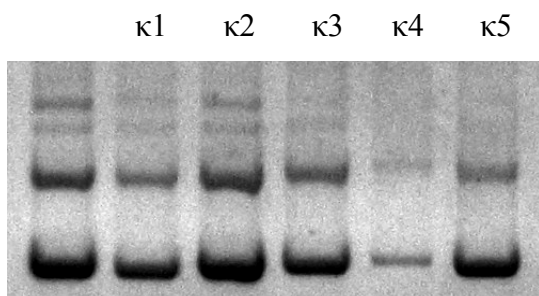
Το ετερογενές προϊόν PCR ανιχνεύθηκε ηλεκτροφορητικά και το μέγεθός του εκτιμήθηκε στις 260 περίπου βάσεις (Εικ. 38). Όπως φαίνεται στην Εικ. 36, εμφανίζεται τόσο στο γονιδιωματικό DNA και των δύο μορφών όσο και στο cDNA της δεσμιωμένης μορφής.



Εικ. 38. Ολικό γονιδιωματικό DNA και cDNA από δεσμωμένο (c) και κανονικό βλαστό (n) της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” όπου ενισχύθηκε με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για το *RT* γονίδιο.

4.3.4.2 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε κλώνο *Ty1-copia* ρετρομεταθετών στοιχείων

Ακολούθησε κλωνοποίηση αυτού στον πλασμιδιακό φορέα PUC. Για τον έλεγχο της ύπαρξης της αλληλουχίας του ρετρομεταθετού στοιχείου στα πλασμίδια που απομονώθηκαν από τα βακτηριακά κύτταρα έγινε διπλή πέψη πλασμιδίου με τα ένζυμα *EcoRI* και *HindIII* και στους πέντε κλώνους (κεφ. 4.2.8.2). Τα προϊόντα της διπλής πέψης φαίνονται στην Εικ. 39 όπου και στους πέντε κλώνους εμφανίζεται η αλληλουχία του ρετρομεταθετού στοιχείου.



Εικ. 39. Επιβεβαίωση ύπαρξης αλληλουχίας ρετρομεταθετού στοιχείου σε πέντε κλώνους (κ1,κ2,κ3,κ4,κ5) πλασμιδίου.

Από τους πέντε κλώνους που απομονώθηκαν ένας στάλθηκε για αλληλούχιση σε εργαστήριο στη Κρήτη (κεφ. 4.2.8.3). Το αποτέλεσμα της αλληλούχισης δίνεται στον Πίν. 46.

Πίν. 46. Νουκλεοτιδική αλληλουχία βάσεων *Ty1*-coria ρετρομεταθετών στοιχείων (μέγεθος περίπου 264 βάσεις) και η αναμενόμενη αμινοξική αλληλουχία.

Νουκλεοτιδική αλληλουχία
ACGGCCTTCCTACACGGTACTTTGGAAGAACCAGTGTTTATGAAGCAGCCGGTTG GTTTTGTGGATCCAAAAAACCTCAATATGTTTGTGCTATTTGCAAGTCTATTTAC AGCCTAAAACAATCATCAAGAAATGTGGCACAAACGGCTTACTCAGGCACTTTTGG ATTTTGGATTTTGGGTTCTAAGGCAGATGTTTCCCTGTACATGCTTTGGGCTGGT ACATCTCTCTTTTATGTTTAATTTATGTGCGACGATATGTTA
Αμινοξική αλληλουχία
TAFLHGTLEEPVFMKQPVGFDPKKQYVCAICKSIYSLKQSSRMWHKRLTQALLDF GFLGSKADVSLYMLWAGTSLLLCLIYVDDML

Νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία με άλλα είδη

Η αναζήτηση ομολογίας στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων GenBank/EMBL αποκάλυψε ότι ο κλώνος ήταν ομόλογος του *RT* γονιδίου ρετρομεταθετών στοιχείων τύπου *Ty1*-coria που έχει απομονωθεί από άλλα φυτικά είδη. Τα υψηλότερα ποσοστά ομολογίας (65-80%) ρετρομεταθετών στοιχείων με τον κλώνο που απομονώθηκε βρέθηκε να είναι για τα εξής φυτικά είδη: *Orobancha ramosa*, *Oryza sativa*, *O. longistaminata*, *Prunus mume*, *Beta vulgaris*, *Arabidopsis thaliana*, *Citrus sinensis* κ.α.

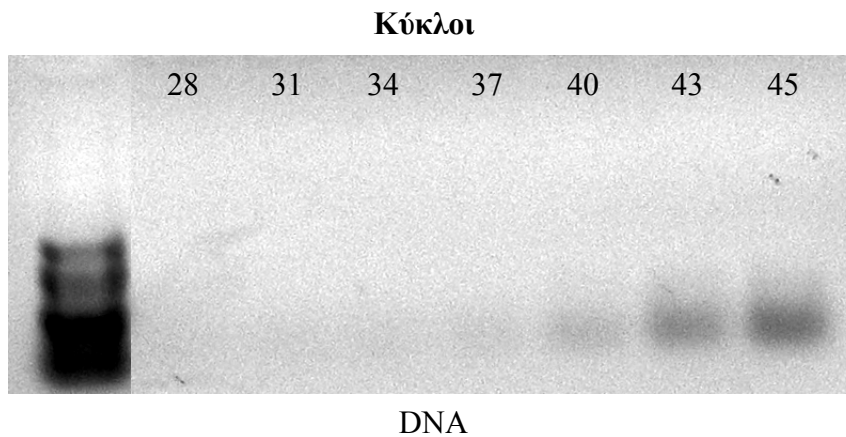
4.3.4.3 Προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων *Ty1*-coria ρετρομεταθετών στοιχείων σε δεσμιωμένη και κανονική μορφή της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”

Η τεχνική της ημιποσοστικής PCR (κεφ. 4.2.9.1) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του αριθμού αντιγράφων των *Ty1*-coria στοιχείων σε γονιδιωματικό DNA.

Προσδιορισμός των κύκλων της αντίδρασης.

Ο προσδιορισμός των κύκλων της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με εκκινητές για το γονίδιο της ακτίνης. 5 μl δείγματος συλλέγονταν μετά τον 28, 31, 34, 37, 40, 43 κύκλο καθώς και μετά το τέλος της αντίδρασης. Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν (Εικ. 40).

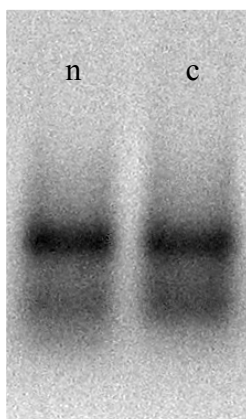
Παρατηρήθηκε ότι ο 45 κύκλος ήταν ικανοποιητικός για να πραγματοποιηθούν οι υπόλοιπες αντιδράσεις μιας και ο εκκινητής δεν είχε φτάσει στο σημείο κορεσμού.



Εικ. 40. Γονιδιωματικό DNA δεσμιωμένης μορφής της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” όπου ενισχύθηκε με την τεχνική της ημιποσοτητικής PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για το γονίδιο της ακτίνης (κύκλοι για δειγματοληψία 28, 31, 34, 37, 40, 43 και 45).

Προσδιορισμός ισοποσοτήτων DNA και cDNA

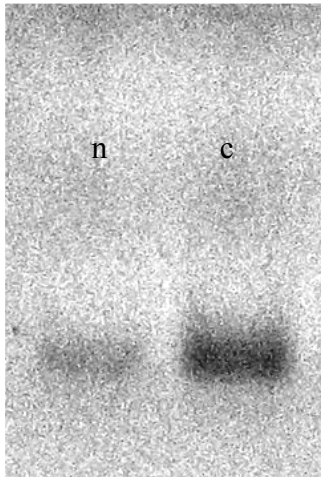
Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις DNA και cDNA από τη δεσμιωμένη και κανονική μορφή της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”. Η απόδειξη ότι τα δείγματα των αραιώσεων DNA και cDNA ήταν σε ισοποσότητες φαίνεται στην Εικ. 41.



Εικ. 41. Ισοποσότητες γονιδιωματικού DNA από δεσμιωμένο (c) και κανονικό βλαστό (n) της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” όπου ενισχύθηκε με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για το γονίδιο ακτίνης (κύκλοι PCR: 42).

Σύγκριση αριθμού αντιγράφων δεσμιωμένης και κανονικής μορφής

Ξεκινώντας από ισοποσότητες DNA *cristata* και κανονικής μορφής της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” πραγματοποιήθηκε νέα αντίδραση PCR στους 45 κύκλους. Το ηλεκτροφόρημα των προϊόντων φαίνεται στην Εικ. 42, όπου φαίνεται η δεσμιωμένη μορφή της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” να έχει μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων απ’ότι η κανονική μορφή.



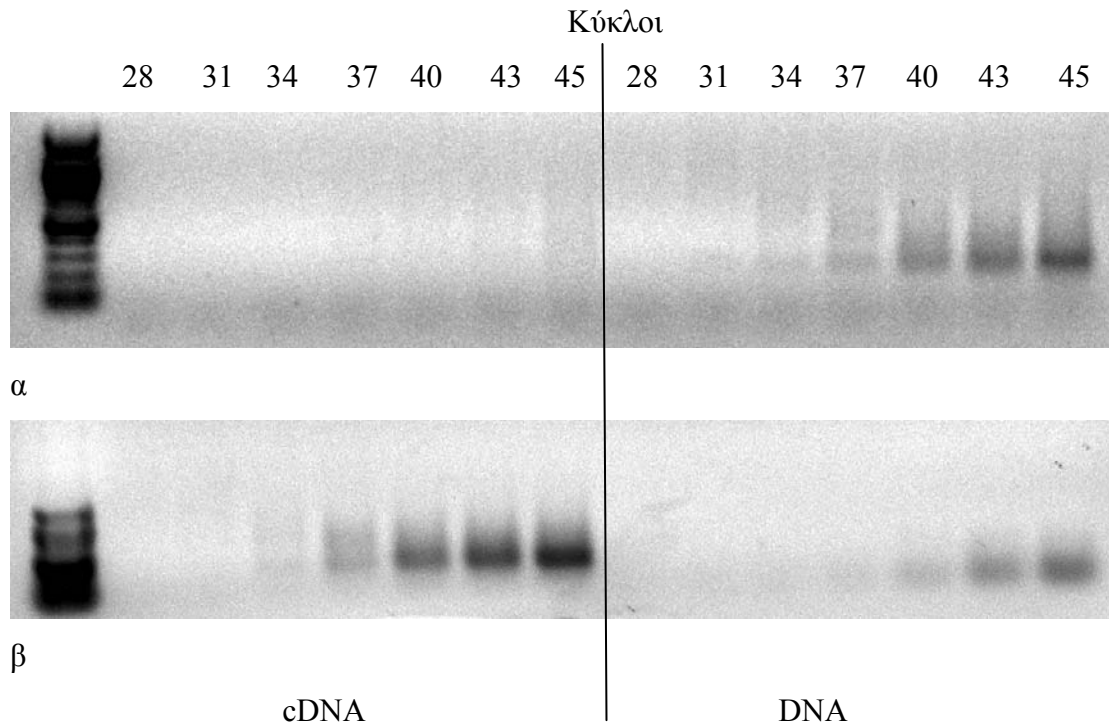
Εικ. 42. Ολικό γονιδιωματικό DNA από δεσμιωμένο (c) κανονικό βλαστό (n) της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” όπου ενισχύθηκε με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για το *RT* γονίδιο.

4.3.4.4 Προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων *Ty1-copia* ρετρομεταθετών στοιχείων σε δεσμιωμένη και κανονική μορφή των παχυφύτων *E. pugniformis* και *M. elongata*.

Η ίδια τεχνική της ημιποσοστικής PCR χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του αριθμού αντιγράφων των *Ty1-copia* στοιχείων σε γονιδιωματικό DNA σε δεσμιωμένη και κανονική μορφή των παχυφύτων *E. pugniformis* και της *M. elongata*.

Προσδιορισμός των κύκλων της αντίδρασης.

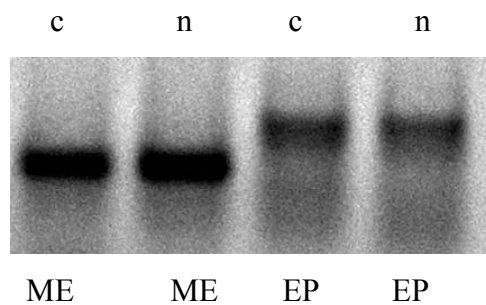
Ο προσδιορισμός των κύκλων της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με εκκινητές για το γονίδιο της ακτίνης. 5 μl δείγματος συλλέγονταν μετά τον 28, 31, 34, 37, 40, 43 κύκλο καθώς και μετά το τέλος της αντίδρασης. Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν (Εικ. 43). Παρατηρήθηκε ότι ο 45 κύκλος ήταν ικανοποιητικός για να πραγματοποιηθούν οι υπόλοιπες αντιδράσεις μιας και ο εκκινητής δεν είχε φτάσει στο σημείο κορεσμού.



Εικ. 43. Γονιδιωματικό cDNA και DNA δεσμιωμένης μορφής της *E. pugniiformis* (α) και της *M. elongata* (β) όπου ενισχύθηκαν με την τεχνική της ημιποσοτητικής PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για το γονίδιο της ακτίνης (κύκλοι για δειγματοληψία 28, 31, 34, 37, 40, 43 και 45).

Προσδιορισμός ισοποσοτήτων DNA και cDNA

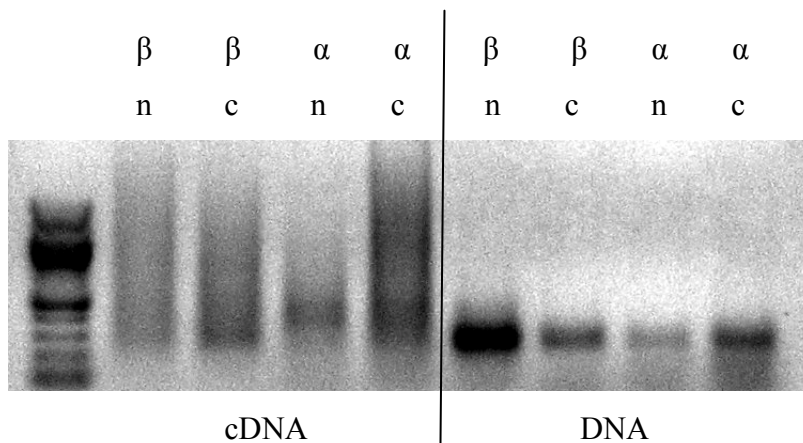
Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις DNA και cDNA από τη δεσμιωμένη και κανονική μορφή των *E. pugniiformis* και *M. elongata* (Εικ. 44).



Εικ. 44. Ισοποσότητες γονιδιωματικού DNA από δεσμιωμένο (c) και κανονικό βλαστό (n) των *E. pugniiformis* (EP) και *M. elongata* (ME), όπου ενισχύθηκε με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για το γονίδιο ακτίνης (κύκλοι PCR: 42).

Σύγκριση αριθμού αντιγράφων δεσμιωμένης και κανονικής μορφής

Ξεκινώντας από ισοποσότητες DNA δεσμιωμένων και κανονικών μορφών των *Euphorbia rugniformis* και *Mammillaria elongata*, πραγματοποιήθηκε νέα αντίδραση PCR στους 45 κύκλους. Το ηλεκτροφόρημα των προϊόντων φαίνεται στην Εικ. 45. Φαίνεται ότι η δεσμιωμένη μορφή της *E. rugniformis* έχει μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων απ'ότι η κανονική μορφή τόσο στο γονιδιωματικό DNA όσο και στο cDNA. Στην *M. elongata* φαίνεται ότι στο γονιδιωματικό DNA η δεσμιωμένη μορφή έχει λιγότερα αντίγραφα σε σχέση με την κανονική ενώ στο cDNA η δεσμιωμένη μορφή έχει περισσότερα αντίγραφα.



Εικ. 45. Γονιδιωματικό cDNA και DNA δεσμιωμένης (c) και κανονικής (n) μορφής της *E. rugniformis* (α) και της *M. elongata* (β) όπου ενισχύθηκε με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για το *RT* γονίδιο.

4.4 Συζήτηση – Συμπεράσματα

Η μεντελική γενετική είναι ένα από τα πιο επιτυχημένα ερμηνευτικά υποδείγματα της βιολογίας, που δίνει υπερβολική έμφαση στα γονίδια και χρωμοσώματα, αγνοώντας τους μηχανισμούς και τις διαδικασίες που είναι ουσιώδεις για την ανάπτυξη και τη λειτουργία των οργανισμών. Ο όρος «επιγενετική», ο οποίος αρχικά επινοήθηκε για να περιγράψει πως χρησιμοποιείται η γενετική πληροφορία κατά την ανάπτυξη, ώστε να δημιουργηθεί ένας οργανισμός, κατέληξε να αναφέρεται σε πολλά διαφορετικά φαινόμενα, τα οποία προκαλούν κληρονομήσιμες τροποποιήσεις του γενετικού υλικού, οι οποίες επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση, αλλά όχι την ίδια την αλληλουχία του γονιδιωματικού DNA (Watson, 2007).

Σε πολλά φυτά παρατηρείται συχνά το φαινόμενο της δεσμίωσης, όπου το κορυφαίο μερίστωμα χάνει τη σημειακή του μορφή και γίνεται γραμμικό. Στη βιβλιογραφία αυτό έχει αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες (Gorter, 1965, Gottschalk and Wolff, 1983, Binnggeli, 1990, Nadjimov *et al.*, 1999), αλλά κανένας εξ αυτών πειραματικά δεν έχει επιφέρει δεσμίωση έτσι ώστε να αποδοθεί σ' αυτόν η αιτία του φαινομένου της δεσμίωσης. Σκοπός της μελέτης του κεφαλαίου αυτού ήταν η ανάλυση του φαινομένου επιγενετικά στα παχύφυτα, καθώς όλοι οι παράγοντες στους οποίους είχε αποδοθεί η αιτία δεσμίωσης, προκαλούν έντονη καταπόνηση στο φυτό. Δυο τέτοια επιγενετικά φαινόμενα είναι η μεθυλίωση και τα ρετρομεταθετά στοιχεία. Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση της μεθυλίωσης καθώς και η ύπαρξη ρετρομεταθετών στοιχείων στα παχύφυτα *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”, *E. pugniformis* var. *cristata* και *M. elongata* var. *cristata*, μια και τα δυο φαινόμενα επιδρούν πάνω στην έκφραση – σίγαση γονιδίων κάτω από καταπόνηση.

Ο έλεγχος της ύπαρξης μεθυλίωσης στο DNA δεσμιωμένων και κανονικών βλαστών του ίδιου φυτού *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” έγινε με τη χρήση ενζύμων περιορισμού. Η μέθοδος αυτή παρέχει μια *χονδροειδή ποσοτικοποίηση* του γονιδιώματος (Steele-Scot *et al.*, 1984). Για να αποδειχθεί η ύπαρξη μεθυλίωσης στο φυτό πρέπει να διαφέρουν τα πρότυπα περιορισμού των δύο ενζύμων. Από την ανάλυση των δεδομένων παρατηρήθηκαν διαφορές στο πρότυπο της πέψης τόσο της δεσμιωμένης όσο και της κανονικής μορφής, που σημαίνει ότι το φυτό παρουσιάζει μεθυλίωση. Η σύγκριση των προτύπων της πέψης μεταξύ των δύο μορφών (*cristata* και κανονικοί βλαστοί) δεν έδειξαν διαφορές μεταξύ των, που πιθανόν να σημαίνει ότι το φαινόμενο της δεσμίωσης δεν οφείλεται σε εκτεταμένες αλλαγές στο πρότυπο της μεθυλίωσης (Tsafaris and Polidoros, 2000).

Η μη ύπαρξη διαφορών στα πρότυπα της πέψης μεταξύ των δύο μορφών δεν συνεπάγεται και μη ύπαρξη μεθυλίωσης, γιατί η μεθυλίωση μπορεί να βρίσκεται σε ένα

συγκεκριμένο γονίδιο που μεταπίπτει μεταξύ ενεργών και ανενεργών φάσεων (McClintock, 1963) όπως συμβαίνει με το στοιχείο Ac στο wx-m7 στο καλαμπόκι. Η ανενεργή Ac ακολουθία δεν ήταν ευπαθής στην πέψη με ένζυμα ευαίσθητα ή μη στη μεθυλίωση (Bennetzen, 1987), ενώ χρησιμοποιώντας διαφορετικά ένζυμα οι Chomet *et al.* (1987) βρήκαν ότι η ανενεργή Ac ακολουθία ήταν μεθυλιωμένη ενώ η ενεργή Ac υπομεθυλιωμένη.

Η χρήση της 5-Azct στο υπόστρωμα καλλιέργειας ήρθε επικουρικά, ώστε έμμεσα να αποδείξει την ύπαρξη μεθυλίωσης. Η 5-Azct είναι ένας παράγοντας απομεθυλίωσης (Brown *et al.*, 1989, Razin and Cedar, 1991, Durante *et al.*, 2005), που προκαλεί καταστολή της μεθυλίωσης, όταν ενσωματώνεται στο DNA κατά την αντιγραφή και δε μπορεί να μεθυλιωθεί στη συνέχεια. Έτσι, ενεργοποιεί πολλά γονίδια ή ρετρομεταθετά στοιχεία που προηγουμένως ήταν αποσιωπημένα (Razin and Cedar, 1991, Watson, 2007). Η μείωση των αναγεννημένων δεσμιωμένων βλαστών *in vitro* μετά την προσθήκη της 5-Azct, στο υπόστρωμα καλλιέργειας πιθανά να οφείλεται σε απομεθυλίωση της δεσμιωμένης μορφής. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και από τους Liu *et al.* (2004) σε πειράματα που χρησιμοποίησαν την 5-Azct *in vitro* στο ρύζι προκαλώντας μερική απομεθυλίωση σε CG και CNG του γονιδίου *Tos17* καθώς και απενεργοποίησή του. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η 5-Azct ενεργεί πάνω σε μερικούς γενετικούς τόπους, ίσως σε ένα μικρό αριθμό κύριων γονιδίων, τα οποία τότε πηγαίνουν κατευθείαν στο αναπτυξιακό πρόγραμμα με το να ενεργοποιούν άλλα ειδικά γονίδια με έναν διαδοχικό τρόπο (Razin and Cedar, 1991). Η χρήση της 5-Azct σε συγκέντρωση πάνω από 25 μM σε φυτά καπνού *in vitro* είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάπτυξης δρώντας τοξικά στα κύτταρα του καπνού (Brown *et al.*, 1989). Στην *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” δεν υπήρξε παρεμπόδιση της ανάπτυξης, ακόμη και με χρήση 100 μM , που δείχνει τη διαφορετική αντίδραση και την ανοχή του γονιδιώματος σε μεταβολές απομεθυλίωσης.

Με βάση την αναφορά των Watson *et al.* (2007), ότι η μεθυλίωση οδηγεί σε ενεργοποίηση γονιδίων ή ρετρομεταθετών στοιχείων, έγινε έλεγχος ύπαρξης ρετρομεταθετών στο γονιδίωμα του φυτού *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”.

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία είναι ευρέως διαδεδομένα στα φυτά και παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των γονιδιωμάτων. Σε πολλές περιπτώσεις συνιστούν πάνω από το 50% του πυρηνικού DNA (Kumar *et al.*, 1997). Ωστόσο, στα φυτά παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές στη γονιδιωματική τους οργάνωση αναφορικά με τον συχνά υψηλό αριθμό αντιγράφων, την εκτεταμένη ετερογένεια στους πληθυσμούς τους και τη διασπορά τους στα χρωμοσώματα (Kumar and Bennetzen, 1999). Τα ρετρομεταθετά στοιχεία στα φυτά ενεργοποιούνται κάτω από περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθώς και από συνθήκες

καταπόνησης (Grandbastien, 1998, Wessler, 1996). Οι Hirochika (1993) και Grandbastien (1998) στις συνθήκες καταπόνησης περιλαμβάνουν την ιστοκαλλιέργεια και όπως έχει δειχθεί για τη *dml1* μετάλλαξη της *Arabidopsis*, μείωση των επιπέδων της μεθυλίωσης μπορεί να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση των μεταθετών στοιχείων (Miura *et al.*, 2001). Οι Liu *et al.* (2004) αναφέρουν επίσης, ότι τα *Ty1*-copia ρετρομεταθετά στοιχεία ενεργοποιούνται από την ιστοκαλλιέργεια και επηρεάζουν τα επίπεδα της μεθυλίωσης στα αναγεννημένα φυτά του ρυζιού (ειδικά στη CNG μεθυλίωση).

Η ύπαρξη ρετρομεταθετών στοιχείων τύπου *Ty1*-copia παρατηρήθηκε στο γονιδιωματικό DNA και των δύο μορφών, κανονικής και δεσμιωμένης μορφής των *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”, *E. pugniformis* var. *cristata* και *M. elongata* var. *cristata*, και στο cDNA της δεσμιωμένης μορφής της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”. Η επιβεβαίωση – ταυτοποίηση του ρετρομεταθετού έγινε με κλωνοποίηση και αλληλούχιση. Η αλληλούχιση έδειξε 264 βάσεις και ο κλώνος ήταν ομόλογος σε μέρος του *RT* γονιδίου ρετρομεταθετού στοιχείου *Ty1*-copia που έχει απομονωθεί από άλλα φυτικά είδη (τα υψηλότερα ποσοστά ομολογίας 65-80% ήταν για τα φυτικά είδη: *Orobancha ramosa*, *Oryza sativa*, *O. langistaminata*, *Prunus mume*, *Beta vulgaris*, *Arabidopsis thaliana*, *Citrus sinensis* κ.α.). Η αλληλουχία του ρετρομεταθετού που απομονώθηκε μπορεί να είναι ενεργή μιας και δε περιείχε κωδικόνια λήξης (Stergiou *et al.*, 2002). Αυτό σημαίνει ότι κωδικοποιεί για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρετρομετάθεση, και παράγουν RNA για παραγωγή πρωτεϊνών καθώς και για την ανάστροφη μεταγραφάση (Grandbastien, 1998).

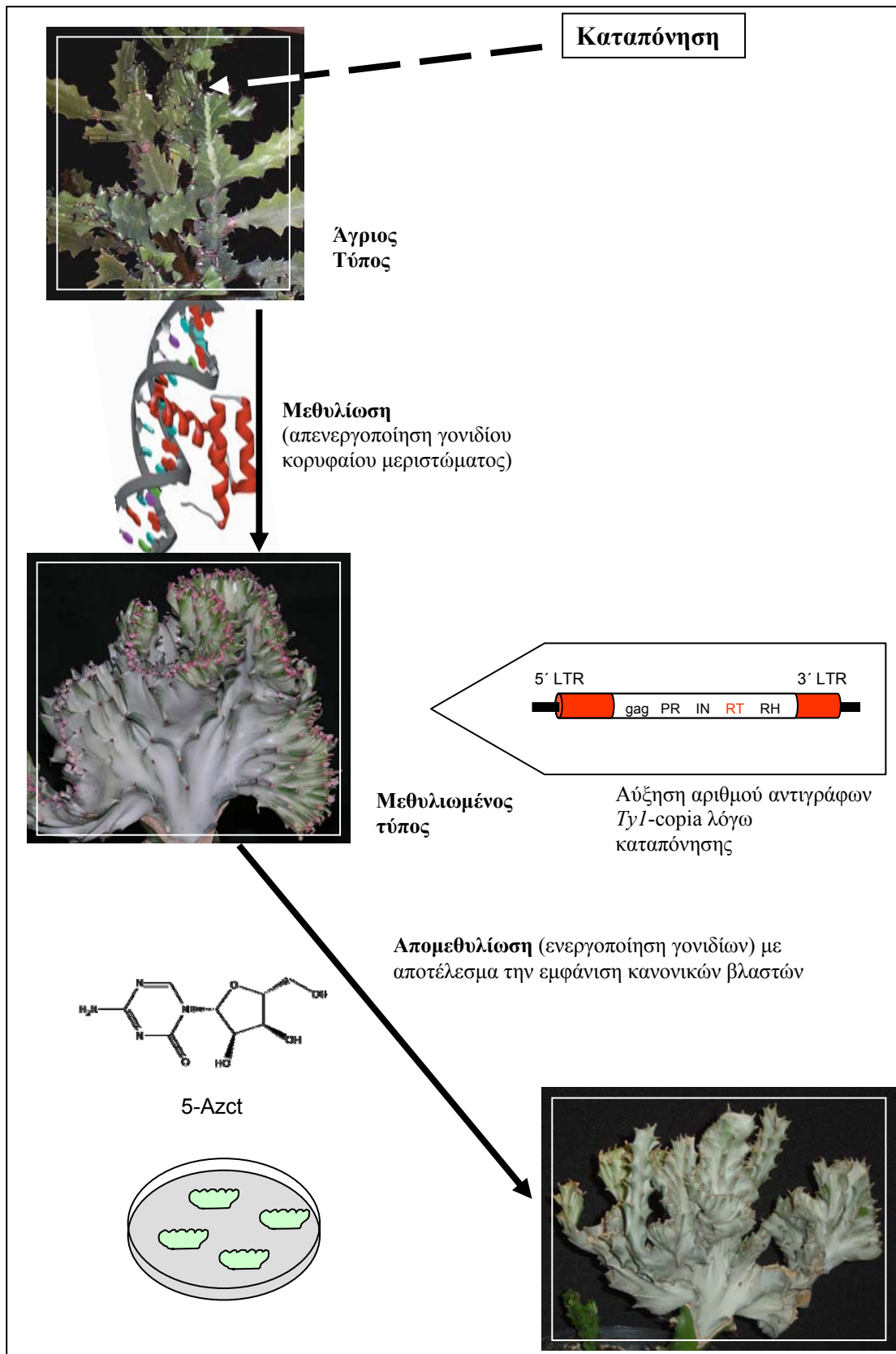
Δεδομένου ότι η ετερογένεια των ρετρομεταθετών στοιχείων μέσα σε ένα γένος ή ακόμη και στο ίδιο είδος εξαρτάται από τον αριθμό αντιγράφων (Charlesworth, 1986, Pearce *et al.*, 1996), έγινε έλεγχος του αριθμού αντιγραφών μεταξύ των δύο μορφών της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”. Έτσι, στη δεσμιωμένη μορφή παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός ρετρομεταθετών στοιχείων τύπου *Ty1*-copia σε σχέση με τη κανονική. Ο έλεγχος έγινε με τη μέθοδο της ημιποσοτικής PCR. Για περαιτέρω ανάλυση του φαινομένου της δεσμίωσης, η διαδικασία της ύπαρξης *Ty1*-copia ρετρομεταθετών στοιχείων, καθώς και ο προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων, έγινε και στις δύο μορφές των *E. pugniformis* και *M. elongata* και σε αυτά τα είδη μετά την επιβεβαίωση της ύπαρξης των στοιχείων *Ty1*-copia στο γονιδιωματικό DNA, παρατηρήθηκε και διαφορετικός αριθμός αντιγράφων στη δεσμιωμένη σε σχέση με την κανονική μορφή.

Με βάση τα δεδομένα αυτά μπορεί να υποθεθεί ότι η δεσμίωση ελέγχεται από επιγενετικό μηχανισμό. Στο Σχ. 75 φαίνεται σχηματικά η παραπάνω υπόθεση. Το κορυφαίο μερίστωμα στην κανονική μορφή (άγριος Τύπος) ελέγχεται από συγκεκριμένο γονίδιο (*Apex*)

που όταν δεχθεί την επίδραση κάποιου παράγοντα καταπόνησης (συνθήκες περιβάλλοντος, εχθροί, μύκητες κ.α.), το γονιδίωμα μεθυλιώνεται και το *Apex* απενεργοποιείται (σίγαση). Έτσι, το κορυφαίο μερίστωμα χάνει τη σημειακή του ανάπτυξη και αναπτύσσεται γραμμικά. Αυτή η καταπόνηση θα οδηγήσει σε αύξηση του αριθμού των ρетроμεταθετών στοιχείων (τύπου *Ty1-copia*). Η απομεθυλίωση του γονιδιώματος του φυτού έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του γονιδίου *Apex* και έτσι σχηματίζονται κανονικοί βλαστοί πάνω στις δεσμιωμένες μορφές. Η απομεθυλιωμένη μορφή (κανονική μορφή) βρέθηκε να έχει μικρότερο αριθμό ρетроμεταθετών στοιχείων. Αν και τα δύο επιγενετικά φαινόμενα (μεθυλίωση, ρетроμεταθετά στοιχεία) θεωρείται ότι δρουν ανεξάρτητα, η σύνδεσή τους έχει μελετηθεί από τους Hirochika *et al.* (2000), Liu and Wendel (2000) και Miura *et al.* (2001) και θεωρούν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ των δύο φαινομένων.

Αυτή η υπόθεση μπορεί να εξηγήσει ικανοποιητικά το γεγονός ότι μια δεσμιωμένη μορφή μπορεί να μετατραπεί σε κανονική και το αντίστροφο.

Περαιτέρω έρευνα θα μπορούσε να επικεντρωθεί στην αναγνώριση – προσδιορισμό του γονιδίου, την εισαγωγή του στη συνέχεια σε κύτταρα κάλου της κανονικής μορφής του παχύφυτου και την πρόκληση αναγέννησης βλαστών. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει ικανοποιητικά το φαινόμενο της δεσμίωσης στα παχύφυτα, που σύμφωνα με τον White (1948) είναι μια ειδική περίπτωση δεσμίωσης. Πέραν όμως της εξήγησης του φαινομένου αυτό θα έχει και ανθοκομικό – εμπορικό ενδιαφέρον για παχύφυτα στα οποία δεν έχει παρατηρηθεί δεσμιωμένη μορφή.



Σχ. 75. Σχηματική απεικόνιση της εξήγησης του φαινομένου της δεσμίωσης επιγενετικά.



5. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1 Διερεύνηση των κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό

Αρκετά παχύφυτα μέχρι σήμερα έχουν πολλαπλασιαστεί *in vitro* (παρ. 2.1.2.4) Η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου πολλαπλασιασμού θα μπορούσε να λύσει το πρόβλημα της μη ύπαρξης αρκετού πολλαπλασιαστικού υλικού καθώς και να μελετηθεί το φαινόμενο της δεσμίωσης που μέχρι σήμερα δεν είναι ξεκάθαρη η αιτία που το προκαλεί.

Στο κεφάλαιο αυτό διερευνήθηκε ο *in vitro* πολλαπλασιασμός τυπικών και δεσμιωμένων μορφών των παχυφύτων *M. elongata*, *E. pugniformis* και *E. lactea*. Μελετήθηκε η επίδραση των φυτορρυθμιστικών ουσιών στο σχηματισμό βλαστών από κάλο τυπικών και δεσμιωμένων μορφών, η επίδραση της εποχής λήψης των εκφύτων στις *M. elongata*, *E. pugniformis*, η επίδραση των υποκαλλιεργειών στη διατήρηση τόσο των δεσμιωμένων βλαστών όσο και του χρώματος της ποικιλίας *E. lactea* var *cristata* ‘Grey Ghost’, η επίδραση του ΒΑ στο σχηματισμό βλαστών τόσο σε δεσμιωμένες όσο και σε τυπικές μορφές των τριών εξεταζόμενων ειδών παχυφύτων, η επίδραση του παρεμποδιστή της αυξίνης ΤΙΒΑ και τέλος η επίδραση του αζώτου του θρεπτικού υποστρώματος MS κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό, η ριζοβολία και ο επιτυχής εγκλιματισμός τους.

Συγκρίνοντας τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των τριών παχυφύτων κανονικών και δεσμιωμένων παρατηρήθηκε ότι:

- ✓ Οι κανονικές μορφές διαφοροποιούν βλαστούς σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών και ειδικά του ΒΑ, σε σχέση με τις δεσμιωμένες μορφές.
- ✓ Η εποχή λήψης των εκφύτων τόσο στις δεσμιωμένες μορφές της *M. elongata* και *E. pugniformis* όσο και στην κανονική μορφή της *M. elongata* επηρέασε το σχηματισμό βλαστών και σχετίζεται με την περίοδο ανάπτυξης
- ✓ Το είδος των εκφύτων (κορυφαίο μερίστωμα ή κάτω από αυτό) στην *M. elongata* var. *cristata* επηρέασε τον τρόπο αντίδρασης όσον αφορά το σχηματισμό βλαστών. Τα έκφυτα κορυφαίου μεριστώματος έδωσαν μεγαλύτερο αριθμό *cristata* βλαστών σε σχέση με έκφυτα κάτω από τη κορυφή.
- ✓ Η δεσμιωμένη μορφή μπορεί να αναπαραχθεί μέσω κάλου.
Στη δεσμιωμένη μορφή αναγέννιονται λιγότεροι *cristata* βλαστοί σε σχέση με κανονικούς.
- ✓ Στα πειράματα βλαστογένεσης και των τριών δεσμιωμένων μορφών η μείωση του ΒΑ στο θρεπτικό υπόστρωμα προκάλεσε σπάσιμο της δεσμίωσης.

- ✓ Οι υποκαλλιέργειες στην *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” οδήγησαν στο σπάσιμο της δεσμιωμένης μορφής, ενώ δεν επηρέασαν το χρωματισμό της.
- ✓ Το TIBA εφαρμοζόμενο στο υπόστρωμα καλλιέργειας δε προκάλεσε δεσμίωση, ενώ δεν επηρέασε το σχηματισμό *cristata* βλαστών.
- ✓ Η αύξηση της συγκέντρωσης αζώτου του θρεπτικού υποστρώματος σε *in vitro* καλλιέργεια μείωσε το σχηματισμό *cristata* καθώς και κανονικών βλαστών, ενώ αντίθετα η αύξησή του οδήγησε σε μείωση των κανονικών βλαστών.
- ✓ Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη ριζοβολία – εγκλιματισμό κανονικών και δεσμιωμένων μικροβλαστών.
- ✓ Οι μικροβλαστοί που παρέμειναν, πέραν των τεσσάρων μηνών, στο αρχικό υπόστρωμα καλλιέργειας ριζοβόλησαν.

5.2. Διερεύνηση της συμπεριφοράς κανονικών και δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων σε *in vivo* καλλιέργεια

Κατά την *in vivo* καλλιέργεια δεσμιωμένων μορφών παχυφύτων παρατηρείται συχνά ο σχηματισμός και κανονικών βλαστών (Johnson, 1969, Johnson and Gorenflot, 1970, Boke and Ross, 1979). Σύμφωνα με τον Rowley (2006) οι δεσμιωμένες μορφές εμφανίζουν διάφορα πρότυπα συμπεριφοράς. Κάποιες δεσμιωμένες μορφές δεν ‘γυρίζουν’ ποτέ στην κανονική μορφή. Άλλες, πάλι γυρίζουν στη κανονική μορφή όταν είναι σε μεγάλη ηλικία ή ‘πεινάνε’ και άλλες γυρνάνε τόσο εύκολα που πρέπει συχνά να αφαιρούνται – κλαδεύονται οι κανονικοί βλαστοί.

Το ερώτημα με βάση τη βιβλιογραφία, εάν η δεσμίωση μπορεί να οφείλεται σε εξωτερικούς παράγοντες όπως η φτωχή ή υπερβολική λίπανση (Houghton, 1930, Butterfield, 1958) ή η εφαρμογή εξωγενώς φυτορρυθμιστικών ουσιών (Linser *et al.*, 1953 Laibach and Mai, 1936; Schoibe and Wohrmann-Hillmann, 1957), ήταν ο στόχος των πειραμάτων του κεφαλαίου. Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε και η *in vivo* συμπεριφορά δεσμιωμένων μορφών των παχυφύτων *M. elongata*, *E. pugniformis* και *E. lactea* που προέρχονταν από φυτάρια *in vitro* καλλιέργειας δεσμιωμένων μορφών και είχαν επιτυχώς εγκλιματιστεί.

- ✓ Η αύξηση της αζωτούχου λίπανσης σε φυτά της *E. pugniformis* var. *cristata* προκάλεσε αύξηση του όγκου, του νωπού και ξηρού βάρους του φυτού καθώς και του εμβαδού του. Παρόμοια αύξηση φαινομενικά δε παρατηρήθηκε στο ύψος και πλάτος του φυτού λόγω της κάμψης των βλάστων από την αύξηση του βάρους των.
- ✓ Η αύξηση της αζωτούχου λίπανσης προκάλεσε αύξηση των κανονικών βλαστών.

- ✓ Η αζωτούχος λίπανση φάνηκε να επιδρά όχι άμεσα αλλά έμμεσα λόγω της θετικής επίδρασης της στη βλαστική ανάπτυξη.
- ✓ Η εφαρμογή του 2,4-D σε φυτά της *M. elongata*, προκάλεσε το σχηματισμό κάλου και τη δημιουργία κανονικών και δεσμιωμένων ριζών πάνω στο κάλο. Η εφαρμογή του στην *E. pugniformis* var. *cristata* φάνηκε να μειώνει το σχηματισμό κανονικών βλαστών, όμως σε κανένα πείραμα δε μετατράπηκε κανονικός βλαστός σε δεσμιωμένο.
- ✓ Η εφαρμογή κυτοκινίνης (BA) σε δεσμιωμένους βλαστούς της *E. pugniformis* var. *cristata* προκάλεσε αύξηση των φύλλων (σχεδόν τριπλασιάστηκε ο αριθμός των) αλλά δε προκάλεσε μείωση κανονικών βλαστών.
- ✓ Το TIBA όταν εφαρμόστηκε στη *M. elongata* προκάλεσε μείωση του αριθμού των αγκαθιών ανά φυμάτιο και επιμήκυνση του βλαστού. Στην *E. pugniformis* var. *cristata* υπήρξε η τάση μείωσης της διάσπασης της δεσμιωμένης μορφής.
- ✓ Φυτάρια δεσμιωμένης μορφής μετά τον επιτυχή εγκλιματισμό τους παρατηρήθηκαν σε *ex vitro* καλλιέργεια για πέντε έτη, και βρέθηκε ότι και τα τρία δεσμιωμένα παχύφυτα δημιούργησαν κανονικούς βλαστούς. Ειδικότερα η πιο ασταθής δεσμιωμένη μορφή ήταν η *E. pugniformis* var. *cristata*.
- ✓ Στην *E. lactea* var. *cristata* παρατηρήθηκε μια παλινδρόμηση της *cristata* προς τη κανονική μορφή και αντίστροφα. Αυτή η παλινδρόμηση μας δείχνει ότι υπερίσχυσε η *cristata* μορφή και μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η *cristata* μορφή ελέγχεται πιθανόν από κάποιο γενετικό παράγοντα ο οποίος εκφράζεται αναλόγως των συνθηκών.

5.3 Επιγενετική ανάλυση του φαινομένου της δεσμίωσης στα παχύφυτα

Σε πολλά φυτά παρατηρείται συχνά το φαινόμενο της δεσμίωσης, όπου το κορυφαίο μερίστωμα χάνει τη σημειακή του μορφή και γίνεται γραμμικό. Στη βιβλιογραφία αυτό έχει αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες (Gorter, 1965, Gottschalk and Wolff, 1983, Binnggeli, 1990, Nadjimov *et al.*, 1999), αλλά κανένας εξ αυτών πειραματικά δεν έχει επιφέρει δεσμίωση ώστε να αποδοθεί σ' αυτόν η αιτία του φαινομένου της δεσμίωσης. Σκοπός της μελέτης του κεφαλαίου αυτού ήταν η ανάλυση του φαινομένου επιγενετικά στα παχύφυτα, καθώς όλοι οι παράγοντες στους οποίους είχε αποδοθεί η αιτία δεσμίωσης, προκαλούν έντονη καταπόνηση στο φυτό. Δυο τέτοια επιγενετικά φαινόμενα είναι η μεθυλίωση και τα ρετρομεταθετά στοιχεία. Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση της μεθυλίωσης καθώς και η ύπαρξη ρετρομεταθετών στοιχείων στα παχύφυτα *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost”, *E.*

pugniformis var. *cristata* και *M. elongata* var. *cristata*, μια και τα δυο φαινόμενα επιδρούν πάνω στην έκφραση – σίγαση γονιδίων κάτω από καταπόνηση.

Ο έλεγχος της ύπαρξης μεθυλίωσης στο DNA δεσμιωμένων και κανονικών βλαστών του ίδιου φυτού της *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” έγινε με τη χρήση ενζύμων περιορισμού.

- ✓ Από την ανάλυση των δεδομένων παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο πρότυπο των ηλεκτροφορημάτων όμως δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δυο διαφορετικών μορφών που σημαίνει ότι το φαινόμενο της δεσμίωσης δεν πρέπει να οφείλεται σε εκτεταμένες αλλαγές στο πρότυπο της μεθυλίωσης.
- ✓ Η μη ύπαρξη μεθυλίωσης μεταξύ των δυο διαφορετικών μορφών δε σημαίνει ότι δεν υπάρχει (Tsaftaris and Polidoros, 2000), ειδικά αν το γονίδιο είναι σιγασμένο δε μπορεί να ανακαλυφθεί κάποια μεθυλωμένη κυτοσίνη (Nick *et al.*, 1986).
- ✓ Η χρήση της 5-Azct στο υπόστρωμα καλλιέργειας ήρθε επικουρικά αλλά και έμμεσα να αποδείξει την ύπαρξη μεθυλίωσης. Η 5-Azt είναι ένας παράγοντας απομεθυλίωσης (Brown *et al.*, 1989, Razin and Cedar, 1991, Durante *et al.*, 2005) που προκαλεί καταστολή της μεθυλίωσης όταν ενσωματώνεται στο DNA κατά την αντιγραφή και δε μπορεί να μεθυλωθεί στη συνέχεια. Έτσι, ενεργοποιεί πολλά γονίδια ή ρετρομεταθετά στοιχεία που προηγουμένως ήταν αποσιωπημένα (Razin and Cedar, 1991, Watson, 2007). Η μείωση των αναγεννημένων δεσμιωμένων βλαστών *in vitro* μετά τη προσθήκη της 5-Azct, που θεωρείται παράγοντας απομεθυλίωσης, απομεθύλωσε τη δεσμιωμένη μορφή.
- ✓ Ενώ η χρήση της 5-Azct πάνω από 25 μ M σε φυτά καπνού *in vitro* είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάπτυξης δρώντας τοξικά στα κύτταρα του καπνού (Brown *et al.*, 1989), στην *E. lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” δεν υπήρξε παρεμπόδιση της ανάπτυξης που δείχνει τη διαφορετική αντίδραση και την ανοχή του γονιδιώματος σε μεταβολές απομεθυλίωσης.

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία είναι ευρέως διαδεδομένα στα φυτά και παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των γονιδιωμάτων. Σε πολλές περιπτώσεις συνιστούν πάνω από το 50% του πυρηνικού DNA (Kumar *et al.*, 1997). Ωστόσο, στα φυτά παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές στη γονιδιωματική τους οργάνωση αναφορικά με τον συχνά υψηλό αριθμό αντιγράφων, την εκτεταμένη ετερογένεια στους πληθυσμούς τους και τη διασπορά τους στα χρωμοσώματα (Kumar and Bennetzen, 1999). Τα ρετρομεταθετά στοιχεία στα φυτά ενεργοποιούνται κάτω από περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και από συνθήκες καταπόνησης (Grandbastien, 1998, Wessler, 1996). Οι Hirochika (1993) και Grandbastien

(1998) στις συνθήκες καταπόνησης περιλαμβάνουν την ιστοκαλλιέργεια και όπως έχει δειχθεί για τη *ddm1* μετάλλαξη της *Arabidopsis*, μείωση των επιπέδων της μεθυλίωσης μπορεί να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση των μεταθετών στοιχείων (Miura *et al.*, 2001). Οι Liu *et al.* (2004) αναφέρουν επίσης, ότι τα *Ty1*-coria ρετρομεταθετά στοιχεία ενεργοποιούνται από την ιστοκαλλιέργεια και επηρεάζουν τα επίπεδα της μεθυλίωσης στα αναγεννημένα φυτά του ρυζιού (ειδικά στη CNG μεθυλίωση).

- ✓ Η ύπαρξη ρετομεταθετών στοιχείων τύπου *Ty1*-coria παρατηρήθηκε στο γονιδιωματικό DNA και των δύο μορφών αλλά μόνο στο cDNA της δεσμιωμένης μορφής *E. lactea* var. *cristata* “*Grey Ghost*”. Η επιβεβαίωση – ταυτοποίηση του ρετρομεταθετού έγινε με κλωνοποίηση και αλληλούχιση. Η αλληλούχιση έδειξε 264 βάσεις και ο κλώνος ήταν ομόλογος του *RT* γονιδίου ρετρομεταθετού στοιχείου *Ty1*-coria που έχει απομονωθεί από άλλα φυτικά είδη (τα υψηλότερα ποσοστά ομολογίας 65-80% ήταν για τα φυτικά είδη: *Orobancha ramosa*, *Oryza sativa*, *O. langistaminata*, *Prunus mume*, *Beta vulgaris*, *Arabidopsis thaliana*, *Citrus sinensis* κ.α.).
- ✓ Η αλληλουχία του ρετρομεταθετού που απομονώθηκε μπορεί να είναι ενεργή μιας και δε περιείχε κωδικόνια λήξης (Stergiou *et al.*, 2002). Αυτό σημαίνει ότι κωδικοποιεί για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρετρομετάθεση, και παράγουν RNA για παραγωγή πρωτεϊνών καθώς και για την ανάστροφη μεταγραφάση (Grandbastien, 1998).
- ✓ Δεδομένου ότι η ετερογένεια των ρετρομεταθετών στοιχείων μέσα σε ένα γένος ή ακόμη και στο ίδιο είδος εξαρτάται από τον αριθμό αντιγράφων έγινε έλεγχος του αριθμού αντιγραφών μεταξύ των δύο μορφών (Charlesworth, 1986, Pearce *et al.*, 1996).
- ✓ Έτσι, στη δεσμιωμένη μορφή παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός ρετρομεταθετών στοιχείων τύπου *Ty1*-coria σε σχέση με τη κανονική. Ο έλεγχος έγινε με τη μέθοδο της ημιποσοτικής PCR.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abou-Mandour, A.A., 1992.** Der Einflub von Phytohormonen auf die Organbildung von Gewebekulturen aus *Mesembryanthemum crystallinum* L. und *Mesembryanthemum nodiflorum* L. *Angewandte Botanik* 66: 187-191.
- Adams, R.L.P., and Burdon, R.H., 1985.** *Molecular biology of DNA methylation.* Springer-Verlag, New York.
- Airò, M., Zizzo, G.V., and Ruffoni, B., 2003.** *In vitro* propagation of an *Euphorbia milii* hybrid. *Acta Horticulturae*, 748:26-30.
- Al Ramamneh, E., Serek, M., and Sriskandarajah, S., 2006.** Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Schlumbergera truncate*. *Acta Horticultura*, p 764.
- Albersten, M.C., Curry, T.M., Palmer, R.G., and Lamotte, C.E., 1983.** Genetics and comparative growth morphology of fasciation in soybeans (*Glycine max* (L) Merr.). *Bot. Gaz.* 144(2): 263-275.
- Alexopoulos, A.A., Akoumianakis, A.K., and Passam, C.H., 2006.** The effect of the time and mode of application of gibberellic acid on the growth and yield of potato plants derived from true potato seed. *J. Sci. Food Agric.* 86:2189–2195.
- Aliyu, B.S., and Mustapha, Y., 2007.** Effect for different media on the *In vitro* growth of cactus *Opuntia ficus-indica* explants. Biological Science Department, Bayero University , Kano, Nigeria.
- Amoo, S.O., Finnie, J.F, and Van Staden, J., 2009.** *In vitro* propagation of *Huernia hystrix* : an endangered medicinal and ornamental succulent . *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 96(3): 273-278.
- Anderson, E.F., 2001.** THE CACTUS FAMILY. Timber Press, Portland Oregon.
- Antequera, F., and Bird, A., 1993.** Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 90:11995-11999.
- Aparecida, O.S., Machado, F.P.S., Prioli, J.A., and Magnolin, C.A., 1994.** *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus mill.*. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 31(1):47-50.
- Asahira, T., Hosoki, T., and Ohta, K., 1982.** Regulation of low temperature induced malformation of tomato fruit by plant growth regulators. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 50: 468-474.
- Ault, J.R., and Blackmon, W.J., 1985.** *In vitro* propagation of selected native cacti species. *HortScience* 20: 541. Abs. 143.
- Ault, J.R., and Blackmon, W.J., 1987.** *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *HortScience* 22, p 126-127.
- Backeberg, C., 1931-1933.** Following in Dr. Rose's footsteps. *Cactus Succulents J.*, p 130-132.
- Bairathi, M.K., and Nathwai, G.S., 1978.** Morphology and anatomy of fasciated plants of Sannhemp. *Flora* 167, 147-157.

- Balch, E.P.M., Perez Reyes, M.E., Amador, E.V., Rangel, E.M., Ruiz, L.D., and Viramontes, H.J.L., 1998.** Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 34(2): 131-135.
- Balen, Bijana, Milosevic, Jadranka, Krsink-Rosol, and Marijana, 2002.** Protein and Glycoprotein patterns related to morphogenesis in *Mammillaria gracillis Pfeiff.* Tissue culture, First Croatian congress on molecular life sciences.
- Balotis, G., and Papafotiou, M., 2003.** Micropropagation and stability of *Euphorbia pugniformis* cristate form. *Acta Horticulturae*, 616: 471-473.
- Banks, J. A., and Fedoroff, N., 1989.** Patterns of developmental and heritable change in methylation of the Suppressor-mutator transposable element. *Dev. Genet.* 10:425-437.
- Banks, J.A., Masson, P., and Fedoroff, N., 1988.** Molecular mechanisms in the developmental regulation of maize Suppressor-mutator transposable element. *Genes Dev.* 2:1364-1380.
- Barthlott, W. and Hunt, D.R., 1993.** Cactaceae. Pages 161-196 in *The Families and Genera of Vascular Plants. Volume 2.* K. Kubitzki, editor. Berlin: Springer-Verlag.
- Bedford, M.T., and Van Helden, P.P., 1990.** Analysis of allele-specific methylation. *Trends Genet.* 6:140-141.
- Behera, N.C., and Patnaik, S.N., 1982.** Histology of mutants in *Amaranthus hypochondriacus*. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 42, 5-10.
- Belanger, F.C., and Hepburn, A.G., 1990.** The evolution of CpNpG methylation in plants. *J. Mol. Evol.* 30:26-35.
- Bennetzen, J.L., 1987.** Covalent DNA modification and the regulation of *Mutator* element transposition in maize. *Mol. Gen. Genet.* 208:45-51.
- Bennetzen, J.L., 2000.** Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology* 42: 251-269
- Bentz, S.E., and Talbott, H.J., 1992.** Micropropagation of yucca (*Yucca glauca* Nutt.). In BAJAJ, Y.P.S. (ed), p. 330-337.
- Bernacchia, C., Primo, A., Giorgetti, L., Pitto, L., and Cella, R., 1998.** Carrot DNA-methyltransferase is encoded by two classes of genes with differing patterns of expression. *Plant*. 13:317-329.
- Bestor, T.H., 1992.** Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of Zn binding regulatory domain. *EMBO J.* 11:2611-2617.
- Bestor, T.H., 1998.** The host defence function of genomic methylation patterns. P.187-195. In: D.J. Chadwick and G. Gardew (eds.). *Epigenetics.* Wiley, Chichester, England.
- Beyer, J.J., 1936.** De invloed van de schuurbehandeling op de bloemkwaliteit van de Hyacinth. *Meded. Lab. Bloembollenonderzoek (Lisse)* 5: 5-32.
- Bhau, K.S., and Wakhlu, A.K., 2001.** Effect of some antibiotics in the *In vitro* morphogenetic response from callus culture of *Corypantha elephantideus* (LEM). *Biologia Plantarum* 41(1): 19-24.
- Bianchi, M.W., and Viotti, A., 1988.** DNA methylation and tissue-specific transcription of the storage proteins of maize. *Plant Mol. Biol.* 11:203-214.

- Binggeli, P., 1990.** Occurrence and causes of fasciation. *Cecidology* 5:57-62.
- Bird, A., 1992.** The Essentials of DNA Methylation. *Cell*, 70:5-8.
- Bird, A., 1997.** Does DNA methylation control transposition of selfish elements in the germline? *Trends Genet.* 13:469-470.
- Bird, A.P., 1986.** CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321:209-213.
- Bloch, R., 1938.** Anatomical changes in *Tradescantia fluminensis* after treatment with growth substances. *Contr. Boyce Thompson Inst.* 9:439-454.
- Boissevain, C.H., and Davidson, C., 1940.** Colorado cacti. Abbey Garden Press Pasadena Calif. pp 61.
- Boke, N.H., 1944.** Histogenesis of the leaf and areole in *Opuntia cylindrica*. *American Journal of Botany* 31: 299-316.
- Boke, N.H., and Ross, R.G., 1978.** Fasciation and dichotomous branching in *Echinocereus* (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 65(5):522-530.
- Bonnes, M.S., Pare, P.W., and Mabry, T.J., 1993.** Novel callus and suspension cultures of the “old man” cactus (*Cephalocereus senilis*). *Cactus Succ. J.* 65: 144-147.
- Bouchard, J., and Momparier, R.L., 1983.** Incorporation of 5-aza-2'-deoxycytidine-. S'-triphosphate and DNA methylase. *Mol. Pharmacol.*, 24:109-114.
- Bramwell, D., 1990.** The role of *In vitro* cultivation in the conservation of endangered species. Hernandez Bermejo *et al.*, In: Hernandez Bermejo, J. E.; Clemente, M.; Heywood, V., eds. Conservation techniques in botanic gardens. Koenigstein, Koeltz Scientific Books; 1990:3-15.
- Brandes, A., Heslop-Harrison, J.S., Kamm, A., Kubis, S., Doudrick, R.L., and Schmidt, T., 1997.** Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of *Ty1*-copia-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. *Plant Molecular Biology* 33:11-21
- Brasil, J.N., Jereissati, E.S., Santos, M.R.A., and Campos, F.A.P., 2005.** *In vitro* propagation of *Nopalea cochenillifera* (Cactaceae). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 73(3): 160-162.
- Brettell, R.I.S., and Dennis, E. S., 1991.** Reactivation of a silent *Ac* following tissue culture is associated with heritable alterations in its methylation pattern. *Mol. Gen. Genet.* 229:365-372.
- Brott, J.J., and Read, P.E., 1993.** Pre-germination treatments influence germination and plant survival of *Yucca glauca* germinated on LS medium. *HortScience*, 28(5) : 165. (Abstract).
- Brown, N.A., 1927.** Sweet pea fasciation, a form of crown gall. *Phytopathology*, 17: 29-30.
- Brown, P.T.H., Yoneyama, K., and Lorz, H., 1989.** An investigation into the role of 5-Azacytidine in tissue culture. *Theor Appl Genet*, 78: 321-328.
- Burn, J.E., Bagnall, D.J., Metzger, J.D., Dennis, E.S., and Peacock, W.J., 1993.** DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 287-291.

- Burton, D.F., 1947.** Formative effects of certain substituted chlorophenoxy compounds on bean leaves. *Bot. Gaz.* 109:183-194.
- Buss, L.W., 1987.** The evolution of individuality. Princeton Univ. Press. Princeton, NJ.
- Butterfield, H.M., 1962.** Monstrose and unusual growth in succulents. *Cactus and Succulent Journal (U.S.)*, 34: 153-155.
- Cai, Q.C., Guy, L., and Moore, G.A., 1996.** Detection of cytosine methylation and mapping of a gene influencing cytosine methylation in the genome of *Citrus*. *Genome* 39:235-242.
- Cardenas, E., Del Cabmen, O.M., Torres, T.E. and Olivares Saenz, E., 1993.** Micropropagation of *Astrophytum capricorne*, an endangered cactus from N.E. Mexico. *Botanic Gardens Micropropagation Newsletter*, 1(6) :75-76.
- Carter, S., and Eggli, U., 1997.** The Cites checklist of succulent *Euphorbia* taxa (Euphorbiaceae). German Federal Agency for Nature Conservation, CITY
- Chandler, V., and Walbot, V., 1986.** DNA modification of a maize transposable element correlates with loss of activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 83:1767-1771.
- Charlesworth, B., 1986.** Genetic divergence between transposable elements. *Genet Res.* 48:111-118.
- Chavanne, F., Zhang, D.X., Liaud, M.F. and Cerff, R., 1998.** Structure and evolution of *Cyclops*: a novel giant retrotransposon of the Ty3/Gypsy family in pea and other legume species. *Plant Molecular Biology* 37: 363-375.
- Chen, L., Paulsen, D.B., Scruggs, D.W., Banes, M.M., Reeks, B.Y., and Lawrence, M.L., 2003.** Alteration of DNA adenine methylase (Dam) activity in *Pasteurella multocida* causes increased spontaneous mutation frequency and attenuation in mice. *Microbiology* 149: 2283-2290.
- Chessin, M. et al., 1961.** External symptoms and giesma-stainable cell inclusions associated with virus infections in cacti. *Phytopathology* 53: 988-989.
- Chessin, M., Solberg, R.A., and Fischer, P.C., 1963.** External symptoms and Giemsa-Stainable cell inclusion associated with virus infection in cacti. *Phytopathology*, 53: 988-989.
- Chomet, P.S., Wessler, S., and Dellaporta, S.L., 1987.** Inactivation of the maize transposable element activator (*Ac*) is associated with its DNA modification. *EMBO J.* 6:295-302.
- 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.
- Church, G.M., and Gilbert, W., 1984.** Genomic sequencing. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 81:1991-1995.
- Citti, L., Gervasi, P.G., Turchi, G. and Mariani, L., 1983.** Improved method for determination of 5-methylcytosine by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatog.* 261:315-319.
- Clayton, P.W., Hubstenberger, J.F., Phillips, G.C., and Butler-Nance, S., 1990.** Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. *J. Amer. Soc.Hort.Sci.*, 115: 337-343.

- Conde, L.F., 1975.** Anatomical comparisons of five species of *Opuntia* (Cactaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62:425–473.
- Constantinides, P.G., Jones, P.A., and Gevers, W., 1977.** Function striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature*, 267(5609):364-366.
- Coria, O.D., and Valverde, A.M., 2008.** Easy cloning and acclimatization of *Rebutia muscular*. *Acta horticulturae* 865.
- Corneanu, M., 1994.** *In vitro* organogenesis in *Aztekium ritteri* Bod. (fam. Cactaceae) on media with or without magnetic fluids. Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. (Abstract No.216).
- Corneanu, M.M., Corneanu, G.C., and Copacescu, S.N., 1990.** Plant regeneration with somaclonal invariability from *Mammillaria sp.* callus. Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Abs. No. A3-66, p. 99.
- Coulondre, C., Miller, J.H, Farabaugh, P.J., and Gilbert, W., 1978.** Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274:775-780.
- Crafts, A.S., 1953.** Herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 4:253-282.
- Crespi, M., Messens, E., Caplan, A.B., Van Montagu, M., and Desomer, J., 1992.** Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *The EMBO J.* 11(3):795-804.
- D'Amato, F., 1957.** Fasciazioni caulinari a fiorali, sterilita ed altre modificazioni di sviluppo indotte della irradiazione cronica gamma da radiocobalto nel lino. *Nuovo Giorn. Bot. Ital.* N.S. vol. 44: 1-8.
- Damiano, C., Curip, P., Cosmi, T. and Ruffoni, B., 1986.** Tissue culture of *Mammillaria* spp. *HortScience*, 21: 804. Abs. 1058.
- Das, T., 1992.** Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 253-255.
- De Medeiros, L.A., De Ribeiro, S., Galla, R., De Oliveira, L.A. and Dematte, S.P., 2006.** *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84(2):165-169.
- De Vries, H., 1891.** Sur un spadice tubuleux du *Peperomia maculosa*. *Arch. Neerl. Sci. exp. Et natur.* (Haarlem), 24: 258-270.
- De Vries, H., 1899.** Sur la culture des fasciations des especes annuelles et bisannuelles. *Rev. gen. Bot.* Vol. 11: 136-151.
- De Vries, H., 1903.** Die Mutationstheorie, Bd. 2. Leipzig : v. Ceit 1903. Αγγλική έκδοση : The mutation theory. (2 vols.) New York : Farmer and Darbishire 1909/1910.
- De Vries, H., 1905.** Species and varieties, their origin by mutation. Chicago: MacDougal.
- De Vries, H., 1910.** Die Mutationstheorie, Bd. 2. english edition: The mutation theory. (2vols).
- Del Castillo, R.F., and González-Espinosa, M., 1988.** Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia* 71:185–196.
- Delf, E.M., 1911.** Transpiration and behaviour of stomate in halophytes. *Ann. Bot.* 25: 485-505.

- Delf, E.M., 1912.** Transpiration in succulent plants. *Ann. Bot.* 26: 409-442.
- 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.
- DeYue, A.G., Dejardins, Y., Lamarre, M., Gosselin, A., 1992.** Photosynthesis and transpiration of in vitro cultured asparagus plantlets. *Sci. Hort.* 49:9-16.
- Dhaliwal, S. H., Yeung, E.C., and Thorpe, T.A., 2004.** Tiba Inhibition of *In vitro* Organogenesis in Excised Tobacco Leaf Explants *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 40(2):235-238.
- Dobos, E., Danos, B., and Laszlo-Bencsik, A., 1994.** Callus induction and shoot regeneration in *Sempervivum tectorum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 141-143.
- Driss-Ecole, D., 1981.** Fasciation from excised shoot apices in *Celosia cristata* (Amaranthaceae) cultivated *In vitro*. *Can. J. Bot.* 59:1367-1373.
- Dubrovsky, J.G., 1999.** Desarrollo de sistema radicular durante la ontogénesis de plantas del género *Stenocereus* (Cactaceae). In *El Pitayo en Jalisco y Especies A.nes en México* (E.Pimienta-Barrios, ed.). Universidad de Guadalajara, Fundación Produce Jalisco, Guadalajara, Mexico. Pp.133 –146.
- Durante, M., Cecchini, E., Natali, L., Citti, L., Geri, C., Parenti, R. and Ronchi, V. N., 2005.** 5-Azacytidine-induced tumorous transformation and DNA hypomethylation in *Nicotiana* tissue culture. *Developmental Genetics.* 10(4): 298-303.
- Escobar, H.A., Villalobos, A.V.M., and Villegasm, A., 1986.** *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 7:269-277.
- Estrada-Luna, A.A., MartinezHernandez, J.D.J., Torres, M.E., and Chable-Moreno, F., 2008.** *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* salm dyck and effects of sprayed GA₃ after transplatetions. *Skientia Horticulturae* 17(4):378-385.
- 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.
- Fambrini, M., Bonsignori, E., Rapparini, F., Cionini, G., Michelotti, V., Bertini, D., Baraldi, R. and Pugliesi, C., 2006.** Stem fasciated, a Recessive Mutation in Sunflower (*Helianthus annuus*), Alters Plant Morphology and Auxin Level. *Annals of Botany* 98: 715–730.
- Fay, M.F, Gratton, T., and Atkinson, P.J., 1995.** Tissue culture of succulent plants. An annotated bibliography. *Bradleya*, 13: 38-42.
- Fay, M.F., and Gratton, J., 1992.** Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10: 33-48.
- Fay, M.F., and Muir, H.J., 1990.** The role of micropropagation in the conservation of European plants. In: J.E. Hernández Bermejo, J.E., Clemente, M. & Heywood, V. (eds.), *Conservation Techniques in Botanic Gardens*, pp. 27-32. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Germany.
- Fedoroff, N.V., 1995.** DNA melhylation and activity of the maize *Spm* transposable element, p. 143-164. In: P. Meyer (ed)., *Gene silencing in higher plants and related phenomena in other eukaryoles*. Springer-Verlag, New York.

- Fedoroff, N.V., 1996.** Epigenetic regulation of the maize *Spm* transposable element. p. 575-592. In: V. E. A. Russo, R. A. Martienssen, and A. D. Riggs (eds.), Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Fieldes, M.A., 1994.** Heritable effects of 5-azacytidine treatments on the growth and developmental of flax [*Linum usitatissimum*] genotrophs and genotypes. *Genome* 37:1-11.
- Finnegan, E.J., and Dennis, E.S., 1993.** Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyl transferase from *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids , Res.* 21:2383-2388.
- Finnegan, E.J., Genger, R.K., Kovac, K., Peacock, W.J., and Dennis, E.S., 1998.** DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 95:5824-5829.
- Flavell, A.J., Pearce, S.R., Heslop-Harrison, J.S., and Kurmar, A., 1997.** The evolution of *Ty1-copia* group retrotransposons in eukaryote genomes. *Genetica* 100:185-195
- Flavell, A.J., Smith, D.B., and Kumar, A., 1992.** Extreme heterogeneity of *Ty1-copia* group retrotransposons in plants. *Mol. Gen. Genet.* 231:233-242
- Flavell, R.B., 1994.** Inactivation of gene expression in plants as a consequence of novel sequence duplications. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 91:3490-3496.
- Flavell, R.B., and Moore, G., 1996.** Plant genome constituents and their organization. *Plant gene isolation: principles and practice.* G.D. Foster and John Wiley and Sons, NY, pp.1-25
- Forchert, G., 1984.** Gedanken und beobachtungen zu verbanderrungen an *E. pugniformis* Boissier. *Kakteen und andere Sukkulente*n, 35(6): 132-133.
- Gaiser, M.S., Lazarte, I.E., and Brown, O.R., 1981.** *In vitro* propagation of *Epiphyllum caryocardiwn*. *HortScience* 16: 425. Abs. 194.
- Gardiner-Garden, M.J., Sved, A., and Frommer, M., 1992.** Methylation sites in angiosperm genes. *J. Mol. Evol.* 34:219-230.
- Gates, H.E., 1929-1931.** *Cristates.* *Cactus and Succulent Journal.* 1-2: 273-274.
- Georgescu, C.C., 1927.** Beitrage zur Kenntnis der Verbanderung. *Bot. Abh.* Vol. 11.
- Gibson, A. C., and Nobel, P. S., 1986.** *The Cactus Primer.* Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Gibson, A.C., and Nobel, P.S., 1990.** *The Cactus Primer.* First Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Giordano, M., Mattachini, M.E., Cella, R., and Pedrali-Noy, G., 1991.** Purification and properties of a novel DNA methyl transferase from cultured rice cells. *Biochem. Biophys. Pers. Commun.* 177:711-719.
- Girod, P.A., and Zryd, J.P., 1991.** Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris*) cells: Differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 25:1-12.
- Giulini, A., Wang, J., and Jackson, D., 2004.** Control of phyllotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue ABPHYL1. *Nature* 430:1031-1034.

- Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F. and Tucci, M., 2002.** *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95(4):319-332.
- Gonzalez Aleman, C., Ortega Gonzalez, C.I., and Rubio Hernandez, A.M., 1988.** Propagation *In vitro* de endemismos canarios en peligro de extincion: *Euphorbia handiensis* Burchd. *Botanica Macaronesica*, p 15-28.
- Gorter, C.J., 1951.** The influence of 2,3,5-triiodobenzoic acid on the growing points of tomatoes. II. The initiation of ringfasciations. *Proc. Kon. Akad. Wet.* 54:181-190.
- Gorter, C.J., 1965.** Origin of Fasciation. In : Ruhland W. ed. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. 15, Part II. New York, NY: Springer-Verlag, 330-351.
- Gottschalk, W., and Wolff, G., 1983.** The alteration of the shoot system by means of mutations. In: Frankel R, Gall GAE, Grossman M, Liskens HF, Riley R, eds. *Monographs on theoretical and applied genetics. Induced mutation in plant breeding*, Berlin: Springer-Verlag. 7:43-64.
- Graham, D., 1962.** In quest of crests. *Cactus and succulent journal*. 34: 156-158.
- Grandbastien, M.A., 1998.** Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in plant science*, 3(5):181-187.
- Gratton, J. and Fay, M.F., 1990.** Vegetative propagation of cacti and other succulents *In vitro*. In POLLARD, J.W. and WALKER, J.M. (eds), *Methods in Molecular Biology. Plant Cell and Tissue Culture*. Humana Press 6:219-225.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., and Gelbart, W.M., 1997.** *An Introduction to Genetic Analysis*. 6th edition, Freeman and Co. N.Y.
- Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H., and Razin, A., 1981.** Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* 292:860-862.
- Grupe, H., 1956.** Morfologischer, anatomischer und entwicklungs- geschichtlicher vergleich zwischen verbanderten und unverbanderten erbsen. *Z. Bot.* 44:221-251.
- Gunter, A., 1984.** *Cacti and succulents*. A&C Black Publ. Ltd, London.
- Haage, W., 1963.** *Cacti and Succulents – A practical handbook*. Studio Vista Limited, London.
- Hamad, A.M., and Taha, R.M., 2008.** Effect of sequential subcultures on *in vitro* proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. *Scientia Horticulturae* 117(4) : 329-334.
- Harder, R., and Oppermann, A., 1952.** Einflubvon 2,3,5-Triiodbenzoesaure auf die Blüten – bildung un d die vegetative Gestaltungvon *Kalanchoe blossfeldiana*. *Planta (Berl.)* 41:1-24.
- Havas, L.J., and Felfoldy, J.M., 1947.** Fasciation and kindred teratims induced in plants by polyploidogenic agents. *Arch. Biol. Hung.* II 17:131-140.
- Hayashi, M., 1987.** Callus characteristics and classification of *Haworthia* and allied genera. *South African Journal of Botany* 53(6): 411-423.
- Hayashizaki, Y., and Watanabe, S., 1997.** *Restriction landmark genomic scanning (RLGS)*. Springer-Verlag, New York.

- Hernandez Hernandez, J., Ruiz Campos, G., and Sanchez Martinez, E., 1994.** Apuntes sobre la propagación *In vitro* de *Melocactus bellavistensis* Rauh et Backeb del Peru. Botanic Gardens Micropropagation Newsletter 1(7):85-86.
- Heslop-Harrison, J. S., and Bennett, M.D., 1990.** Nuclear architecture in plants. Trends Genet, 6:401-405.
- Heslop-Harrison, J.S., Brandes, A., Taketa, S., Schmidt, T., Vershinin, A.V., Alkhimova, E.G., Kamm, A., Doudrick, R.L., Schwarzacher, T., Katsiotis, A., Kubis, S., Kumar, A., Pearce, S.R., Flavell, A., Harrison, G.E., 1997.** The chromosomal distributions of *Ty1*-copia group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. Genetica 100: 197-204
- Hester, J.P., 1940.** Carnegia gigantean cristata. Desert plant life. 10-12:85-86, 109-111.
- Higgins, V., 1933.** The study of cacti. Blandford Press Ltd. London. Johnson
- Hirochika, H. 1997.** Retrotransposons of rice: their regulation and use for genome analysis. Plant Molecular Biology 35: 231-240.
- Hirochika, H., 1993.** Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. EMBO J.,12:2521-2528.
- Hohtola, A., 1988.** Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue cultures from mature Scots pine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 5(3):211-222.
- Houghton, A.D., 1930.** The cactus book. The MacMillan Company pp. 106-139.
- Huang, D.S., and Backhaus, R., 1990.** Micropropagation of selected desert-adapted species. HortScience 25: 1124.
- Hummel, E.C., 1935-37.** Fasciation. Cactus and Succulent Journal. 7-8: 53-56.
- Hunter, M., 1984.** Another look at fasciating cacti. Cactus and Succulent Journal (U.S.), vol. 56: 40-42.
- Hus, H., 1906.** Fasciation in *Oxalis crenata* and experimental production of fasciations. Rep. Missouri bot. Gard. 17: 147-152.
- Infante, R., 1992.** *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31:155-159.
- Irvine, V.C., 1940.** X-radiation and growth substances as affecting growth primordial tissues. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 43: 453-455.
- Jablonka, E., and Lamb, M.J., 1995.** Epigenetic inheritance and evolution. The Lamarckian dimension, Oxford Univ. Press. New York.
- Jacobsen, S.E., and Meyerowitz, E.M., 1997.** Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in *Arabidopsis*. Science 277:1100-1103.
- Jakobek, J.L., Backhaus, R.A., and Herman, K., 1986.** Micropropagation of candelilla, *Euphorbia antisiphilitica* Zucc. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 7:145-148.
- Johansen, D.A., 1929- 1931.** Crest. Cactus and Succulent Journal 1-2:177.
- Johanson, E.L., 1936.** Effects of X rays upon green plants. In: Biological effects of radiations (B. M. Duggar, ed.). New York and London, McGraw-Hill. pp. 961-985.

- John, M.C., and Amasino, R.M., 1989.** Extensive changes in DNA methylation patterns accompany activation of a silent T-DNA *itp* gene in *Agrobacterium tumefaciens* transformed plant cell. *Mol. Cell Biol.* 9:4292-4303.
- Johnson, G., 1969.** Recherches ontogeniques sur une anomalie spontanee du stapelia. *Rev. Gen. Bot.*, 76:37-74.
- Johnson, G., and Gorenflot, R., 1970.** Etude compare de divers aspects structuraux de la fasciation. *Bull. Soc. Bot. France, Mem.*, 117:113-142.
- Johnson, J.L., and Emino, E.R., 1979a.** *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. *HortScience* 14:605-606.
- Johnson, J.L., and Emino, E.R., 1979b.** Tissue culture propagation of cacti. *Cact. Succ. J. (US)*, 51:275-277.
- Johnson, J.L., and Emino, E.R., 1982.** Spine initiation and development in *Mammillaria elongata* DC. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107(6): 1008-1011.
- Jones, D., and Tisserat, B., 1990.** Clonal propagation of orchids. In Pollard, J.W. and Walker J.M. (eds), *Methods in Molecular Biology. Plant Cell and Tissue Culture.* 6 : 181-191.
- Jones, D.F., 1997.** Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis. *Genetics* 2:466-479.
- Jones, P.A., 1984.** in *DNA methylation: Biochemistry and Biological Significance*, eds. Razin, A., Cedar, H. and A.D. Riggs (Springer, New York), 165-187.
- Jones, P.A., 1985.** Altering gene expression with 5-azacytidine. *Cell* 40:485-486.
- Jones, P.A., Rideout, W.M., Shen, J.C., Spruck, C.H., and Tsai, Y.C., 1992.** Methylation, mutation and cancer, *BioEssays* 14:33-36.
- Jones, P.A., Taylor, S.M., and Wilson, V.L., 1983.** Inhibition of DNA methylation by 5-Azacytidine. *Recent Results in Cancer Research*, 84:202-211.
- Jorgensen, R.A., 1995.** Cosuppression flower color patterns, and metastable gene expression states. *Science* 268:686-691.
- Josse, I., Kaiser, A.D., and Komberg, A., 1961.** Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid VIII. Frequencies of nearest neighbor base sequences in deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 236:864-875.
- Jost, J.P., and Saluz, H.P., 1993.** *DNA methylation: molecular biology and biological significance.* Brinkhauser Verlag, Boston.
- Juarez, M.C., and Passera, C.B., 2002.** *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* and acclimatization to field conditions. *Biocell* 26(3):319-324.
- Kaeppler, S.M., and Phillips, R.L., 1993.** Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8773-8776.
- Karagiozova, M., and Meshineva, V., 1977.** Histological characteristic of band-shaped fasciations. *Annual Journal of Sofia University*, 68(2): 11-30 (in Bulgarian).
- Kartsonas, Ep., 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, Tissue and Organ Culture*, 90: 111-116.

- Kavyashree, R., 2007.** A repeatable protocol for *in vitro* micropropagation of mulberry variety S54. *Indian Journal of Biotechnology*, 6: 385-388.
- Kendrich, J.B., and Middleton, J.T., 1954.** Funnel leaf of spinach induced by 2,4-D. *Bull. Torrey Bot. Club* 81:137-140.
- Kewen, C.P., 1929-1931.** *Crest. Cactus and Succulent Journal*. 1-2: 216-217.
- Khalafalla, M.M., Abdellatef, E., Mohameed, M.M.A., and Osman, M.G., 2007.** Micropropagation of cactus *Opuntia ficus-indica* as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. Commission for biotechnology and genetic engineering, national center for research (P.O Box 2404 khartoum, sudan).
- Kidwell, M.G., and Lisch, D.R., 1998.** Transposons unbound. *Nature* 393:22-23.
- Kirby, E.G., Leustek, T., and Lee, M.S., 1987.** Nitrogen nutrition. *In: Bonga, J.M. and D.J. Durzan, (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 1, p. 237. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- Kitin, P., Iliev, I., Scaltsoyianes, A., Nellas, C., Rubos, A., and Funada, R., 2005.** A comparative histological study between normal and fasciated shoots of *Prunus avium* generated *In vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 82:141-150.
- Klar, A.J.S., 1998.** Propagating epigenetic states through meiosis: where Mendel's gene is more than a DNA moiety. *Trends Genet.* 14:299-301.
- Knox, A.A., 1908.** The induction, development and heritability of fasciation. *Publ. Carnegie Inst. (Wash.)*, 98: 3-21.
- Kochar, T.S., 1994.** Influence of abscisic acid and auxins on organogenesis in *Haworthia* callus. Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. (Abstract No. 10).
- Kolar, Z., Bartek, J., and Vyskot, B., 1976.** Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* Craig through tissue cultures. *Experientia*, 32:668-669.
- Kress, U., 1953.** Ergebnisse der Rontgenbestrahlung bei der Gulzower suben Gelblupine (*Lupinus luteus*). *Zuchter* vol. 23: 168-172.
- Kricker, M.C., Drake, J.W., and Radman, M., 1992.** Duplication-targeted DNA methylation and mutagenesis in the evolution of eukaryotic chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 89:1075-1079.
- Krogstrup, P., Find, J.L., Kristensen, M.M.H, Damgaard, J., 2006.** Micropropagation of *Adenia goetzei* Harms, an attractive caudiciform from Central Africa. *Bradleya* 23:61-65.
- Krulik, G., 1980.** Tissue culture of succulent plants. *Nat. Cact. Succ. J.* 35:14-17.
- Kubis, S.E., Castilho, A.M.M.F., Vershinin, A.V., and Heslop-Harrison, J.S., 2003.** Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology*, 52:69-79.
- Kuckuck, H., Kobabe, G., and Wenzel, G., 1991.** Fundamentals of plant breeding. Springer-Verlag. Berlin.
- Kuhlemeier C. and Reinhardt D., 2001.** Auxin And Phyllotaxis. *Trends In Plant Sciences* 6: 187-189.

- Kumar, A., 1996.** The adventures of the *Ty1* -copia group of retrotransposons in plants. *TIG* 12(2): 41-43
- Kumar, A., and Bennetzen, L., 1999.** Plant retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 33, 479-532
- Kumar, A., Pearce, S.R., McLean, K., Harrison, G., Heslop-Harrison, J.S., Waugh, R., Flavell, A., 1997.** *Ty1*-copia group of retrotransposons in plants: genomic organization, distribution and use as molecular markers. *Genetica* 100: 205-217
- Kumar, S., Cheng, X., Klimasauskas, S., Posfai S.Mi.J., Roberts, R.J., and Wilson, G.G., 1994.** The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 22:1-10.
- Kuster, E., 1952.** Über die Verbanderungen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 65: 289-295.
- Lacey, M. S., 1936.** Further studies on a bacterium causing fasciation of sweet peas. *Ann. Appl. Biol.*, 23: 743-751.
- Laibach, F., and Mai, G., 1936.** Über die kunstliche erzeugung von bildungsabweichungen bei pflazen. *Wilhelm Roux Arch. Entwickl. Mech. Org.* 134:200-205.
- LaMotte, C.E., Curry, T.M., Palmer, R.G., Albertsen, M.C., 1988.** Developmental anatomy and morphology of fasciation in the soybean (*Glycine max*). *Botanical Gazette* 149: 398-407.
- Langdale, J.A., Taylor, W.C., and Nelson, T., 1991.** Cell-specific accumulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase is correlated with demethylation at a specific site >3 kb upstream of the gene. *Mol. Gen. Genet.* 225:49-55.
- Langridge, J., and Griffing, B., 1959.** A study of high temperature lesions in *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J. Biol. Sci.* 12:117-135.
- Lassocinski, W., 1985.** Chlorophyll-deficient cacti in tissue cultures. *Acta Horticulturae*, 167: 287-293.
- Laten, H.M., 1999.** Phylogenetic evidence for *Ty1*-copia-like endogenous retroviruses in plant genomes. *Genetica* 107: 87-93
- Laten, H.M., Majumdar, A., and Gaucher, E.A., 1998.** *SIRE-1*, a copia-*Ty1*-like retroelement from soyabean, encodes a retroviral envelope-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6897-6902
- Lauster, R., Trautner, T.A., and Noyer-Weidner, M., 1989.** Cytosine-specific type II DNA methyltransferases; A conserved enzyme core with variable target-recognizing domains. *J. Mol. Biol.* 206:305-312.
- Lebedeva, T., 1963.** On the distribution of fasciation in cultivated plants. *Botanicheskii J.* 48:526-535.
- Lee, B.H., Yu, S., and Jackson D., 2009.** Control of plant architecture: The role of phyllotaxy and plastochron. *J. Plant Biol.* 52:277-282.
- Lei, H., Oh, S., Okano, M., Jutterman, R., Goss, K. A., Jaenisch, R., and Li, E., 1996.** De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 122:3195-3205.
- Leutwiler, L.S., Haigh-Evans, B.R., and Meyerowitz, E.M., 1984.** The DNA of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 194:15-23.
- Levine, M., 1933.** Crown Gall on Saguaro. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 60:9.

- Lin, B.Y., 1975.** Parental effects on gene expression in maize endosperm development. Ph.D. thesis. Univ. Wisconsin, Madison.
- Lin, B.Y., 1982.** Association of endosperm reduction with parental imprinting in maize. *Genetics* 100:475-486.
- Lin, B.Y., 1984.** Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics* 107:103-115.
- Linnaeus, C., 1751.** *Philosophia botanica*.
- Linsler, H., Frohner, W., and Kirschner, R., 1953.** Formbildende Wirkungen von Wuchsstoffen. *Phyton (Argentina)*, 3:53-107.
- Liu, Z.L., Han, F.P., Tan, M., Shan, X.H., Dong, Y.Z., Wang, X.Z., Fedak, G., Hao, S. and Liu, B., 2004.** Activation of a rice endogenous retrotransposon *Tos17* in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions. *Theor Appl Genet*, 109(1): 200-209.
- Loiseau, J.E., 1954.** Sur des fasciations provo quees. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 238: 85-87.
- Loiseau, J.E., 1955.** Effect de la destruction totale de la zone periferique de l'apex chez *Impatiens roylei* Walp. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 241: 571-573.
- Lopriore, G., 1904.** Kunstlich erzeugte Verbänderung infolge des Kopfens. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 22: 394-396.
- Lopriore, G., and Buscaglioni, E., 1903.** La fasciazione della radici in rapporto ad azioni traumatiche. *Atti Acad. Gioenia Catania*, 17.
- Lucas, H., Moore, G., Murphy, G., Flavell, R.B., 1992.** Inverted repeats in the long-terminal repeats of the wheat retrotransposon *Wis 2-1 A*. *Mol. Biol. Evol.* 9(4): 716-728.
- Lynn, K.R., and Clevette-Radford, N.A., 1987.** Biochemical properties of lattices from the Euphorbiaceae. *Phytochemistry*, 26(4): 939-944.
- Mace, T., and Mace, S., 2001.** *Cactus and Succulents: Hamlyn care manual*. Octopus Pub. London.
- Machado, M.F., and Prioli, J., 1996.** Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae) by areole activation. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 32(3):199-203.
- Malagnac, F., Wendel, B., Goyon, C., Faugeton, G., Zickler, D., Rossignol, J.L., Noyer-Weidner, M., Vollmayr, P., Trautner, T.A., and Walter, J., 1997.** A gene essential for de novo methylation and development in *Ascomobolus* reveals a novel type of eucaryotic DNA methyltransferase structure. *Cell* 91:281-290.
- Malda, G., Backhaus, R.A., and Martin, C., 1999.** Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *In vitro* cultured cactus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58: 1-9.
- Mangolin, C.A., Prioli, A.J., and Machado, M.F.P.S., 1994.** Isozyme patterns in callus cultures and in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus*. *Biochemical Genetics* 32(7/8): 237-247.
- Manninen, I., Schulman, A.H., 1993.** *BARE-1*, a copia-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology* 22: 829-846.

- Martienssen, B., 1998.** Transposons, DNA methylation and gene control. *Trends Genet.* 14:263-264.
- Martienssen, R.A., 1996.** Epigenetic silencing of *Mu* transposable elements in maize. p. 593-610. In: V. E. A. Russo, R. A. Martienssen, and A. D. Riggs (eds.). *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Martienssen, R.A., and Richards, E.J., 1995.** DNA methylation in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:234-242.
- Martinez-Vasquez, O., and Rubluo, A., 1989.** *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada. *J. Hort. Sci.*, 64:99-105.
- Masters, M.T., 1869.** *Vegatable Teratology*. Ray Society, UK.
- Matzke, A.J.M., Neuhuber, F., Park, Y. D., Ambros, P.F., and Matzke, M.A., 1994.** Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol. Gen. Genet.* 224:219-229.
- Matzke, M.A., and Matzke, A.J.M., 1995.** How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiol*, 107:679-685.
- Matzke, M.A., and Matzke, A.J.M., 1996.** Stable epigenetic states in differentiated plant cells: implications for somaclonal variation and gene silencing in transgenic plants. p. 377-392 .in: V. E. A. Russo, R. A. Martienssen. and A. D. Riggs (eds.). *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 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., and Halperin, W., 1975.** Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *Am. J. Bot* 62:869-877.
- Mauseth, J.D., and Kiesling, R., 1997.** Comparative anatomy of *Neoraimondia roseiflora* and *Neocardenasia herzogiana* (Cactaceae). *Haseltonia* 5:37 –50.
- Mauseth, J.D., and Landrum, J.V., 1997.** Relictual vegetative anatomical characters in Cactaceae: The genus *Pereskia*. *Journal of Plant Research* 110:55 –64.
- McClintock, B., 1957.** Genetic and cytological studies of maize. *Carnegie Inst. Wash. Yearb.* 56:393-401.
- McClintock, B., 1958.** The suppressor-mutator or system of control of gene action in maize. *Carnegie Inst. Wash. Yearb.* 57:415-452.
- McClintock, B., 1959.** Genelic and cytological studies of maize. *Carnegie Inst. Wash. Yearb.* 58:415-429.
- McClintock, B., 1963.** Further studies of gene-control systems in maize. *Carnegie Inst. Wash. Yearb.* 62:486-493.

- Medeiros, L.A., Salvador de Ribeiro, R.C., Gallo, L.A., de Oliveira, E., and Demattê, M.E.S., 2006.** *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. Plant Cell Tissue Culture, 84(2): 147-151.
- Mehra, P.N., and Cheema, G.S., 1980.** *In vitro* studies on *Mammillaria elongata* var. *tenuis*. Phytomorphology, 30:241-249.
- Mertens, T.R., and Burdick, A. B., 1954.** The morphology, anatomy and genetics of a stem fasciation in *Lycopersicon esculentum*. *Amer. J. Bot.* 41, 726-732.
- Messeguer, R., Ganal, M.W., Steffens, J.C., and Tanksley, S.D., 1991.** Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. *Plant Mol. Biol.* 16:753-770.
- Meyer, P., Niedenhof, I., and Lohuis, M.T., 1994.** Evidence for cytosine methylation of non-symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*. *EMBO J.* 13:2084-2088.
- Milicic, D., 1954.** Virus bodies and anomalies of cell division in *Opuntia brasiliensis*. *Protoplasma* 43:228-236.
- Miller, J.T., Dong, F., Jackson, S.A., Song, J., and Jiang, J., 1998.** Retrotransposon-related DNA sequences in the centromeres of grass chromosomes. *Genetics* 150: 1615-1623.
- Mingo-Castel, A.M., Pelacho, A.M., and Funes, E., 1984.** Physiological Studies in *Euphorbia Lathyris* 2. Effect of Growth Regulators on Its Development and Latex Content. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias Serie Agricola*, 31-40.
- Minocha, S.C., and Mehra, P.N., 1974.** Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *Amer. J. Bot.*, 61:168-173.
- Misawa, N., Yamano, Y., Ohyama, K., and Komano, T., 1982.** Protoplast culture of *Euphorbia tirucalli* and oil body formation in the cells. In Fujiwara, A. (ed). *Plant Tissue Culture 1982. Proc. 5th Intl. Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, p. 145-146.
- Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H., and Kakutani, T., 2001.** Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature*, 441:212-214.
- Moebius, G.K.G., Rosas, M.M., and Avila, V.M.C., 2003.** Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem) K. Schum.(Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 39(4):388-393.
- Mohamed-Yasseen, Y., 1994.** Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britt. et Rose). *HortScience* 9(5):559. (Abstract).
- Mohamed-Yasseen, Y., 2002.** Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton and Rose). *In vitro Cellular and Development Biology- Plant* 38(5):427-429.
- Mohamed-Yasseen, Y., and Davenport, T.L., 1993a.** Micropropagation of endangered succulent plants *Aloe juvenna*, *Aloe volkensii* and *Stapelia semota*. *HortScience* 28(5):508.
- Mohamed-Yasseen, Y., and Davenport, T.L., 1993b.** Fast micropropagation of tuna (*Opuntia ficus-indica* Mill.) and plant establishment in soil. *HortScience* 8(5):509. (Abstract).

- Molliard, M., 1900.** Cas de virescence et de fasciation d'origine parasitaire. Rev. gen. Bot. Vol. 12: 323-328.
- Moquin-Tandon, 1840.** Elements de teratologie vegetale. Paris: Loss.
- Moss, E.H., 1959.** Flora of Alberta. Toronto:University of Toronto.
- Muncie, J. H., and Patel, M.K., 1930.** Fasciation of sweet peas. Amer. J. Bot., 17: 218-230.
- Murai, N., Skoog, F., Doyle, M.E., and Hanson, S., 1980.** Relationships between cytokinin production, presence of plasmids, and fasciation caused by strains of *Corynebacterium fascians*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(1):619-623.
- Murashige, T., and Skoog, F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15:473-497.
- Murphy, G., Lucas, H., Moore, G., Flavell, R.B., 1992.** Sequence analysis of WIS-2-1A, a retrotransposon-like element from wheat. Plant Molecular Biology, 20: 991-995.
- Murthy, B.N.S., Murh, S.J., Saxena, P.K., 1998.** Thiadiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant 34:267-275.
- Nadjimov, U.K., Scott, I.M., Fatkhullaeva, G.N., Mirakhmedov, M.S., Nasirullaev, B.U., and Musaev, D.A., 1999.** Conditioning of fasciation by gibberellin and genotype in cotton (*Gossyion hirsutum* L.). Journal of Plant Growth Regulation,18:45-48.
- Nehra, N.S., Kartha, K.K., Stuistnoff, C., and Gils, K.L. 1992.** The influence of plant growth regulator concentration and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerates of strawberry. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 29:257-268.
- Nestler, A., 1894.** Untersuchungen uber Fasciationen. Osterr. Bot. Zeitschr. 44:343-350.
- Neuhuber, F., Park, Y.D., Matzke, A.J.M., and Matzke, M.A., 1994.** Susceptibility of transgene loci In homology-dependent gene silencing. Mol. Gen. Genet. 224: 230-241.
- Ngernprasirtsiri, J., Chollet, R., Kobayashi, H., Sugiyama, T., and Akazawa, T., 1989.** DNA methylation and the differential expression of C4 photosynthesis genes in mesophyll and bundle sheath cells of greening maize leaves. J. Biol. Chem. 264: 8241-8248.
- Nick, H., Bowen, B., Ferl, R.J., and Gilbert, W., 1986.** Detection of cytosine methylation in the maize alcohol dehydrogenase gene by genomic sequencing. Nature 319: 243-246.
- Nilsson, O., Moritz, T., Sundberg, B., Sandberg, G., and Olsson, O., 1996.** Expression of the *Agrobacterium shizogenes rolC* gene in a deciduos forest tree alters growth and development and leads to stem fasciation. Plant Physiol. 112: 493-502.
- Nobel, P.S., 1994.** Remarkable Agaves and Cacti. Oxford University Press, New York.
- Nobel, P.S., and Bobich, E.G., 2002.** Enviromental Biology, In: Nobel P.S. 2002. CACTI – BIOLOGY AND USES. UNIVERSITY OF CALIFORNIA PRESS Berkeley Los Angeles London.
- Norman, A.G., Minaric, C.E., and Weintraub, R.L., 1950.** Herbicides. Ann. Rev. Plant Physiol. 1:141-168.
- Norton, M., and Norton, C.R., 1986.** Change in shoot proliferation with repeated in vitro subculture of shoots of woody species of Rosaceae. Plant Cell Tissue Organ Culture 5: 187-197.

- Ogura-Tsujita, Y. and H. Okubo. 2006.** Effects of low nitrogen medium on endogenous changes in ethylene, auxins, and cytokinins *in vitro* shoot formation from rhizomes of *Cymbidium Kanran*. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 42(6):614-616.
- Oliviera, A.J.B., and Machado M.F.P.S., 2003.** Alkaloid production by callus tissue culture of *Cereus peruvianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104(2): 149-155.
- Ottoline, L.H.M., and Furner, I.J., 1992.** Characterisation of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 116:397-403.
- 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: 163-167.
- Parfitt, B.D., 1991.** Biosystematics of the *Opuntia polyacantha* Complex. Ph. D. thesis, Arizona State University.
- Pearce, S.R., Harrison, G., Li, D., Heslop-Harrison, J.S., Kumar A., and Flavell, A.J., 1996.** The Ty1-copia group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localization. *Mol. Gen. Genet.* 250:305-315.
- Pelah, D., Kaushik, R.A., Mizrahi, Y., and Sitrit, Y., 2002.** Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus magalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71(1):81-84.
- Peschke, V.M., Phillips, R.L., and Gengenbach, B.G., 1991.** Genetic and molecular analysis of tissue culture derived *Ac* elements. *Theor. Appl. Genet.* 82:121-129.
- Peterson, P.A., 1965.** A relationship between the *Spm* and *En* control systems in maize. *Am. Nat.* 44:391-398.
- Peterson, P.A., 1986.** Mobile elements in maize: a force in evolutionary and plant breeding processes. *Stadler Genet. Symp.* 17:47-78.
- Peyritsch, J., 1888.** Über Kunstliche Erzeugung von gefüllten Bluthen und andere Bildungsabweichungen. *S. B. Kais. Acad. Wiss. Wien, Math- nat. Kl.* 97: 597-605.
- Phillips, R.L., Kaeppler, S.M., and Olhoft, P., 1994.** Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 91:5222-5226.
- Pilbeam, J., 1999.** The Cactus File Handbook 6: *Mammillaria*. Cirio Publ. UK.
- Pimienta-Barrios, E., Loera-Quezada, M., and López-Amezcuca, L., 1993.** Estudio anatómico comparativo en colectas del subgénero *Opuntia*. *Agrociencia serieFitociencia* 4:7 –21.
- Pizzetti, M., 1985.** In Simon and Schuster guide to Cacti and Succulents.
- Powers, D.E., and Backhaus, A., 1989.** *In vitro* propagation of *Agave arizonica*. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 16(1):57-60.
- Pradhan, S., and Adams, R.L.P., 1995.** Distinct CG and CNG DNA methyltransferases in *Pisum sativum*. *Plant J*, 7:471-481.
- Preece, J.E. and Sutter, E.G., 1991.** Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field.- In *Micropropagation: Technology and Application* Depergh P.C. and Zimmermann R.H., eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp 71-93.

- Price, C., Stewart, W.S., and Erickson, L.C., 1950.** Some effects of plant growth regulators on bolting and other responses of sugar beets. *Proc. Amer. Soc. Sugarbeet Technol.*, 6:130-136.
- Quemada, H., Roth E.J., and Lark, K. G., 1987.** Changes in methylation of tissue cultured soybean cells detected by digestion with the restriction enzymes HpaII and MspI. *Plant Cell Reports*, 6 (1):63-66.
- Quiala, E., Matos, J., Montalvo G., de Fera M. Chavez M., Capote A., Perez N. Bardon R., and Kowalski B., 2009.** *In vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *J. PACD* 11:18-25.
- Raina, R., Schlappi, M., and Fedoroff, N., 1998.** Epigenetic mechanisms in the regulation of the maize Suppressor-mutator transposon. p. 133-140. In: D. J. Chadwick and G. Gardew (eds.), *Epigenetics*. Wiley, Chichesler, England.
- Ramirez-Malagon, R., Aguilar-Ramirez, I., Borodanenko, A., Perez-Moreno, L., Barrena-Guerra, J.L., Munez-Pelenius, H.G., Ochoa-Alejo, N., 2007.** *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 43:660-665.
- Rance, S.J., Cameron, D.M., and Williams, E.R., 1982.** Correction of crown disorders of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* by application of zinc. *Pl. Soil* 65, 293-296.
- Raunkiaer, C., 1907.** Planterigets livsformer og deres betydning for geografien. Nordisk Forlag, Copenhagen.
- Ravishankar Rai, V., 2002.** Rapid clonal propagation of *Nothapodytes foetida* (Wight) Sheuner – a threatened medicinal tree. *In Vitro Cell. Dev. B. – Plant* 38:347-351.
- Razin A., and Cedar, H., 1991.** DNA Methylation and Gene Expression. *Microbiological Reviews*. 55(3): 451-458.
- Razin, A., and Kafri, T., 1994.** DNA methylation from embryo to adult. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 48:53-81.
- Reed, T., 1912.** Some points in the morphology and physiology of fasciated seedlings. *Ann. Bot.* 26: 389-402.
- Reinhardt, D., Mandel, T., and Kuhlemeier, C., 2000.** Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* 12: 507–518.
- Reinhardt, D., Pesce, E.R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J., and Kuhlemeier, C., 2003.** Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426: 255–260.
- Rhounim, L., Rossignol, J.L., and Faugeron, G., 1992.** Epimutation of repeated genes in *Ascobolus immersus*. *EMBO J.* 11:4451-4457.
- Richwine, A.M., Triton, J., and Thompson, G., 1994.** Micropropagation of *Hesperaloe parviflora*. *Hortscience* 29(5):31 (Abstract).
- Robert, M.L., Herrera, J.L., Chan, J.L., and Contreras, F., 1992.** Micropropagation of *Agave* spp. In BAJAJ, Y.P.S. (ed), p. 306-329.
- Rodriguez-Garay, B., and Rubluo, A., 1992.** *In vitro* morphogenetic responses of endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cactus and Succulent Journal (U.S.)* 64(3):116-119.

- Rogers, S.M.D., 1993a.** Optimization of plant regeneration and rooting from leaf explants of five rare *Haworthia*. *Scientia Horticulturae* 56: 157-161.
- Rogers, S.M.D., 1993b.** Culture phenotype affects on regeneration capacity in the monocot *Haworthia comptoniana*. *In vitro Cell and Developmental Biology*. 29:9-12.
- 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.
- Rosenzopf, E., 1951.** Are protein spindles virus inclusions? *Phyton* 3: 95-101.
- Rowley, G., 1978.** In "THE ILLUSTRATED ENCYCLOPEDIA OF SUCCULENTS". Ed. Gordon Rowley p. 178-179, 201- 202.
- Rowley, G., 1990.** Mathematical *Mammillarias*. The journal of the *Mammillaria* Society 30: 47-48.
- Rowley, G., 2006.** Teratopia: The World Of Cristate And Variegated Succulents. Cactus and Co, publ. Italy.
- Rubluo, A., Arriaga, E., Arias, S., Perez Amador, C., Amor, D., Santos, E., Rojas, E., and Elizalde, P., 1990.** Tissue culture applications in the endangered *Mammillaria huitzipochtli*, (Cactaceae). Abstracts VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Abs. No. A3,191, p. 130.
- Rubluo, A., Chavez, V., Martinez, A.P., and Martinez-Vasquez, O., 1993.** Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in-vitro* cultivation. *Biological Conservation* 63: 163-169.
- Russell, C.E., and Felker, P., 1987.** The prickly-pears (*Opuntia* spp., Cactaceae): a source of human and animal food in semiarid regions. *Economic Botany*, 41:433-455.
- Russell, G. J., Walker, P.M.B., Elton, R.A., and Subak-Sharpe, J.H., 1976.** Doublet frequency analysis of fractionated vertebrate nuclear DNA. *J. Mol. Biol*, 108:1-23.
- Sachar, R.C., and 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.
- Sachs, J., 1859.** Physiologische Versuche uber die Keimung der Schminkbohne (*Phaseolus multiflorus*). S.B. kais. Akad. Wiss. Wien, Math. Naat. Kl. 37: 86-151.
- 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.
- Sajeva, M., and Constanzo, 1998.** Succulents, The illustrated dictionary, p 18. A Cassell Book, UK
- Sakakibara H., Hayakawa, A., Deji, A., Gawronski, S., and Sugiyama, T., 1999.** *Plant Mol. Biol.*41:563-573.
- Sakakibara H., Suzuki, M., Takei, K., Deji, A., Taniguchi M., and Sugiyama, T., 1998.** *Plant Jour.*14:337-344.
- Salisbury, G., and Ross, C., 1991.** In "Plant Physiology". Fourth edition, Florence: Brooks Cole.242-244.
- Samuelson, M.E., Larsson, C.M., 1993.** Nitrate regulation of zeatin riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium. *Plant Sci* 93:77-84.

- Samyn, G.L.J., 1993.** *In vitro* propagation of ponytail palm: producing multiple-shoot plants. HortScience 28(3) : 225.
- Sanchez Martínez, E., 1994.** Avances en la propagación *In vitro* de cactáceas. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey Campus Queretaro, Mexico, p. 39.
- Sankewitsch, E., 1952.** Untersuchungen über Röntgenmorphosen bei *Nicotiana rustica* L. Beitr. Biol. Pflanzen, 29:1-74.
- SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Springer, P., Edwards, K.J., Lee, M., Avramova, Z., Bennetzen, J.L., 1996.** Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. Science 274: 765-769
- Sano, H., Kamada, I., Youssefian, S., Katsumi, M., and Wabiko, H., 1990.** A single treatment of rice seedlings with 5-azacytidine induces heritable dwarfism and undermethylation of genomic DNA. Mol. Gen. Genet. 220:441-447.
- Santos-Diaz, M.S, Ontiveros, R.M., Gomez, A.A, Santos-Diaz, M.L., 2003b.** *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In vitro* Cell. Biol. – Plant 39:480-484.
- Santos-Diaz, M.S., Ontiveros, R.M., Gomez, A.A, Santos-Diaz, M.L., 2003a.** Clonal propagation of *Turbincarpus laui* Glass and Foster, a cactus threatened with extinction. Bradleya 21:7-12.
- Santos-Diaz, M.S., Rodriguez, C.E., Santos-Diaz, M.L., 2006.** Effect of coconut water, darkness and auxins on morphogenesis of *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Cactacea). Bradleya 24:83-88.
- Sawsan, S.S., Dahab, T.A., and Youssef, E.M.A., 2004.** *In vitro* propagation of Cactus *Cereus peruvianus* L. Horticulture Research Institute, Ornamental Horticulture Department, Faculty of agriculture, Cairo University, Egypt.
- Schlappi, M., Smith, D., and Fedoroff, N., 1993.** *TnpA* trans-activates methylated maize Suppressor-mutator transposable elements in transgenic tobacco. Genetics 133: 1009-1021.
- Schoene, G., and Yeager, T., 2005.** Micropropagation of sweet viburnum (*Viburnum odoratissimum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 271-277.
- Schoibe, A., and Woehrmann- Hillmann, B., 1957.** Über gengesteuerte formbildungsprozesse beim stengelbau der erbse. Z. Bot. 45:97-121.
- Schoute, J.C., 1936.** Fasciation and dichotomy. Rec. Trav. Bot. Neerl. 33:649-669.
- Schuster, W., Brennicke, A., 1987.** Plastid, nuclear and reverse transcriptase sequences in the mitochondrial genome of *Oenothera*: is genetic information transferred between organelles via RNA? EMBO J. 45: 61-78.
- Schwartz, D., and Dennis, E., 1986.** Transposase activity of the *Ac* controlling element in maize is regulated by its degree of methylation. Mol. Gen. Genet, 205:476-482.
- Selker, E.U., 1997.** Epigenetic phenomena in filamentous fungi: useful paradigms or repeated induced confusion? Trends Genet. 13:296-301.
- Shallanon, H., and Maziere, Y., 1992.** Influence of growth room and vessel humidity on the *in vitro* development of rose plants. Plant Cell Tissue Organ Culture 30: 121-125.

- Sharma, V.K., Fletcher, J.C., 2002.** Maintenance of shoot and floral meristem cell proliferation and fate. *Plant Physiology* 129: 31–39.
- Shen, T.M., Cowen, R.D., and Meyer, M.M., 1991.** *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *HortScience* 26(6):756. (Abstract).
- Shibuya, T., 1939.** The occurrence of fasciation in flax stem in relation to the environment. *J. Soc. Trop. Agric.* 11:227-236.
- Shikari, M., Yosimura, A., and Iwata, N., 1998.** Increased frequency of chimeric plants in progenies of dwarf chimeric rice plant treated with 5-azacytidine. *Rice Genetics Newsletter, Japan*, 14:55-57.
- Shurly, E., 1959.** *Cacti*. Ward, Lock and Company, Ltd. London pp. 83-87.
- Sidik, N.J., 2008.** Establishment of Tissue Culture and Evaluation of Biological Activities of Jarum Tujuh Bilah (*Pereskia bleo* K.) Thesis Submitted to the School of Graduate Studies, Universiti Putra Malaysia.
- Simerda, B., 1990.** Effective ways of propagating endangered cacti . *Brit. Cact. Succ. J.*, 8: 9-12.
- Smith, J.A.C., 1984.** Water relations in CAM plants. In: *Eco-Fisiologia de Plantas CAM* (E. Medina), pp. 30–51. Centro de Ecologia, Caracas .
- Smith, R.H., Burdick, P.J., Antony, J., and Reilley, A.A., 1991.** *In vitro* propagation of *Coryphantha macromeris*. *HortScience* 26(3), p 315.
- Snyder, E.E., and Weber, D.J., 1966.** Causative factors of cristation in the cactaceae. *Cactus and Succulent Journal (U.S.)*, 30:27-32.
- Sorauer, P., 1921.** *Handbuch der Pflanzenkrankheiten*. Bd. L. Berlin, Perey.
- Spena, A., Viotti, A., and Pirrotta, V., 1983.** Two adjacent genomic zein sequences: Structure, organization and tissue specific restriction pattern., *J. Mol. Biol.* 169:799-811.
- Srinivasan, C., and Mullins, M.G., 1981.** Physiology of Flowering in the Grapevine – Review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 32(1): 47-63.
- Srivastava, P.S., and Glock, H., 1987.** FPA-induced fasciation of shoots of birch *In vitro*. *Phytomorphology*, 37 (4): 395-399.
- Starling, R. 1985.** *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cact. Succ. J. (U. S.)* 57:114-115.
- Starling, R.J., and Hutson, R., 1984.** Sterile culture of succulent plants. *Brit. Cact. Succ. J.*, 2: 69-70.
- Steele-Scott, N., Kavanagh, T.A., and Timmis, J.N., 1984.** Methylation of rRNA genes in some higher plants. *Plant Sci. Lett.* 35:213-217.
- Steeves, T.A., Sussex, I.M., 1989.** *Patterns in plant development*, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Stergiou, G., Katsiotis, A., Hagidimitriou, M., and Loukas, M., 2002.** Genomic and chromosomal organization of *Ty1*-copia-like sequences in *Olea europaea* and evolutionary relationships of *Olea* retroelements. *Theor Appl Genet*, 104:926-933.
- Stevenick, R.F.M., 1956.** The occurrence of funnel leaflets and ringfasciation in yellow lupins. *Ann. Bot.* 20:385-392.

- Stratham, G., 1953-1955.** From England. *Cactus and Succulent Journal*. 25-27:183.
- Stuppy, W., and Nagl, W., 1992.** Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya* 10: 85-88.
- Surani, M.A., 1998.** Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell* 93:309-312.
- Synge, M.P., 1981:** In: *The Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening*. Second ed. III.
- Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M., Sugiyama. T., 2001.** Nitrogen dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol* 42:85-93.
- Tang, Y., and Skopurska, H.T., 1997.** Expression of fasciation mutation in apical meristems of soybean *Glycine max* (Leguminosae). *Amer. J. Bot.* 84(3):328-335.
- Taylor, S.M., Constantinides, P.A. and Jones, P.A., 1984.** 5-Azacytidine, DNA methylation, and differentiation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 108:115-127.
- Theiss, G., Schleichner, R., Schimpff-Weiland, R., and Follmann, H., 1987.** DNA methylation in wheat. Purification and properties of DNA methyltransferase. *Eur. J. Biochem.* 167:89-96.
- Thomson, K.S., Hertel, R., Müller, S., and Tavares, J.E., 1973.** 1-N-naphthylphthalamic acid and 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Planta*. 109(4): 337-352.
- Tideman, J., and Hawker, J.S., 1982.** *In vitro* propagation of latex-production plants. *Am. Botn.*, 49: 273-279.
- Traas, J., and Vernoux, T., 2002.** The shoot apical meristem: the dynamics of a stable structure. *Philosophical Transactions of the Royal Society London, Series B* 357: 737-747.
- Troll, A.J., 1952.** Viren, deren Schaden und genetische Resistenzfragen bei *Lupinus luteus*. *Zuchter* vol. 22: 164-175.
- Tsaftaris, A.S., and Polidoros, A.N., 2000.** DNA methylation and plant breeding. *Plant Breeding Reviews*, ed. J.Wiley and Sons Inc. Canada. 18:87-176.
- Tsaftaris, A.S., Kafka, M., and Polidoros, A.N., 1997.** Epigenetic modifications of total genomic maize DNA: The role of growth conditions, p. 125-130. In: A. S. Tsaftaris (ed.), *Genetics, biotechnology and breeding of maize and sorghum*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Tsaftaris, A.S., Kafka, M., Polidoros, A., and Tani, E., 1999.** Epigenetic changes in maize DNA and heterosis. In: J. Coors (ed.). *The genetics and exploitation of heterosis in crops*. Am. Soc. Agronomy, Madison, WI.
- Upreti, J., Dhar, U., 1996.** Micropropagation of *Bauhinia valii* Wight and Arnott-a leguminous liana. *Plant Cell Rep.* 16:250-254.
- Uschdraweit, H.A., 1962.** Views Related Monstrosity in Cactus Plants. *Z.* 43:320-322.
- Van Overbeek, J., 1952.** Agricultural application of growth regulators and their physiological basis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 3:87-108.

- Van Steveninck, R.F.M., 1956.** The occurrence of funnel leaflets and ringfasciations in yellow lupins. *Ann. Bot.*, 20: 385-392.
- Vanyushin, B.F., Tkacheva, S. G., and Belozerski, A.N., 1970.** Rare bases in animal DNA. *Nature* 225:948-949.
- Varga, A., Thoma, L.H., and Bruinsa, J., 1988.** Effects of auxins and cytokinins on epigenetic instability of callus-propagated *Kalanchoe blossfeldiana* Pelln. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 15:223-231.
- Vershinin, A.V., and Ellis, T.H.N., 1999.** Heterogeneity of the internal structure of *PDR1*, a family of *Ty1*-copia-like retrotransposons in pea. *Mol. Gen. Genet.* 262: 703-713
- Vicient, C.M., Kalendar, R., Anamthawat-Jonsson, K., Suoniemi, A., Schulman, A.H., 1999.** Structure, functionality, and evolution of the *BARE-1* retrotransposon of barley. *Genetica* 107: 53-63.
- Vilpo, I. A., Rasi, S., Suvato, E., and Vilpo, L.M., 1986.** An improved radioimmunoassay for quantitation of DNA methylation. *J. Immun. Meth.* 87:179-183.
- Vinterhalter, B., Ninković, S., Zdravkovic- Korac, S., Subotic, A., and D. Vinterhalter. 2007.** Effect of nitrogen salts on the growth of *ceratonia siliqua* l. shoot cultures *Arch. Biol. Sci.*, 59 (3):217-222.
- Vitkovskii, V., 1959.** Fasciation of *Syringa josikaea* shoots. *Botanicheskii J.* 44:505-506.
- Voytas, D.F., 1996.** Retroelements in genome organization. *Science* 274: 737-738
- Voytas, D.F., and Naylor, G.J.P., 1998.** Rapid flux in plant genomes. *Nature* 20: 6-7
- Voytas, D.F., Cummings, M.P., Konieczny, A., Ausubel, F.M., Rodermel, S.L., 1992.** *Copia*-like retrotransposons are ubiquitous among plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7124-7128
- Vyskot, B., and Jara, Z., 1984.** Clonal propagation of cacti through axillary buds *In vitro*. *J. Hort. Sci.*, 59: 449-452.
- Vyskot, B., Koukalova, B., Kovarik, A., Sachambula, L., Reynolds, D., and Bezdek, M., 1995.** Meiotic transmission of a hypomethylated repetitive DNA family in tobacco. *Theor. Appl. Genet.* 91:659-660.
- Wagner, I., and Capesius, I., 1981.** Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high performance liquid chromatography, *Biochim. Biophys. Acta* 654:52-56.
- Wagner, L.S. Beck, S.L., 1993.** Identification and quantification of the major endogenous cytokinins in pistachio seedlings. *Journal of plant growth regulation.* 32: 351 –357.
- Wakhlu, A.K., and Bhau, B.S., 2000.** Tissue culture studies in mulberry – A review. *Sericologia* 41: 1–20.
- Warming, E., 1909.** *Oecology of Plants.* Clarendon, Oxford.
- Watson, D.J., Caudy, A.A., Myers, R.M., and Witkowski, J.A., 2007.** Ανασυνδυασμένο DNA. Γονίδια και Γονιδιώματα – Μια Συνοπτική Παρουσίαση. 1^η Ελλ. Έκδοση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, Αλεξανδρούπολη.
- Watson, D.P., 1948.** An anatomical study of the modification of bean leaves as a result of treatment with 2,4-D. *Amer. J. Bot.* 35:543-555.

- Waugh O'Neill, R.J., O'Neill, M.J., and Marshall Graves, J.A., 1998.** Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature* 393:68-72.
- Weber, F., and Kenda, G., 1952.** Protein spindles associated with cactus virus. *Protoplasma* 41:111-120.
- Weber, H., Ziechmann, C., and Graessmann, A., 1990.** *In vitro* DNA methylation inhibits gene expression in transgenic tobacco. *EMBO J.* 9:4409-4415.
- Weih, F., Nitsch, D., Reik, A., Schutz, G., and Becker, P.B., 1991.** *EMBO J.* 10: 2559-2567.
- Wenck, K., 1952.** Die Wirkung von Wuchs und Hemmstoffen auf die Blattform. *Z. Bot.* 40:33-51.
- Werner, R., 1988.** Unusual growth in succulent Euphorbias. 'Fasciation & Dichotomus Branching'. *The Euphorbia journal*, Strawberry Press, Mill California 5: 7-17.
- Wessler, S.R., 1996.** Plant retrotransposons: Turned on by stress. *Current Biology* 6(8): 959-961.
- West, J., 1929.** Crests. *Cactus and Succulent Journal* 1-2:175-176.
- White, O.E., 1916.** Studies of teratological phenomena in their relation to evolution and the problems of heredity. II. The nature, causes, distribution and inheritance of fasciation with special reference to its occurrence in *Nicotiana*. *Z. indukt. Abstamm. U. Vererb.-Lehre*, 16: 49-185.
- White, O.E., 1948.** Fasciation. *Bot Rev.*, 14, p 319-358.
- Willert, D.J., Eller, B.M., Werger, M.J.A., and Brinckmann, E., 1990.** Desert succulents and their strategies. *Vegetatio* 90: 133-143.
- Willert, D.J., Eller, B.M., Werger, M.J.A., Brinckman, E., and Ihlenfeldt, H.D., 1992.** Life strategies of succulents in deserts, with special reference to the Namib desert. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Wolthuys, J.J.V, 1938.** The Enigma of the Monstrosity and Cristation in Succulent Plants. Joh. Enschede En Zonen Grafische Inrichting N. V. Haarlem (Holland).
- Wolthuys, W., 1945.** The Enigma Of The Origin Of Monstrosity And Cristation In Succulent Plants. DE TORENLAAN pub. ASSEN, Holland.
- Worsdell, W.C., 1915-1916.** The Principles Of Plant Teratology. 2 Vols. Ray Society, UK.
- Wright, D.A., and Voytas, D.F., 1998.** Potential retroviruses in plants: *Tat1* is related to a group of *Arabidopsis thaliana* *Ty3*-gypsy retrotransposons that encode envelope-like proteins. *Genetics* 149(2): 703-715
- Wyka, T.P., Hamerska, M., and Wroblewska, M., 2006.** Organogenesis of vegetative shoots from *In vitro* culture flower buds of *Mammillaria albicoma* (*Cactaceae*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87(1), p 27-32.
- Yamamoto, Y., Mzugug, F.F.L.R., and Yamada, Y., 1981.** Chemical constituents of cultured cells of *Euphorbia tirucalli* and *E. millii*. *Plant Cell Reports* 1: 29-30.
- Yesufu, H.M.J.I., Honley, A., Rinaldi, A., and Adams, R.L.P., 1991.** DNA methylase from *Pisum sativum*. *Biochem. J* 273: 469-475.

- Yoder, J. A., Walsh, C. P., and Bestor, T.H., 1997.** Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13:335-340.
- Zhang, B., Stoltz, L.P., and Snyder, J.C., 1989.** *In vitro* propagation of *Euphorbia fulgens*. *Hortscience*, 22(3): 486-488.
- Zielinski, O., 1945.** Fasciation in horticultural plants with special reference to the tomato. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 46:263-268.
- Zimmerman, P.W., 1951.** Formative effects of hormone-like growth regulators. pp. 175-183. In F. Skoog (ed). *Plant Growth Substances*, Univ. Wisconsin. Press, Madison.
- Βυζαντινόπουλος, Σ., 1992.** Φυτοτοξικότητα στο καλαμπόκι από τη χρήση των ζιζανιοκτόνων. *Γεωργία και Ανάπτυξη*, 19(2):15-19.
- Καββάδας Δ.** 1956. Βοτανικό Φυτολογικό Λεξικό, τόμος Δ.
- Διαδίκτυο 1.:** /www.euphorbia-international.org/
- Μπαλωτής, Γ., 1997.** Πολλαπλασιασμός *in vitro* των παχυφύτων *Mammillaria elongata* και *Haworthia fasciata*. Πτυχιακή Μελέτη, Γ.Π.Α.
- Μπαλωτής, Γ., 2001.** Σύγκριση της *in vitro* συμπεριφοράς τυπικών και *cristata* μορφών των *Euphorbia pugniformis* και *Euphorbia lactea*. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γ.Π.Α.
- Μπαλωτής, Γ., και Παπαφωτίου, Μ., 2004α.** Δυνατότητα πολλαπλασιασμού *in vitro* της τυπικής και *cristata* μορφής της *Euphorbia pugniformis* . Πρακτικά ΕΕΕΟ, 11B: 429-432.
- Μπαλωτής, Γ., και Παπαφωτίου, Μ., 2004β.** Δυνατότητα πολλαπλασιασμού *in vitro* της τυπικής και *cristata* μορφής της *Euphorbia lactea*. Πρακτικά ΕΕΕΟ, 11B: 429-432.
- Μπαλωτής, Γ., και Παπαφωτίου, Μ., 2007.** Επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών στον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *Euphorbia lactea* var. *cristata* “Grey Ghost” και αξιολόγηση της διατήρησης του ετεροχρωματισμού της στις υποκαλλιέργειες. Πρακτικά ΕΕΕΟ, 12B: 211-214.
- Παπαφωτίου, Μ., Μπαλωτής, Γ., Παπαγεωργίου, Σ., και Χρονόπουλος, Ι., 1998.** Δυνατότητα πολλαπλασιασμού *in vitro* των *Mammillaria elongata* και *Mammillaria zeilmanniana*. Πρακτικά ΕΕΕΟ, 7: 397-400.

