



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ  
ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΛΟΥ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ  
ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΜΕΡΗ ΦΥΤΩΝ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΑΣ  
(ROSA SP.)**



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΛΥΚΑΣ ΧΡΗΣΤΟΣ  
ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΚΑΡΑΤΟΣΙΔΟΥ ΧΑΡΟΥΛΑ-ΜΑΡΙΑ

ΒΟΛΟΣ, 2017

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε σε διάστημα δυο περίπου ετών, από τον Φεβρουάριο του 2016 έως τον Οκτώβριο του 2017, στο εργαστήριο Ανθοκομίας του τμήματος Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βόλο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Λύκα Χρήστο για την ανάθεση αυτού του θέματος και τη δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με έναν κλάδο πολλά υποσχόμενο για την επιστήμη της Γεωπονίας, καθώς και για την βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε.

Θα ήθελα, επιπρόσθετα, να ευχαριστήσω την οικογένεια και τις φίλες μου για την αδιάλειπτη ψυχολογική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν, καθώς και για την βοήθεια τους όλο αυτό το διάστημα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή ερευνάται η δυνατότητα παραγωγής κάλου από διάφορα βλαστικά μέρη της τριανταφυλλιάς, όπως είναι ο βλαστός, τα φύλλα και ο μίσχος. Επιλέχθηκε η τριανταφυλλιά ως φυτό μελέτης γιατί αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα ανθοκομικά φυτά και ευρέως χρησιμοποιούμενα. Σήμερα καλλιεργούνται πάνω από 30.000 ποικιλίες τριαντάφυλλων με σημαντική οικονομική σημασία. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε και προετοιμάστηκε το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα πάνω στο οποίο στη συνέχεια τοποθετήθηκαν έκφυτα από διάφορα τμήματα του φυτού της τριανταφυλλιάς για να αναπτυχθεί ο κάλος. Στο πείραμα έγινε, επίσης, προσπάθεια για δημιουργία καλικού εναιωρήματος από τα προϋπάρχοντα καλικά κύτταρα . Κι εδώ, μελετήθηκαν οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την καλλιέργεια.

Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν τόσο από την ανάπτυξη του κάλου όσο και από τα καλικά εναιωρήματα ήταν αρκετά θετικά, αν και υπάρχει μεγάλο περιθώριο αύξησης του ποσοστού επιτυχίας, αλλά και ταυτόχρονης μείωσης των μολύνσεων.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>3</b>
<b>Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>6</b>
1. ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΑ.....	6
1.1. Βοτανική περιγραφή-ιστορικά.....	6
1.2. Χρήσεις του τριαντάφυλλου και οικονομική σημασία.....	6
1.3. Πολλαπλασιασμός τριανταφυλλιάς.....	8
2. ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	9
2.1. Η έννοια της ιστοκαλλιέργειας.....	9
2.2. Χρήση της ιστοκαλλιέργειας.....	9
2.3. Η ιστορία της ιστοκαλλιέργειας στο τριαντάφυλλο.....	10
2.4. Πλεονεκτήματα της ιστοκαλλιέργειας.....	10
2.5. Μειονεκτήματα της ιστοκαλλιέργειας.....	11
2.6. Προβλήματα μικροπολλαπλασιασμού και αντιμετώπισή τους.....	12
2.6.1. Μολύνσεις.....	12
2.6.2. Υάλωση.....	12
2.6.3. Αποτυχία αναγέννησης.....	13
2.6.4. Έκκριση φαινολών.....	13
2.7. Στάδια μικροπολλαπλασιασμού.....	13
2.8. Κατάλληλη επιλογή εκφύτου.....	14
2.9. Μητρικό φυτό.....	16
2.10. Παράγοντες του περιβάλλοντος.....	17
3. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΛΟΥ.....	18
3.1. Γενικά.....	18
3.2. Δημιουργία κάλου από βλαστικά μέρη τριανταφυλλιάς.....	19
3.3. Καλλιέργεια αιωρημάτων κυττάρων (cell suspension culture).....	20
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	21

<b>Β.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>22</b>
1.Θρεπτικό Υπόστρωμα.....	22
2. Φυτικό υλικό- Δημιουργία κάλου.....	23
3. Δημιουργία καλικών κυτταρικών εναιωρημάτων.....	26
4. Επαναλήψεις δημιουργίας κάλου.....	27
<b>Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>30</b>
1. Πρώτη παραγωγή κάλου.....	30
2. Δεύτερη έως πέμπτη επανάληψη παραγωγής κάλου.....	34
3. Έκτη επανάληψη παραγωγής κάλου.....	36
4. Αποτελέσματα δημιουργίας εναιωρήματος καλικών κυτταρικών.....	40
<b>Δ.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>47</b>
1.Μολύνσεις.....	47
2.Σχηματισμός κάλου.....	48
3.Καλικό κυτταρικό εναιώρημα.....	49
<b>Ε.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>50</b>
<b>ΣΤ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>51</b>

## **A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΑ**

#### **1.1.Βοτανική περιγραφή-ιστορικά**

Η τριανταφυλλιά είναι το πιο διαδεδομένο και δημοφιλές καλλωπιστικό φυτό. Ανήκει στο γένος *Rosa* της οικογένειας *Rosaceae*. Το γένος αυτό περιέχει περίπου 200 είδη (18 είναι αυτοφυή της Ελλάδος) τα περισσότερα από τα οποία παρατηρούνται στις υποτροπικές περιοχές του βόρειου ημισφαιρίου (Roberts and Smith, 1990). Λόγω της εμπορικής της αξίας έχουν δημιουργηθεί πάρα πολλές ποικιλίες και υβρίδια με χρώματα ανθέων που ποικίλουν, ενώ υπάρχουν και ποικιλίες με δίχρωμα άνθη. Τα τριαντάφυλλα είναι ορθόκλαδα, αναρριχητικά ή θάμνοι, οι μίσχοι των οποίων είναι συνήθως γεμάτοι με οπές με διάφορα σχήματα και μεγέθη, που ονομάζονται αγκάθια. Τα φύλλα είναι εναλλασσόμενα και πρυμνοειδή, συνήθως με ωοειδή φυλλάρια τα οποία είναι οξύληκτα. Τα λουλούδια των άγριων τριαντάφυλλων έχουν συνήθως πέντε πέταλα, ενώ τα άνθη των καλλιεργημένων τριαντάφυλλων είναι συχνά διπλά (δηλαδή με πολλαπλό αριθμό πετάλων). Η διάμετρος των λουλουδιών κυμαίνεται από 1,25 εκατοστά στα φυτά μινιατούρες έως και περισσότερα από 17,5 εκατοστά σε υβρίδια. Μεταξύ των πολλών ειδών, μόνο επτά έχουν αναγνωρισθεί ότι συνέβαλαν στην ανάπτυξη των νέων ποικιλιών. Οι σημερινές ποικιλίες είναι υβρίδια που προήλθαν από διασταυρώσεις, επί σειρά ετών, μεταξύ διάφορων Ασιατικών –Ευρωπαϊκών ειδών. Τα πρώτα υβρίδια προήλθαν από διασταυρώσεις μεταξύ του *R. chinensis*, *R. odorata*, και *R. gallica* που προέρχονται από την Κίνα. Αυτά διασταυρώθηκαν με το *R. odorata* και έδωσαν τα *tea roses* από τα οποία το 1920, προήλθαν τα υβρίδια τσαγιού, τα οποία ονομάστηκαν έτσι λόγω της ομοιότητας του ελαφρού αρώματος τους με τα νεοσυγκομισθέντα φύλλα τσαγιού.

#### **1.2.Χρήσεις του τριαντάφυλλου και οικονομική σημασία**

Η τριανταφυλλιά καλλιεργείται για διάφορους εμπορικούς, κυρίως, αλλά και επιστημονικούς-ερευνητικούς σκοπούς, οι οποίοι κάνουν επιτακτική την ανάγκη για τη μαζική παραγωγή του φυτού σε σύντομο χρονικό διάστημα και απαλλαγμένο από ιούς και ασθένειες. Οι κυριότερες χρήσεις του τριαντάφυλλου είναι:

- *Ως διακοσμητικά φυτά.* Περισσότερα από 200 εκατομμύρια θάμνοι φυτεύονται κάθε χρόνο σε κήπους σε όλο τον κόσμο, που αντιπροσωπεύουν μια λιανική αγορά περίπου 720 εκατ. δολαρίων.
- *Ως δρεπτά άνθη.* Η σημασία του τριαντάφυλλου ως κομμένο λουλούδι υποδεικνύεται από τις πωλήσεις, που είναι άνω των 4 δισεκατομμυρίων ανθέων με ετήσια λιανική αξία της τάξης των 11 δισεκατομμυρίων δολαρίων. Στην περιοχή του Ηνωμένου Βασιλείου, περίπου 30 εκατομμύρια καλλιεργούμενα φυτά και 0,5 εκατομμύριο δρεπτά άνθη πωλούνται ετησίως. Στην ηπειρωτική Ευρώπη, υπάρχει μεγαλύτερη ζήτηση για δρεπτά άνθη και 900 εκατομμύρια πωλούνται ετησίως σε μια μόνο αγορά στο Aalsmere (Ολλανδία) (SHORT and ROBERTS).
- *Για το άρωμα που παράγει.* Τα τριαντάφυλλα χρησιμοποιούνται από τις εμπορικές αρωματοποιίες για το αιθέριο έλαιο που παράγουν, καθώς ακόμα και ορισμένες φορές για φαρμακευτικούς σκοπούς ([en.wikipedia.org/wiki/Rose](http://en.wikipedia.org/wiki/Rose)).
- *Ως συστατικό σε φαγητά και ποτά.* Στη μαγειρική-ζαχαροπλαστική χρησιμοποιούνται οι "καρποί" του τριαντάφυλλου σε μαρμελάδες, ζελέ, σούπες ή μεταποιούνται για χρήση σε τσάι, κυρίως λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε βιταμίνη C. Επίσης, χρησιμοποιούνται για την παρασκευή σιροπιού και ελαίου, αλλά και ως συστατικά σε προϊόντα περιποίησης του δέρματος και σε καλλυντικά. Ένα ακόμη σχετικό προϊόν είναι το ροδόνερο που χρησιμοποιείται για το μαγείρεμα, τα καλλυντικά, την ιατρική και τις θρησκευτικές πρακτικές.
- *Στην Ιατρική.* Το τριαντάφυλλο χρησιμοποιείται ως δευτερεύουσα πηγή βιταμίνης C.

### 1.3.Πολλαπλασιασμός τριανταφυλλιάς

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρέως για τον πολλαπλασιασμό της τριανταφυλλιάς είναι οι εξής:

1. Με μοσχεύματα.
2. Με σπόρο.
3. Με εμβολιασμό.
4. Με την ιστοκαλλιέργεια.

Ο πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα είναι κατάλληλος για όλα τα τυπικά είδη και τα υβρίδιά τους, για τις μινιατούρες τριανταφυλλίες, τις τριανταφυλλίες με μακριά κλαδιά, που δεν είναι πολύφορες, και τις παραδοσιακές θαμνώδεις τριανταφυλλίες ( Davidson, 1982 ). Τα φυτά που παράγουμε με αυτό τον τρόπο είναι λιγότερο εύρωστα αλλά ριζώνουν πιο εύκολα.

Ο πολλαπλασιασμός με σπόρο μπορεί να γίνει σε όλα τα τυπικά είδη τριανταφυλλιάς, τα φυτά διατηρούν όλα τα γονικά χαρακτηριστικά και ανθίζουν μετά από 3 περίπου χρόνια.

Ο πολλαπλασιασμός με εμβολιασμό στην τριανταφυλλιά γίνεται κυρίως με ενοφθαλισμό και με εγκεντρισμό. Στην περίπτωση του ενοφθαλισμού δημιουργούνται κάποια προβλήματα όπως το ότι οι βλαστοί από τους οποίους λαμβάνονται τα εμβόλια θα πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα να συντηρηθούν, υπάρχει δυσκολία στην αποκόλληση των οφθαλμών και την ανασήκωση του φλοιού του υποκειμένου, καθώς παίζει ρόλο και η φυλλική επιφάνεια του υποκειμένου και η εποχή αφαίρεσής της. Όσον αφορά τον εγκεντρισμό, θα πρέπει να έχουμε καλά ξυλοποιημένο υποκείμενο και να γίνεται σύμπτωση των καμβίων υποκειμένου-εμβολίου, το εμβόλιο θα πρέπει να έχει την ίδια διάμετρο με το υποκείμενο κι έτσι προκύπτει περιορισμός στον αριθμό των εμβολίων. Το σημαντικότερο, ωστόσο, μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η αδυναμία προγραμματισμού της παραγωγής, καθώς ο εμβολιασμός πρέπει να γίνει λίγο πριν την έναρξη της βλαστικής περιόδου.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι πολλαπλασιασμού είναι πολύ αργές, χρονοβόρες και κουραστικές. Επιπλέον, οι ασθένειες που συχνά υπάρχουν και μεταφέρονται με τις πιο πάνω μεθόδους πολλαπλασιασμού ωθούν στην αναζήτηση άλλων μεθόδων πολλαπλασιασμού. Η ιστοκαλλιέργεια από την άλλη φαίνεται να είναι μια πολύ καλή εναλλακτική μέθοδος πολλαπλασιασμού υγιών φυτών, μαζικά και γρήγορα.



## **2.ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ**

### **2.1.Η έννοια της ιστοκαλλιέργειας**

Η ιστοκαλλιέργεια είναι μια μέθοδος αγενούς αναπαραγωγής στην οποία χρησιμοποιούνται εξελιγμένες τεχνικές και αφορά στην παραγωγή φυτών από πολύ μικρά φυτικά τμήματα, ιστούς ή κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται κάτω από ασηπτικές, ελεγχόμενες συνθήκες μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Η διαδικασία που χρησιμοποιείται είναι γνωστή ως τεχνική *in vitro*, με την οποία γίνεται απομάκρυνση κυττάρων από τον επιθυμητό οργανισμό και στη συνέχεια διατήρηση και ανάπτυξή τους σε ένα τεχνητό περιβάλλον καλλιέργειας με ελεγχόμενες συνθήκες. Ο μικροπολλαπλασιασμός των φυτών βασίζεται στην ολοδυναμία των κυττάρων τους, δηλαδή στην ιδιότητα ενός κυττάρου μεμονωμένου ή μιας ομάδας κυττάρων να δημιουργήσουν ένα πλήρως ολοκληρωμένο φυτό.

Σημαντικό ρόλο, επίσης, στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών παίζουν και οι μεταβολές που συμβαίνουν στα κύτταρα που απομονώνονται από τα μητρικά φυτά και μεταφέρονται σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα, με σημαντικότερη αυτή που αφορά τη λειτουργία του συνόλου των γονιδίων του κυττάρου. Σε κάθε κύτταρο εκφράζονται μερικά μόνο από τα γονίδια του την ίδια στιγμή προσδίδοντάς του έτσι μια συγκεκριμένη λειτουργία. Ο αριθμός των γονιδίων αυτών αυξάνεται όταν το κύτταρο μεταφέρεται σε συνθήκες *in vitro* και το κύτταρο περνάει στη φάση της αποδιαφοροποίησης, χάνει δηλαδή τη συγκεκριμένη λειτουργία του. Με αυτόν τον τρόπο, λοιπόν, δημιουργείται ο κάλλος από το σύνολο των αποδιαφοροποιημένων κυττάρων που σχηματίζουν μια άμορφη μάζα, μια διαδικασία που ονομάζεται καλλογένεση.

### **2.2.Χρήση της ιστοκαλλιέργειας**

Η ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται ως μέθοδος στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών για την παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών, υγιών και απόλυτα όμοιων με το μητρικό. Μπορούν έτσι να παραχθούν μεγάλες ποσότητες ανώτερης ποιότητας φυτών σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα ανεξάρτητα καιρικών συνθηκών και συνθηκών αγρού. Επίσης, εφαρμόζεται για την εξυγίανση και παραγωγή άνοσου φυτικού υλικού, καθώς και για τη γενετική βελτίωση των φυτών. Ακόμη, κάτω από ορισμένες συνθήκες τα καλλιεργούμενα *in vitro* κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν μια

δομή διαφορετική από αυτή που είχαν αρχικά ανάλογα με το τι θέλουμε εμείς να δημιουργήσουμε τελικά, μια διαδικασία που ονομάζεται διαφοροποίηση *in vitro*.

### **2.3. Η ιστορία της ιστοκαλλιέργειας στο τριαντάφυλλο**

Η ιστορία της ιστοκαλλιέργειας στο τριαντάφυλλο ξεκίνησε το 1945 όταν οι Nobecourt and Kofler κατάφεραν να αποκτήσουν κάλο και ρίζες από έκφυτα μπουμπουκιών. Το 1946, ο Lamments για πρώτη φορά ανέφερε ότι χρησιμοποιείται η εμβρυογένεση για την παραγωγή τριαντάφυλλων. Μελέτες ξεκίνησαν από τους Nickell and Tulecke (1959) και Weinstein et al. (1962) σε κύτταρα καλλιέργειας, κυτταρικό εναιώρημα και κάλο για την κατανόηση της διαφοροποίησης και της αναγέννησης. Η πρώτη οργανογένεση βλαστών από τον ιστό του κάλου αναφέρθηκε από τον Hill (1967) στο αναρριχητικό υβριδικό τσάι τριαντάφυλλο "The Doctor". Οι πρώτες αναφορές για τον μικροπολλαπλασιασμό του τριαντάφυλλου ήταν των Jacob et al. (1969, 1970a,b) και Elliott (1970) για τα *R. hybrida cv. Superstar* και *R. multiflora*, αντίστοιχα.

### **2.4. Πλεονεκτήματα της ιστοκαλλιέργειας**

Έτσι, η ιστοκαλλιέργεια στις μέρες μας έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για τον πολλαπλασιασμό διάφορων φυτικών ειδών σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους πολλαπλασιασμού. Το γεγονός αυτό οφείλεται, πέρα από όσα αναφέραμε παραπάνω, και σε μια πληθώρα πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει η τεχνική αυτή, τα οποία συμβάλλουν στην απαλοιφή κάποιων προβλημάτων που παρουσιάζουν οι άλλες τεχνικές. Τα πλεονεκτήματα αυτά είναι τα εξής:

1. Τα παραγόμενα φυτά είναι απαλλαγμένα από οποιαδήποτε προσβολή, καθώς αναπτύσσονται κάτω από ασηπτικές συνθήκες.
2. Έχουμε παραγωγή τεράστιου αριθμού γενετικά πανομοιότυπων φυτών, τα οποία προέρχονται από ένα πολύ μικρό κομμάτι τμήματος του μητρικού φυτού.
3. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού είναι πολύ μεγάλος σε σχέση άλλες μεθόδους.
4. Δίνεται η δυνατότητα για μακροπρόθεσμη συντήρηση του πολλαπλασιαστικού υλικού που έχουμε παράγει.
5. Απαιτείται μικρός αριθμός μητρικών φυτών για τη δημιουργία του πολλαπλασιαστικού υλικού και έτσι δίνεται η δυνατότητα αποθήκευσης της

αρχικής εγκατάστασης σε μικρό χώρο (συνήθως προστατευμένο από καιρικές συνθήκες και βιοτικούς παράγοντες).

6. Μειώνεται το κόστος συντήρησης του γενετικού και πολλαπλασιαστικού υλικού, μιας και μειώνεται όπως είπαμε ο χώρος αποθήκευσης.
7. Δίνει τη δυνατότητα γρήγορης αναπαραγωγής νέων ή βελτιωμένων ποικιλιών ή υβριδίων που προέρχονται από βελτιωτικά προγράμματα και τη γρήγορη εισαγωγή τους στην παραγωγική διαδικασία.
8. Δίνει τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού και διάσωσης φυτικών ειδών που επιζούν σε πολύ μικρό αριθμό ή απειλούνται από εξαφάνιση.

### **2.5.Μειονεκτήματα της ιστοκαλλιέργειας**

Ωστόσο, η τεχνική αυτή παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα τα οποία γίνεται προσπάθεια να εξαλειφτούν. Τα μειονεκτήματα αυτά είναι τα εξής:

1. Οι εγκαταστάσεις που απαιτούνται για τη διεξαγωγή της ιστοκαλλιέργειας είναι ακριβές.
2. Απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό, άρα και με υψηλή αμοιβή.
3. Οι δυο παραπάνω παράγοντες αυξάνουν κατά πολύ το κόστος της ιστοκαλλιέργειας και την καθιστούν οικονομικά ασύμφορη, σε μικρής κλίμακας επιχειρήσεις.
4. Δεν είναι πάντα εφικτό και εύκολο να γίνει αποδιαφοροποίηση των κυττάρων ή η επιθυμητή επανα-διαφοροποίηση, άρα δεν μπορούμε να πετύχουμε τον αρχικό μας στόχο που είναι ο έλεγχος της μορφογένεσης του φυτικού κυττάρου.
5. Πολλές φορές ερχόμαστε αντιμέτωποι με μολύνσεις της ιστοκαλλιέργειάς μας διότι δεν είναι πάντα εφικτό να δουλέψουμε κάτω από πλήρως ασηπτικές συνθήκες ή τουλάχιστον να διατηρήσουμε τον πληθυσμό των βλαβερών μικροοργανισμών σε ακίνδυνα επίπεδα.
6. Κάτω από κάποιες συνθήκες τα παραγόμενα φυτά μπορεί να διαφέρουν πολύ μεταξύ τους αλλά και με το μητρικό φυτό. Ορισμένες φορές η ιστοκαλλιέργεια μπορεί να επιφέρει μεταλλάξεις στα φυτά και εμφάνιση νέων φαινοτύπων, φαινόμενο γνωστό ως σωματοκλωνική παραλλακτικότητα.
7. Υπάρχει πιθανότητα τα φυτά να αντιμετωπίσουν πρόβλημα εγκλιματισμού κατά τη μετάβαση από το εργαστήριο στον αγρό.

## **2.6.Προβλήματα μικροπολλαπλασιασμού και αντιμετώπισή τους**

### **2.6.1.Μολύνσεις**

Ένας βασικός στόχος της ιστοκαλλιέργειας είναι η δημιουργία φυτών πλήρως υγιών και για αυτό το λόγο το περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιείται η εργασία θέλουμε να είναι απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς και βακτήρια, δηλαδή να δουλεύουμε κάτω από πλήρως ασηπτικές συνθήκες. Όπως ήδη αναφέρθηκε, αυτό δεν είναι πάντα εφικτό και έτσι δημιουργείται το βασικότερο πρόβλημα του μικροπολλαπλασιασμού που είναι οι μολύνσεις. Οι μολύνσεις μπορούν να συμβούν είτε κατά τη διάρκεια της απολύμανσης των εκφύτων, όπου καταστρέφονται τυχόν έντομα και οι μικροοργανισμοί, αλλά υπάρχει περίπτωση να επιζήσουν διάφορα μικρόβια και να μολύνουν την καλλιέργειά, είτε κατά τη διάρκεια της εργασίας στο θάλαμο νηματικής ροής.

Για να αποφευχθούν οι μολύνσεις θα πρέπει:

- Το μητρικό φυτό από το οποίο προέρχονται τα έκφυτα να είναι υγιές και αμόλυντο ή να προστατεύεται με αντιβιοτικό ή μυκητοκτόνο.
- Το υπόστρωμα στο οποίο τοποθετούνται τα έκφυτα αλλά και όλα τα εργαλεία να είναι αποστειρωμένα.
- Όλες οι εργασίες να γίνονται με προσοχή στο θάλαμο νηματικής ροής.

### **2.6.2.Υάλωση**

Η υάλωση είναι άλλο ένα πρόβλημα που αντιμετωπίζεται συχνά στον μικροπολλαπλασιασμό και είναι ένα φαινόμενο το οποίο ακολουθείται συχνά από νέκρωση της κορυφής με αποτέλεσμα την νέκρωση ολόκληρου του φυτικού υλικού. Είναι μια φυσιολογική ανωμαλία, η οποία μπορεί να προκαλέσει απώλεια σε ποσοστό 20-50%. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στο γενότυπο, τη σύνθεση του υποστρώματος, τον τύπο και τη συγκέντρωση του άγαρ, τη μεταχείριση των νεαρών βλαστών και τις συνθήκες του περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης αιθυλενίου στο δοχείο καλλιέργειας.

Για να περιοριστεί το φαινόμενο της υάλωσης θα πρέπει να μεταφερθεί η καλλιέργεια σε νέο υπόστρωμα το οποίο δεν περιέχει κυτοκίνη και έχει προστεθεί πηκτίνη. Επίσης, φαίνεται πως η συγκέντρωση του αιθυλενίου στο δοχείο αυξάνει το πρόβλημα, άρα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δοχεία τα οποία δεν κλείνουν αεροστεγώς και ανακυκλώνεται ο αέρας μέσα σε αυτά (Paoli et al., 1994).

### **2.6.3.Αποτυχία αναγέννησης**

Η αναγέννηση των φυτών, δηλαδή ο "εγκληματισμός" τους στις νέες συνθήκες καλλιέργειας στο τεχνητό υπόστρωμα και ο πολλαπλασιασμός τους πάνω σε αυτό, είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό τους για τον μικροπολλαπλασιασμό τους, αλλά υπάρχουν περιπτώσεις όπου παρατηρείται αδυναμία της αναγέννησής τους. Αν το έκφυτο παραμένει κοιμώμενο για αρκετές υποκαλλιέργειες μπορεί να:

- Αυξηθεί η γιββεριλίνη στο υπόστρωμα.
- Να μεταφερθεί σε διάλυμα με αυξημένη κυτοκινίνη.
- Να τοποθετηθεί το έκφυτο σε μεγαλύτερο βάθος στο υπόστρωμα.
- Να γίνουν περισσότερες επανακαλλιέργειες.

### **2.6.4.Έκκριση φαινολών**

Κάποιες καλλιέργειες *in vitro* εκκρίνουν φαινολικές ουσίες τις οποίες μεταφέρουν στο θρεπτικό υπόστρωμα κατά την τοποθέτηση του εκφύτου σε αυτό. Σημαντικό ρόλο σε αυτό φαίνεται να παίζει και η χρονική περίοδος που λαμβάνονται τα έκφυτα από το μητρικό φυτό. Όταν εκκρίνονται φαινολικές ουσίες παρεμποδίζεται η δημιουργία κάλου και αρχίζει μια διαδικασία αποδιοργάνωσης. Για να περιοριστεί και αντιμετωπιστεί το φαινόμενο αυτό θα πρέπει μόλις γίνει αντιληπτό να πραγματοποιηθεί επανακαλλιέργεια σε νέο υπόστρωμα.

### **2.7.Στάδια μικροπολλαπλασιασμού**

Ο μικροπολλαπλασιασμός γίνεται σε πέντε στάδια(Murashige, 1974):

- I. Επιλογή και προετοιμασία του μητρικού φυτού. Το στάδιο αυτό είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας καθώς από το μητρικό φυτό θα ληφθούν τα έκφυτα από τα οποία στην πορεία θα παραχθούν χιλιάδες νέα φυτά. Έτσι, τα φυτά της μητρικής φυτείας θα πρέπει να έχουν άριστη υγιεινή κατάσταση δηλαδή να είναι απαλλαγμένα από ιώσεις, βακτήρια και έντομα.
- II. Απομόνωση εκφύτου- εγκατάσταση ασηπτικής καλλιέργειας. Στο στάδιο αυτό τεμαχίζονται τα έκφυτα στο κατάλληλο μέγεθος, απολυμαίνονται και τοποθετούνται πάνω στο στερεό θρεπτικό

υπόστρωμα, κάτω από ασηπτικές συνθήκες, για την επαγωγή της καλλιέργειας.

- III. Πολλαπλασιασμός κάλου. Στο στάδιο αυτό αφού έχει γίνει επιτυχής πρόκληση της κυτταροδιαίρεσης εμφανίζονται κυτταρικές μάζες από κάλο γύρω από τις τομές του εκφύτου.
- IV. Αναγέννηση ολόκληρων φυτών. Στο στάδιο αυτό το φυτικό υλικό που εγκαταστάθηκε με επιτυχία μεταφέρεται σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα με κατάλληλες αναλογίες ρυθμιστών ανάπτυξης (κυρίως σχέση κυτοκινινών / αυξινών) που ελέγχουν το ρυθμό παραγωγής νέων μικροβλαστών. Οι νέοι αυτοί μικροβλαστοί κατά τακτά χρονικά διαστήματα διαχωρίζονται, κόβονται σε μικρομοσχεύματα και επανακαλλιεργούνται με αποτέλεσμα να αυξάνεται σε κάθε επανακαλλιέργεια με γεωμετρική πρόοδο ο αριθμός του φυτικού υλικού.
- V. Εγκλιματισμός (σκληραγώγηση). Σε αυτό το στάδιο τα φυτά περνάνε από την *in vitro* φάση στις πραγματικές συνθήκες, δηλαδή είναι το στάδιο στο οποίο τα φυτά από ετερότροφα που ήταν μέχρι τώρα πρέπει να γίνουν αυτότροφα. Ο εγκλιματισμός των φυτών γίνεται σταδιακά. Αρχικά, τοποθετούνται σε θερμοκήπιο σε συνθήκες πολύ υψηλής σχετικής υγρασίας και χαμηλής έντασης φωτός και σιγά σιγά μεταφέρονται σε συνθήκες περιβάλλοντος.

### **2.8.Κατάλληλη επιλογή εκφύτου**

Η επιτυχία ενός πειράματος ιστοκαλλιέργειας επηρεάζεται σημαντικά από τα έκφυτα που θα χρησιμοποιηθούν και κυρίως από το είδος του ιστού από τον οποίο προέρχονται. Συνηθέστερα, τα έκφυτα λαμβάνονται από:

- 1) Τα κορυφαία μεριστώματα.
- 2) Τα κορυφαία τμήματα βλαστών.
- 3) Τους οφθαλμούς.
- 4) Τα μεσογονάτια διαστήματα βλαστών.
- 5) Τα φύλλα.
- 6) Τα έμβρυα.

Τα είδη των κυττάρων που μπορεί να απαντηθούν σε ένα έκφυτο είναι: τα μεριστωματικά κύτταρα, τα μεσοφυλλικά κύτταρα, τα κύτταρα ξυλώδους ή ηθμώδους παρεγχύματος και τα επιδερμικά κύτταρα. Τα μεριστωματικά κύτταρα αντιδρούν πολύ καλά στην ιστοκαλλιέργεια, καθώς διαιρούνται ταχύτατα χωρίς να μεταβάλουν το εξελικτικό τους μονοπάτι. Είναι μικρά και ισοδιαμετρικά με πυκνό κυτταρόπλασμα και συναντώνται στις κορυφές των βλαστών, στα ακρορρίζια και μέσα στους οφθαλμούς. Τα μεσοφυλλικά κύτταρα αντιδρούν σχετικά καλά στην ιστοκαλλιέργεια αλλά αποδιαφοροποιούνται αλλάζοντας το εξελικτικό τους μονοπάτι. Είναι στρόγγυλα ή τετράγωνα, πλούσια σε χλωροφύλλη και βρίσκονται σε αφθονία στους βλαστούς και τα φύλλα. Όσον αφορά τους άλλους δύο τύπους κυττάρων, τα κύτταρα ξυλώδους ή ηθμώδους παρεγχύματος και τα επιδερμικά κύτταρα, δεν αντιδρούν καλά στην ιστοκαλλιέργεια οπότε δεν θα γίνει αναφορά καθόλου σε αυτά.

Πέρα από το είδος των κυττάρων, σημαντικό ρόλο παίζει και η ηλικία του μητρικού φυτού, καθώς και η σχετική θέση του έκφυτου πάνω σε αυτό. Όσον αφορά την ηλικία του φυτού, τα νεαρότερα φυτά δίνουν έκφυτα που αντιδρούν καλύτερα στην ιστοκαλλιέργεια απ' ό,τι τα γηραιότερα. Επίσης, ακόμη και για ιστούς του ίδιου φυτού ισχύει κάτι αντίστοιχο, δηλαδή τα φύλλα για παράδειγμα που είναι παλαιότερα αντιδρούν λιγότερο στην ιστοκαλλιέργεια από τα νεαρά φύλλα που μόλις άρχισαν να εκπτύσσονται. Αναφορικά με τη σχετική θέση του έκφυτου πάνω στο μητρικό φυτό και την απόκρισή του στην ιστοκαλλιέργεια έγκειται στο γεγονός ότι υπάρχει διαβάθμιση της συγκέντρωσης των ορμονών στον κεντρικό άξονα του φυτού. Για παράδειγμα, οι αυξίνες συντίθενται κυρίως στην κορυφή κάθε βλαστού και η συγκέντρωσή τους ελαττώνεται προχωρώντας προς τα κάτω, ενώ το αντίθετο ακριβώς συμβαίνει με τις κυτοκινίνες (οι οποίες συντίθενται βασικά στις ρίζες). Επομένως κάθε ιστός σε διαφορετικό σημείο του μητρικού φυτού περιέχει διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτών των ορμονών με αποτέλεσμα να έχει και διαφορετική προδιάθεση στην ιστοκαλλιέργεια. Έτσι, τα έκφυτα που προέρχονται από φύλλα σε ψηλότερη θέση στο μητρικό φυτό παράγουν λιγότερα σωματικά έμβρυα σε σχέση με έκφυτα που προέρχονται από φύλλα σε χαμηλότερες θέσεις. Αυτό αποδίδεται στη χαμηλότερη περιεκτικότητα των ανώτερων φύλλων σε κυτοκινίνες (οι οποίες συντίθενται στις ρίζες των φυτών).

Ακόμη, το είδος των εμφυτευμάτων όπως φύλλα, μίσχος, κοτυληδονικό φύλλο, υποκοτύλιο, επικοτύλιο, το έμβρυο, το εσωτερικό και το μόσχευμα της ρίζας

επηρεάζουν σημαντικά τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας των φυτών (Khan et al., 1988; Sujatha and Mukta, 1996; Tyagi et al., 2001; Gubis et al., 2003; Alagumanian et al., 2004; Ali and Mirza, 2006; Kumar et al., 2011b). Το φύλλο είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο έκφυτο για αναγέννηση λόγω της μεγαλύτερης διαθέσιμης επιφάνειας του (Sujatha and Muktha, 1996; Tyagi et al., 2001). Παρακάτω φαίνεται μια εικόνα όπου απεικονίζει την απόκριση των διαφόρων ιστών και οργάνων στην ιστοκαλλιέργεια[(Εικόνα 1), (Κίντζιος 2015)].



**Εικόνα 1:** Απόκριση των διαφόρων ιστών και οργάνων στην ιστοκαλλιέργεια.

## 2.9.Μητρικό φυτό

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η σωστή επιλογή έκφυτου είναι καθοριστική για την επιτυχή ιστοκαλλιέργεια. Για να παραλαμβάνονται όμως τα κατάλληλα έκφυτα θα πρέπει και το μητρικό φυτό να έχει και τις κατάλληλες ιδιότητες (γονότυπος, είδος, ποικιλία). Ο γονότυπος είναι ο καθοριστικότερος παράγοντας για την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας, δηλαδή το φυτικό είδος που χρησιμοποιείται και πολλές φορές ακόμα και η ποικιλία (Kintzios et al. 1996a). Έτσι, κάποια φυτικά είδη αποκρίνονται εύκολα και άμεσα στην ιστοκαλλιέργεια, ενώ κάποια άλλα, τα λεγόμενα δύστροπα, έχουν πολύ μικρή απόκριση. Επίσης, οι συνθήκες καλλιέργειας της μητρικής καλλιέργειας επηρεάζουν την αποδοτικότητα των εκφύτων (ένταση



φωτισμού/φωτοπερίοδος, θερμοκρασία) και τέλος, η εποχή λήψης τους. Η εποχή του χρόνου επηρεάζει σημαντικά το μικροβιακό φορτίο των φυτών, το οποίο είναι αυξημένο το καλοκαίρι (λόγω υψηλών θερμοκρασιών), με αποτέλεσμα να πρέπει να γίνεται ισχυρότερη επιφανειακή απολύμανση των εκφύτων πριν καλλιεργηθούν in vitro.

## **2.10.Παράγοντες του περιβάλλοντος**

- I. Ανταλλαγή αερίων. Η απόκριση της ιστοκαλλιέργειας μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από τα αέρια συστατικά εντός του δοχείου αλλά και του περιβάλλοντος χώρου. Το διοξείδιο του άνθρακα, το οξυγόνο και το αιθυλένιο είναι τα συστατικά της ατμόσφαιρας της καλλιέργειας που έχουν μελετηθεί περισσότερο (Read and Preece, 2003). Το δοχείο καλλιέργειας είναι συνήθως ένα κλειστό σύστημα, αλλά μπορεί να συμβεί μερική ανταλλαγή αερίων ανάλογα με τον τύπο του δοχείου, το κλείσιμο και το πόσο σφιχτά σφραγίζονται μαζί. Η σφράγιση των δοχείων πρέπει να επιτρέπει επαρκή εξαερισμό ώστε να αποτρέπεται σημαντική συσσώρευση αιθυλενίου και εξάντληση του CO<sub>2</sub> (Buddendorf-Joostenand Woltering, 1994). Στο σκοτάδι, οι συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> αυξάνονται λόγω της αναπνοής, ενώ κατά τη διάρκεια της περιόδου φωτός η συγκέντρωση μειώνεται (Buddendorf-Joosten and Woltering, 1994).
- II. Φωτισμός και θερμοκρασία. Το φως είναι ένας σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας που ελέγχει την ανάπτυξη των φυτών, εφόσον σχετίζεται με τη φωτοσύνθεση, το φωτοτροπισμό και τη μορφογένεση (Read and Preece, 2003). Τα τρία χαρακτηριστικά του φωτός, τα οποία επηρεάζουν την in vitro ανάπτυξη, είναι το μήκος κύματος, η πυκνότητα ροής και η διάρκεια της φωτοπερίοδου (George, 1993). Επίσης, η επιρροή της θερμοκρασίας σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, όπως η αναπνοή και η φωτοσύνθεση, είναι πολύ γνωστή και δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι επηρεάζει τα φυτά ιστοκαλλιέργειας. Τα

έκφυτα που τοποθετούνται για την παραγωγή κάλλου καλλιεργούνται είτε στο σκοτάδι είτε σε φως με ένταση 2 Klux με φωτοπερίοδο 16 ώρες και σε θερμοκρασία  $26\pm 2$  °C.

### **3.ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΛΟΥ**

#### **3.1.Γενικά**

Ο κάλλος αποτελείται από μεριστωματικά και αδιαφοροποίητα κύτταρα που προκύπτουν από κυτταροδιαίρεση αλλά και τάνυση των κυττάρων σε ένα τμήμα του εκφύτου και είναι ο απλούστερος ιστός για καλλιέργεια. Όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με άτακτο τρόπο δημιουργείται ένας συμπαγής και άμορφος ιστός, ο κάλος. Αρχίζει να δημιουργείται στις άκρες των εκφύτων ή στα σημεία που έχουν τις τομές, γεγονός που μάλλον σχετίζεται με τη διευκόλυνση της εισόδου των απαραίτητων αυξητικών και θρεπτικών στοιχείων από το θρεπτικό υπόστρωμα στο έκφυτο. Η καλογένεση πραγματοποιείται με γοργούς ρυθμούς, καθώς τα κύτταρα του κάλου έχουν μεγάλα χυμοτόπια και διαιρούνται ταχύτατα με αποτέλεσμα ο κάλλος να αυξάνεται γρήγορα τόσο σε αριθμό κυττάρων όσο και σε βάρος. Ο κάλος μπορεί να είναι μαλακός και εύθρυπτος και να αυξάνεται σαν μεμονωμένη μάζα κυττάρων, αλλά μπορεί να είναι και συμπαγής και σκληρός. Η μορφολογία και τα χαρακτηριστικά του ιστού σχετίζονται με τη σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος πάνω στο οποίο αναπτύσσεται ο κάλος και κυρίως με τη συγκέντρωση των αυξητικών ουσιών. Επίσης, το χρώμα του κάλου μπορεί να είναι κιτρινωπό, αν αναπτύσσεται στο σκοτάδι ή σε αδύνατο διάχυτο φως (1000Lux). Αν αναπτύσσεται στο φως μπορεί να παράγει χλωροφύλλη και καροτινοειδή ή ανθοκυάνες στο χυμοτόπιό του.

Αν και ο κάλος παραμένει σε αδιαφοροποίητη μορφή, καθώς η ανάπτυξη συνεχίζεται, μπορεί να αρχίσουν να εμφανίζονται στα περιφερειακά του στρώματα κάποιου είδους διαφοροποιήσεις που μπορούν να δώσουν όργανα, όπως ρίζες και βλαστούς ή ακόμη και έμβρυα. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται μορφογένεση (morphogenesis), μέσα από την οποία επιτυγχάνεται ακόμη και η πλήρης αναγέννηση (regeneration) του φυτού. Η αναγέννηση αποτελεί πολύτιμο εργαλείο στη διαδικασία της γενετικής βελτίωσης (Yeoman and Forchee 1980).

### 3.2.Δημιουργία κάλου από βλαστικά μέρη τριανταφυλλιάς

Η παραγωγή κάλου από διάφορα φυτικά είδη είναι πλέον εφικτή, όπως είναι γνωστό. Το γένος *Rosa* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε σχετικές μελέτες (Weinstein et al., 1962; Jacobs et al., 1968; Nesius et al., 1972; Nesius and Fletcher, 1973; Fletcher, 1974, 1975; Mollard and Barnoud, 1976a, b; Mollard et al., 1976; Amarin et al., 1977; Lam and Street, 1977; Smith et al., 1978; Tabaezadeh and Khosh-Khui, 1981).

Έχουν αναφερθεί αρκετές μελέτες για την καλλιέργεια κάλου για διαφορετικά είδη τριανταφυλλιάς, κάποια από τα οποία είναι οι *Rosa glauca* (Hustache et al. 1975), Paul's Scarlet rose (Nesius et al. 1972, Nash & Davies 1972, Nash & Boll 1975, Cladas & Cladas 1976, Fosket 1981) και Damask Rose (Kirreva et al. 1977, 1978). Η *Rosa hybrida* είναι ευρέως καλλιεργούμενη τριανταφυλλιά. Μελέτες για την ιστοκαλλιέργεια διαφόρων καλλιεργειών όπως οι Super Star (Jacobs et al. 1969, 1970), Improved Blaze (Hasegawa 1980), Bridal Pink (Khosh-Khui & Sink 1982), Crimson Glory και Glenfiddich (Barve et al. 1984) έχουν δημοσιευτεί. Το 1990 έγινε μια μελέτη για την παραγωγή και ανάπτυξη κάλου από τις ποικιλίες *Rosa manetti* Hort και *R. hybrida* L. 'Tropicana' στο Πανεπιστήμιο Michigan. Στο πείραμα τοποθετήθηκαν τα έκφυτα σε διαφορετικά υποστρώματα, με διαφορετικούς ρυθμιστές ανάπτυξης και σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού, για να διαπιστωθούν οι καλύτερες συνθήκες για την επαγωγή και διατήρηση του κάλου. Τα αποτελέσματα που πήραν έδειξαν πως η επαγωγή του κάλου γίνεται γρηγορότερα και καλύτερα για την ποικιλία 'Tropicana', με θρεπτικό μέσο MS και την προσθήκη καζεΐνης (casein), 2,4-D και κινετίνης (K) και σε συνθήκες σκοταδιού.

Μια άλλη μελέτη που έγινε το 1993 στο Πανεπιστήμιο Punjab στο Lahore του Πακιστάν, αφορούσε την παραγωγή κάλου συγκριτικά ανάμεσα στις ποικιλίες Diamond Jubly και Lans France. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ποιότητα και η ποσότητα του Κάλου που παραγόταν και η επίδραση του 2,4-D και της κινετίνης. Τα αποτελέσματα που πήραν έδειξαν πως με την προσθήκη μόνο 2,4-D είχαν επαγωγή κάλου μόνο 20% στην Diamond Jubly και 50% στην Lans France μετά από 15 ημέρες καλλιέργειας. Όταν όμως, προστέθηκε μαζί με το 2,4-D και η κινετίνη η επαγωγή κάλου έφτασε το 60% στην Diamond Jubly. Τέλος, και για τις δυο ποικιλίες παρατηρήθηκε πως ο παραγόμενος κάλος ήταν καλύτερης ποιότητας με τη προσθήκη κινετίνης.

Το 2001, στο Πανεπιστήμιο Illinois των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής ερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του 2,4-D στην επαγωγή κάλου από τις ποικιλίες Carefree Beauty, Grand Gala και Red Sunblaze. Τα αποτελέσματα έδειξαν αρχικά, πως και στις τρεις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε επαγωγή κάλου με την παρουσία του 2,4-D στο υπόστρωμα καλλιέργειας ενώ απουσία αυτού δεν γινόταν επαγωγή κάλου από τα έκφυτα. Όσον αφορά τη συχνότητα παραγωγής κάλου, ανάλογα με τη συγκέντρωση του 2,4-D που προστέθηκε στο υπόστρωμα, παρατηρήθηκε πως στις Carefree Beauty και Grand Gala η μεγαλύτερη συχνότητα ήταν με την εφαρμογή της μικρότερης ποσότητας 2,4-D, ενώ αυξάνοντας την ποσότητα του 2,4-D μειωνόταν η συχνότητα επαγωγής. Στην Red Sunblaze παρατηρήθηκε πως δεν σημειώνεται σημαντική διαφορά στην συχνότητα επαγωγής του κάλου είτε εφαρμοστεί σε μικρή συγκέντρωση το 2,4-D είτε εφαρμοστεί σε μεγαλύτερη.

Τέλος, άλλη μια έρευνα που έγινε για την παραγωγή κάλου από έκφυτα τριανταφυλλιάς αφορούσε την ποικιλία *Rosa indica*, και πραγματοποιήθηκε το 2003 σε πανεπιστήμια του Πακιστάν. Ερευνήθηκε ο αριθμός των νέων συγκεντρώσεων και συνδυασμών φυτορμονών για την επαγωγή της καλλιέργειας κάλου. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι διαφορετικοί συνδυασμοί των IBA και NAA και πήραν αποτελέσματα μετά από τέσσερις εβδομάδες, τα οποία έδειξαν πως σε όλους τους συνδυασμούς γίνεται επαγωγή κάλου.

### **3.3.Καλλιέργεια αιωρημάτων κυττάρων (cell suspension culture)**

Όπως αναφέραμε πιο πάνω, ο κάλος διακρίνεται σε μαλακό και εύθρυπτο και σε συμπαγές και σκληρό. Ο κάλος που ανήκει στην πρώτη κατηγορία εάν μεταφερθεί σε υγρό υπόστρωμα το οποίο βρίσκεται σε συνεχή ανάδευση διαχωρίζεται και παράγει ένα αιώρημα από δραστήρια διαιρούμενα κύτταρα. Οι καλλιέργειες αιωρημάτων ξεκινούν τοποθετώντας συνήθως τμήματα κάλου σε υγρό υπόστρωμα όπου κάτω από συνεχή ανάδευση μεμονωμένα κύτταρα αποχωρίζονται και σχηματίζουν νέες κυτταρικές αλυσίδες ή μικρές ομάδες. Μελέτες έδειξαν ότι παρατηρούνται διαφορές στην υφή, τη μορφολογία, τη βιοχημεία και τη μορφογενετική ικανότητα μεταξύ των τύπων των κυττάρων μέσα στην ίδια καλλιέργεια. Ένας πιθανός λόγος για αυτό είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιήθηκε μεγάλο έκφυτο για την παραγωγή των κυττάρων και κατά συνέπεια είχε διάφορους

τύπους κυττάρων, καθώς τα έκφυτα γενικά περιέχουν διάφορους τύπους κυττάρων, σε διαφορετική φυσιολογική κατάσταση. Υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες σε καλλιέργειες αιωρημάτων μπορεί να σχηματιστούν σωματικά έμβρυα από ένα και μοναδικό κύτταρο (Geile and Wagner 1980). Εάν τα κύτταρα ή οι ομάδες των κυττάρων από τις καλλιέργειες αιωρημάτων επανακαλλιεργηθούν σε στερεά υποστρώματα προκύπτει κάλος και συχνά παρατηρείται αναγέννηση φυταρίων. Αυτή η μέθοδος ιστοκαλλιέργειας χρησιμοποιείται πολύ στη διαδικασία παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών.

Συχνά παρατηρούνται ομοιότητες ανάμεσα στα κύτταρα κάλου και τα καλλιεργούμενα κύτταρα. Στο στάδιο της αύξησης το μεγαλύτερο μέρος του όγκου των κυττάρων καταλαμβάνεται από ένα μεγάλο κεντρικό χυμοτόπιο και το κυτόπλασμα σχηματίζει ένα λεπτό περιφερειακό υπόστρωμα. Εάν τα κύτταρα μεταφερθούν σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα έχουμε την αντικατάσταση του χυμοτοπίου από μικρότερα χυμοτόπια και τη σύνθεση νέου κυτοπλάσματος. Επίσης, αυξάνεται το ενδοπλασματικό δίκτυο, ο αριθμός των μιτοχονδρίων, των πλαστιδίων και των ριβοσωμάτων.

#### **4.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η διερεύνηση παραγωγής κάλου από διαφορετικά βλαστικά όργανα της τριανταφυλλιάς σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Επίσης, μελετήθηκε η δυνατότητα δημιουργίας εναιωρήματος καλλικών κυττάρων, ώστε να δημιουργηθεί η "πρώτη ύλη" για τον απευθείας πολλαπλασιασμό της τριανταφυλλιάς με καλικά κύτταρα.

## **Β.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1.ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ**

Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος, στο οποίο τοποθετήθηκαν τα έκφυτα για την καλογένεση, χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό, MS (Murashige and Skoog basal medium), 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), K (Kinetin), CH (Casein hydrolysate), άγαρ και ζάχαρη, στις ποσότητες που ήταν απαραίτητες με βάση την προκαθορισμένη σύσταση του υποστρώματος που δίνεται στον Πίνακα 2 (Khosh-Khui M. and Sink K. C., 1981). Η τιμή του pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 5,8 με τη χρήση KOH ή HCl. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα KOH για τη διάλυση της K, καθώς παρέχεται σε μορφή δυσδιάλυτης σκόνης.

Για την παρασκευή του υποστρώματος ακολουθήθηκε μία συγκεκριμένη διαδικασία. Αρχικά, σε κωνική φιάλη, πληρωμένη έως τα  $\frac{3}{4}$  του επιθυμητού όγκου με νερό, προστέθηκε το MS, το 2,4-D, η K και το CH και έγινε ανάδευση για 15 λεπτά στον μαγνητικό αναδευτήρα. Έγινε ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 5,8, με προσθήκη λίγων σταγόνων KOH ή HCl. Στη συνέχεια προστέθηκε το άγαρ, η ζάχαρη και το νερό μέχρι τον επιθυμητό τελικό όγκο διαλύματος και το στόμιο της κωνικής φιάλης καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο, για την αποφυγή, όσο το δυνατόν περισσότερο, της απώλειας θερμότητας και της εξάτμισης. Το διάλυμα θερμάνθηκε, με ταυτόχρονη ανάδευση, μέχρι το σημείο βρασμού. Όταν δημιουργήθηκαν φυσαλίδες, η φιάλη αποσύρθηκε από τον αναδευτήρα και το υπόστρωμα κατανεμήθηκε σε τριβλία petri ή γυάλινα φιαλίδια, τα οποία τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο προς αποστείρωση σε θερμοκρασία 121 °C και πίεση 1,5 Kg/cm για 20 λεπτά.

Για την παρασκευή του διαλύματος δημιουργίας καλικών κυτταρικών εναιωρημάτων, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, αλλά, δεν προστέθηκε καθόλου άγαρ.

**Πίνακας 2:**Σύσταση διαλύματος UM-C – για παρασκευή 1 λίτρου

H <sub>2</sub> O	1 lt
MS	4,4 gr (αναγράφεται στην ετικέτα του σκευάσματος)
2,4-D	2 mg
K	0,25 mg
CH	2 gr
Άγαρ	8 gr
Ζάχαρη	30 gr
pH	5,8

## 2.ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΛΟΥ

Το πείραμα άρχισε τον Φεβρουάριο του 2016. Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε φυτικό υλικό ανθοφόρων βλαστών τριανταφυλλιά της ποικιλίας First red. Τα φυτικά μέρη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βλαστός από μεσογονάτια διαστήματα, νεαρά πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα και μίσχους, που βρίσκονταν κάτω από τον πρώτο και μέχρι τον τέταρτο κόμβο από την κορυφή έτσι ώστε να μην προέρχονται από σχετικά γερασμένο τμήμα του φυτού. Το φυτικό υλικό απολυμάνθηκε αρχικά με αιθανόλη περιεκτικότητας 70% για δύο λεπτά κι έπειτα με διάλυμα χλωρίνης 15% και Tween20 0,1% για άλλα οχτώ λεπτά. Στη συνέχεια, το φυτικό υλικό ξεπλύθηκε επαρκώς με απιονισμένο νερό το οποίο είχε πρώτα απολυμανθεί στον κλίβανο. Όλα τα υλικά και εργαλεία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής, ώστε η τοποθέτηση του φυτικού υλικού στο υπόστρωμα να γίνει κάτω από ασηπτικές συνθήκες . Τέλος, οι βλαστοί, τα φύλλα και οι μίσχοι κόπηκαν σε μικρότερα τεμάχια μεγέθους περίπου 1-2 cm, χωρίς να λαμβάνονται τμήματα από τα περιθώρια και το κεντρικό νεύρο των φύλλων, και

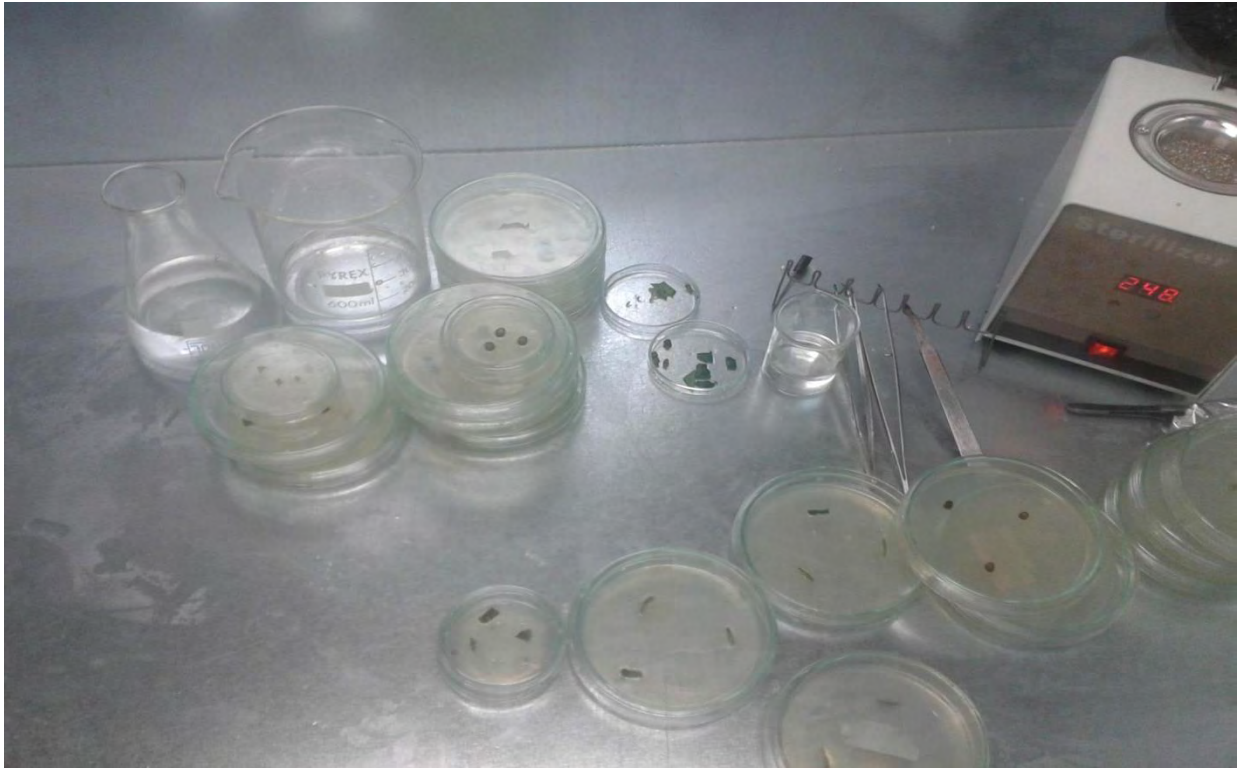
μεταφέρθηκαν στα φιαλίδια με το θρεπτικό υπόστρωμα. Όταν ολοκληρώθηκε η τοποθέτηση των εκφύτων σε όλα τα τριβλία Petri, αυτά μεταφέρθηκαν σε θάλαμο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ( $26\pm 2$  °C) και φωτοπεριόδου (16 ώρες) (Εικόνες 2-5). Τοποθετήθηκαν συνολικά 58 έκφυτα σε 20 τριβλία ως εξής:

1. Φύλλα →  
4 τριβλία με 2 έκφυτα στο καθένα  
2 τριβλία με 3 έκφυτα στο καθένα  
2 τριβλία με 4 έκφυτα στο καθένα  
  
Συνολικά 22 έκφυτα.
  
2. Βλαστοί →  
2 τριβλία με 2 έκφυτα στο καθένα  
2 τριβλία με 3 έκφυτα στο καθένα  
2 τριβλία με 4 έκφυτα στο καθένα  
  
Συνολικά 18 έκφυτα.
  
3. Μίσχοι →  
2 τριβλία με 2 έκφυτα στο καθένα  
2 τριβλία με 3 έκφυτα στο καθένα  
2 τριβλία με 4 έκφυτα στο καθένα  
  
Συνολικά 18 έκφυτα.



**Εικόνα 2:** Θάλαμος με ελεγχόμενες συνθήκες





**Εικόνα 3:** Τοποθέτηση εκφύτων σε τριβλία Petri.



**Εικόνα 4:** Τοποθέτηση εκφύτων σε τριβλία Petri.



**Εικόνα 5:** Τοποθέτηση εκφύτων σε τριβλία Petri.

### **3.ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΛΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΩΝ**

Το επόμενο βήμα του πειράματος αφορούσε τη δημιουργία καλικών κυτταρικών σε εναιώρημα. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκε υγρό υπόστρωμα και μοιράστηκε σε 12 κωνικές φιάλες. Το υγρό υπόστρωμα, ήταν ίδιο με αυτό που παρασκευάστηκε για την τοποθέτηση των εκφύτων με τη διαφορά ότι δεν περιείχε άγαρ. Μέσα σε αυτό τοποθετήθηκαν κομμάτια από κάλο φύλλων, βλαστών και μίσχων που δημιουργήθηκε σε προηγούμενο στάδιο της εργασίας. Η τοποθέτηση του κάλου στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα έγινε κάτω από ασηπτικές συνθήκες στο θάλαμο νηματικής ροής αφού προηγήθηκε αποστείρωση σε αυτόκαυστο των εργαλείων και του υποστρώματος. Αφού τοποθετήθηκαν οι κάλοι στις κωνικές φιάλες, σφραγίστηκαν ξανά με τα βαμβάκια και τα αλουμινόχαρτα και τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα. Ο περιστροφικός αναδευτήρας προκαλεί δονήσεις ώστε οι κωνικές φιάλες να βρίσκονται σε συνεχή ανάδευση και να σπάσουν οι δεσμοί μεταξύ των κυττάρων με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεμονωμένων καλικών κυττάρων, ενώ επιπλέον επιτρέπει την οξυγόνωση του μέσου. (Εικόνα 6). Η όλη διαδικασία έγινε δύο φορές.



**Εικόνα 6:** Τοποθέτηση κάλου σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.

#### **4.ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΛΟΥ**

Η διαδικασία παραγωγής κάλου έγινε συνολικά έξι φορές. Όπως ήδη αναφέρθηκε, την πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα από βλαστό, φύλλα και μίσχους τα οποία τοποθετήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε τριβλία Petri. Τις επόμενες τέσσερις φορές, το θρεπτικό υπόστρωμα μοιράστηκε σε γυάλινα φιαλίδια, αντί για τριβλία έτσι ώστε να τοποθετείται ένα έκφυτο ανά φιαλίδιο και να αποφεύγονται επιπλέον μολύνσεις από έκφυτα που βρίσκονται στο ίδιο τριβλίο (Εικόνα 7). Τέλος, την έκτη και τελευταία φορά, το θρεπτικό υπόστρωμα μοιράστηκε σε γυάλινα βάζα με καπάκι και τοποθετήθηκε ένα έκφυτο ανά βάζο (Εικόνα 8). Επίσης, αυτή τη φορά καταγράφηκε και η ποσοτική παραγωγή του κάλου. Έτσι, ζυγίστηκε ο κάλος από δύο έκφυτα ένα μήνα μετά την τοποθέτησή τους και ο κάλος από τα υπόλοιπα έκφυτα που έμεινα ζυγίστηκε τρεις μήνες μετά την τοποθέτησή τους. Πέρα από τον κάλο ζυγίστηκαν και τα έκφυτα από τα οποία προερχόταν ο κάλος, ουσιαστικά ζυγίστηκαν μόνο οι βλαστοί γιατί τα φύλλα είχαν μηδαμινό βάρος.

Παρακάτω παρατίθεται ένας πίνακας όπου παρουσιάζονται τα στοιχεία όλων των επαναλήψεων παραγωγής κάλου, δηλαδή πόσα έκφυτα τοποθετήθηκαν συνολικά κάθε φορά και από ποιο φυτικό τμήμα προέρχονταν (Πίνακας 3).



**Πίνακας 3:** Στοιχεία εκφύτων για παραγωγή κάλου(2η- 6η επανάληψη)

	2η επανάληψη	3η επανάληψη	4η επανάληψη	5η επανάληψη	6η επανάληψη
Αριθμός εκφύτων βλαστών	30	19	18	100	12
Αριθμός εκφύτων φύλλων	30	11	12	0	12
Αριθμός εκφύτων μίσχων	30	0	0	0	0
Συνολικός αριθμός φιαλιδίων ή βάζων θρεπτικό υπόστρωμα	90	30	30	100	24



**Εικόνα 7:** Τοποθέτηση εκφύτων σε γυάλινα φιαλίδια.



**Εικόνα 8:** Τοποθέτηση εκφύτων σε γυάλινα βάζα.

## Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1.ΠΡΩΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΛΟΥ

Μετά την τοποθέτηση των τριβλίων στο θάλαμο παρατηρήθηκε η εξέλιξη των εκφύτων κάθε 3-4 ημέρες. Η πρώτη ανάπτυξη κάλου γύρω ή πάνω στα έκφυτα παρατηρήθηκε περίπου δύο εβδομάδες μετά την τοποθέτησή τους στο θρεπτικό υπόστρωμα (Εικόνες 9-17). Συνολικά τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από αυτή την πρώτη παραγωγή κάλου φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 4).

**Πίνακας 4:** Αριθμός εκφύτων στα οποία εμφανίστηκε κάλος.

	Έκφυτα με κάλο	Μολυσμένα	Χωρίς εξέλιξη
Βλαστός	81,8%	18,2%	0%
Φύλλα	61,1%	38,9%	0%
Μίσχος	16,6%	50%	33,4%

Σε αυτή την πρώτη προσπάθεια παραγωγής κάλου τα έκφυτα βλαστού και φύλλου έδωσαν αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα με ποσοστά επιτυχίας 81,8% και 61,1% αντίστοιχα, σε αντίθεση με τα έκφυτα μίσχου που παρουσίασαν ποσοστό επιτυχίας μόλις 16%. Αντίστοιχα, τα ποσοστά μολύνσεων ήταν 18,2%, 38,9% και 50%.



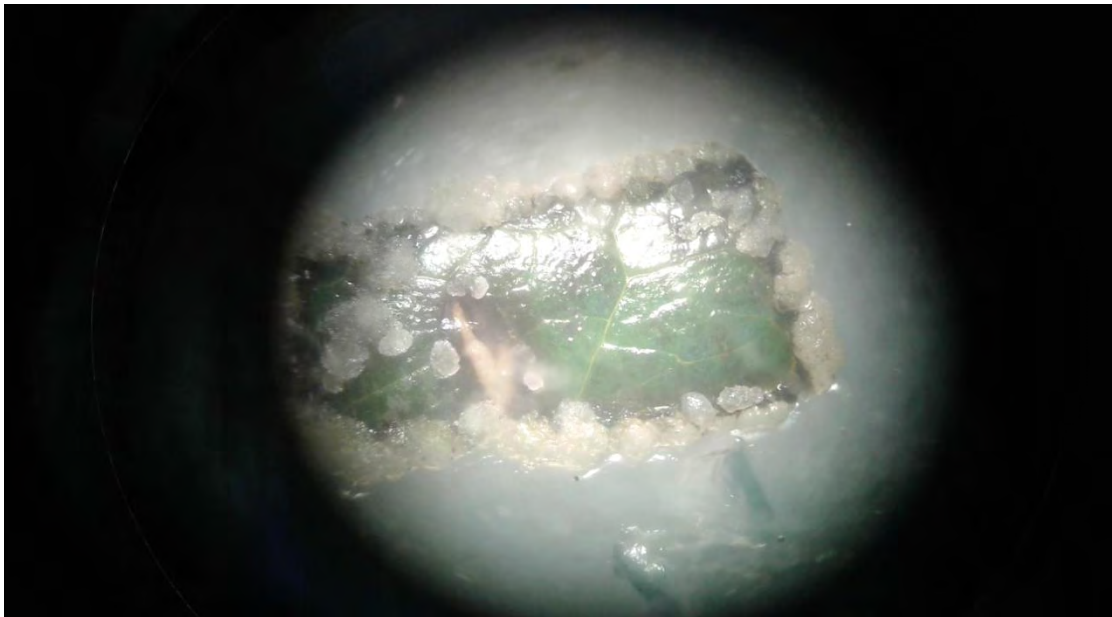
**Εικόνα 9:** Έκφυτα φύλλων μολυσμένα



**Εικόνα 10:** Έκφυτα βλαστού μολυσμένα.

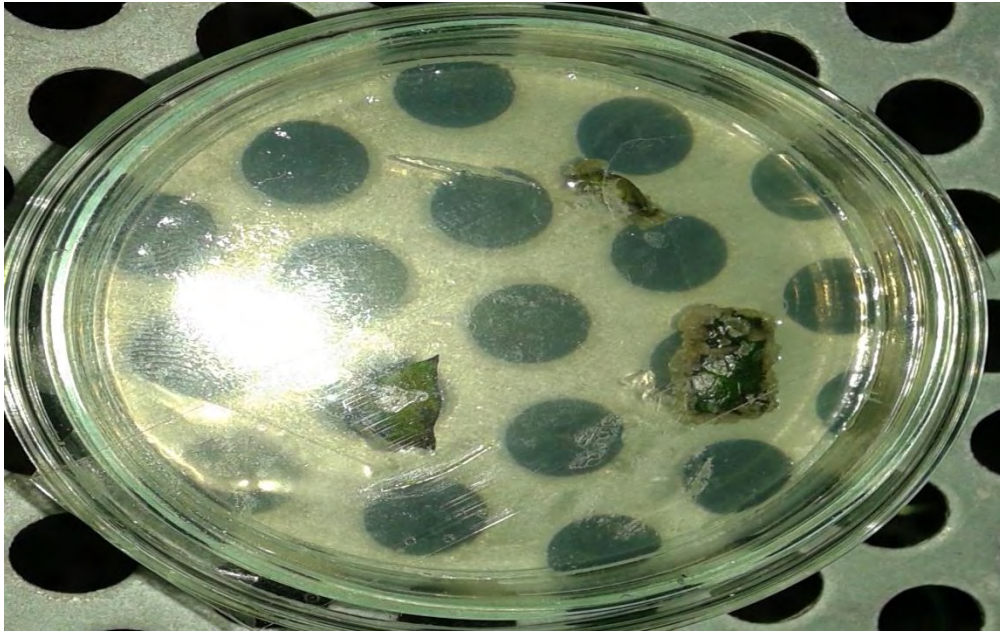


**Εικόνα 11:** Έκφυτο μίσγου με κάλο.

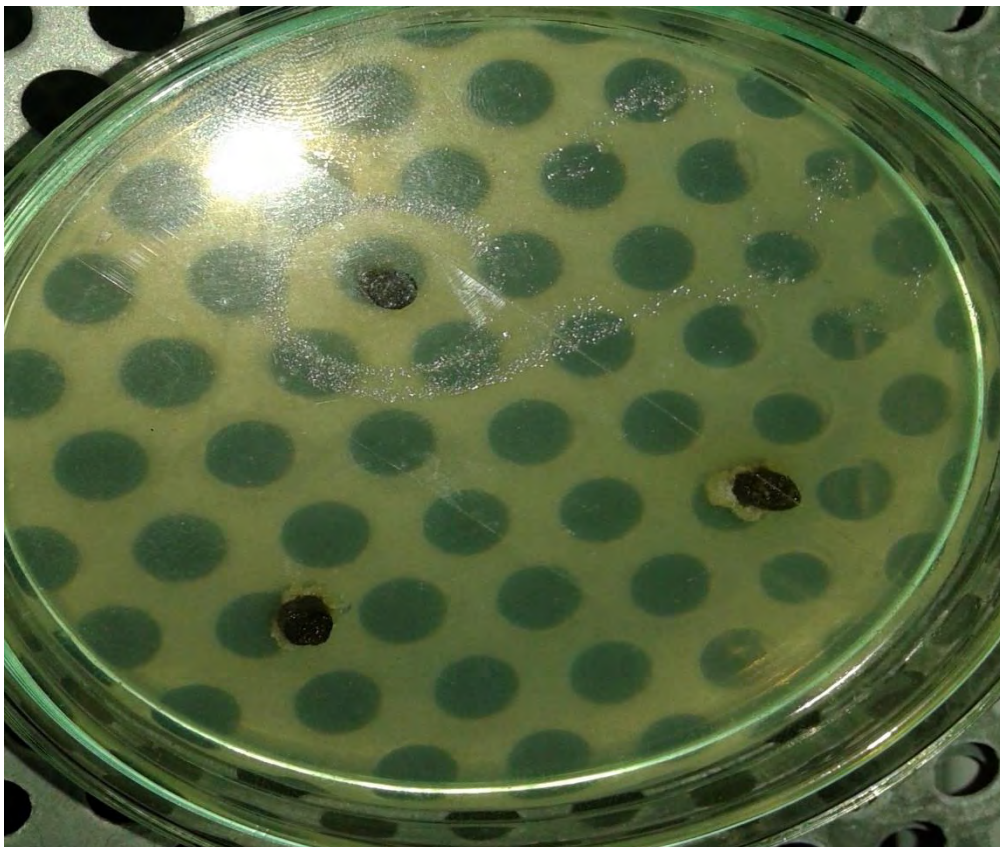


**Εικόνα 12:** Φύλλο με κάλο, στερεοσκοπική παρατήρηση.





**Εικόνα 13:** Έκφρατα φύλλων με κάλο.

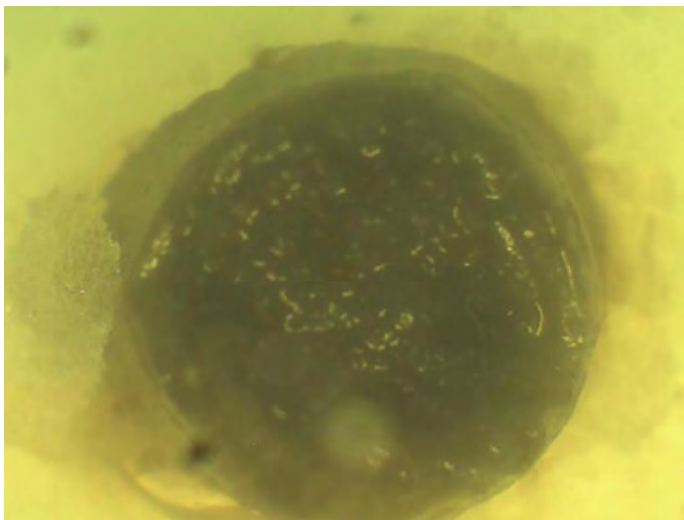


**Εικόνα 14:** Έκφρατα βλαστού με κάλο.

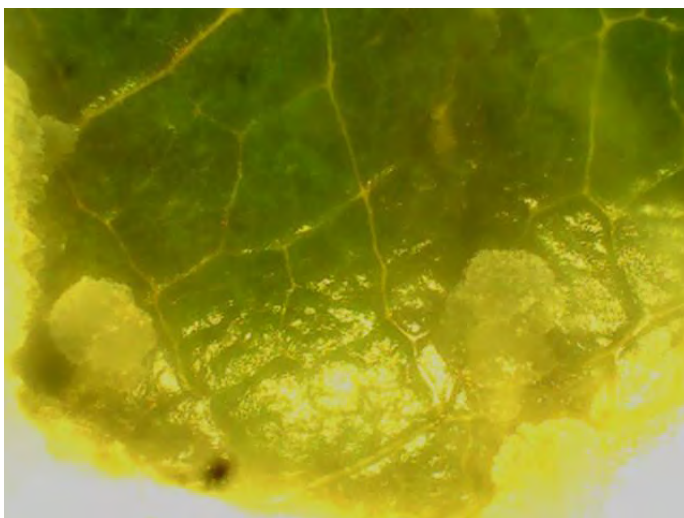




**Εικόνα 15:** Στερεοσκοπική παρατήρηση κάλου μίσχου.



**Εικόνα 16:** Στερεοσκοπική παρατήρηση κάλου βλαστού.



**Εικόνα 17:** Στερεοσκοπική παρατήρηση κάλου φύλλου.

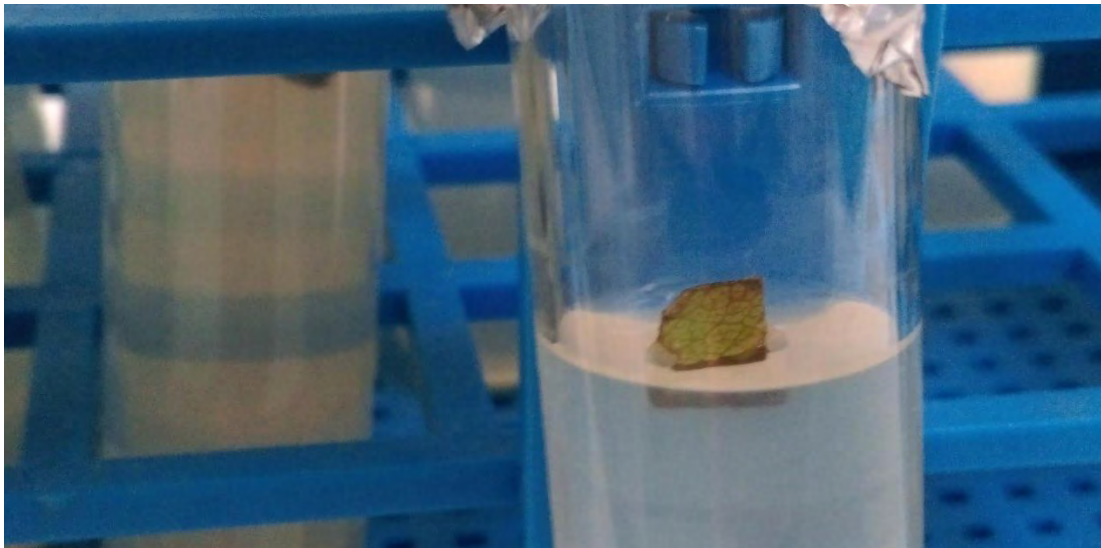
## 2.ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΩΣ ΠΕΜΠΤΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΛΟΥ

Κατά τη δεύτερη προσπάθεια παραγωγής κάλου έως και την πέμπτη προσπάθεια, όπως ήδη έχει αναφερθεί, το υπόστρωμα κατανεμήθηκε σε φιαλίδια και όχι σε τριβλία και στο καθένα τοποθετήθηκε ένα έκφυτο και λαμβάνονταν παρατηρήσεις κάθε 3-4 μέρες. Από την τρίτη προσπάθεια και μετά δεν χρησιμοποιήθηκαν καθόλου έκφυτα μίσχου γιατί η παραγωγή κάλου από αυτούς ήταν μηδαμινή. (Εικόνες 18-20). Εμφάνιση κάλου υπήρξε μετά από δύο εβδομάδες περίπου σε όλες τις περιπτώσεις και τα συνολικά αποτελέσματα που καταγράφηκαν φαίνονται στον πίνακα παρακάτω (Πίνακας 5). Στη τρίτη επανάληψη, τα φυτά από τα οποία λήφθηκαν τα έκφυτα, πάρθηκαν από υπαίθρια καλλιέργεια και όχι από ανθοπωλείο όπως στις υπόλοιπες επαναλήψεις. Αυτό, οδήγησε στην μόλυνση όλων των φιαλιδίων που παρασκευάστηκαν, γεγονός που αποδίδεται στην κατάσταση της υγείας του μητρικού φυτού.

**Πίνακας 5:** Αριθμός εκφύτων στα οποία εμφανίστηκε κάλος..

	2η επανάληψη	3η επανάληψη	4η επανάληψη	5η επανάληψη
Έκφυτα βλαστού με κάλο	26,7%	0%	5,5%	20%
Έκφυτα βλαστού μολυσμένα	73,3%	100%	94,5%	42%
Έκφυτα βλαστού χωρίς εξέλιξη	0%	0%	0%	38%
Έκφυτα φύλλων με κάλο	53,3%	0%	0%	-
Έκφυτα φύλλων μολυσμένα	46,7%	100%	100%	-
Έκφυτα φύλλων χωρίς εξέλιξη	0%	0%	0%	-
Έκφυτα μίσχου με κάλο	16,7%	-	-	-
Έκφυτα μίσχου μολυσμένα	83,3%	-	-	-
Έκφυτα μίσχου χωρίς εξέλιξη	0%	-	-	-

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η παραγωγή κάλου από έκφυτα μίσχου ήταν αποθαρρυντική, γεγονός που επαληθεύτηκε και κατά τη δεύτερη προσπάθεια παραγωγής κάλου, με ποσοστό επιτυχίας 16,7% και ποσοστό μόλυνσης 83,3%. Τα αντίστοιχα ποσοστά επιτυχίας και μόλυνσης στα έκφυτα βλαστού και φύλλων ήταν: 26,7% και 73,3% στο βλαστό και 53,3% και 46,7% στα φύλλα. Κατά την τρίτη και τέταρτη επανάληψη της διαδικασίας τα ποσοστά επιτυχίας ήταν μηδενικά και υπήρξε καθολική μόλυνση. Τέλος, κατά την πέμπτη επανάληψη, όπου λόγω καλύτερων ποσοστών χρησιμοποιήθηκαν μόνο έκφυτα βλαστού, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν ήταν 20% επιτυχία και 42% μολύνσεις.



**Εικόνα 18:** Έκφυτο φύλλου με κάλο.



**Εικόνα 19:** Έκφυτο βλαστού με κάλο.



**Εικόνα 20:** Έκφυτο μίσχου με ελάχιστο κάλο

### 3. ΈΚΤΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΛΟΥ

Κατά την έκτη επανάληψη παραγωγής κάλου το θρεπτικό υπόστρωμα κατανεμήθηκε σε γυάλινα βάζα με καπάκι και όχι σε φιαλίδια έτσι ώστε να παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες κάλου (Εικόνες 21-25). Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν συνολικά απεικονίζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 6 και Πίνακας 7).

**Πίνακας 6:** Αποτελέσματα έκτης επανάληψης.

	Έκφυτα με κάλο	Μολυσμένα	Χωρίς εξέλιξη
Βλαστός	66,7%	33,3%	0%
Φύλλα	41,7%	58,3%	0%

Αυτή τη φορά τα ποσοστά επιτυχίας στα έκφυτα βλαστού και κάλου ήταν 66,7% και 41,7% αντίστοιχα, ενώ τα ποσοστά μολύνσεων ήταν 33,3% και 58,3% αντίστοιχα.

**Πίνακας 7:** Βάρος κάλων και, αντίστοιχο, βάρος εκφύτων από τα οποία προέρχεται, 1 και 3 μήνες μετά την τοποθέτηση τους στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Βλαστός				Φύλλο			
1 <sup>ος</sup> μήνα		3 <sup>ων</sup> μηνών		1 <sup>ος</sup> μήνα		3 <sup>ων</sup> μηνών	
Έκφυτο (gr)	Κάλος (gr)	Έκφυτο (gr)	Κάλος (gr)	Έκφυτο (gr)	Κάλος (gr)	Έκφυτο (gr)	Κάλος (gr)
0,162	0,195	0,036	2,377	-	-	-	1,469
0,122	0,253	0,133	0,590	-	-	-	1,630
-	-	0,062	3,111	-	-	-	0,744
-	-	0,069	2,510	-	-	-	0,784
-	-	0,061	2,270	-	-	-	1,300
-	-	0,154	0,990	-	-	-	-
Μέσος όρος αποτελεσμάτων και τυπική απόκλιση							
0,142±0,03	0,224±0,04	0,086±0,05	1,975±0,97	-	-	-	1,185±0,4



**Εικόνα 21:** Τοποθέτηση εκφύτων σε γυάλινα βάζα.





**Εικόνα 22:** *Κάλος βλαστού.*



**Εικόνα 23:** *Κάλος φύλλου.*



**Εικόνα 24:** *Κάλος.*



**Εικόνα 25:** *Κάλος που άρχισε να χαλάει.*

#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΚΑΛΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ

Η διαδικασία απομόνωσης και πολλαπλασιασμού των καλικών κυττάρων έγινε, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και σε δύο επαναλήψεις. Η δημιουργία καλικών κυτταρικών εναιωρημάτων υποδηλώνεται μακροσκοπικά από τον μεταχρωματισμό του αρχικά διάφανου διαλύματος σε ένα διάλυμα γαλακτώδους μορφής. Για να διαπιστωθεί η δημιουργία καλικών κυττάρων, λήφθηκε δείγμα από το διάλυμα και από κάλο και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο (Εικόνες 26-31). Έγινε σύγκριση των δύο δειγμάτων και με βάση τη μορφή των κυττάρων του κάλου διαπιστώθηκε η ύπαρξη καλικών κυττάρων στο διάλυμα. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8) φαίνονται τα συνολικά αποτελέσματα από την δημιουργία εναιωρημάτων καλικών κυττάρων στις κωνικές φιάλες την πρώτη και δεύτερη φορά (Εικόνες 32-34).

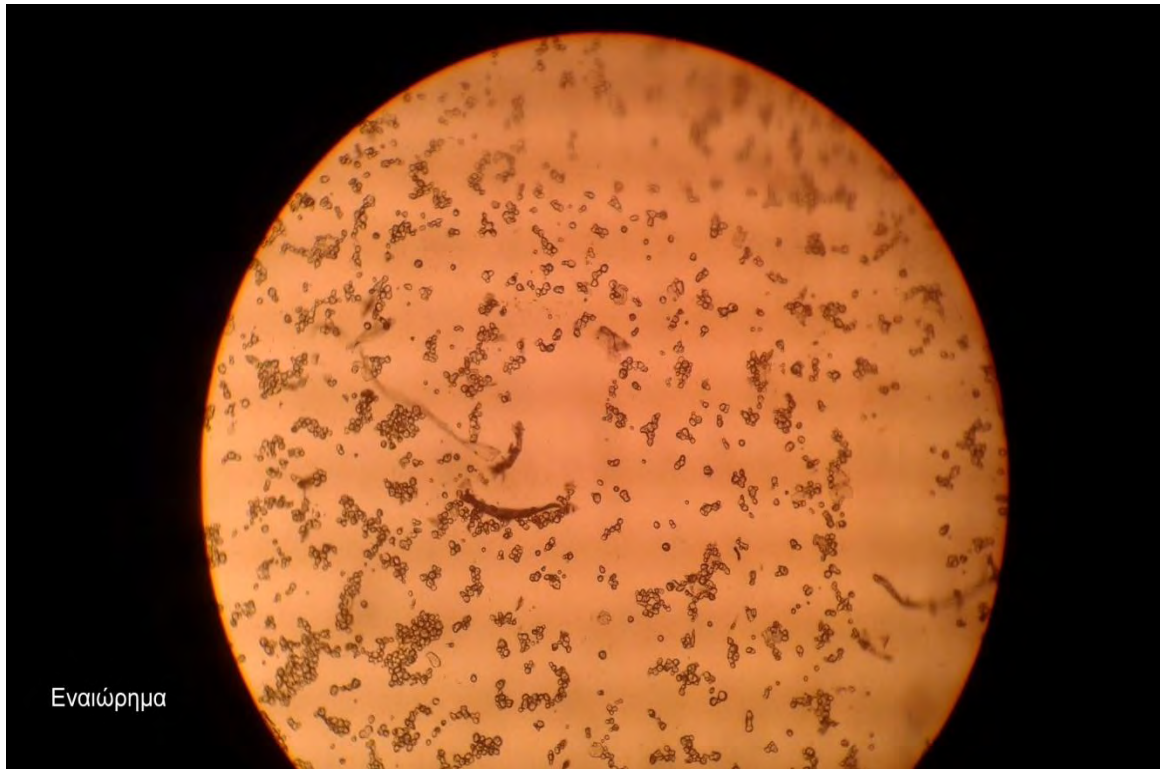
**Πίνακας 8:** Αποτελέσματα καλικών εναιωρημάτων.

	1 <sup>η</sup> παρασκευή	2 <sup>η</sup> παρασκευή
Κωνικές φιάλες γαλακτώδους εναιωρήματος με καλικά κύτταρα από κάλο βλαστού	50%	50%
Κωνικές φιάλες εναιωρήματος με κάλος βλαστού που μολύνθηκε	50%	50%
Κωνικές φιάλες εναιωρήματος με κάλος βλαστού χωρίς εξέλιξη σε καλικά κύτταρα	0%	0%
Κωνικές φιάλες γαλακτώδους εναιωρήματος με καλικά κύτταρα από κάλο φύλλου	50%	50%
Κωνικές φιάλες εναιωρήματος με κάλο φύλλου που μολύνθηκε	0%	50%

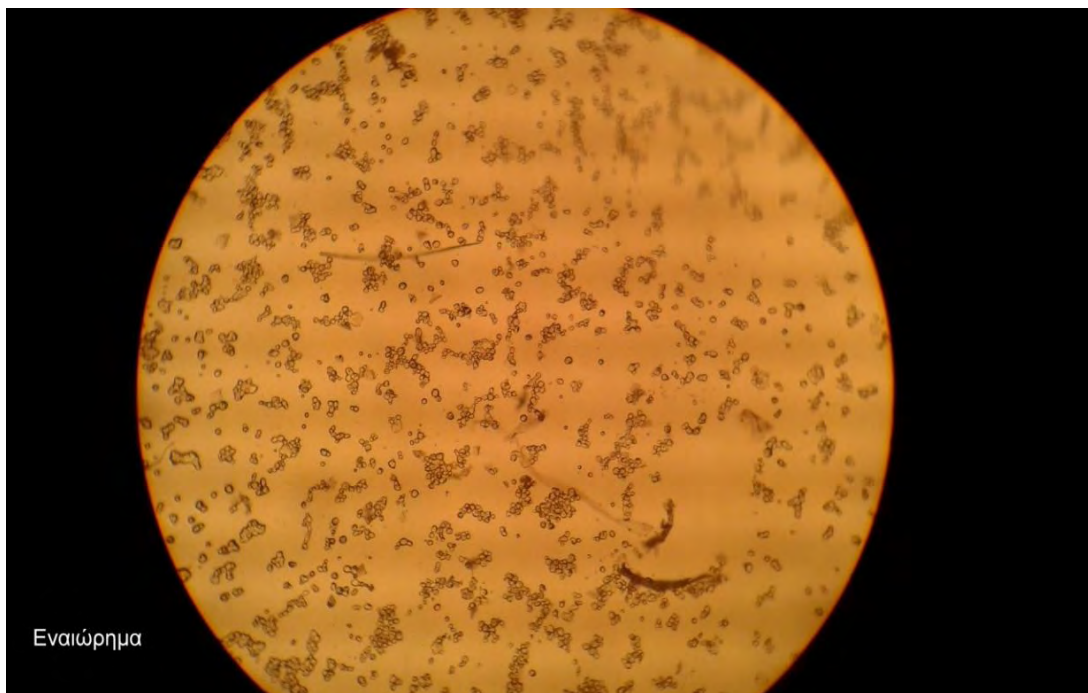


Κωνικές φιάλες εναιωρήματος με κάλος φύλλου χωρίς εξέλιξη σε καλικά κύτταρα	50%	0%
Κωνικές φιάλες γαλακτώδους εναιωρήματος με καλικά κύτταρα από κάλο μίσχου	75%	100%
Κωνικές φιάλες εναιωρήματος με κάλος μίσχου που μολύνθηκε	0%	0%
Κωνικές φιάλες εναιωρήματος με κάλος μίσχου χωρίς εξέλιξη σε καλικά κύτταρα	25%	0%

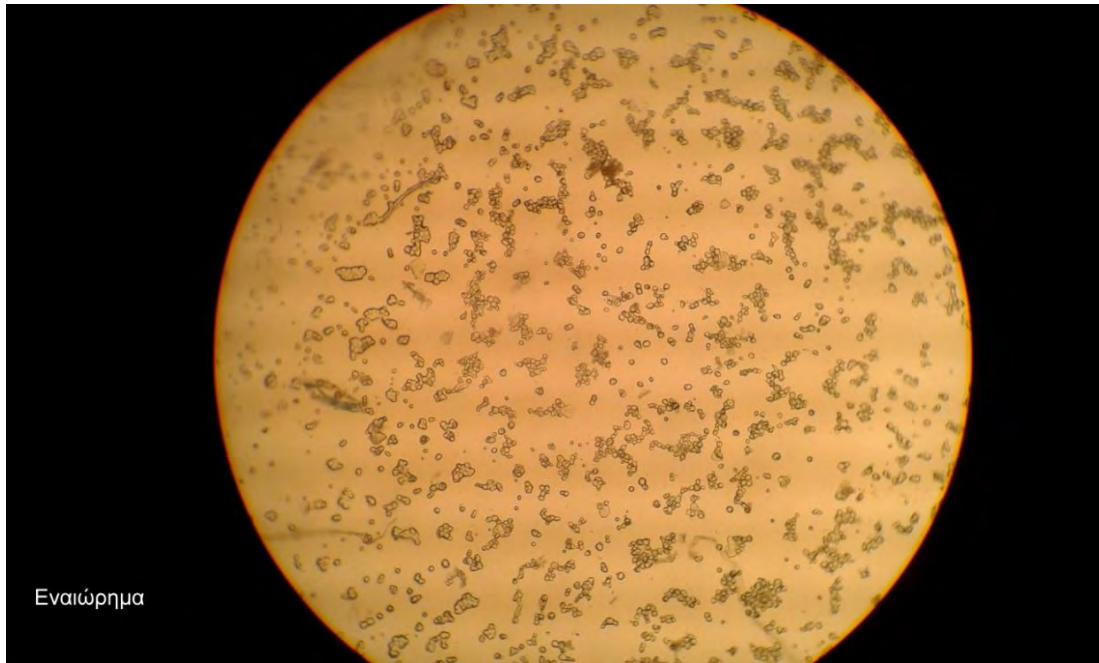
Τα ποσοστά επιτυχίας και από τις δυο μεταχειρίσεις στο υγρό θρεπτικό διάλυμα ήταν 50% για το βλαστό, 50% για τα φύλλα και 87,5% για το μίσχο και αντίστοιχα, τα ποσοστά μολύνσεων ήταν 50%, 25% και 0%.



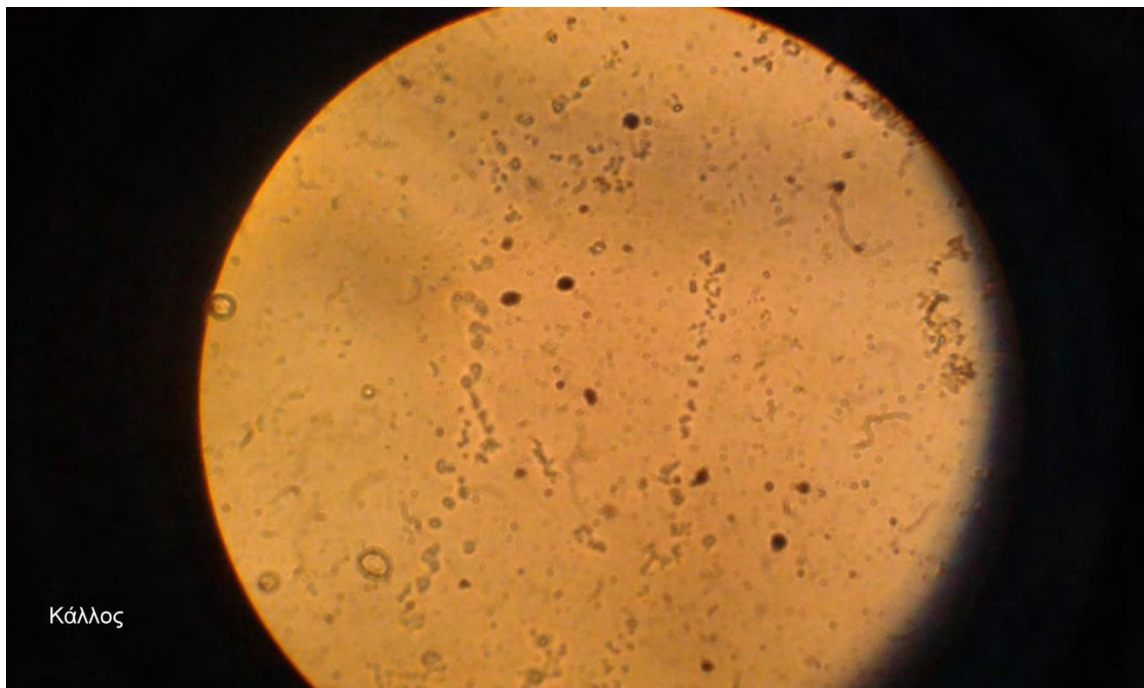
**Εικόνα 26:** Καλικά κύτταρα.



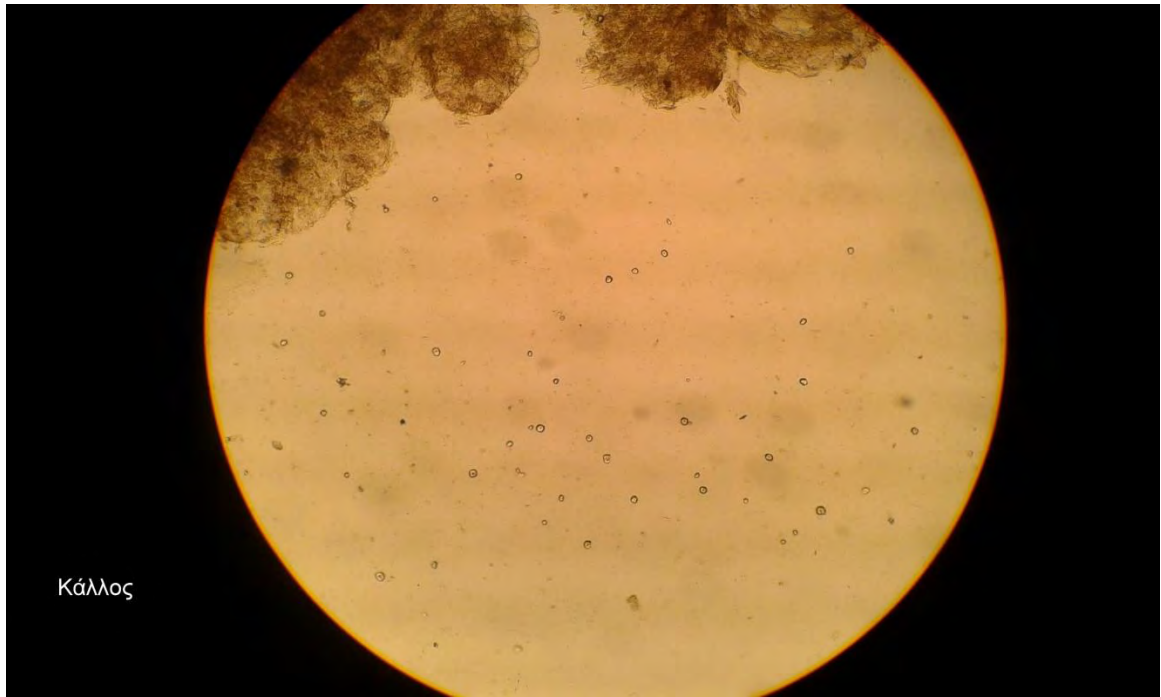
**Εικόνα 27:** Καλικά κύτταρα.



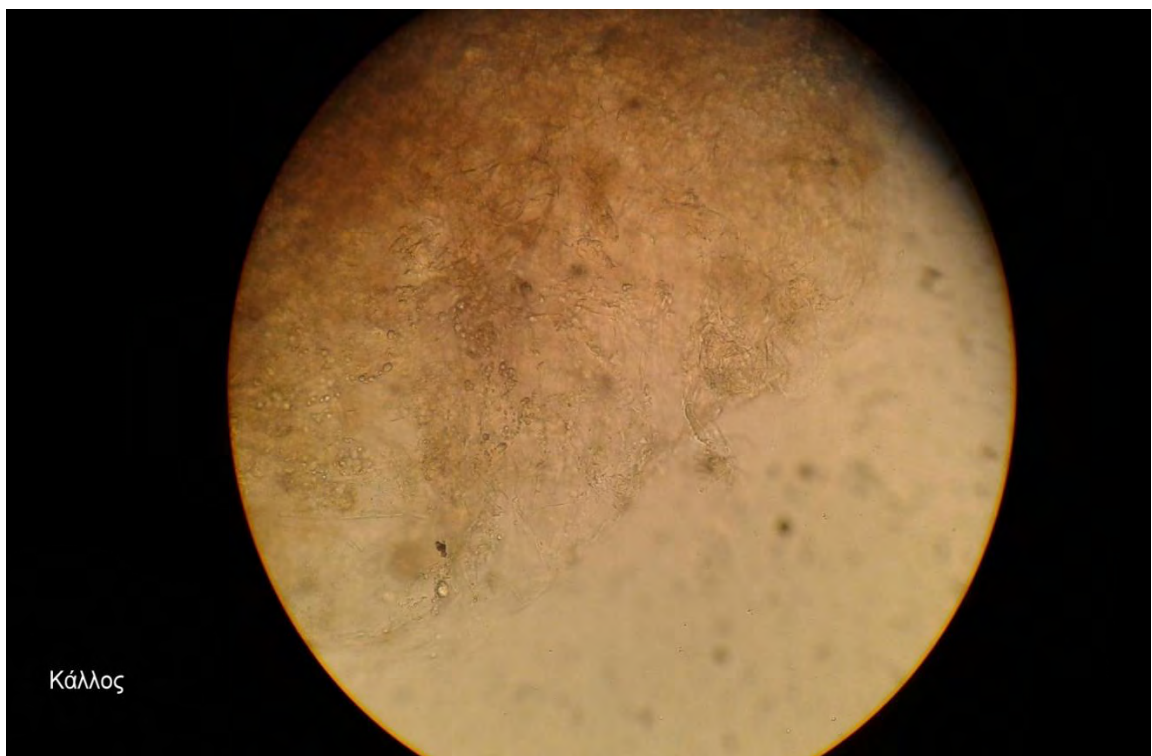
**Εικόνα 28:** Καλικά κύτταρα.



**Εικόνα 29:** Καλικά κύτταρα.



**Εικόνα 30:** Καλικά κύτταρα.



**Εικόνα 31:** Καλικά κύτταρα.

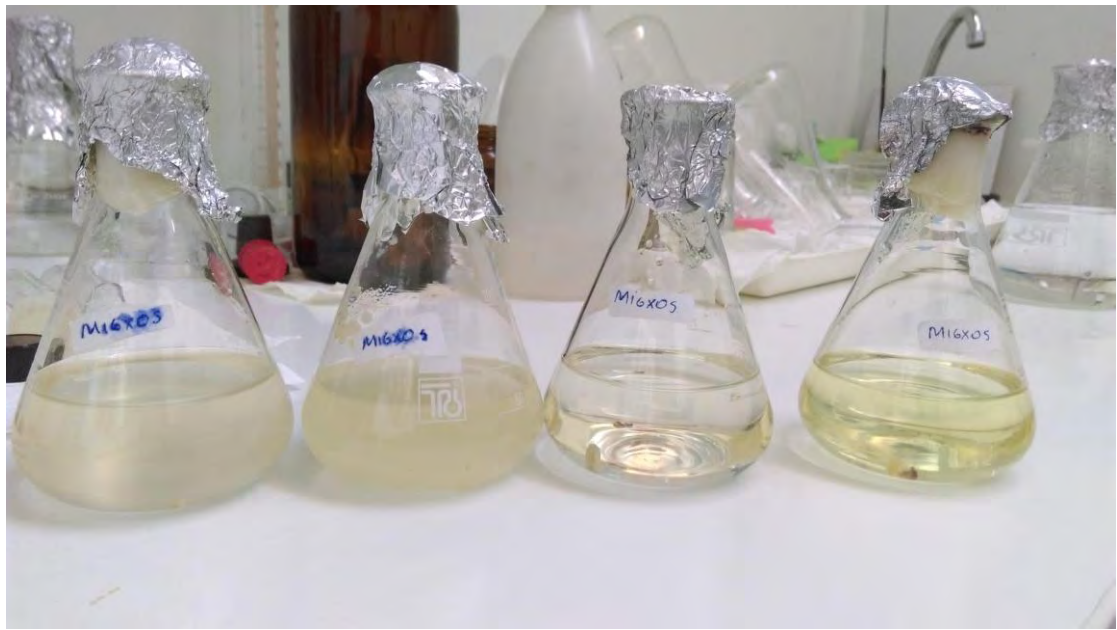




**Εικόνα 32:** *Εναιωρήματα με κάλο βλαστού.*



**Εικόνα 33:** *Εναιωρήματα με κάλο φύλλου.*



**Εικόνα 34:** *Εναιωρήματα με κάλο μίχου.*

## Δ.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1.ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ

Οι μολύνσεις, όπως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα κεφάλαια, είναι ένα μεγάλο πρόβλημα που αντιμετωπίζεται στην Ιστοκαλλιέργεια. Έτσι, μιας και όπως έγινε φανερό και στα αποτελέσματα του πειράματος, κατείχαν ένα αξιοσημείωτο ποσοστό σε αυτά θα γίνει μια μικρή αναφορά στους πιθανούς λόγους εμφάνισής τους.

Στο πείραμα παρατηρήθηκαν δύο ειδών προσβολές:

1. Υάλωση γύρω από το έκφυτο (μεταξύ εκφύτου-υποστρώματος) ή οποία στην πορεία έπαιρνε ένα λευκό-γαλακτερό χρώμα και κάποιες φορές μαύρο. Τέτοιου είδους προσβολές μπορεί να οφείλονται είτε στο ίδιο το έκφυτο, και ιδιαίτερα η τριανταφυλλιά που παράγει φαινολικές ουσίες, είτε σε μύκητες ή βακτήρια.
2. Διάφορες προσβολές. Συχνά εμφανίζονταν πορτοκαλί κηλίδες στο θρεπτικό υπόστρωμα, λευκές ή γκρι μεγάλες χνουδωτές κηλίδες, οι οποίες σε κάποιες περιπτώσεις καταλάμβαναν όλη την επιφάνεια του υποστρώματος, όπως επίσης και μικρά μαύρα στίγματα σε συμπαγή μορφή. Αυτού του είδους οι μολύνσεις ίσως οφείλονται σε προσβολές από διάφορους μύκητες.

Γενικά, ένα μεγάλο ποσοστό των προσβολών στην καλλιέργεια πιθανότατα οφείλεται σε λανθασμένους χειρισμούς που ίσως έγιναν κατά τη μεταφορά των φιαλιδίων από το αυτόκαυστο στο θάλαμο νηματικής ροής ή ακόμη και στην ανεπαρκή απολύμανση των θαλάμων εργασίας.

Επίσης, σημαντικό ρόλο στο ποσοστό των μολύνσεων φαίνεται να έπαιξε η εποχή τοποθέτησης των εκφύτων. Έκφυτα που λήφθηκαν από φυτά τα οποία πάρθηκαν από τέλος Φεβρουαρίου έως τέλος Απριλίου παρουσίασαν μεγαλύτερη απόκριση στην Ιστοκαλλιέργεια και μικρότερα ποσοστά μολύνσεων (πρώτη, δεύτερη και έκτη μεταχείριση), σε σχέση με τα φυτά που πάρθηκαν από το Σεπτέμβριο έως το Νοέμβριο (τρίτη, τέταρτη και πέμπτη μεταχείριση, όπου στην τρίτη μεταχείριση λήφθηκαν έκφυτα από υπαίθριο φυτό), γεγονός που οφείλεται πιθανόν στο στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Την άνοιξη, όπως είναι λογικό, τα φυτά είναι πολύ πιο εύρωστα σε σχέση με το φθινόπωρο ή το χειμώνα. Αυτό αποτυπώθηκε ξεκάθαρα στα

αποτελέσματα, καθώς η παραγωγή κάλου από φθινοπωρινά-χειμερινά έκφυτα ήταν αισθητά μικρότερη. Ενδεικνύεται άλλωστε η λήψη φυτών την άνοιξη αφού τότε βρίσκονται στο στάδιο της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού τους.

Τέλος, το είδος του εκφύτου φαίνεται ότι έπαιξε ρόλο τόσο στην ευπάθεια σε μολύνσεις όσο και στον παραγόμενο κάλο. Έτσι, παρατηρήθηκε πως τα έκφυτα του μίσχου ήταν πιο ευπαθή στις προσβολές απ' ό,τι τα έκφυτα βλαστού ή φύλλων, και για αυτό το λόγο στην πορεία χρησιμοποιήθηκαν μόνο έκφυτα των δύο τελευταίων. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την απολύμανση, μικροβιακό φορτίο μπορεί να παραμείνει σε σημεία που είναι δύσκολο να δράσει το διάλυμα απολύμανσης.

## **2.ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΛΟΥ**

Στο σχηματισμό και την ανάπτυξη του κάλου σημαντικό ρόλο έπαιξε το είδος του εκφύτου, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω. Τα έκφυτα του μίσχου είχαν πολύ μικρό ποσοστό επιτυχίας σε σχέση με τα έκφυτα του βλαστού και των φύλλων. Το γεγονός αυτό ίσως συνδέεται με την διαθέσιμη επιφάνεια του κάθε τύπου εκφύτου, τα φύλλα και ο βλαστός έχουν μεγαλύτερη διαθέσιμη επιφάνεια από το μίσχο, και μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό επίπεδο των ενδογενών φυτικών ορμονών που υπάρχουν στα μέρη των φυτών (Sujatha and Muktha, 1996; Tyagi et al., 2001). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με βιβλιογραφικές αναφορές που καταλήγουν σε αντίθετο συμπέρασμα, δηλαδή ότι τη μεγαλύτερη απόκριση στην ιστοκαλλιέργεια έχουν τα φύλλα και έπειτα ο μίσχος [Sujatha and Muktha, 1996; Tyagi et al., 2001; Gubis et al. (2003); Alagumanian et al. (2004); Ali and Mirza (2006)].

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως παρόλο που ο μίσχος δεν είχε καλή απόκριση στον σχηματισμό κάλου είχε την καλύτερη απόκριση στον σχηματισμό και πολλαπλασιασμό των καλικών κυττάρων στο υγρό θρεπτικό διάλυμα.

Τέλος, όσον αφορά τον παραγόμενο κάλο παρατηρήθηκε πως τα έκφυτα βλαστού έδιναν μεγαλύτερη ποσότητα κάλου και η παραγωγή του ξεκινούσε πιο γρήγορα απ' ό,τι στα έκφυτα φύλλου (για αυτό το λόγο στην πέμπτη επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν μόνο έκφυτα βλαστού). Παρατηρήθηκε πως τα έκφυτα βλαστού άρχιζαν να παράγουν κάλο περίπου 10 μέρες μετά την τοποθέτησή τους στο θρεπτικό υπόστρωμα, ενώ τα έκφυτα φύλλου περίπου 15 μέρες μετά. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 7 υπάρχουν περιπτώσεις όπου ο κάλος του βλαστού είναι 2 ή ακόμη και



τριπλάσιος σε βάρος από τον κάλο του φύλλου. Όσον αφορά την ποιότητα του κάλου και στις δύο περιπτώσεις ήταν συμπαγής και σκληρός.

### **3.ΚΑΛΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ**

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τα καλικά κυτταρικά εναιωρήματα ήταν αρκετά θετικά, καθώς από τη σύγκριση που έγινε ανάμεσα σε δείγμα εναιωρήματος, αφού αυτό είχε περάσει στη "γαλακτερή" φάση, και σε δείγμα κάλου παρατηρήθηκε πως τα δείγματα έμοιαζαν μεταξύ τους. Η ομοιότητα των δυο δειγμάτων δείχνει πως υπήρξε διαχωρισμός του κάλου και πολλαπλασιασμός των καλικών κυττάρων. Όπως φάνηκε και στα αποτελέσματα τη μεγαλύτερη απόκριση είχε ο κάλος που προερχόταν από το μίσχο και τη μικρότερη ο κάλος που προερχόταν από το φύλλο. Επίσης, στο στάδιο αυτό το ποσοστό μόλυνσης των διαλυμάτων με κάλο μίσχου ήταν μηδενικό, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, ενώ στις άλλες δυο μεταχειρίσεις υπήρξαν κάποιες μολύνσεις.

## Ε.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της εργασίας προκύπτει συμπερασματικά ότι:

- Τα τμήματα του βλαστού έδωσαν περισσότερο κάλο, σε συνολικό ποσοστό 33,4%, σε σχέση με αυτόν των φύλλων και των μίσχων, που είχαν ποσοστά επιτυχίας 31,2% και 16,7% αντίστοιχα.
- Η ταχύτερη δημιουργία κάλου επιτεύχθηκε με χρήση τμημάτων βλαστού. Όπως παρατηρήθηκε, τα έκφυτα βλαστού άρχιζαν την παραγωγή κάλου περίπου 4-5 ημέρες νωρίτερα σε σχέση με τα έκφυτα φύλλων και μίσχων.
- Η χρήση τμημάτων μίσχων εγκυμονεί περισσότερους κινδύνους μόλυνσης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη δυσκολία απολύμανσης των μίσχων, καθώς το απολυμαντικό μέσο ίσως δεν είναι δυνατόν να εξαλείψει το μικροβιακό φορτίο από όλα τα σημεία του εκφύτου.
- Ο χρόνος λήψης του φυτικού υλικού παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη χρονικά και ποσοτικά του παραγόμενου κάλου. Τα έκφυτα θα πρέπει να προέρχονται από φυτό που βρίσκεται στο στάδιο ανάπτυξής του, δηλαδή την άνοιξη.
- Αποφεύγονται οι επιπλέον μολύνσεις όταν τα έκφυτα τοποθετούνται μεμονωμένα σε φιαλίδια/βάζα/τριβλία. Επίσης, έτσι υπάρχει περισσότερος χώρος για την ανάπτυξη του κάλου και την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας.
- Το φυτικό υλικό θα πρέπει να λαμβάνεται από φυτά τα οποία έχουν όσο το δυνατόν μικρότερο μικροβιακό φορτίο, ώστε να είναι πιο εύκολες στη συνέχεια οι μεταχειρίσεις απολύμανσης. Παρατηρήθηκε πως η λήψη φυτικού υλικού από υπαίθριο φυτό αυξάνει το μικροβιακό φορτίο της καλλιέργειας και το ποσοστό της μόλυνσης ανέρχεται στο 100%.
- Όσον αφορά το υγρό θρεπτικό εναιώρημα, παρουσίασε αρκετά μεγάλο ποσοστό επιτυχίας και με τα τρία είδη κάλου (από βλαστούς, φύλλα και μίσχους), από τα οποία επιτεύχθηκε ο πολλαπλασιασμός καλικών κυττάρων σε αυτό.

## ΣΤ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Buddendorf-Joosten, J.M.C. and Woltering, E.J. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development in vitro. In: Lumsden, P.J.; Nicholas, J.R.; Davies, W.J. (Eds.). Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 165-190.
- Gautheret, R.J.1983. Plant tissue culture: A history. Bot. Mag. 96:393-410.
- Gautheret, R.J.1985. History of plant tissue and cell culture: A personal account. In I. K. Vasil, ed. Cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol. 2. New York: Academic Press. pp. 1-59.
- Gautheret, R. J. 1934. Culture du tissu cambial. C. R. Acad. Sci. 198:2195-96
- Gautheret, R. J. 1939. Sur la possibilite de realisier la culture indefinite des tissus de tubercules de carotte. C. R. Acad. Sci. 208:118-30.
- Geile, W. and Wanger, E. 1980. Rapid development of cell suspension cultures from leaf sections of *Chenopodium rubrum* L. Plant Cell Env. 3: 141-148).
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1: The Technology, 2nd edition. Exegetics Ltd., England.
- George, E. F. and Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Eversley, UK: Exegetics Ltd.
- George, E.F., Hall, M. A. and Geert-Jan De Klark. 2008. Plant Propagation by Tissue culture 3<sup>rd</sup> Edition, Volume 1. The Background. Springer.
- Haberlandt, G. 1902. Kultur versu chemiti solierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Der Wiss. Wien, Math.-Naturwiss. K1, 111:69-92.
- Hackett, W. P. 1966. Applications of tissue culture to plant propagation. Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 16:88-92.
- Hartmann and Kester. 1983. Plant Propagation: Principles and Practices. 4<sup>th</sup> edition. Prentice-Hall, Inc..
- Hartmann and Kester. 1987. Plant Propagation. Principles and Practices. 4<sup>th</sup> edition. Prentice-Hall, Inc..
- Hartmann and Kester. 2014. Plant Propagation Principles and Practices. Hartmann Kester Davies Geneve, Eighth Edition. Pearson New International Edition.
- Holdgate, D. P. and Aynsley, J. S. 1977. The development and establishment of a commercial tissue culture laboratory. Acta Hort. 78:31-6.
- Khosh-Khui M. and Sink, K. C. 1981. Callus induction and culture of *Rosa*. Science Horticulturae, 17 (1982) 361-370.

- Li, X., Krasnyanski, F. S. and Korban S. S. 2001. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*. Department of Natural Resources & Environmental Sciences, University of Illinois, 310 ERML, 1201 W. Gregory, Urbana. IL 61801, USA. *J. Plant Physio.* 159. 313-319.
- Muir, W. H., Hildebrandt, A. C. and Riker, A. J. 1954. Plant tissue cultures produced from single isolated cells. *Science* 119:877-78.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-97.
- Murashige, T. 1966. Principles of in vitro culture. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 16:80-8.
- Nitish, K. and Reddy, M. P. 2011. *In vitro Plant Propagation: A Review*
- Nobecourt, P. 1939. Sur la perenniteet l'augmentation de volume des cultures de tissus vegetaux. *C. R. Soc. Biol.* 130:1270-71.
- Pratap, K. P., Siba, P. R., Madhu, S., Anil, S. and Paramvir, S. A. 2006. In vitro propagation of rose—a review. *Biotechnology Advances* 24 (2006) 94-114.
- Read, P. E. and Preece, J. E. 2003. Environmental management for optimizing micropropagation. *Acta Hort.* 616, 129-133.
- Reinert, J. 1959. Über die Kontrolle die Morphogenese und die Induktion von Adventive embryo nen angewebe kulturen aus karotten. *Planta* 53:318-33.
- Savita, Vijay, G. S., Virk and Avinash, N. 2010. Effect of explant type and different plant growth regulators on callus induction and plantlet regeneration in Citrus. *Environ. WeInt. J. Sci. Tech.* 5 (2010) 97-106.
- Shahzad, H., Zaheer, A., Khan, F. Z. and Mahmood A. 1993. Callus Cultures of *Rosa Hybridacvs.*, Diamond Jubly and Lans France. Faculty of Farmacy, University of the Punjab, Lahore, Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 25(2): 193-198, 1993.
- Short, K. C. and Roberts, A. V. 1991. *Rosa* spp. (Roses): In Vitro Culture, Micropropagation, and the Production of Secondary Products, Medicinal and Aromatic Plants III pp 376-397. Part of the Biotechnology in Agriculture and Forestry book series (AGRICULTURE, volume 15).
- Skoog, F. and Miller, C. O. 1957. Chemical regulator of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Bio.* 11:118-31.
- Soomro, R., Yasmin, S. and Aleem, R. 2003. In vitro Propagation of *Rosa Indica*. Department of Botany, Shah Abdul Latif University, Khairpur, Pakistan, Department of Botany, University of Sindh, Jamshoro, Pakistan and Department of Biological Science, Quaid-e-Azam University, Islamabad, Pakistan. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6 (9): 826-830.
- Steward, F. C., Mapes, M. O. and Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured carrots. II. Organization in cultures from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* 454:705-8.

- Sujatha, M. and Mukta, N. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44,135-141.
- Tyagi, A.P., Comai, L. and Byers, B. 2001. Comparison of plant regeneration from root, shoot and leaf explants in pigeon pea (*Cajanus cajan*) cultivars. *SABRAO J. Breed. Gen.* 33, 59-71.
- Vasil, I. K. and Hildebrandt, A. C. 1965. Differentiation of tobacco plants from single isolated cells in microcultures. *Science* 150:889-90
- White, P. R. 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. *Amer. J. Bot.* 26:59-64.
- White, P. R. and Braun, A. C. 1941. Crown-gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science.* 94:239-41.

#### *ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ*

- Γρηγοριάδου Αικατερίνη. 2003. Μελέτη της *In Vitro* αναπαραγωγής ελληνικών ποικιλιών Ελιάς (*Olea europaea* L.). Διδακτορική διατριβή, Θεσσαλονίκη.
- Δημάση-Θεριού Κορτέσσα και Θεριός Ιωάννης. 2006. Γενική Δενδροκομία-Μέρος Α'. Πολλαπλασιασμός και Υποκείμενα Οπωροφόρων. Εκδόσεις Γαρταγάνη. Θεσσαλονίκη. Ελλάδα. Ε.Ε..
- Κάνουρα Μαρίνα. 2008. Αναπαραγωγή του νέου υποκειμένου ροδακινιάς (αμυγδαλοροδάκινο) P1. Πτυχιακή Διατριβή. Θεσσαλονίκη.
- Κίντζιος Σπύρος. 1994. Επιχειρηματική Ιστοκαλλιέργεια: Κατασκευή και Διαχείριση Επιχειρηματικών Μονάδων Παραγωγής Ανθοκομικού Πολλαπλασιαστικού Υλικού με Ιστοκαλλιέργεια. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα- Πειραιάς.
- Κίντζιος Σπύρος. 2015. Εισαγωγή στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών. Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.
- Λύκας Χρήστος. Σημειώσεις για το μάθημα Ανθοκομίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Νάνος Γεώργιος. 2011. Σημειώσεις για το μάθημα Παραγωγή Αγενώς Πολλαπλασιαζόμενου Υλικού, Εργαστήριο δεντροκομίας, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Ντόρκος Άγγελος. 2008. Μικροπολλαπλασιασμός Διάφορων Καλλωπιστικών Θάμνων. Πτυχιακή Διατριβή, Κρήτη.
- Ραπτοπούλου Χριστίνα. 2009. Εξυγίανση - Αναπαραγωγή *In Vitro* του Αμυγδαλοροδάκινου P1. Πτυχιακή Διατριβή. Θεσσαλονίκη.

- Σουρρή Αγγελική. 2003. Ιστοκαλλιέργεια αμπέλου: επίδραση μικροπεριβάλλοντος κατά την ex vitro σκληραγώγηση των φυταρίων. Μεταπτυχιακή διατριβή, Βόλος.

#### *ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ*

- [en.wikipedia.org/wiki/Rose](http://en.wikipedia.org/wiki/Rose)
- [www.britannica.com/plant/rose-plant](http://www.britannica.com/plant/rose-plant).