

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού
Περιβάλλοντος

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΩΝ ΚΑΙ
ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ & ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«Επίδραση διαφορετικών φυτορρυθμιστικών ουσιών στη
δημιουργία κάλου και εκβλαστημάτων από βλαστικά μέρη φυτών
τριανταφυλλιάς (*Rosa* sp.)»

«Effect of different plant growth regulators on callus formation
and shoots induction using material from rose (*Rosa* sp.) plants organs»

Καρατσιδου Χαρούλα-Μαρία

Βόλος, 2020

«Επίδραση διαφορετικών φυτορρυθμιστικών ουσιών στη δημιουργία κάλου και εκβλαστημάτων από βλαστικά μέρη φυτών τριανταφυλλιάς (*Rosa* sp.)»

«Effect of different plant growth regulators on callus formation and shoots induction using material from rose (*Rosa* sp.) plants organs»

Καρατοσίδου Χαρούλα-Μαρία

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Λύκας Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής, Ανθοκομία, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων

Λεβίζου Ευθυμία, Επίκουρος Καθηγήτρια, Φυσιολογία Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

Πετρόπουλος Σπυρίδων, Επίκουρος Καθηγητής, Λαχανοκομία, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

Copyright © ΚΑΡΑΤΟΣΙΔΟΥ ΧΑΡΟΥΛΑ-ΜΑΡΙΑ, 2020

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ειδίκευσης πραγματοποιήθηκε κατά το διάστημα από το Φεβρουάριο του 2019 έως τον Ιανουάριο του 2020, στο Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του τμήματος Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Οι πειραματικές δοκιμές και τα αποτελέσματα που προέκυψαν και αναλύονται στην παρούσα διατριβή αποτελούν τον αντικατοπτρισμό πολύωρης και επίμονης εργασίας και μελέτης, με σκοπό την επιτυχή επίτευξή της και την ενίσχυση των επιστημονικών δεδομένων πάνω σε αυτό το αντικείμενο. Έστω και μια μικρή κουκίδα να προστεθεί ακόμη στο χάρτη της Ιστοκαλλιέργειας της Τριανταφυλλιάς μέσα από αυτή την πειραματική έρευνα θα είναι μια σημαντική εξέλιξη στη μελέτη του είδους.

Για την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και απαιτητικό αντικείμενο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διατριβής μου Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Χ. Λύκα. Η εμπιστοσύνη και η συνεχής καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας, καθώς και η διαρκής προσπάθεια κάλυψης των υλικών αναγκών της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσαν σημαντικό έναυσμα για τη συνεχή πυροδότηση και του δικού μου ζήλου. Ακόμη, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ και στην κυρία Μ. Καζή, Υποψήφια Διδάκτορα του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τον σημαντικό συμβουλευτικό ρόλο που μου παρείχε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένεια μου για την αμέριστη στήριξή τους και για τη δυνατότητα που μου έδωσαν να πραγματοποιήσω την ειδίκευσή μου, καθώς και τους φίλους μου για την ηθική υποστήριξη και τη συμπαράσταση που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Ανθοκομία αποτελεί έναν πολύ σημαντικό κλάδο τόσο της γεωπονικής επιστήμης όσο και της αγοράς. Ένα από τα πιο διαδεδομένα ανθοκομικά φυτά είναι η τριανταφυλλιά (*Rosa* sp.), την οποία πολλοί χαρακτηρίζουν και ως βασίλισσα των λουλουδιών, λόγω των θεσπέσιων χρωμάτων και αρωμάτων που αναδύει. Η μεγάλη ζήτηση των τριαντάφυλλων από το καταναλωτικό κοινό έχει οδηγήσει στην αναζήτηση τρόπων για τη καλύτερη μεταχείριση της καλλιέργειας, τη διατήρηση των πιο σημαντικών και παραγωγικών ποικιλιών αλλά και τη δημιουργία καινούριων ποικιλιών με τις επιθυμητές ιδιότητες. Το κύριο μέσο για την επίτευξη αυτών των στόχων είναι ο εύκολος και επιτυχής πολλαπλασιασμός του φυτού.

Σκοπός της εργασίας είναι να μελετηθεί η επίδραση διαφορετικών φυτορρυθμιστικών ουσιών στη δημιουργία κάλου και εκβλαστημάτων από βλαστικά μέρη των φυτών τριανταφυλλιάς.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν μικρομοσχεύματα φύλλων, μίσχων και βλαστών τριανταφυλλιάς της ποικιλίας Miss Piggy για την καλλιέργεια τους σε θρεπτικό υπόστρωμα κατάλληλο για την επαγωγή κάλου με σύνθεση 4,4 g/L MS, 2 mg/L 2,4-D, 25 mg/L Kinetin, 2 g/L Caseine, 8 g/L Άγαρ, 30 g/L Ζάχαρη και pH 5,8. Ο κάλος αυτός διατηρούνταν στο εν λόγω υπόστρωμα μέχρι να αυξηθεί ικανοποιητικά ώστε να μπορεί να διαχωριστεί σε μικρότερα μέρη (~1-2 mm) και να χρησιμοποιηθεί για επανακαλλιέργεια.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν θρεπτικά υποστρώματα με διαφορετικές αναλογίες και συνδυασμούς των φυτορρυθμιστικών ουσιών BA, IBA, GA₃, NAA και TDZ, όπου τοποθετήθηκε ο κάλος, βλαστικά έκφυτα βλαστών, φύλλων και μίσχων καθώς και κάλος με βλαστικά έκφυτα για να μελετηθεί η περαιτέρω εξέλιξή τους.

Η διαδικασία επαγωγής κάλου έδωσε θετικά αποτελέσματα και αποτέλεσε μια ικανοποιητική πηγή πρώτης ύλης για περαιτέρω καλλιέργεια με σκοπό την οργανογένεση. Αντίθετα, η εφαρμογή των φυτορρυθμιστικών ουσιών δεν απέδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα και τελικά την επαγωγή οργανογένεσης από τον κάλο. Ωστόσο, επετεύχθη πράσινος μεταχρωματισμός του κάλου, το οποίο υποδηλώνει πιθανώς τη δημιουργία χλωροφύλλης στα καλικά κύτταρα, όταν αυτός τοποθετήθηκε στα θρεπτικά υποστρώματα τα οποία πέρα από 4,4 g/L MS, 8 g/L Άγαρ και 30 g/L

Ζάχαρη περιείχαν : 0,002 mg/L Kinetin+0,003 mg/L BA, 2 mg/L BA+ 0,5 mg/L GA₃, 6 mg/L BA+0,5 mg/L NAA, 30 mg/L BA+0,5 mg/L NAA, 0,5 mg/L BA+0,01 mg/L IBA+0,35 mg/L GA₃, 20 mg/L TDZ, 1 mg/L GA₃+1,5 mg/L TDZ, 2 mg/L BA+0,1 mg/L NAA, 1 mg/L BA+0,3 mg/L NAA+0,1 mg/L TDZ, 2 mg/L TDZ και 0,005 mg/L NAA+15 mg/L TDZ.

Συμπερασματικά, για την επαγωγή κάλου ενδείκνυται η λήψη μικρομοσχευμάτων κατά τις περιόδους βλαστικής ανάπτυξης του μητρικού φυτού και η χρήση έκφυτων βλαστού για ταχύτερη παραγωγή. Επίσης, ο κάλος βλαστού και τα έκφυτα βλαστού παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά πράσινου μεταχρωματισμού και σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα. Τέλος, τα θρεπτικά υποστρώματα που έδωσαν τα πιο θετικά αποτελέσματα ήταν αυτά με σύνθεση 2 mg/lt BA+0,1 mg/lt NAA και 1 mg/lt BA+0,3 mg/lt NAA+0,1 mg/lt TDZ.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: τριανταφυλλιά, ιστοκαλλιέργεια, κάλος, οργανογένεση, φυτορρυθμιστικές ουσίες

SUMMARY

Floriculture is one of the most important section both of the agriculture science and the market. One of the most commercial floricultural plants is rosa (*Rosa* sp.), which is called queen of flowers, because of its extraordinary colors and fragrances. Due to very big demand from consumers, the scientists were led to research methods for better manipulating techniques of canopy, for preservation of the most important and most productive varieties and for the production of new varieties which will meet the desirable properties. The main way to achieve these goals is the propagation of the plant.

The aim of this research is to study the proliferation of roses by the method of tissue culture through the effect of different plant growth regulators (PGRs) on the induction of callus and shoots from stem parts of rose plants.

Were used microcuttings of leaves, stems and shoots from rosa cultivar Miss Piggy which are placed in nutritious medium for callus induction with synthesis 4,4 g/L MS, 2 mg/L 2,4-D, ,25 mg/L Kinetin, 2 g/L Caseine, 8 g/L Agar, 30 g/L Sugar and pH 5,8. Callus was maintained in this medium until it achieves the appropriate size (~1-2 mm), in order to use it in the following propagation phases.

During these phases, nutrient substrates, which contains the hormones BA, IBA, GA₃, NAA και TDZ in different combinations, were prepared where the callus, explants from leaves, stems and shoots and explants with callus were placed, in order to study their direct organogenesis .

The process of callus induction showed positive results and was a satisfactory source of raw material for further cultivation for organogenesis. In contrast, the application of PGRs did not gave the expected results and ultimately the induction of organogenesis by callus. However, was achieved alter in the callus color to green, which probably indicates chlorophyll formation in the callus cells when they were placed on nutrient substrates which contains, except from 4,4 g/L MS, 8 g/L Agar and 30 g/L Sugar, also: 0,002 mg/L Kinetin+0,003 mg/L BA, 2 mg/L BA+ 0,5 mg/L GA₃, 6 mg/L BA+0,5 mg/L NAA, 30 mg/L BA+0,5 mg/L NAA, 0,5 mg/L BA+0,01 mg/L IBA+0,35 mg/L GA₃, 20 mg/L TDZ, 1 mg/L GA₃+1,5 mg/L TDZ, 2 mg/L

BA+0,1 mg/L NAA, 1 mg/L BA+0,3 mg/L NAA+0,1 mg/L TDZ, 2 mg/L TDZ and 0,005 mg/L NAA+15 mg/L TDZ.

In conclusion, for the induction of callus it is advisable to obtain micro-cuttings during the vegetative growth periods of the mother plant and the use of shoots for faster production. Also, callus from shoot explants and shoot explants showed higher percentages of green pigmentation and in a shorter time. Finally, the nutrient substrates that gave the most positive results were those with 2 mg/L BA+0,1 mg/L NAA and 1 mg/L BA+0,3 mg/L NAA+0,1 mg/L TDZ.

KEY WORDS: rosa, tissue culture, callus, organogenesis, plant growth regulators (PGRs)

«Εγώ, η Χαρούλα-Μαρία Καρατοσίδου, είμαι η συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε.. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.»

«Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα Καρατοσίδου Χαρούλα-Μαρία»

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iv
SUMMARY	vi
Κατάλογος συντομογραφιών.....	xiii
Κατάλογος Πινάκων	xiv
Κατάλογος Διαγραμμάτων.....	xiv
Κατάλογος Εικόνων.....	xv
A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.Υφιστάμενη Κατάσταση	1
2.Σκοπός εργασίας	2
3.Τριανταφυλλιά.....	3
3.1.Γενικά στοιχεία	3
3.2.Οικονομική σημασία	4
3.3.Μέθοδοι πολλαπλασιασμού.....	5
4.Ιστοκαλλιέργεια	6
4.1.Γενικά στοιχεία	6
4.2.Ιστοκαλλιέργεια στην Τριανταφυλλιά	8
4.3.Παράγοντες που επηρεάζουν την αναγέννηση κυττάρων	9
4.4.Στάδια Ιστοκαλλιέργειας	11
5.Αποδιαφοροποίηση – Διαφοροποίηση - Οργανογένεση (Dedifferentiation-Differentiation - Organogenesis).....	12
5.1.Οδοί διαφοροποίησης <i>in vitro</i>	13

5.2.Άμεση οργανογένεση	15
5.3.Έμμεση οργανογένεση	15
5.4.Μορφογενετική έκφραση	16
6.Κάλος - Γενικά στοιχεία.....	17
7.Φυτορρυθμιστικές ουσίες (Ορμόνες).....	18
7.1.Γενικά στοιχεία	18
7.2.Αυξίνες (Auxins).....	20
7.3.Κυτοκινίνες (Cytokinins).....	22
7.4.Γιββερελλίνες (Gibberellins)	23
B.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
1.Φυτικό Υλικό.....	25
1.2.Κριτήρια επιλογής φυτικού υλικού.....	25
2.Απολύμανση	26
2.1.Απολύμανση μικρομοσχευμάτων	26
2.2.Απολύμανση θαλάμου.....	26
3.Έμμεση οργανογένεση	26
3.1.Θρεπτικό Υπόστρωμα (Θ.Υ.)	26
3.2.Υποκαλλιέργεια	32
3.3.Κριτήρια επιλογής κάλου για οργανογένεση.....	33
4.Άμεση οργανογένεση	33
Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	35
1.Αποτελέσματα καλλιέργειας επαγωγής κάλου.....	35

1.1.Επαγωγή κάλου.....	35
1.2.Μολύνσεις-Νεκρώσεις ιστών	38
2.Αποτελέσματα έμμεσης και άμεσης οργανογένεσης.....	40
2.1.Πρασίνισμα κάλου	40
2.2. Έμμεση οργανογένεση	41
2.3.Άμεση οργανογένεση	44
Δ.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	50
Ε.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53

Κατάλογος συντομογραφιών

Ελληνικά

ΘΥ Θρεπτικό Υπόστρωμα

Αγγλικά

2-iP (2-Isopentenyl)adenine

2,4-D 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

4-cpa 4-Chlorophenoxyacetic acid

ABA Abscisic acid

ABP Auxin binding proteins

BA 6-Benzyladenine

GA₃ Gibberellic acid

IAA Indole-3-acetic acid

IBA Indole-3-butyric acid

KIN Kinetin

NAA 1-Naphthaleneacetic acid

PGRs Plant growth regulators

TDZ Thidiazuron

ZEA Zeatin

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Επίδραση αυξητικών ρυθμιστικών ουσιών στη μορφογένεση των φυτών. (Πηγή: Γαλάτης κ.α., 2003).....	16
Πίνακας 2: Σύσταση στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για επαγωγή κάλου και οργανογένεση.....	27
Πίνακας 3: Αριθμός επαναλήψεων ανά έκφυτο και ανά περίοδο για τη διαδικασία της καλογένεσης στο ΘΥ1.....	28
Πίνακας 4: Αριθμός επαναλήψεων ανά είδος κάλου και ανά ΘΥ για την έμμεση οργανογένεση.	28
Πίνακας 5: Αριθμός επαναλήψεων ανά μεταχείριση για την άμεση οργανογένεση.	34
Πίνακας 6: Ποσοστά μολύνσεων και νεκρώσεων στο κάθε βλαστικό μέρος ανά εποχή λήψης μοσχευμάτων.	39
Πίνακας 7: Ποσοστό κάλων από έκφυτα βλαστού.	42
Πίνακας 8: Ποσοστό κάλων από έκφυτα φύλλου.	42
Πίνακας 9: Ποσοστό κάλων από έκφυτα μίσχου.	42
Πίνακας 10: Ποσοστό επαγωγής κάλου βλαστού και σύνθεσης χλωροφύλλης.	45
Πίνακας 11: Ποσοστό επαγωγής κάλου φύλλου και σύνθεσης χλωροφύλλης.....	46
Πίνακας 12: Ποσοστό επαγωγής κάλου μίσχου και σύνθεσης χλωροφύλλης.....	47
Πίνακας 13: Ποσοστό πράσινων καλικών κυττάρων από καλλιέργεια έκφυτου βλαστού με κάλο. .	48
Πίνακας 14: Ποσοστό πράσινων καλικών κυττάρων από καλλιέργεια έκφυτου φύλλου με κάλο.	49
Πίνακας 15: Ποσοστό πράσινων καλικών κυττάρων από καλλιέργεια έκφυτου μίσχου με κάλο.	49

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Μέσος όρος ημερών που απαιτούνται για την έναρξη δημιουργίας κάλου σε έκφυτα βλαστού, φύλλου και μίσχου.....	35
Διάγραμμα 2: Ποσοστό επαγωγής κάλου από έκφυτα βλαστού (■), φύλλου (■) και μίσχου (■) κατά τις 5 διαφορετικές περιόδους λήψης μοσχευμάτων.....	38

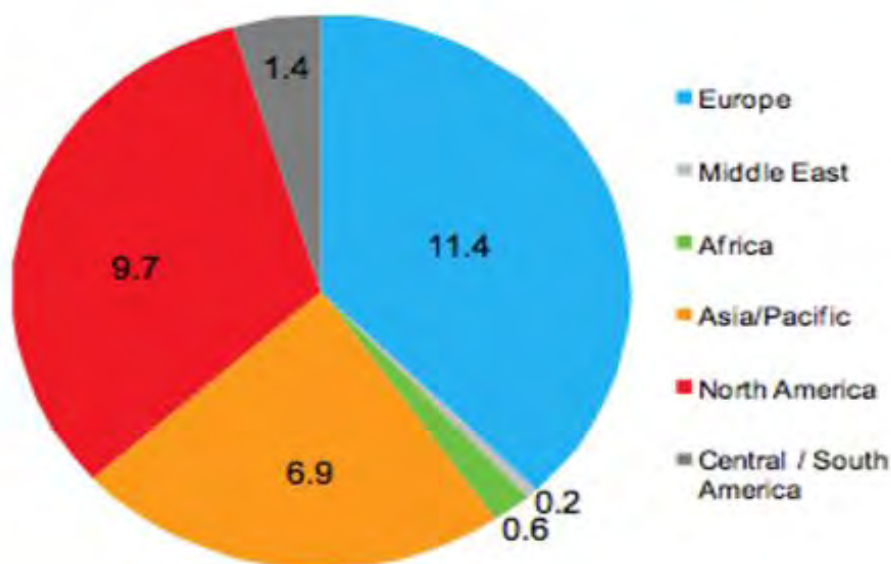
Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Παραγωγή (δισ. €) ανθοκομικών φυτών σε παγκόσμιο επίπεδο. (Πηγή: Γιαγνάμ Ταράση, 2015).....	1
Εικόνα 2: Απεικόνιση τυπικής μορφής στελέχους τριανταφυλλιάς με επισήμανση των κύριων οργάνων που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια. (Πηγή: www.supercoloring.com).....	4
Εικόνα 3: Διαδρομές διαφοροποίησης που μπορεί να ακολουθήσει ένα φυτικό κύτταρο. (Πηγή:Feher, 2019).....	8
Εικόνα 4: Απόκριση στην ιστοκαλλιέργεια. (Πηγή: Κίντζιος, 2015).....	10
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση σταδίων ιστοκαλλιέργειας. (Πηγή: George et al., 2008d).....	12
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση διαφόρων διαδικασιών που περιλαμβάνουν αποδιαφοροποίηση και διαφοροποίηση φυτικών κυττάρων. (α. Απεικόνιση φυτικών κυττάρων και ιστών, b. Διαδικασίες διαφοροποίησης και αποδιαφοροποίησης, c. Διαδικασίες αποδιαφοροποίησης και επαναδιαφοροποίησης προκαλούμενες από εξωτερικά ερεθίσματα. (1) Η αρχική διαδικασία του σχηματισμού πλευρικής ρίζας από το περικύκλιο που παρουσιάζεται ως μορφή αποδιαφοροποίησης. (2) Άμεση εμβρυογένεση που προκαλείται από καταπόνηση επιδερμικών κυττάρων. (3) Ορμονική επαγωγή κάλου από το περικύκλιο της ρίζας. (4) Σχηματισμός κάλου λόγω τραυματισμού από το παρέγχυμα. (5) Μετασχηματισμός των μεσοφυλλικών κυττάρων στα τραχειακά στοιχεία. (6) Σχηματισμός κάλου από καλλιέργεια μεσοφυλλικών πρωτοπλαστών. (7) Επανασύνδεση ιστών στο κομμένο στέλεχος. (Πηγή: Sugiyama, 2015).....	13
Εικόνα 7: Μονοπάτια διαφοροποίησης <i>in vitro</i> . (Πηγή: Κίντζιος, 2015).....	14
Εικόνα 8: Σχέση μεταξύ του λόγου αυξίνης : κυτοκινίνης ως προς την μορφογένεση των φυτών. (Πηγή: Hartmann et al., 2014).....	17
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση διάφορων ειδών κάλου. (Πηγή: Sugiyama, 2015).....	18
Εικόνα 10: Σημαντικότερες αυξίνες. (Πηγή: Κίντζιος, 2015).....	21
Εικόνα 11: Σημαντικότερες κυτοκινίνες. (Πηγή: Κίντζιος, 2015).....	23
Εικόνα 12: Αυτόκαυστο υγρής αποστείρωσης.....	30
Εικόνα 13: Κλειστός θάλαμος εργασίας κατά τη διάρκεια τοποθέτησης καλλιέργειας.....	31
Εικόνα 14: Θάλαμος ελεγχόμενων συνθηκών ανάπτυξης.....	31
Εικόνα 15: Τοποθέτηση δοκιμαστικών σωλήνων στο θάλαμο ανάπτυξης.....	32
Εικόνα 16: Κάλος σε έκφυτο βλαστού.....	36
Εικόνα 17: Κάλος σε έκφυτο μίσχου.....	36
Εικόνα 18: Κάλος από έκφυτο βλαστού που έχει πρασινίσει στο θρεπτικό υπόστρωμα 10.	44

Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.Υφιστάμενη Κατάσταση

Ο κλάδος της γεωργίας αποτελεί έναν πολύ σημαντικό πυλώνα τόσο της χώρας μας όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο και για το λόγο αυτό γίνονται όλο και περισσότερες έρευνες για την ανάπτυξη και την εξέλιξη του. Η ανθοκομία αποτελεί ένα σχετικά μικρό τμήμα αυτού του κλάδου αλλά είναι ένα εξαιρετικά σημαντικό και ταχέως ανερχόμενο κομμάτι. Καταλαμβάνοντας ένα πολύ μικρό ποσοστό της συνολικής γεωργικής παραγωγής καταφέρει και κατακτά μια πολύ υψηλή θέση στην οικονομική κατάταξη των γεωργικών προϊόντων. Χάρη στην ανάπτυξη των θερμοκηπίων και των τεχνολογιών που εφαρμόζονται, η Ευρώπη καταφέρει και παράγει υψηλής ποιότητας και αξίας ανθοκομικά προϊόντα, υπερέχοντας στις διεθνείς αγορές (Γιαγνάμ Τaráση, 2015) (Εικόνα 1). Ένα από τα σημαντικότερα και πιο δημοφιλή ανθοκομικά φυτά είναι η τριανταφυλλιά (*Rosa* sp.), η οποία θεωρείται η βασίλισσα των λουλουδιών λόγω του κάλους και των αρωμάτων της (Shabbir et al., 2009). Τα τριαντάφυλλα, πέρα από την καλλωπιστική τους χρήση ως διακοσμητικά φυτά, χρησιμοποιούνται επίσης και σε διάφορες άλλες βιομηχανίες, όπως στη φαρμακοβιομηχανία, την ποτοποιία, την αρωματοποιία κ.α..



Εικόνα 1: Παραγωγή (δισ. €) ανθοκομικών φυτών σε παγκόσμιο επίπεδο. (Πηγή: Γιαγνάμ Τaráση, 2015)

Οι απαιτήσεις της σύγχρονης αγοράς επιτάσσουν περαιτέρω γενετική βελτίωση των υφιστάμενων ποικιλιών και διατήρησή τους αλλά και άμεση δημιουργία καινούργιων ποικιλιών. Χρήσιμο εργαλείο για όλα αυτά αποτελεί ο πολλαπλασιασμός των φυτών, ο οποίος μπορεί να γίνει είτε εγγενώς, με σπόρο, είτε αγενώς, με μοσχεύματα, με εμβολιασμό και με ιστοκαλλιέργεια. Το βασικό μέλημα όσων ασχολούνται με αυτό το κομμάτι είναι να παράγουν τα καινούρια φυτά σε όσο το δυνατόν πιο σύντομο χρονικό διάστημα και σε μεγάλες ποσότητες. Τη λύση σε αυτή την επιδίωξη μπορεί να δώσει η Ιστοκαλλιέργεια. Μέσω της τεχνικής αυτής και της εφαρμογής φυτορρυθμιστικών ουσιών στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας μπορεί να επιτευχθεί μείωση της επιμήκυνσης των βλαστών και προαγωγή της πλευρικής-δευτερογενούς βλάστησης και της ανθοφορίας σε διακοσμητικά και φαρμακευτικά φυτά. Τα συμπαγή και πυκνά φυτά χρειάζονται λιγότερο χώρο σε ένα θερμοκήπιο, χρειάζονται λιγότερο νερό για άρδευση, έχουν αυξημένη διάρκεια ζωής, αλλά έχουν επίσης καλύτερες πωλήσεις λόγω του μεγέθους, του σχήματος και των σκούρων πράσινων φύλλων τους, τα οποία γενικά συνδέονται με καλύτερη ποιότητα.

2.Σκοπός εργασίας

Σκοπός της εν λόγω εργασίας είναι η μελέτη της δυνατότητας παραγωγής κάλου από διάφορα βλαστικά μέρη τριανταφυλλιάς για την *in vitro* αναγέννηση βλαστών σε σύντομο χρονικό διάστημα. Με αυτό τον τρόπο υπάρχει η δυνατότητα διατήρησης σπάνιων ή/και πολύ σημαντικών ποικιλιών, χωρίς να υπάρχει κίνδυνος αλλοίωσης των χαρακτηριστικών τους. Επιπλέον, δύναται η άμεση κάλυψη της αγοράς με νέες ποικιλίες που θα πληρούν τις επιθυμητές προϋποθέσεις. Για την εκπόνηση του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν φυτά ποικιλίας Miss Piggy και εφαρμόστηκαν διαφορετικά πρωτόκολλα, ώστε να επιλεγεί στο τέλος το κατάλληλο. Τα βλαστικά τμήματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεσογονάτια τμήματα βλαστών, νεαρά πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα και τμήματα μίσχων, τα οποία τοποθετήθηκαν σε τεχνητό υπόστρωμα ανάπτυξης για την επαγωγή κάλου και την μετέπειτα καλλιέργειά του σε υπόστρωμα οργανογένεσης για την επαγωγή βλαστού. Η εκλογή του κατάλληλου πρωτόκολλου γίνεται με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για την γρήγορη παραγωγή νέων και πιο εμπορικών ποικιλιών τριανταφυλλιάς, καθώς και για την ανάπτυξη νέων τεχνικών εμβολισμού που θα δίνουν τη δυνατότητα δημιουργίας υγιών φυτών στις εκάστοτε επιθυμητές ημερομηνίες.

3.Τριανταφυλλιά

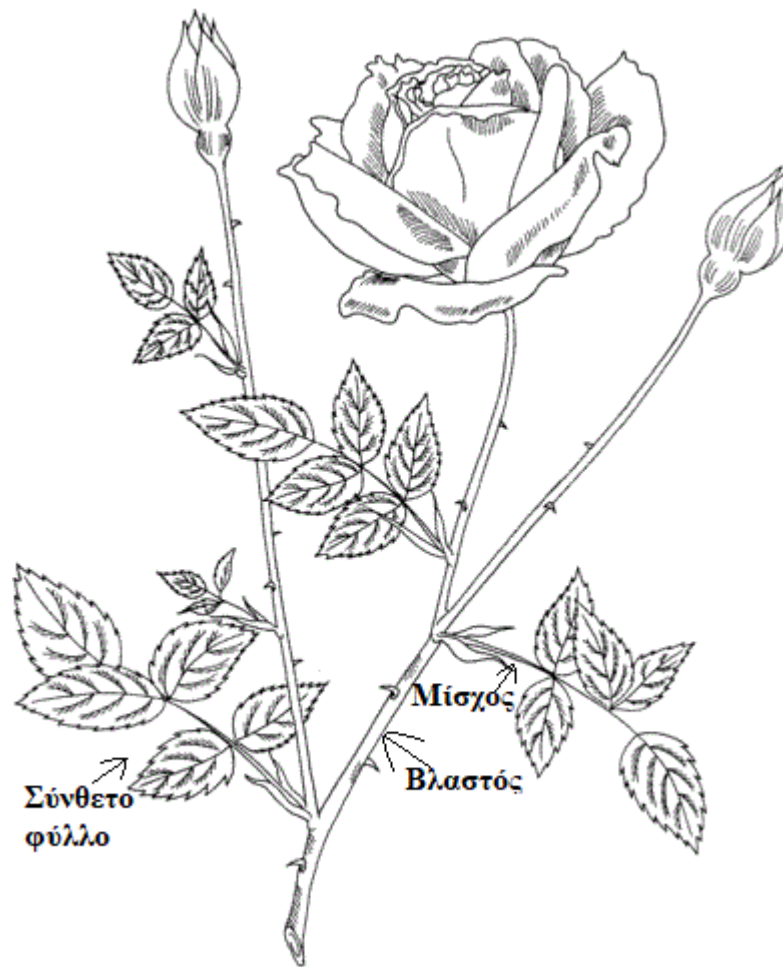
3.1.Γενικά στοιχεία

Ο κλάδος της ανθοκομίας αποτελεί πολύ σημαντικό κομμάτι τόσο της ελληνικής γεωργίας όσο και της οικονομίας. Η τριανταφυλλιά θα μπορούσε να θεωρηθεί ένα από τα κορυφαία ανθοκομικά φυτά, καθώς καλλιεργείται εκτενέστατα τόσο ως γλαστρικό φυτό όσο και ως δρεπτό άνθος. Εντάσσεται στην οικογένεια των Rosaceae, στο γένος Rosa. Τα άνθη της ποικίλουν σε μέγεθος, από πολύ μικρά (ποικιλίες μινιατούρες) έως αρκετά μεγάλα (υβρίδια). Το άνθος βρίσκεται στην κορυφή του ανθοφόρου βλαστού, ακολουθείται από το λαιμό κι έπειτα συναντάται το πρώτο γόνατο. Από το γόνατο εκφύονται τα φύλλα του φυτού και ανάμεσα στο κάθε γόνατο βρίσκονται τα μεσογονάτια διαστήματα, τα οποία είναι τρυφερά έως ένα σημείο και από εκεί και κάτω αρχίζουν και ξυλοποιούνται. Τα φύλλα της διακρίνονται στα απλά και τα σύνθετα. Τα απλά έχουν ενιαίο έλασμα ενώ στα σύνθετα το έλασμα αποτελείται από πολλά φυλλάκια και συνδέεται στο βλαστό με το μίσχο. Τα σύνθετα φύλλα είναι πτεροειδή και αποτελούν τα κύρια φύλλα της τριανταφυλλιάς (Εικόνα 2). Τα τρυφερά τμήματα του βλαστού, τα κύρια φύλλα και οι μίσχοι είναι αυτά που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια.

Τα τριαντάφυλλα, πέρα από την καλλωπιστική τους χρήση ως διακοσμητικά φυτά, χρησιμοποιούνται επίσης και στην αρωματοποιία και τη φαρμακοβιομηχανία για το άρωμα που παράγουν αλλά και ως συστατικά στη μαγειρική – ζαχαροπλαστική και στην ποτοποιία (en.wikipedia.org/wiki/Rose). Οι πιο σημαντικοί στόχοι των προγραμμάτων για την ανάπτυξη της καλλιέργειας του τριαντάφυλλου είναι η βελτίωση κάποιων χαρακτηριστικών, όπως το χρώμα των ανθέων και η μορφή τους, η ανθεκτικότητα σε παράσιτα και ασθένειες και η μετασυλλεκτική ζωή αλλά και το άρωμα των δρεπτόν λουλουδιών (Bao et al., 2012).

Λόγω της μεγάλης εμπορικής του αξίας έχουν δημιουργηθεί πολλές καινούριες ποικιλίες και υβρίδια, με πληθώρα χαρακτηριστικών ώστε να καλύπτονται οι προτιμήσεις των καταναλωτών. Ως επί των πλείστων οι ποικιλίες που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι αποτέλεσμα διασταυρώσεων Ευρωπαϊκών και Ασιατικών ειδών, σε διάφορα χρώματα και μεγέθη, και είναι απόγονοι επτά κυρίως ποικιλιών, ανάμεσα στα πολλά είδη που υπάρχουν. Αυτό είναι αποτέλεσμα

αλληπαλλήλων διασταυρώσεων στο πέρασμα των χρόνων κι ως εκ τούτου τα περισσότερα υβρίδια στις μέρες μας προέρχονται κυρίως από τη διασταύρωση των ειδών *Rosa gallica* και *Rosa chinensis* (GAIApedia). Ένα σημαντικό υβρίδιο είναι το tea rose, το οποίο παράγει άνθη μεγάλης διαμέτρου και ποικίλων χρωμάτων, με τα κόκκινα να είναι τα πιο δημοφιλή και τα ροζ να ακολουθούν κερδίζοντας ολοένα και περισσότερο την προτίμηση των καταναλωτών (Boodley, 1998).



Εικόνα 2: Απεικόνιση τυπικής μορφής στελέχους τριανταφυλλιάς με επισήμανση των κύριων οργάνων που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια. (Πηγή: www.supercoloring.com)

3.2.Οικονομική σημασία

Είναι φανερό πως η καλλιέργεια της τριανταφυλλιάς έχει πολλή μεγάλη εμπορική αξία και για το λόγο αυτό έχουν δημιουργηθεί πάρα πολλές ποικιλίες με διάφορους χρωματισμούς, και μπορεί να έχουν θαμνώδη ή ορθόκλαδη ανάπτυξη. Αξίζει να σημειωθεί πως μόνο την 14^η Φεβρουαρίου, ημέρα του Αγίου Βαλεντίνου οι

πωλήσεις δρεπτόν τριαντάφυλλων ξεπερνούν τα 175 εκατομμύρια στελέχη (Γιαγνάμ Ταράση, 2015). Σύμφωνα με τα τελευταία στατιστικά στοιχεία του υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων το έτος 2018 η καλλιέργεια του τριαντάφυλλου καταλαμβάνει 738 στρέμματα στη χώρα μας, ενώ αντίστοιχα, το έτος 2017 καταλαμβάνει 646 στρέμματα και συγκριτικά με τα προηγούμενα έτη παρατηρείται μια συνεχής αύξηση στον αριθμό των στρεμμάτων όπου καλλιεργείται το τριαντάφυλλο (συγκριτικά με το 2016 υπήρξε τριπλασιασμός των στρεμμάτων αυτών).

3.3.Μέθοδοι πολλαπλασιασμού

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το τριαντάφυλλο έχει πολύ μεγάλο αντίκρισμα στην ανθοκομική αγορά και η οικονομική του σημασία είναι σημαντική. Για το λόγο αυτό ο τρόπος πολλαπλασιασμού του αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο για τη συνέχιση, ανάπτυξη και εξέλιξη της καλλιέργειας του. Για τον πολλαπλασιασμό της τριανταφυλλιάς έχουν κυριαρχήσει τέσσερις μέθοδοι. Οι μέθοδοι αυτοί είναι με μοσχεύματα, με εμβολιασμό, με σπόρο και με την ιστοκαλλιέργεια. Ο πολλαπλασιασμός με σπόρο χρησιμοποιείται μόνο για τη γενετική βελτίωση των ποικιλιών και οι δύο πρώτες τεχνικές αποτελούν τις πιο συμβατικές μεθόδους πολλαπλασιασμού και έχουν εφαρμογή σε όλα τα είδη τριανταφυλλιάς, ωστόσο παρουσιάζουν κάποια σημαντικά μειονεκτήματα. Τα μειονεκτήματα αυτά αφορούν τα παραγόμενα φυτά, τα οποία μπορεί να παρουσιάζουν μειωμένη ευρωστία και καθυστέρηση στην παραγωγή (σπόρος - μοσχεύματα), τις δυσκολίες επιτυχίας τους αλλά και την αδυναμία προγραμματισμού της παραγωγής (εμβολιασμός πριν την έναρξη της βλαστικής περιόδου). Έτσι, η άμεση εξάρτηση από την εποχή και ο χαμηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού είναι βασικοί περιοριστικοί παράγοντες για τη χρήση των κλασικών μεθόδων πολλαπλασιασμού (Pati et al., 2006). Επίσης, οι τεχνικές αυτές απαιτούν αρκετό χρόνο, κόστος εργασίας και έχουν υψηλό κόστος γενικά, ενώ αυξάνουν τον κίνδυνο μετάδοσης ασθενειών στα παραγόμενα φυτά (Seema et al., 2012). Τέλος, το γεγονός ότι οι περισσότερες ποικιλίες τριανταφυλλιάς είναι ετερόζυγες σε αρκετά μεγάλο βαθμό δημιουργεί αμφιβολίες ως προς τα επιθυμητά αποτελέσματα στους χαρακτήρες των παραγόμενων φυτών, οι οποίοι μπορεί να εμφανίζονται αλλοιωμένοι.

Η ιστοκαλλιέργεια ξεπερνά όλα αυτά τα προβλήματα που δημιουργούνται με τις συμβατικές μεθόδους πολλαπλασιασμού, που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Με την τεχνική αυτή δίνεται η δυνατότητα να παραχθεί μεγάλος αριθμός φυτών, πανομοιότυπων μεταξύ τους, σε σύντομο χρονικό διάστημα, χωρίς να υπάρχει περιορισμός στην εποχή που θα πραγματοποιηθεί αυτό και απαλλαγμένα από ασθένειες (Brunda et al., 2016; Razavizadeh and Ehsanpour, 2008; Dhawan and Bhojwani, 1986). Ακόμη, τα φυτά που παράγονται έχουν πιο ομοιόμορφο σχήμα, με περισσότερους βλαστούς και άνθη (Maurya et al., 2013). Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, το γεγονός ότι η τριανταφυλλιά παρουσιάζει μεγάλη ετεροζυγωτία και πολυπλοειδία απαιτεί την ανάπτυξη διαφορετικών πρωτοκόλλων ιστοκαλλιέργειας για τον κάθε ένα γενότυπο (Pati et al., 2006; Canli and Kazaz, 2009; Shirdel et al., 2013).

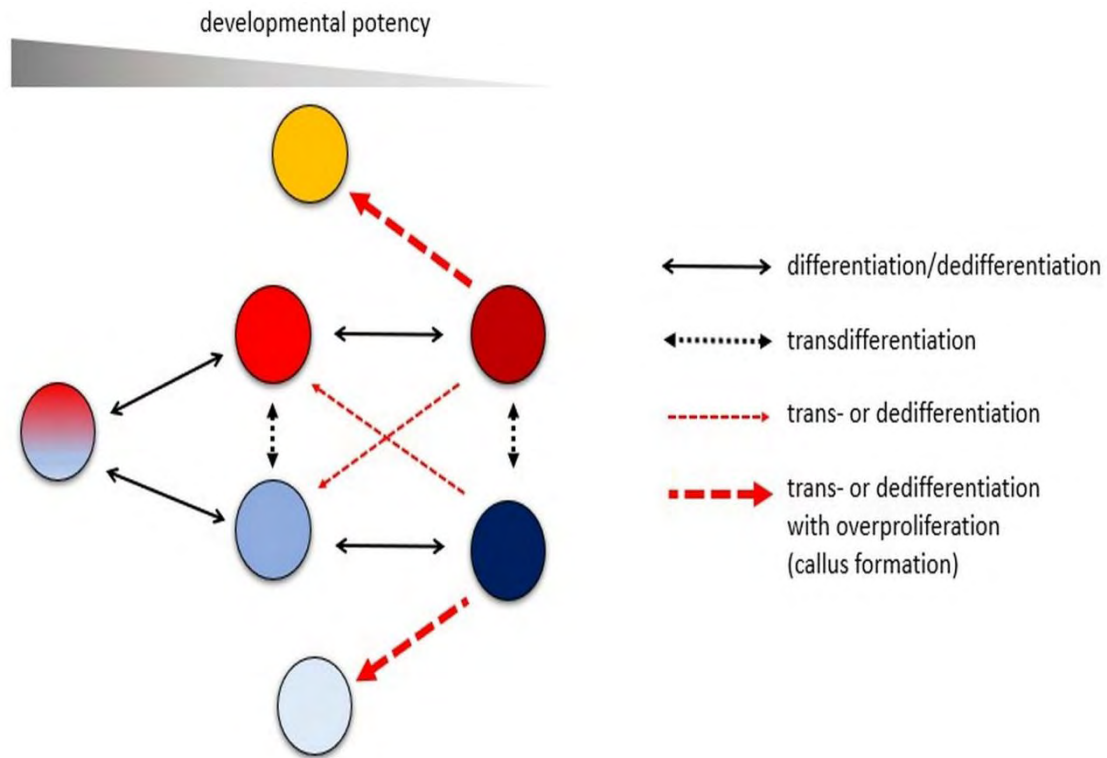
4.Ιστοκαλλιέργεια

4.1.Γενικά στοιχεία

Η Ιστοκαλλιέργεια ή αλλιώς *in vitro* καλλιέργεια είναι μια μέθοδος πολλαπλασιασμού φυτών στην οποία φυτικά τμήματα ή φυτικά κύτταρα μεταφέρονται από το μητρικό φυτό σε ένα τεχνητό υπόστρωμα καλλιέργειας, κάτω από ελεγχόμενες, ασηπτικές συνθήκες. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι περιέχουν το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα όπου οι φυτικοί ιστοί, ή αλλιώς έκφυτα, διατηρούνται και αναπτύσσονται. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται με απώτερο σκοπό τον έλεγχο της λειτουργίας των κυττάρων που καλλιεργούνται μέσω των φυσικών συνθηκών που επιβάλουμε (καθορισμός θερμοκρασίας και φωτισμού) αλλά και των τεχνικών μέσων, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω (θρεπτικά υποστρώματα και εφαρμογή ρυθμιστών ανάπτυξης) (Κίντζιος, 2015). Αξίζει να σημειωθεί πως η Ιστοκαλλιέργεια βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στα ανθοκομικά φυτά, καθώς όπως ήδη αναφέρθηκε τα αναγεννημένα φυτά είναι πιο “compact” και παράγουν περισσότερα άνθη, καθώς επίσης αναπτύσσονται με γρηγορότερο ρυθμό και μπαίνουν πιο σύντομα στην ανθοφορία σε σχέση με αυτά που παράγονται με τις παραδοσιακές τεχνικές (Dubois, 1988).

Η κυριότερη αλλά και εμπορικότερη μορφή ιστοκαλλιέργειας είναι ο μικροπολλαπλασιασμός. Η επίτευξη του μικροπολλαπλασιασμού στηρίζεται στην αρχή της ολοδυναμίας βάση της οποίας έστω κι από ένα μόνο φυτικό κύτταρο, ανεξαρτήτως από ποιο όργανο προέρχεται, μπορεί να αναγεννηθεί ένα ολόκληρο φυτό. Κάθε ζωντανό κύτταρο περιέχει την πληροφορία που χρειάζεται ώστε να αναπτυχθεί σε έναν ολοκληρωμένο οργανισμό (Khan and Shaw, 1988). Η έννοια της ολοδυναμίας (totipotency) εισήχθη το 1838 από τους Schwann και Schleiden και δίνει πλέον τη δυνατότητα για την επίτευξη πολύ μεγάλων αποδόσεων (παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών από έναν μόνο ιστό) έναντι των συμβατικών μεθόδων πολλαπλασιασμού. Το 1985 ο Martin απέδειξε πως από ένα μόνο τριαντάφυλλο μπορούν να παραχθούν ετησίως έως και 400.000 φυτά με αυτή τη μέθοδο, τα οποία θα είναι πανομοιότυπα με το μητρικό φυτό. Ο μικροπολλαπλασιασμός μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία καινούριων φυτών μέσω δύο οδών, της άμεσης οργανογένεσης και της έμμεσης οργανογένεσης.

Μια θεμελιώδης έννοια του μικροπολλαπλασιασμού είναι αυτή της αποδιαφοροποίησης (dedifferentiation). Κατά τη μεταφορά του κυττάρου σε *in vitro* συνθήκες, δηλαδή σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας και σε ασηπτική κατάσταση, αυξάνεται ο αριθμός των γονιδίων που εκφράζονται συγχρόνως και το ωθούν σε συγκεκριμένες λειτουργίες προκαλώντας την “απορρύθμιση” του κυττάρου. Ουσιαστικά το κύτταρο βγαίνει από τη συγκεκριμένη λειτουργία του και περνάει στη φάση της αποδιαφοροποίησης, όπου εισέρχεται ξανά στον κυτταρικό κύκλο και μέσα από μια διαδικασία πολλαπλών κυτταροδιαρρέσεων οδηγείται στη δημιουργία ενός όγκου αδιαφοροποίητων κυττάρων που ονομάζεται κάλος. Έπειτα από αυτή τη διαδικασία τα κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν ξανά, δεδομένης της ευκολίας επαναπρογραμματισμού τους, παράγοντας ένα καινούριο όργανο ανεξαρτήτως του είδους εκφύτου από το οποίο προήλθαν (Gailloch et al., 2015). Η ιδιότητά τους αυτή ονομάζεται αναπτυξιακή ικανότητα ή αναπτυξιακή ισχύς (developmental competence or developmental potency) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Διαδρομές διαφοροποίησης που μπορεί να ακολουθήσει ένα φυτικό κύτταρο. (Πηγή: Feher, 2019)

4.2. Ιστοκαλλιέργεια στην Τριανταφυλλιά

Αρκετά χρόνια πριν την πρώτη καλλιέργεια φυτού σε σωλήνα παρουσιάζεται η πρώτη θεωρητική τοποθέτηση σχετικά με αυτή τη μέθοδο, όταν το 1902 ο Gottlieb Haberlandt υποστήριξε πως μπορεί να υπάρξει αυτόνομη ζωή από μεμονωμένα φυτικά κύτταρα. Η καλλιέργεια *in vitro* σε φυτό τριανταφυλλιάς απαντάται για πρώτη φορά το 1945 όταν έκφυτα μπουμπουκιών έδωσαν κάλο και ρίζα σε πείραμα που πραγματοποίησαν οι Nobecourt και Kofler. Την αμέσως επόμενη χρονιά, το 1946, γίνεται αναφορά από τον Lamments ότι μπορούν να παραχθούν τριαντάφυλλα με τη διαδικασία της εμβρυογένεσης. Ωστόσο, δεν ήταν ξεκάθαρος ο τρόπος με τον οποίο γινόταν αυτό κι έτσι μερικά χρόνια αργότερα ξεκίνησε η διερεύνηση της διαδικασίας της διαφοροποίησης και της αναγέννησης από τους Nickell και Tulecke (1959) και τον Weinstein και τους συνεργάτες του (1962) από κύτταρα, κάλο και κυτταρικό εναιώρημα. Έτσι, ο Hill το 1967 πραγματοποιεί την πρώτη έμμεση οργανογένεση βλαστών στην τριανταφυλλιά “The Doctor”. Έπειτα από αυτό έχουμε τις πρώτες

αναφορές μικροπολλαπλασιασμού των *Rosa hybrida* και *Rosa multiflora* από τους Jacob et al. (1969, 1970a,b) και Elliot (1970).

4.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την αναγέννηση κυττάρων

Όπως αναφέρθηκε, η αποδιαφοροποίηση και η αναγέννηση των φυτικών κυττάρων αποτελούν τη βασική αρχή της *in vitro* καλλιέργειας. Η αποδιαφοροποίηση εξαρτάται από φυσικούς και τεχνητούς παράγοντες, όπως είναι οι συνθήκες του περιβάλλοντος και το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του έκφυτου.

Η ποικιλία του φυτού παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση των κυττάρων (Castillon and Kamo, 2002). Ιδιαίτερα στην περίπτωση του τριαντάφυλλου είναι ίσως καθοριστικός παράγοντας για την επίτευξη της επαναδιαφοροποίησης, δεδομένου ότι είναι ένα φυτό που παρουσιάζει μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα. Το 1992 ο Horn παρατήρησε πως οι ποικιλίες Kardinal και Lilli Marleen πολλαπλασιαζόντουσαν ιδιαίτερα εύκολα σε αντίθεση με τις ποικιλίες Athena, Mercedes, Pasadena και Golden times, οι οποίες παρουσίαζαν μεγάλη δυσκολία στον πολλαπλασιασμό τους. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσίασαν και οι Khosh-Khui και Sink (1982a,b) και ο Bressan με την ερευνητική του ομάδα (1982). Έτσι, η επίτευξη οργανογένεσης χρήζει εκτεταμένης έρευνας και πειραματισμού ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες φυτορρυθμιστικές ουσίες και οι απαραίτητες συνθήκες και μέσα ανάπτυξης και καλλιέργειας που θα οδηγήσουν στο ενδεδειγμένο πρωτόκολλο ιστοκαλλιέργειας. Το πρωτόκολλο αυτό πιθανόν θα είναι διαφορετικό και σε κάποιες περιπτώσεις μοναδικό για την κάθε ποικιλία που καλλιεργείται.

Ένας ακόμη παράγοντας είναι το ίδιο το έκφυτο, και συγκεκριμένα το είδος του εκφύτου που χρησιμοποιείται για την αναγέννηση. Έχει παρατηρηθεί πως αποκρίνονται διαφορετικά μεταξύ τους τα φύλλα, οι μίσχοι και οι βλαστοί. Η αποκλίνουσα απόκριση ίσως οφείλεται στη διαφορετική φυσιολογική κατάσταση του κάθε βλαστικού μέρους αλλά και στο διαφορετικό αριθμό κυττάρων που υφίστανται αποδιαφοροποίηση στο καθένα. Επίσης, το κάθε όργανο περιέχει διαφορετική συγκέντρωση των ορμονών (κυρίως αυξίνες και κυτοκινίνες) που επηρεάζουν την αναγέννηση, ωθώντας τα αδιαφοροποίητα κύτταρα που βρίσκονται σε αδρανή κατάσταση να ξεκινήσουν τη διαφοροποίηση. Τα επίπεδα των ορμονών που

περιέχονται στα διάφορα μέρη του φυτού εξαρτώνται επίσης κι από την ηλικία του οργάνου, καθώς όσο πιο γηρασμένο και κοντά στη ρίζα είναι ένα όργανο τόσο μικρότερες ποσότητες ορμονών περιέχει άρα ανταποκρίνεται λιγότερο στην ιστοκαλλιέργεια (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Απόκριση στην ιστοκαλλιέργεια. (Πηγή: Κίντζιος, 2015)

Επιπλέον, η επιτυχία της καλλιέργειας *in vitro* επηρεάζεται και από το περιβάλλον και της συνθήκες εγκατάστασης και ανάπτυξής της. Πρώτα απ' όλα θα πρέπει καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας να πληρούνται ασηπτικές συνθήκες, οι οποίες επιτυγχάνονται μέσω της επιφανειακής απολύμανσης των εκφύτων, της αποστείρωσης του θρεπτικού υποστρώματος και των εργαλείων και της απολύμανσης των θαλάμων εργασίας. Ακόμη, θα πρέπει η καλλιέργεια να διατηρείται σε ορισμένες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού (Read and Preece, 2003). Συγκεκριμένα, στις περισσότερες περιπτώσεις, η θερμοκρασία θα πρέπει να διατηρείται στους $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ και ο φωτισμός να εφαρμόζεται με φωτοπερίοδο 16 ωρών.

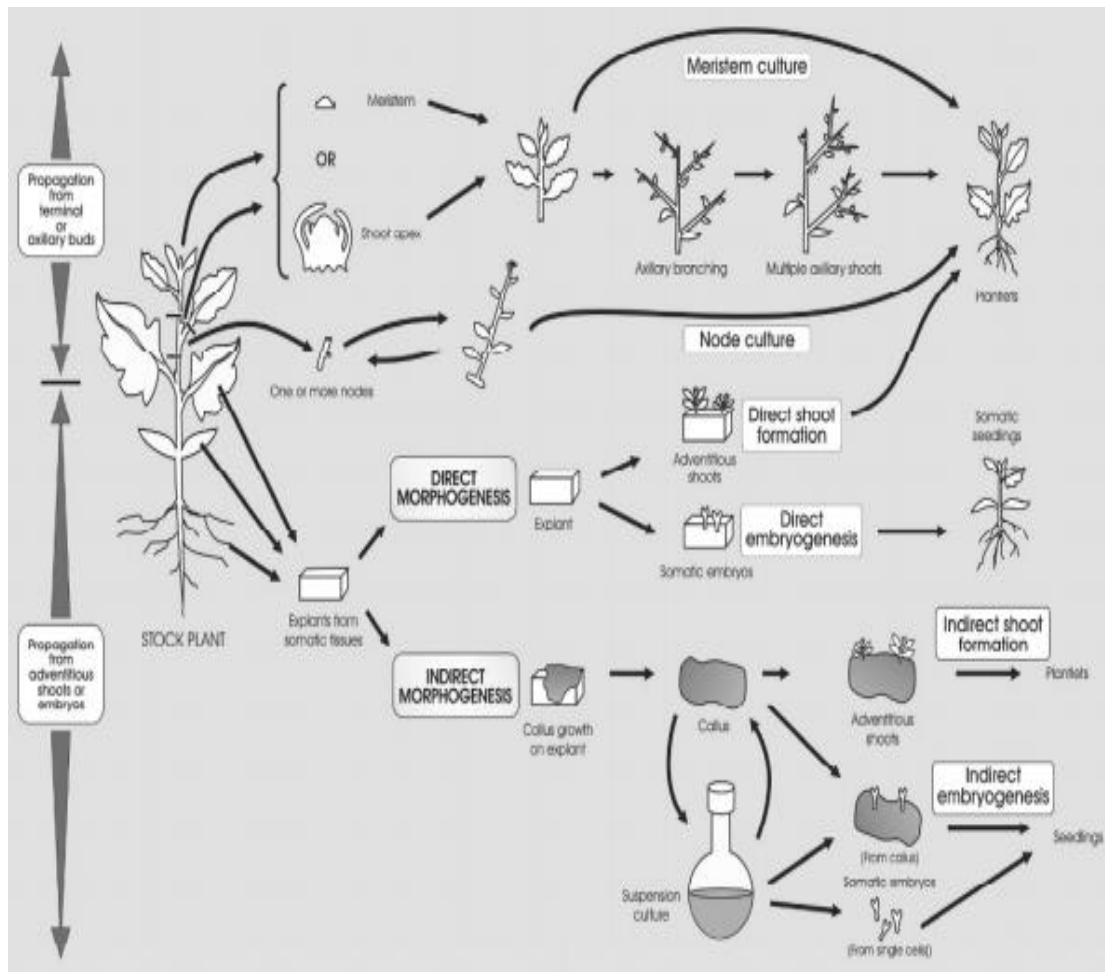
Τέλος, ανάλογα με το φυτικό είδος που θα καλλιεργηθεί θα πρέπει να προετοιμάζεται το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα με την ενδεδειγμένη συνταγή. Έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με τη σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας της τριανταφυλλιάς. Για κάποια από τα συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των ιστών η σχετική έρευνα έδειξε ότι μπορεί να είναι απαραίτητα σε διαφορετικές αναλογίες για διαφορετικές ποικιλίες τριανταφυλλιάς ώστε να

επιτευχθούν τα μέγιστα ποσοστά επιτυχίας. Για παράδειγμα, μια συγκεκριμένη σύνθεση του MS (Murashige and Skoog's medium, 1962) βρέθηκε πως είναι καταλληλότερη για την καλογένεση και οργανογένεση σε πληθώρα ποικιλιών τριανταφυλλιάς (Curir et al., 1986; Salm et al., 1994; Salehi and Khosh-Khui, 1996b; Ibrahim and Debergh, 2001; Kim et al., 2003a). Άλλο ένα παράδειγμα είναι το άγαρ, το οποίο προτιμάται ως επί των πλείστων από πολλούς ερευνητές λόγω της σταθερότητας και της αδράνειας που παρουσιάζει σαν συστατικό μέσο στο μέσο ανάπτυξης (Ibrahim, 1994).

4.4.Στάδια Ιστοκαλλιέργειας

Ένας ευρέως αποδεκτός, τόσο από τους ερευνητές όσο και από τα εμπορικά εργαστήρια ιστοκαλλιέργειας, διαχωρισμός της διαδικασίας του μικροπολλαπλασιασμού σε τρία στάδια είναι αυτός που θεσπίστηκε το 1974 από τον Murashige. Στην πορεία, ωστόσο, η προετοιμασία της καλλιέργειας θεωρήθηκε ξεχωριστό στάδιο και συμπεριλήφθηκε σε αυτά και η σκληραγώγηση των φυτών (Debergh and Maene, 1981). Έτσι, τα στάδια της ιστοκαλλιέργειας διαμορφώθηκαν ως εξής (Εικόνα 5):

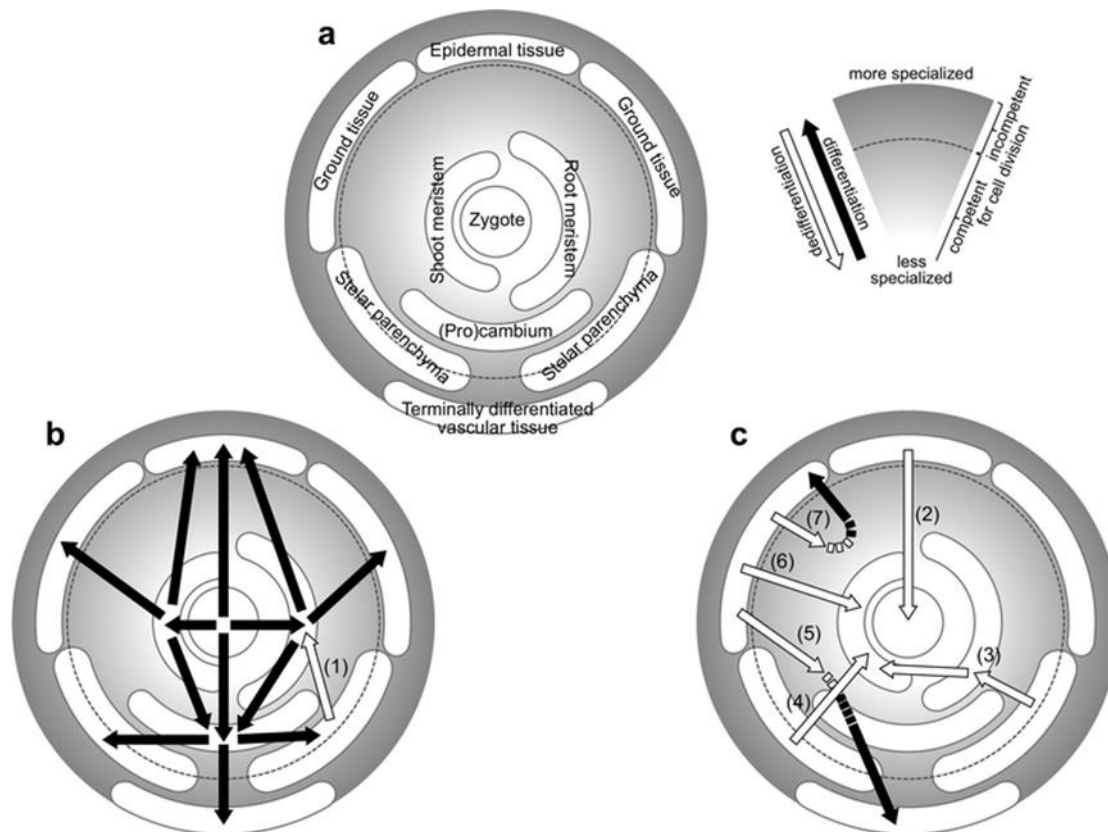
- I. Μητρικό φυτό, επιλογή και προετοιμασία.
- II. Σύσταση και τοποθέτηση της ασηπτικής καλλιέργειας.
- III. Επαγωγή και αύξηση του κάλου.
- IV. Οργανογένεση.
- V. Σκληραγώγηση των νέων φυτών.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση σταδίων ιστοκαλλιέργειας. (Πηγή: George et al., 2008d)

5.Αποδιαφοροποίηση – Διαφοροποίηση – Οργανογένεση (Dedifferentiation-Differentiation - Organogenesis)

Η αποδιαφοροποίηση, όπως και η διαφοροποίηση, είναι μια διαδικασία που οδηγεί τα κύτταρα από μια διαφοροποιημένη κατάσταση σε μία άλλη. Η φάση της διαφοροποίησης περιέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για τη μορφογένεση των κυττάρων. Κατά τη φάση αυτή τα κύτταρα μπορούν να ανταποκριθούν σε ορμονικά σήματα επαγωγής οργάνων (Howell et al., 2003). Κατά τον Bloch (1941) η αποδιαφοροποίηση είναι μια διαδικασία όπου τα κύτταρα χάνουν τα διαφοροποιημένα χαρακτηριστικά τους και ανανεώνονται και αποτελεί σημαντική αντίδραση των φυτικών κυττάρων έναντι των πληγών. Κατά την αποδιαφοροποίηση λαμβάνει χώρα η επέκταση του κυτταρικού τοιχώματος, μιτοχονδριακές αλλαγές, πυρηνική ανάπτυξη και διαίρεση και, όπως είπαμε, κυτταρική διαίρεση (Εικόνα 6).

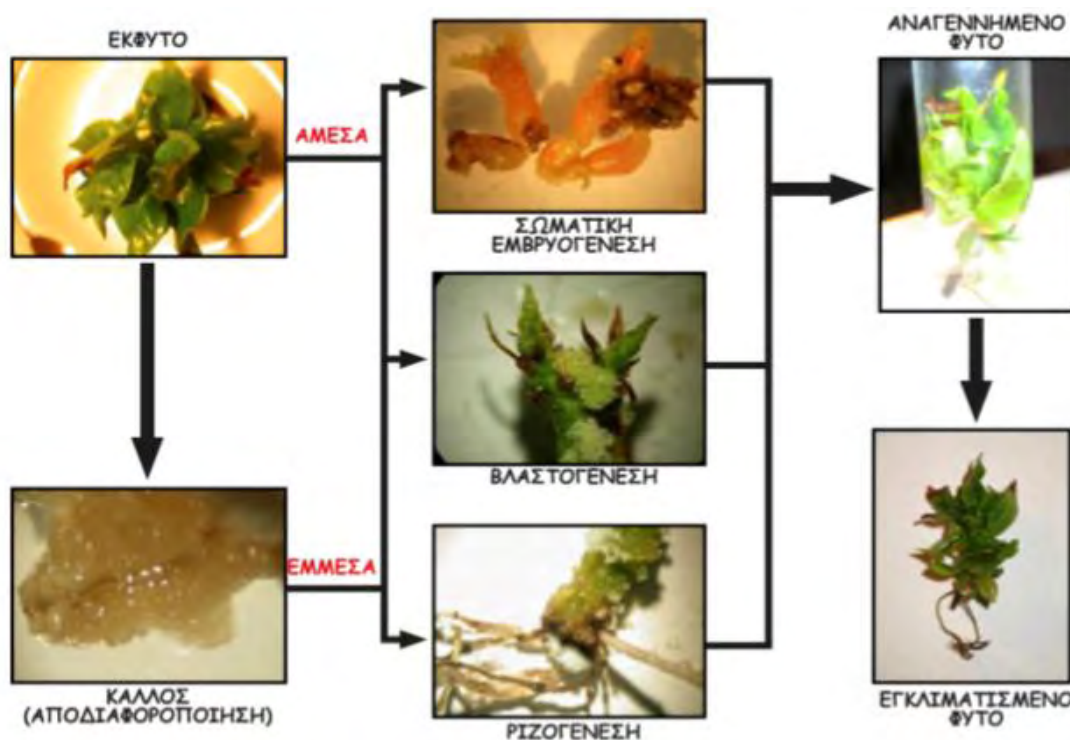


Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση διαφόρων διαδικασιών που περιλαμβάνουν αποδιαφοροποίηση και διαφοροποίηση φυτικών κυττάρων. (a. Απεικόνιση φυτικών κυττάρων και ιστών, b. Διαδικασίες διαφοροποίησης και αποδιαφοροποίησης, c. Διαδικασίες αποδιαφοροποίησης και επαναδιαφοροποίησης προκαλούμενες από εξωτερικά ερεθίσματα. (1) Η αρχική διαδικασία του σχηματισμού πλευρικής ρίζας από το περικύκλιο που παρουσιάζεται ως μορφή αποδιαφοροποίησης. (2) Άμεση εμβρυογένεση που προκαλείται από καταπύηση επιδερμικών κυττάρων. (3) Ορμονική επαγωγή κάλου από το περικύκλιο της ρίζας. (4) Σχηματισμός κάλου λόγω τραυματισμού από το παρέγχυμα. (5) Μετασχηματισμός των μεσοφυλλικών κυττάρων στα τραχειακά στοιχεία. (6) Σχηματισμός κάλου από καλλιέργεια μεσοφυλλικών πρωτοπλαστών. (7) Επανασύνδεση ιστών στο κομμένο στέλεχος. (Πηγή: Sugiyama, 2015)

5.1.Οδοί διαφοροποίησης *in vitro*

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό των φυτών *in vitro* οδηγούν τα κύτταρα στη διαδικασία αποδιαφοροποίησης, επανεισαγωγής στον κυτταρικό κύκλο και διαφοροποίησης ξανά. Τα φυτά διαθέτουν πολλαπλές οδούς διαφοροποίησης των κυττάρων τους, η κάθε μια από τις οποίες ενεργοποιείται από διαφορετικά ερεθίσματα και ρυθμιστές. Ωστόσο, υπάρχουν δύο οδοί που οδηγούν στη διαφοροποίηση των κυττάρων, και αυτές είναι η σωματική εμβρυογένεση (somatic embryogenesis) και η οργανογένεση (organogenesis) (Εικόνα 7). Και οι δύο

διαδικασίες μπορεί να πραγματοποιηθούν άμεσα πάνω στο έκφυτο ή έμμεσα έπειτα από τη δημιουργία κάλου.



Εικόνα 7: Μονοπάτια διαφοροποίησης *in vitro*. (Πηγή: Κίντζιος, 2015)

Κατά τη σωματική εμβρυογένεση έχουμε το σχηματισμό σωματικών εμβρύων χωρίς τη μεσολάβηση γονιμοποίησης. Ουσιαστικά, μέσω των σωματικών οργάνων (βλαστών, φύλλων κ.λπ.) που δεν δύνανται να γονιμοποιηθούν παράγονται εμβρυακές δομές, οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν την αρχή της δημιουργίας ενός ολόκληρου φυτού. Αυτό αποτελεί άλλη μια απόδειξη της ολοδυναμίας των σωματικών φυτικών κυττάρων. Κατά την οργανογένεση έχουμε το σχηματισμό καταβολών οργάνων και διακρίνεται ανάλογα με το είδος των οργάνων αυτών σε βλαστογένεση, οφθαλμογένεση, ριζογένεση κ.λπ.. Κατά τη διαδικασία αυτή οι καταβολές των οργάνων που παράγονται μπορεί να προέρχονται είτε από έκφυτα ίδιου είδους οργάνου είτε διαφορετικού. Σε αντίθεση με τη σωματική εμβρυογένεση, στην οργανογένεση δεν έχουμε άμεση δημιουργία ολόκληρου του φυτού αλλά πρέπει πρώτα να δημιουργηθεί ο βλαστός κι έπειτα να ξεκινήσει η διαδικασία δημιουργίας ρίζας. Συμπερασματικά, καταλαβαίνουμε πως δεν είναι πάντα όλα τα κύτταρα ολοδύναμα αλλά κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες μπορούν να γίνουν.

5.2. Άμεση οργανογένεση

Άμεση οργανογένεση είναι η διαδικασία παραγωγής φυτών *in vitro* χωρίς τη μεσολάβηση δημιουργίας κάλου. Στην τεχνική αυτή τα έκφυτα του προοριζόμενου για πολλαπλασιασμό φυτού τοποθετούνται στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και από αυτά εκπτύσσονται τα νέα φυτά. Σημαντικό ρόλο παίζει η προέλευση του φυτού που χρησιμοποιείται ως μητρικό για τη λήψη των εκφύτων, καθώς είναι άμεσα εξαρτώμενη από το γενότυπο. Ως έκφυτα μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα όργανα, όπως φύλλα, μίσχοι, βλαστοί, ρίζες, κ.λπ.. Για την επίτευξη της οργανογένεσης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο το είδος και οι αναλογίες των φυτορρυθμιστικών ουσιών που θα προστεθούν στο θρεπτικό διάλυμα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για πολλαπλασιασμό με αυξημένο ρυθμό, παραγωγή διαγονιδιακών φυτών και κυρίως για κλωνική αναπαραγωγή.

5.3. Έμμεση οργανογένεση

Έμμεση οργανογένεση είναι η διαδικασία παραγωγής φυτών *in vitro* με ενδιάμεσο στάδιο την επαγωγή και ανάπτυξη κάλου. Η επαγωγή κάλου συνεπάγεται ένα αρχικό στάδιο διαφοροποίησης από τον γονικό ιστό. Ο φυτικός ιστός καλλιεργείται σε μέσο το οποίο περιέχει λίγο πιο υψηλή συγκέντρωση αυξίνης ή σχετική ισορροπία αυξίνης : κυτοκινίνης για να ενεργοποιήσει την κυτταρική διαίρεση και να διεγείρει την παραγωγή καλικών κυττάρων και στη συνέχεια η προκύπτουσα κυτταρική μάζα μεταφέρεται σε μέσο χωρίς ή με μειωμένο επίπεδο αυξίνης (Skoog and Miller, 1957; Thorpe and Stasolla, 2001). Και σε αυτή την περίπτωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα όργανα του φυτού. Η παραγωγή αναγεννημένου φυτού μέσω της έμμεσης οργανογένεσης είναι μια μέθοδος που μπορεί να συμβάλει στη γενετική βελτίωση, και προτιμάται έναντι της άμεσης οργανογένεσης βλαστών (Avilés et al., 2009). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται με στόχο τη δημιουργία μεταβλητότητας για την εισαγωγή νέων επιθυμητών χαρακτηριστικών και τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών (Fereol et al., 2005). Ακόμη, είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη δημιουργία αποθεμάτων γενετικού υλικού και τη διατήρηση σπάνιων ειδών, καθώς ο κάλος μπορεί να διατηρείται, με τις σωστές τεχνικές, επ' αόριστων. Τέλος, η καλογένεση θεωρείται ως ένα σημαντικό

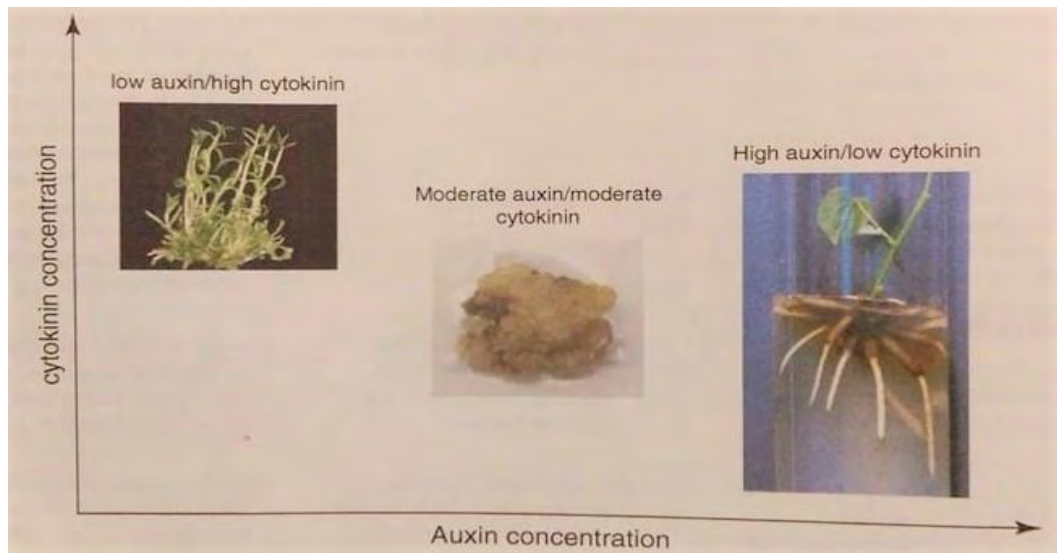
χαρακτηριστικό της έμμεσης οργανογένεσης για την έρευνα σε βιολογικά ενεργά μόρια σε διακοσμητικά και φαρμακευτικά είδη (Abbasi et al., 2010).

5.4.Μορφογενετική έκφραση

Η εξέλιξη που θα έχουν τα αποδιαφοροποιημένα κύτταρα ονομάζεται μορφογενετική έκφραση και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις φυτορρυθμιστικές ουσίες που θα εφαρμοστούν. Ωστόσο, επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, όπως το είδος του ίδιου του εκφύτου και το θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας του, αλλά τον πιο καθοριστικό ρόλο παίζει το είδος και οι συγκεντρώσεις των αυξητικών ορμονών. Όπως έχει επισημανθεί παραπάνω, το κάθε φυτικό είδος, ακόμα και οι διαφορετικές ποικιλίες, χρειάζονται διαφορετικές συγκεντρώσεις ώστε να επιτευχθεί η οργανογένεση. Παρ' όλα αυτά κυριαρχεί ένα γενικό μοτίβο ως προς τη συνεργιστική δράση των ουσιών αυτών, ανάλογα με το ποια κατέχει κυρίαρχο ρόλο. Έτσι, η ίση αναλογία αυξινών : κυτοκινινών προκαλεί την επαγωγή κάλου, η παρουσία αυξίνης σε μεγαλύτερο ποσοστό επάγει την ριζογένεση και η παρουσία κυτοκινίνης σε μεγαλύτερο ποσοστό επάγει τη βλαστογένεση (Πίνακας 1, Εικόνα 8).

*Πίνακας 1: Επίδραση αυξητικών ρυθμιστικών ουσιών στη μορφογένεση των φυτών.
(Πηγή: Γαλάτης κ.α., 2003)*

Αυξητική ρυθμιστική ουσία	Μορφογενετική έκφραση
Αυξίνη ~ Κυτοκινίνη	Καλογένεση
Αυξίνη > Κυτοκινίνη	Ριζογένεση
Αυξίνη < Κυτοκινίνη	Βλαστογένεση



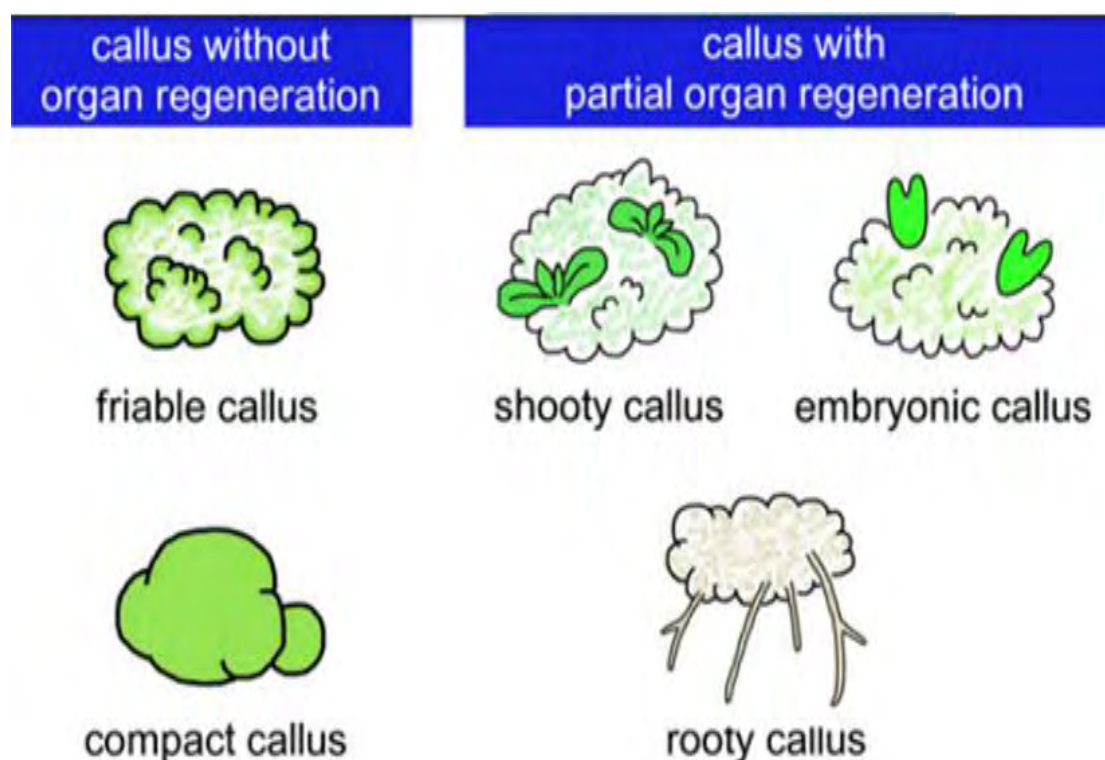
Εικόνα 8: Σχέση μεταξύ του λόγου αυξίνης : κυτοκινίνης ως προς την μορφογένεση των φυτών.
(Πηγή: Hartmann et al., 2014)

6.Κάλος - Γενικά στοιχεία

Το αποτέλεσμα της κυτταρικής διαίρεσης, και επαναπρογραμματισμού, σε μη διαφοροποιημένα παρεγχυματικά κύτταρα είναι ο κάλος. Ο κάλος είναι μια άμορφη μάζα ανοργάνωτων παρεγχυματικών κυττάρων, η οποία προκαλείται ως φυσική αντίδραση του φυτού έπειτα από οποιονδήποτε τραυματισμό του. Στην ιστοκαλλιέργεια η έκπτυξη του κάλου γίνεται έπειτα από την τοποθέτηση των εκφύτων στο θρεπτικό υπόστρωμα κάτω από ασηπτικές συνθήκες και επάγεται από τα κομμένα τμήμα του μικρομοσχεύματος. Η επαγωγή από αυτό το σημείο ίσως συνδέεται με το γεγονός ότι εκεί υπάρχει μεγαλύτερη ευκολία στη διέλευση των θρεπτικών και αυξητικών ουσιών από το μέσο καλλιέργειας. Τα καλικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από το μεγάλο μέγεθος των χυμοτοπίων τους, τα οποία μάλιστα διαιρούνται με πολύ γρήγορο ρυθμό, με αποτέλεσμα την ταχύτερη αύξηση του κάλου. Το χαρακτηριστικό του αυτό είναι πολύ χρήσιμο στον πολλαπλασιασμό των φυτών γιατί μας δίνει τη δυνατότητα από ένα πολύ μικρό φυτικό ιστό να παραλάβουμε σημαντική ποσότητα κάλου από τον οποίο θα δημιουργήσουμε εκατοντάδες καινούρια φυτά.

Ο κάλος διακρίνεται από γονίδια ποικίλης προελεύσεως τα οποία μπορούν να εκφραστούν οποιαδήποτε στιγμή κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες. Μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος του και τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά του και διακρίνεται σε κάποιες κατηγορίες. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στο

είδος του εκφύτου από το οποίο προήλθε, στην ηλικία του και στις συνθήκες ανάπτυξης (Evans et al., 2003). Έτσι, μπορεί να είναι λευκός, πράσινος ή ακόμα και διαφόρων άλλων χρωμάτων, ανάλογα με την ποικίλα παρουσία χρωμάτων των ανθοκυανινών. Επίσης, μπορεί να είναι μαλακός και εύθρυπτος, πιο συμπαγής και σκληρός και να είναι σε διάφορους βαθμούς οργανογενής (Zimmerman, 1993; Frank et al., 2000) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση διάφορων ειδών κάλου. (Πηγή: Sugiyama, 2015)

7. Φυτορρυθμιστικές ουσίες (Ορμόνες)

7.1. Γενικά στοιχεία

Ως ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών (PGRs) ή φυτορρυθμιστικές ουσίες ή ορμόνες μπορούν να θεωρηθούν φυσικές ή χημικές ενώσεις οι οποίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις επηρεάζουν αναπτυξιακές ή μεταβολικές διεργασίες των φυτών. Οι ορμόνες επηρεάζουν την κυτταρική διαίρεση (κυτταρικός αριθμός), την κυτταρική επιμήκυνση (μέγεθος κυττάρου) και τη δομή και λειτουργία των κυττάρων

(κυτταρική διαφοροποίηση). Κάποια παραδείγματα της δράσης τους είναι η βλάστηση των σπόρων, η άνθηση, η ανάπτυξη της ρίζας, η ανάπτυξη των καρπών, ο λήθαργος κ.α.. Δεν είναι φυτοτοξικές, καθώς χρησιμοποιούνται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, αλλά ούτε επηρεάζουν τη θρέψη των φυτών. Οι φυτοορμόνες αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες πρωτεΐνες-υποδοχείς ρυθμίζοντας τις κυτταρικές διεργασίες. Η εξωγενής εφαρμογή τους αναστέλλει τη βιοσύνθεση των ενδογενών ορμονών ή τη μετατόπιση τους από τη θέση παραγωγής στο σημείο δράσης, παρεμποδίζοντας έτσι τους ορμονικούς υποδοχείς. Διακρίνονται στις φυσικές ορμόνες, που παράγονται από τα ίδια τα φυτά, και στις συνθετικές ορμόνες, που παράγονται εργαστηριακά. Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τον χαρακτηρισμό που έδωσε ο Davies το 2013, «ένας ρυθμιστής αύξησης είναι: «Μια οργανική ουσία η οποία δεν είναι θρεπτική (δηλαδή δεν περιέχει άνθρακα, ενέργεια ή απαραίτητα ανόργανα στοιχεία), είναι ενεργή σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (π.χ. <math><1\mu\text{M}</math>), η οποία συντίθεται σε κάποιο μέρος του φυτού και συνήθως μεταφέρεται σε άλλο σημείο όπου διεγείρει κάποια ειδική βιοχημική, φυσιολογική και/ή μορφολογική αντίδραση»».

Οι φυτορρυθμιστικές ουσίες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με τη δράση τους στην ανάπτυξη των φυτών. Στη μια κατηγορία εντάσσονται οι ομάδες που προωθούν την κυτταρική διαίρεση, τη τάνυση των κυττάρων, την ανθοφορία και το σχηματισμό καρπών, και ονομάζονται προωθητές ανάπτυξης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αυξίνες, οι γιββερελλίνες και οι κυτοκινίνες. Στη δεύτερη κατηγορία κατατάσσονται οι ουσίες αυτές που αναστέλλουν την ανάπτυξη και προωθούν την επαγωγή ληθάργου και αποκοπής, και ονομάζονται αναστολείς ανάπτυξης. Σε αυτή τη ταξινομική ομάδα ανήκει το αμπισισικικό οξύ (ABA) ή αλλιώς αποκοπτικό οξύ.

Έχουν θεσπιστεί πέντε βασικές ομάδες ρυθμιστών ανάπτυξης:

1. Αυξίνες (auxins)
2. Κυτοκινίνες (cytokinins)
3. Γιββερελλίνες (gibberellins)
4. Αμπισισικικό οξύ (abscisic acid)
5. Αιθυλένιο (ethylene)

Οι ορμόνες αποτελούν από τα σημαντικότερα και καθοριστικότερα συστατικά του θρεπτικού διαλύματος που χρησιμοποιούμε στην ιστοκαλλιέργεια. Ωστόσο, από τις ομάδες αυτές τον πιο μεγάλο ρόλο παίζουν οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες, με διαφορά υπεροχής έναντι των υπολοίπων ομάδων, καθώς προωθούν την ανάπτυξη του κάλου, των καλικών εναιωρημάτων και οργάνων και ρυθμίζουν τη μορφογένεση (George et al., 2008b,c). Από την άλλη το αιθυλένιο είναι ένας παράγοντας που όχι μόνο δεν προτιμάται για χρήση στην ιστοκαλλιέργεια αλλά γίνονται και προσπάθειες απομάκρυνσής του όταν αυτό βρεθεί στην καλλιέργεια των βιτρόφυτων (Konstas and Kintzios, 2003).

7.2.Αυξίνες (Auxins)

Οι αυξίνες είναι οργανικές φυτοορμόνες μικρού μοριακού βάρους που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην ιστοκαλλιέργεια, καθώς επάγουν την επιμήκυνση των κυττάρων και την κυτταρική διαίρεση (George et al., 2008b). Οι φυσικές αυξίνες εξάγονται από ένα φυτό ή παράγονται από βακτήρια αλλά τα φυσικά προϊόντα θεωρείται ότι υποβαθμίζονται γρήγορα, περιορίζοντας έτσι την εφαρμογή του σκευάσματος (Reich, 2013). Οι συγκεντρώσεις τους είναι μεγαλύτερες στα υψηλότερα τμήματα του φυτού (φύλλα, μπουμπούκια) και μικρότερες στα κατώτερα (ρίζες). Οι συνθετικές αυξίνες θεωρούνται πιο αποτελεσματικές από τις φυσικές, καθώς δεν οξειδώνονται μέσα στον φυτικό ιστό (George et al., 2008b).

Οι αυξίνες συμμετέχουν σε φωτοτροπικές και γεωτροπικές αντιδράσεις, είναι υπεύθυνες για το φαινόμενο της κυριαρχίας της κορυφής, ενισχύουν και επιταχύνουν τη ριζοβολία, επάγουν την άνθηση και την καρπόδεση αλλά και την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών και δημιουργούν και διατηρούν πολική αύξηση. Η δράση τους εκκινείται μέσω της σύνδεσης τους με κάποιες ειδικές πρωτεΐνες, τις ABP (auxin binding proteins). Συντίθενται στα μεριστώματα του βλαστού, των φύλλων και της ρίζας και μεταφέρονται στα παρεγχυματικά κύτταρα του αγωγού ιστού από πάνω προς τα κάτω, δηλαδή βασιπεταλικά. Η μεταφορά τους γίνεται πολικά ανεξάρτητα από τη βαρύτητα και δαπανάται ενέργεια για να επιτευχθεί.

Το ινδολ-3-οξικό οξύ (Indole-3-acetic acid, IAA) ήταν η πρώτη ουσία που αναγνωρίστηκε ως αυξίνη και καθορίστηκε από τους Kogl και Kostermans (1934) και Thomann (1935). Έκτοτε αποκαλύφθηκαν και άλλες αυξίνες στα φυτά. Οι

σημαντικότερες, πέρα από το IAA, είναι το ινδολυλ-3-βουτυρικό οξύ (IBA), το α-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA), το 2,4-διχλωροφαινοξικό οξύ (2,4-D) και το 4-χλωροφαινοξικό οξύ (4-cpa) (Εικόνα 9).



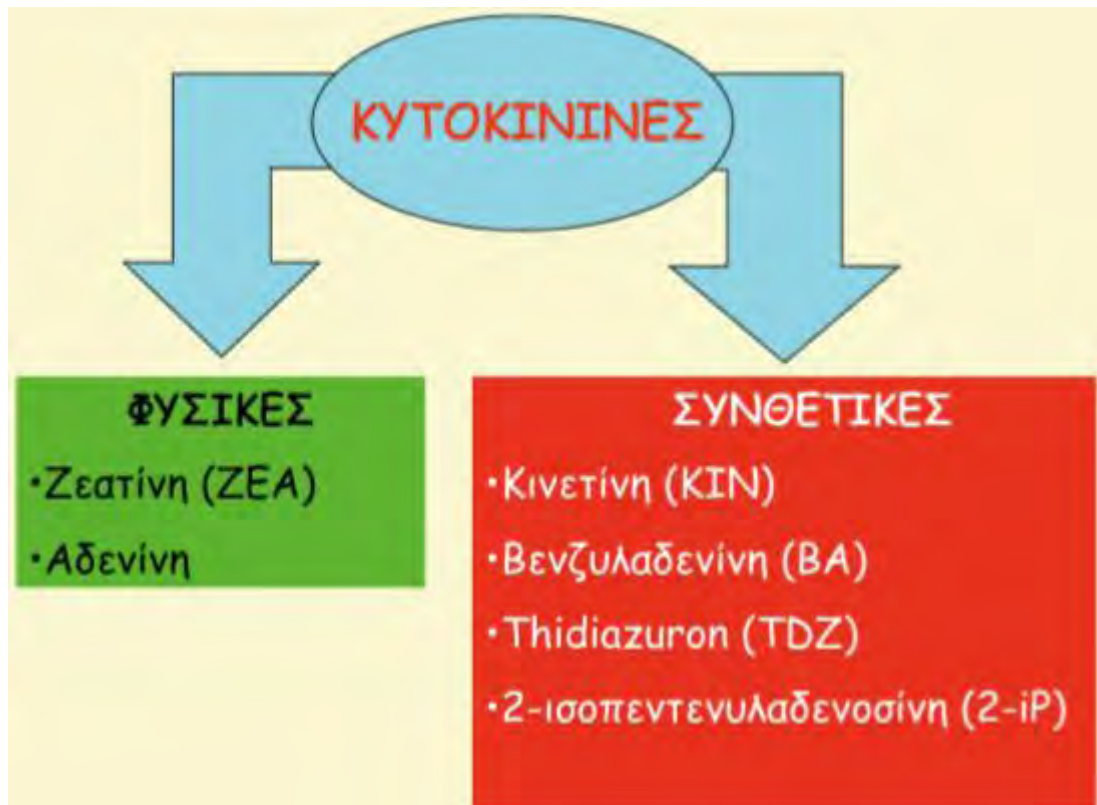
Εικόνα 10: Σημαντικότερες αυξίνες. (Πηγή: Κίντζιος, 2015)

Οι αυξίνες είναι απαραίτητο συστατικό του θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας για την επαγωγή κάλου από τα μικρομοσχεύματα. Ο LO Schiavo και οι συνεργάτες του (1989) πρότειναν πως οι αυξίνες ωθούν στη μεθυλίωση του DNA, περισσότερο από το σύννηθες, και αυτό μπορεί να είναι το έναυσμα για τον επαναπρογραμματισμό των αποδιαφοροποιημένων κυττάρων. Παρόλο που το IAA μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ιστοκαλλιέργεια παρουσιάζει έντονη οξειδωση μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα και μεταβολίζεται ταχύτατα. Βέβαια, το IAA συνεχίζει να χρησιμοποιείται στις φυτικές ιστοκαλλιέργειες (Dai et al., 1987; Grout and Read, 1986), παρά την απόδειξη ότι είναι ασταθής. Απ' την άλλη, η χρήση άλλων αυξινών, όπως το IBA, το NAA και το 2,4-D, έχει αυξηθεί επειδή συχνά φαίνονται πιο αποτελεσματικές από το IAA για την επαγωγή μορφογενετικών αποκρίσεων, ίσως λόγω της αυξημένης σταθερότητάς τους. Η αυξίνη που προστίθεται ως επί των πλείστων στα υποστρώματα καλογένεσης είναι το 2,4-D, ενώ για την οργανογένεση αντικαθίσταται από τα IBA και NAA (George et al., 2008b).

7.3.Κυτοκινίνες (Cytokinins)

Οι κυτοκινίνες είναι φυτοορμόνες που φυσιολογικά παράγονται σε αναπτυσσόμενους ή μεριστοματικούς ιστούς και όργανα, όπως οι κορυφές βλαστών, ανώριμα όργανα, κορυφές ρίζας κ.α., και υπάρχουν περίπου 20 φυσικές φυτικές κυτοκινίνες (Osugi και Sakakibara, 2015; Rademacher, 2015). Παίζουν πολύ κρίσιμο ρόλο στην διαίρεση των φυτικών κυττάρων, καθώς ρυθμίζουν άμεσα τη σύνθεση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μίτωση. Απουσία των κυτοκινινών, ο κυτταρικός κύκλος έχει παρατηρηθεί να σταματάει (George et al., 2008c). Μέσω της διέγερσης της κυτταρικής διαίρεσης, της πρωτεϊνικής σύνθεσης, της μεγέθυνσης των κυττάρων και της μεταφοράς αμινοξέων στα φυτά, προωθούν τη δημιουργία βλαστών από τα εσωτερικά κύτταρα, την ωρίμανση των χλωροπλαστών και το σχηματισμό κάλου (George et al., 2008c; Harms and Oplinger, 1988). Σε αντίθεση με τις αυξίνες, οι κυτοκινίνες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις διαδικασίες διαφοροποίησης και μορφογένεσης των κυττάρων και των ιστών. Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες πριν και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αναγέννησης είναι ο τύπος και η συγκέντρωση της κυτοκινίνης που εφαρμόζεται. Η θειδιαζουρόνη (TDZ) και η βενζυλαδενίνη (BA) είναι οι κυτοκινίνες που χρησιμοποιούνται συχνότερα στα συστήματα αναγέννησης, αλλά η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από τον γονότυπο και άλλους παράγοντες.

Η πρώτη κυτοκινίνη που αναγνωρίστηκε ήταν η κινετίνη (kinetin) όταν στη δεκαετία του 1950, οι Skoog και Miller καθόρισαν τον δομικό τύπο μιας κυτοκινίνης της 6-φουρφυουραμινοπουρίνης, μιας ουσίας που απομονώθηκε από ένα παρασκεύασμα DNA σπέρματος ρέγγας που προάγει τη διαίρεση των φυτικών κυττάρων *in vitro*. Στην πορεία ανακαλύφθηκαν κι άλλες κυτοκινίνες. Οι σημαντικότερες είναι η ζεατίνη (ZEA), η αδενίνη, που είναι δύο φυσικές κυτοκινίνες, η κινετίνη (KIN), η βενζυλαδενίνη (BA), το thidiazuron (TDZ) και η 2-ισοπεντενυλαδενοσίνη (2-iP), που είναι συνθετικές κυτοκινίνες (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Σημαντικότερες κυτοκινίνες. (Πηγή: Κίντζιος, 2015)

Οι φυσικές και τεχνητές κυτοκινίνες αναγνωρίζονται από κοινούς υποδοχείς κυτοκινίνης. Οι κυτοκινίνες περιλαμβάνουν μια οικογένεια σηματοδοτικών μορίων που είναι απαραίτητα για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της αύξησης των φυτών, ενεργώντας τόσο τοπικά όσο και σε αποστάσεις. Η σύνθεσή τους γίνεται στο κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα, στους αναπτυσσόμενους σπόρους και στη ρίζα και η μεταφορά τους πραγματοποιείται παθητικά μέσω του ξυλώματος και του φλοιώματος.

Οι κυτοκινίνες είναι πολύ αποτελεσματικές τόσο στην άμεση όσο και στην έμμεση οργανογένεση. Για να επιτευχθεί όμως το επιθυμητό αποτέλεσμα θα πρέπει να υπάρχει η σωστή αναλογία ανάμεσα στις κυτοκινίνες και τις αυξίνες. Έχει βρεθεί πως οι κυτοκινίνες, όπως η κινετίνη, η 6-βενζυλαδερίνη και η θειδιαζουρόνη, προάγουν την κυτταρική διαίρεση, τον πολλαπλασιασμό και την μορφογένεση των βλαστών (Smith, 2013).

7.4.Γιββερελλίνες (Gibberellins)

Οι γιββερελλίνες είναι ενδογενείς ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών, των οποίων η βιοσύνθεση επηρεάζεται τόσο από ερεθίσματα αναπτυξιακά όσο και

περιβαλλοντικά (Iqbal and Ashraf, 2013). Έχουν αναγνωριστεί πάνω από 136 φυσικές γιββερελλίνες, πολλές από τις οποίες δεν έχουν ενδογενή βιολογική δράση και είναι πρόδρομα μόρια των βιοδραστικών GA ή μόρια απενεργοποίησής τους. Η πρώτη γιββερελλίνη ανακαλύφθηκε σε έναν παθογόνο μύκητα του ρυζιού, τον *Gibberella fujikuroi*. Στη δεκαετία του 1950 απομονώθηκε μια χημική ουσία από την καλλιέργεια της *Gibberella*, η οποία ονομάστηκε γιββερελλικό οξύ. Έχει επικρατήσει ο όρος γιββερελλικό οξύ να χρησιμοποιείται μόνο για το GA₃, ενώ ο όρος γιββερελλίνες για όλη την ομάδα των GA. Οι φυσικές γιββερελλίνες συντίθενται κυρίως στις άκρες των ριζών και στα νεαρά φύλλα.

Οι γιββερελλίνες μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά μια σειρά αναπτυξιακών διεργασιών (Taiz και Zeiger, 2012):

- Έχουν τη δυνατότητα να προωθήσουν την φύτευση των σπερμάτων,
- Μπορούν να προκαλέσουν την επιμήκυνση του βλαστού και της ρίζας,
- Ανάλογα το είδος του φυτού, επιβραδύνουν ή επιταχύνουν τη μετάβαση από τη νεανική στην ενήλικη φάση,
- Επηρεάζουν την επαγωγή της άνθισης και τον καθορισμό του φύλλου,
- Προωθούν την ανάπτυξη των γυρεόκοκκων και την αύξηση του γυρεοσωλήνα,
- Προωθούν την καρπόδεση και την παρθενοκαρπία,
- Προωθούν την πρόωμη ανάπτυξη των σπερμάτων.

Στην ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται κυρίως το γιββερελλικό οξύ (GA₃). Η δράση του είναι παρόμοια με αυτή της αυξίνης. Σε υψηλές συγκεντρώσεις επάγει την ανάπτυξη μη διαφοροποιημένων κυττάρων κάλου (Murashige, 1964; Altman and Goren, 1974) και μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη του κάλου σε συνδυασμό με την αυξίνη και χαμηλές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης (Engelke et al., 1973). Επίσης, έχει βρεθεί πως σε κάποια φυτικά είδη, ανάμεσα στα οποία βρίσκεται και η τριανταφυλλιά, μπορεί να ενισχύσει την δημιουργία βλαστών, όταν εφαρμοστεί σε συνδυασμό με άλλες ορμόνες (Valles and Boxus, 1987 a,b).

Β.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.Φυτικό Υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος προερχόταν από υδροπονική καλλιέργεια τριανταφυλλιάς ποικιλίας Miss Piggy. Η καλλιέργεια ήταν ηλικίας δύο ετών και αναπτυσσόταν σε υδροπονικό σύστημα με υπόστρωμα περλίτη σε θερμοκήπιο του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο. Η συγκομιδή του φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή κάλου γινόταν πρωινές ώρες και προτιμούνταν φυτικό τμήμα πάνω από το τέταρτο φύλλο του βλαστού. Η συλλογή γινόταν από φυτά που βρίσκονταν σε διαφορετικά σημεία μέσα στην καλλιέργεια.

Για τη δημιουργία μικρομοσχευμάτων χρησιμοποιήθηκαν: α) μεσογονάτια τμήματα βλαστών ανάμεσα από το 1^ο και 4^ο φύλλο, β) τμήματα μίσχων και γ) νεαρά φύλλα, τα οποία λαμβάνονταν από σημεία όσο το δυνατόν πιο κοντά στην κορυφή. Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε στις 21/2/2019 με τη λήψη φυτικού υλικού για την τοποθέτησή του σε θρεπτικό υπόστρωμα για επαγωγή κάλου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν άλλες τέσσερις επαναλήψεις της διαδικασίας επαγωγής κάλου στις εξής ημερομηνίες: 22/3/2019, 23/4/2019, 26/5/2019 και 10/10/2019.

1.2.Κριτήρια επιλογής φυτικού υλικού

Το φυτικό υλικό από το οποίο λαμβάνονται τα μικρομοσχεύματα πληρούσε συγκεκριμένα κριτήρια για την ομαλή έκβαση του πειράματος (Κίντζιος, 2015; George et al., 2008a) (Μέρος Α, Ενότητα 4.3, Εικόνα 4). Τα κριτήρια ήταν τα εξής:

- Κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης μητρικών φυτών
- Μητρική φυτεία απαλλαγμένη από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς
- Επιλογή νεαρών βλαστών
- Απόρριψη ξυλοποιημένων τμημάτων

2.Απολύμανση

2.1.Απολύμανση μικρομοσχευμάτων

Για την απολύμανση του φυτικού υλικού ακολουθήθηκαν δυο διαφορετικές μεθοδολογίες ώστε να διαπιστωθεί ποια είναι πιο αποτελεσματική στη μείωση του μικροβιακού φορτίου για το κάθε είδος έκφυτου που χρησιμοποιήθηκαν ως μικρομοσχεύματα (Κίντζιος, 2015). Κατά τις τρεις πρώτες μεταχειρίσεις τα φυτικά τμήματα εμβαπτίστηκαν για δύο λεπτά στο απολυμαντικό Dentalrapid, έπειτα για άλλα οκτώ λεπτά σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (10%) και Tween 20 (0,1%) και τέλος ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό κάτω από ασηπτικές συνθήκες (Khosh-khui and Sink, 1982). Κατά τις επόμενες δύο μεταχειρίσεις τα τμήματα των φυτών εμβαπτίστηκαν στο απολυμαντικό Dentalrapid για 5 λεπτά, έπειτα για 10 λεπτά σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (15%) και Tween 20 (0,1%) και ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό κάτω από ασηπτικές συνθήκες (Ishioka and Tanimoto, 1990; Pati et al., 2006; Κίντζιος, 2015).

2.2.Απολύμανση θαλάμου

Για την απολύμανση του κλειστού θαλάμου εργασίας χρησιμοποιήθηκε υποχλωριώδες νάτριο, ενεργοποίηση της λάμπας UV, που βρίσκονταν μέσα στο θάλαμο, για τουλάχιστον 2 ώρες πριν τη χρήση του και ψεκασμός με αλκοόλη 70% (v/v) κατά την έναρξη της διαδικασίας. Καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μέσα στο θάλαμο άναβε λύχνος αλκοόλης και οι τοποθετήσεις, είτε των μικρομοσχευμάτων είτε του κάλου, γινόταν δίπλα στη φλόγα ώστε να μειωθούν περαιτέρω οι πιθανότητες μόλυνσεων.

3.Έμμεση οργανογένεση

3.1.Θρεπτικό Υπόστρωμα (Θ.Υ.)

Η επαγωγή του κάλου από τα φυτικά μικρομοσχεύματα τριανταφυλλιάς έγινε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (1) με τη σύνθεση που φαίνεται στον πίνακα 2. Η επιλογή του συγκεκριμένου υποστρώματος έγινε με βάση προηγούμενη έρευνα που πραγματοποιήθηκε όσον αφορά την αποτελεσματικότητά του στην καλογένεση

(Καρατοσίδου, 2017). Επίσης, παρασκευάστηκαν ακόμα 19 στερεά θρεπτικά υποστρώματα στα οποία προστέθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί ορμονών για τη τοποθέτηση του παραγόμενου κάλου και τη διερεύνηση πιθανής οργανογένεσης (Πίνακας 2). Ο αριθμός των μικρομοσχευμάτων που τοποθετήθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα (1) για επαγωγή κάλου και των τμημάτων του κάλου που τοποθετήθηκαν στα υπόλοιπα θρεπτικά υποστρώματα (2-20) για έμμεση οργανογένεση φαίνεται στους πίνακες 3 και 4, αντίστοιχα.

Πίνακας 2: Σύσταση στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για επαγωγή κάλου και οργανογένεση.

Θρεπτικό Υπόστρωμα / Συστατικά	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
H ₂ O(L)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MS(g)	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33	4,33
2,4-D (mg/L)	2																			
K (mg/L)	0,25			0,002																
CH(g)	2																			
Άγαρ (g)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Ζάχαρη(g)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
BA (mg/L)		4	0,5	0,003		2	6	30	0,5								2	1		
IBA (mg/L)			0,05						0,01											
GA ₃ (mg/L)			0,1		1	0,5			0,35		1					2				
NAA (mg/L)		0,5					0,5	0,5									0,1	0,3		0,005
TDZ (mg/L)										20	1,5	0,5	30	50	60	10		0,1	2	15
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

Πίνακας 3: Αριθμός επαναλήψεων ανά έκφυτο και ανά περίοδο για τη διαδικασία της καλογένεσης στο Θρεπτικό Υπόστρωμα 1 (ΘΥ1).

Περίοδος λήψης βλαστικού υλικού	Επαναλήψεις ανά είδος εκφύτου			
	Βλαστός	Φύλλο	Μίσχος	Σύνολο
1η (Φεβρουάριος)	25	25	30	80
2η (Μάρτιος)	40	20	40	100
3η (Απρίλιος)	45	45	45	135
4η (Μάιος)	20	20	20	60
5η (Οκτώβριος)	40	39	40	119

Πίνακας 4: Αριθμός επαναλήψεων ανά είδος κάλου και ανά Θρεπτικό Υπόστρωμα (ΘΥ) για την έμμεση οργανογένεση.

ΘΥ	Είδος κάλου			Σύνολο
	Κάλος Βλαστού	Κάλος Φύλλου	Κάλος Μίσχου	
2	5	2	3	10
3	25	25	25	75
4	25	25	25	75
5	5	5	5	15
6	8	8	8	24
7	8	8	8	24
8	0	0	10	10
9	0	10	10	20
10	16	0	12	28
11	30	0	24	54
12	30	0	24	54
13	4	0	0	4
14	24	24	0	48
15	0	24	24	48
16	0	30	0	30
17	24	20	20	64
18	20	20	20	64
19	0	30	0	30
20	0	25	0	25

Η παρασκευή όλων των θρεπτικών υποστρωμάτων έγινε με την ίδια διαδικασία, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της βιβλιογραφικής ανασκόπησης (Khosh-Khui and Sink, 1981). Πραγματοποιήθηκε ισόποσος διαμοιρασμός όλων των θρεπτικών υποστρωμάτων, τόσο αυτών που χρησιμοποιήθηκαν για καλογένεση όσο και αυτών που χρησιμοποιήθηκαν για οργανογένεση, σε δοκιμαστικούς σωλήνες ιστοκαλλιέργειας, κάλυψη των δοκιμαστικών σωλήνων με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και, τέλος, υγρή αποστείρωση των υποστρωμάτων σε αυτόκαυστο (121 °C για 20 λεπτά) (Εικόνα 12). Έπειτα, όλα τα εργαλεία, τα φυτικά τμήματα και οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το θρεπτικό υπόστρωμα μεταφέρθηκαν στον κλειστό θάλαμο εργασίας για να γίνει η τοποθέτηση των εκφύτων πάνω στα υποστρώματα (Εικόνα 13).

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας και φωτισμού (26±2 °C και 16 ώρες, αντίστοιχα) (Εικόνες 14 και 15). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το θρεπτικό υπόστρωμα (1) που χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή και καλλιέργεια κάλου κατά τις δύο πρώτες προσπάθειες τοποθετήθηκε σε συνθήκες απουσίας φωτός στους 26±2 °C, ενώ στις επόμενες τρεις επαναλήψεις τοποθετήθηκαν στον ίδιο θάλαμο με τους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν τα υπόλοιπα υποστρώματα (2-20 του πίνακα 2) (26±2 °C και 16 ώρες φωτοπερίοδος).



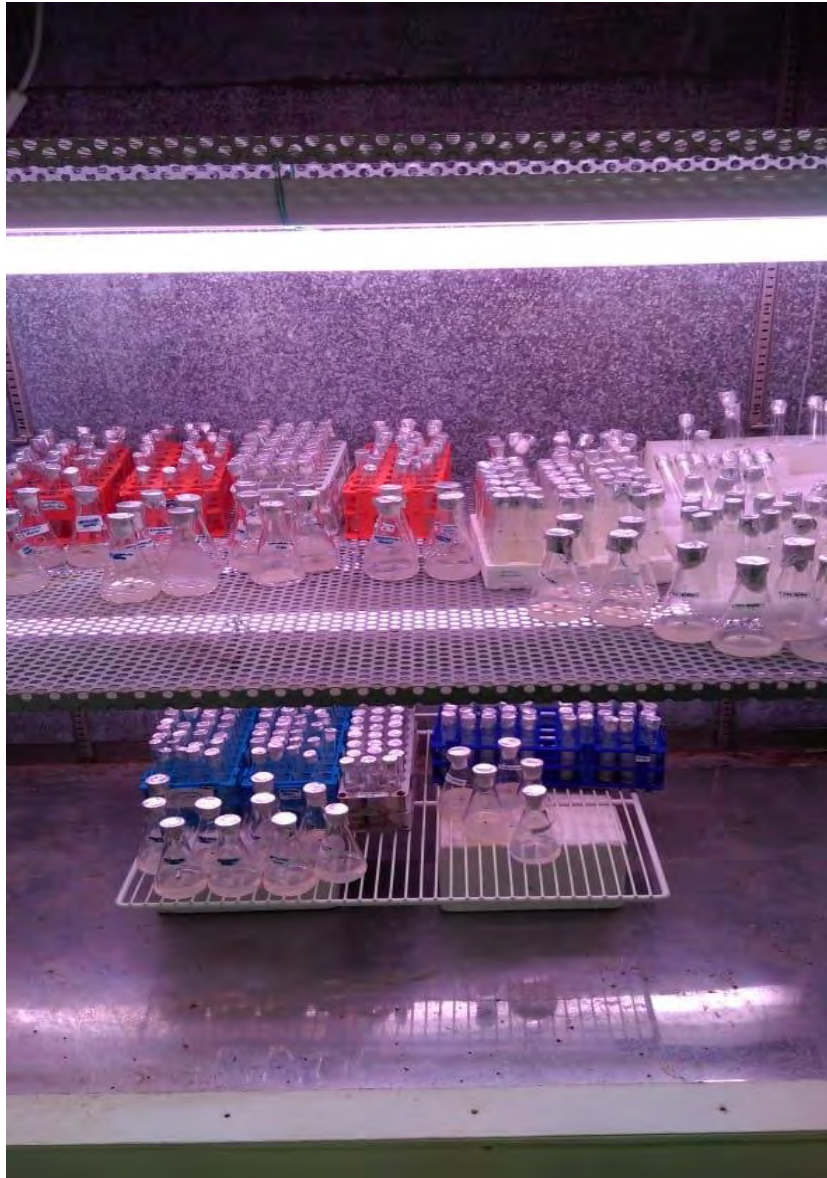
Εικόνα 12: Αυτόκαυστο υγρής αποστείρωσης.



Εικόνα 13: Κλειστός θάλαμος εργασίας κατά τη διάρκεια τοποθέτησης καλλιέργειας.



Εικόνα 14: Θάλαμος ελεγχόμενων συνθηκών ανάπτυξης.



Εικόνα 15: Τοποθέτηση δοκιμαστικών σωλήνων στο θάλαμο ανάπτυξης.

3.2. Υποκαλλιέργεια

Για τη διατήρηση του κάλου στο βασικό θρεπτικό υπόστρωμα γινόταν υποκαλλιέργεια κάθε τρεις με τέσσερις εβδομάδες. Παρασκευαζόταν το ΘΥ1 (Πίνακας 2), με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, και τοποθετούνταν το τμήμα εκφύτου μαζί με τον κάλο που είχε δημιουργηθεί πάνω σε αυτό. Η διαδικασία αυτή γινόταν με σκοπό να συντηρηθεί ο κάλος για μελλοντική χρήση ή για να αυξηθεί κι άλλο το μέγεθος του ώστε να χρησιμοποιηθεί επαρκής ποσότητα στο επόμενο στάδιο της καλλιέργειας.

3.3.Κριτήρια επιλογής κάλου για οργανογένεση

Κατά το στάδιο της μεταφοράς του επαγόμενου κάλου σε διαφορετικό θρεπτικό υπόστρωμα με σκοπό την αναγέννηση φυτικού μέρους έγινε επιλογή του με βάση συγκεκριμένα χαρακτηριστικά:

- Λευκό ή υπόλευκο χρώμα
- Συμπαγής δομή
- Σκληρή υφή
- Απουσία μολύσματος

Στις περιπτώσεις όπου ο κάλος είχε κίτρινο ή καφέ χρώμα, ήταν πιο υδαρής ή πολύ εύθρυπτος και είχε γύρω του ή επάνω του σημεία μολύσματος απορρίπτονταν.

4.Άμεση οργανογένεση

Κατά την τελευταία φάση της πειραματικής διαδικασίας έγινε μια δοκιμή άμεσης οργανογένεσης στα μικρομοσχεύματα της τριανταφυλλιάς Miss Piggy. Η λήψη των στελεχών τριανταφυλλιάς και η τοποθέτησή τους στα ΘΥ-17, 18, 19 και 20 για οργανογένεση έγινε στις 5/12/2019. Τα εν λόγω θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν επίσης και στην περίπτωση της έμμεσης οργανογένεσης, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Όπως και στην περίπτωση της επαγωγής κάλου χρησιμοποιήθηκαν βλαστικά μέρη από στελέχη τριανταφυλλιάς της ποικιλίας Miss Piggy, από φυτά που αναπτύσσονται σε υδροπονικό σύστημα σε θερμοκήπιο του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο. Η διαδικασία συλλογής του φυτικού υλικού ήταν η ίδια όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1 της παρούσης ενότητας. Επίσης, τηρήθηκαν τα ίδια κριτήρια επιλογής του, όπως αναφέρθηκαν παραπάνω, καθώς και τα ίδια πρωτόκολλα απολύμανσης του φυτικού υλικού, των εργαλείων και των χώρων εργασίας.

Για την επαγωγή βλαστών από τα μικρομοσχεύματα της τριανταφυλλιάς χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα 17, 18, 19 και 20 (Πίνακας 2). Στο υπόστρωμα 17 τοποθετήθηκαν 20 έκφυτα φύλλου, 20 έκφυτα μίσχου και 24 έκφυτα

βλαστού (Maurya et al., 2013). Αντιθέτως, στα υποστρώματα 18, 19 και 20 τοποθετήθηκαν μόνο έκφυτα φύλλου (Pati et al., 2004; Li et al., 2002). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε κάλος που καλλιεργήθηκε (10/10/2019) στο βασικό θρεπτικό υπόστρωμα καλογένεση (1) και τοποθετήθηκε μαζί με το έκφυτο από το οποίο παράχθηκε για περαιτέρω καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες με τα ΘΥ-17, 18, 19 και 20. Χρησιμοποιήθηκε υλικό (κάλος+έκφυτο) και από τα τρία είδη μικρομοσχεύματος (φύλλο, μίσχος, βλαστός).

Τα θρεπτικά υποστρώματα διαμοιράστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες ιστοκαλλιέργειας και σε κωνικές φιάλες χωρητικότητας 50 mL ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 3.1 αυτού του κεφαλαίου. Ο αριθμός των επαναλήψεων φαίνεται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5: Αριθμός επαναλήψεων ανά μεταχείριση για την άμεση οργανογένεση.

Έκφυτο		Επαναλήψεις			
		ΘΥ17	ΘΥ18	ΘΥ19	ΘΥ20
Βλαστός	Δοκιμαστικοί σωλήνες με έκφυτο	24	0	0	0
	Κωνικές φιάλες με κάλο+έκφυτο	5	5	5	0
Φύλλο	Δοκιμαστικοί σωλήνες με έκφυτο	20	0	30	25
	Κωνικές φιάλες με κάλο+έκφυτο	5	5	5	5
Μίσχος	Δοκιμαστικοί σωλήνες με έκφυτο	20	0	0	0
	Κωνικές φιάλες με κάλο+έκφυτο	5	5	5	0

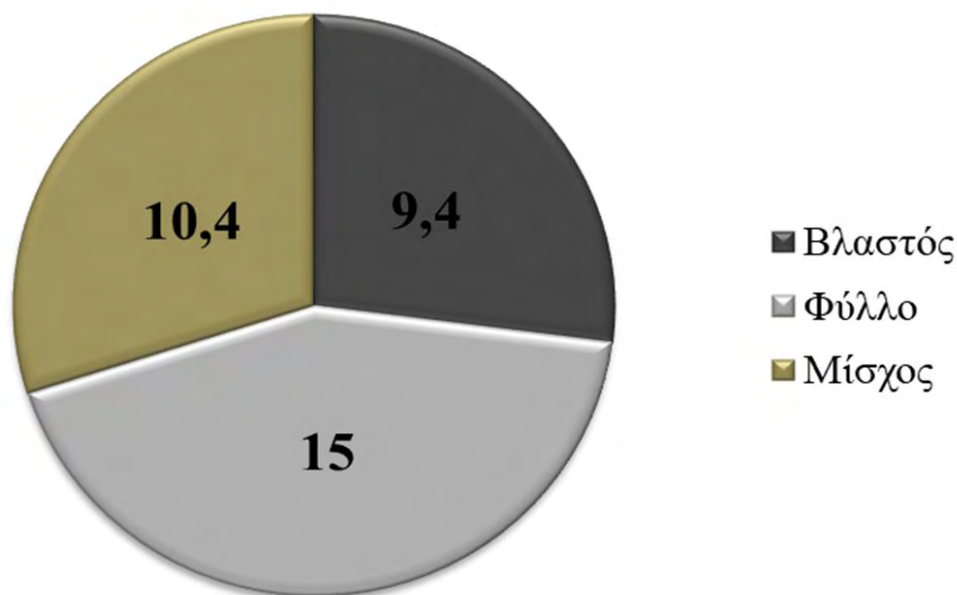
Μετά την τοποθέτηση των δοκιμαστικών σωλήνων στο θάλαμο καλλιέργειας, άρχισαν να λαμβάνονται παρατηρήσεις σχετικά την έναρξη επαγωγής κάλου και την εξέλιξή του πάνω στα έκφυτα. Η καταγραφή των αποτελεσμάτων γίνονταν κάθε 2-3 ημέρες.

Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1.Αποτελέσματα καλλιέργειας επαγωγής κάλου

1.1.Επαγωγή κάλου

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 1, τα έκφυτα βλαστού και μίσχου παρουσιάζουν ταχύτερη έναρξη επαγωγής κάλου σε σχέση με αυτά του φύλλου. Η δημιουργία κάλου στα μικρομοσχεύματα βλαστού και μίσχου ξεκινάει σχεδόν ταυτόχρονα κατά μέσο όρο μετά από 9,4 και 10,4 μέρες αντίστοιχα από την τοποθέτησή τους στο θρεπτικό υπόστρωμα (Εικόνες 16 και 17) ενώ στα μικρομοσχεύματα φύλλου η παραγωγή κάλου ξεκινάει περίπου 6 ημέρες αργότερα, δηλαδή κατά μέσο όρο 19 ημέρες μετά την τοποθέτησή τους. Παρόμοια ευρήματα υπήρξαν και σε άλλα πειράματα όπου τα έκφυτα φύλλου παρουσίαζαν μια καθυστέρηση ως προς την έναρξη επαγωγής κάλου σε σχέση με τα υπόλοιπα έκφυτα (Ram et al., 2011). Η διαφορετική απόκριση ανάμεσα στα τρία είδη εκφύτων μπορεί να οφείλεται στη διαφορά στην φυσιολογική τους κατάσταση καθώς και στον αριθμό των κυττάρων που υφίστανται αποδιαφοροποίηση (Maurya et al., 2013).



Διάγραμμα 1: Μέσος όρος ημερών που απαιτούνται για την έναρξη δημιουργίας κάλου σε έκφυτα βλαστού, φύλλου και μίσχου.



Εικόνα 16: Κάλος σε έκφυτο βλαστού.



Εικόνα 17: Κάλος σε έκφυτο μίσχου.

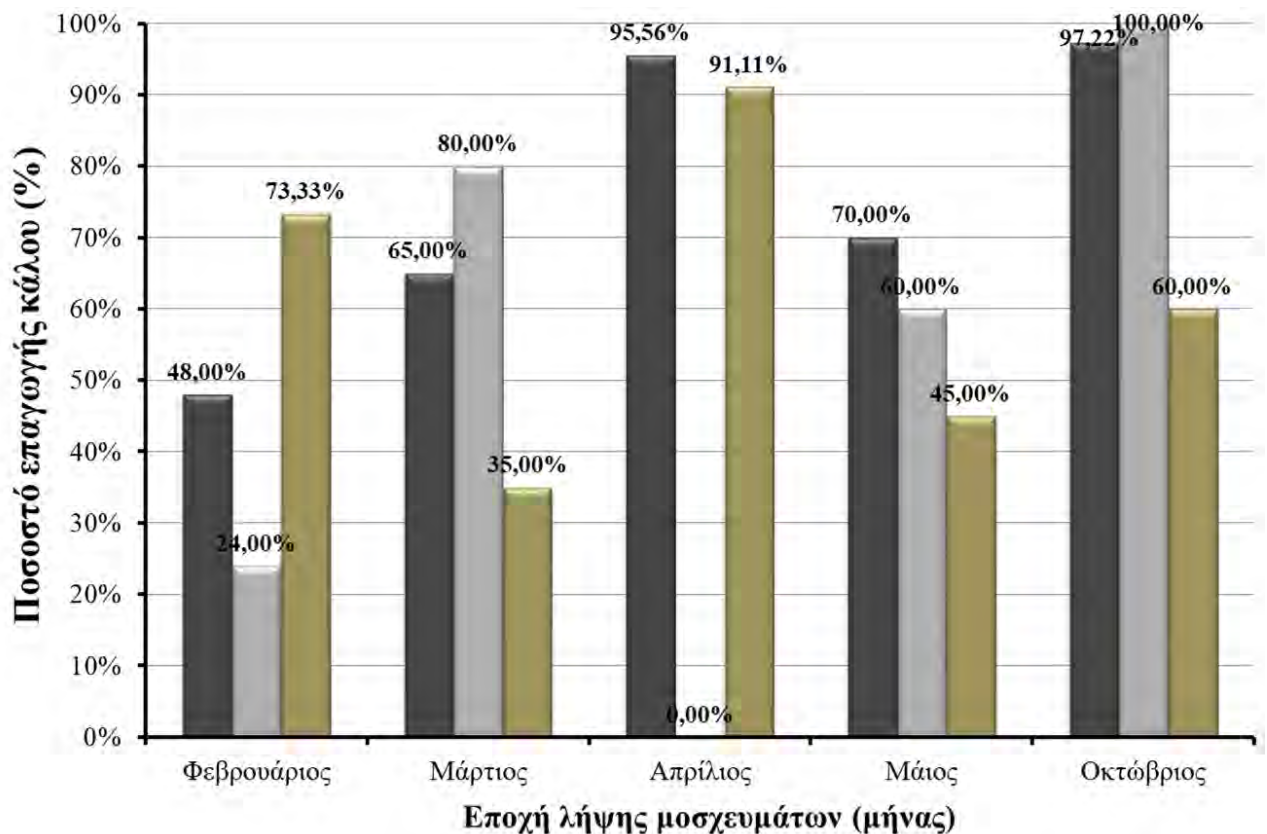
Η απόκριση των βλαστικών εκφύτων στην ιστοκαλλιέργεια εξαρτάται από τα κύτταρα που περιέχονται στο κάθε είδος εκφύτου και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, καθώς και από τα επίπεδα των ενδογενών ορμονών, και κυρίως των αυξινών, που περιέχονται στο κάθε τμήμα. Και τα τρία είδη εκφύτων που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούνται από μεγάλο ποσοστό μεριστωματικών κυττάρων άρα αναμένεται να έχουν καλή απόκριση στην ιστοκαλλιέργεια (Κίντζιος, 2015). Επίσης, έχει μελετηθεί η χρήση αυτών των βλαστικών μερών ως έκφυτα στην ιστοκαλλιέργεια και βρέθηκε πως αποδίδουν ικανοποιητικά αποτελέσματα (Khosh-Khui and Sink, 1982; Arene et al., 1993; Borissova, 2000; Seema et al., 2012). Στο διάγραμμα 2 φαίνονται τα διαφορετικά ποσοστά επαγωγής κάλου από τα τμήματα βλαστού, φύλλων και μίσχων για διαφορετικές εποχές λήψης των βλαστικών μερών.

Η εποχή λήψης των μικρομοσχευμάτων από το μητρικό φυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση του στην ιστοκαλλιέργεια. Η μητρική φυτεία από την οποία λαμβάναμε τα έκφυτα παρήγαγε άνθη κατά την περίοδο από τον Μάρτιο μέχρι τον Οκτώβριο. Κατά το Φεβρουάριο πράγματι παρατηρούνται πολύ χαμηλά ποσοστά επιτυχίας, καθώς το φυτό είναι σε φάση επανέναρξης της λειτουργίας του και της

αύξησής του, επομένως δεν έχει σχηματίσει ακόμα επαρκής ποσότητες ενδογενών αυξινών. Στο διάστημα Μαρτίου-Οκτωβρίου έγιναν οι 4 από τις 5 λήψεις φυτικού υλικού και όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2 τότε παρουσιάζονται τα μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας επαγωγής κάλου. Ιδιαίτερα στην περίπτωση των βλαστών και των φύλλων τα ποσοστά αυτά φτάνουν το 97,22% και 100%, αντίστοιχα κατά το μήνα Οκτώβριο. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι μετά το πέρας του καλοκαιριού το φυτό έχει συσσωρεύσει μεγάλες ποσότητες αποθησαυριστικών ουσιών, οι οποίες κατά κύριο λόγο βρίσκονται στο βλαστό, και ανταποκρίνεται καλύτερα στην ιστοκαλλιέργεια. Δεν συμβαίνει το ίδιο και με τους μίσχους όμως οι οποίοι αντιθέτως παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό νέκρωσης των ιστών τους κατά το μήνα αυτό. Την εποχή αυτή το φυτό λαμβάνει κάποια περιβαλλοντικά μηνύματα, όπως η μεταβολή που παρουσιάζεται στην θερμοκρασία και το φωτισμό (μείωση διάρκειας της ημέρας) τα οποία οδηγούν στην έναρξη της διαδικασίας της γήρανσης του (Taiz et al., 2012). Κατά τη διαδικασία αυτή τα θρεπτικά συστατικά υφίστανται βαθμιαία επανακινητοποίηση και ανακατανομή μέσα στο φυτό, ώστε να οδηγηθούν τελικά στα αναπτυσσόμενα όργανα, ενώ υπάρχει μια διαφοροποίηση των κυττάρων του μίσχου τα οποία σχηματίζουν τελικά μια ζώνη αποκοπής (Taiz et al., 2012).

Ωστόσο, σε κάποιες από τις μεταχειρίσεις παρατηρούνται μεγάλες διαφορές ως προς την επαγωγή κάλου στα τρία είδη εκφύτων, γεγονός μη αναμενόμενο βάσει της εποχής λήψης των μοσχευμάτων και βάσει των βιβλιογραφικών αναφορών. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι σε αυτές τις περιπτώσεις υπήρξαν σημαντικά ποσοστά μόλυνσης ή νέκρωσης ή και των δύο μαζί και δεν επέτρεψαν την επαγωγή του κάλου (Διάγραμμα 2, Πίνακας 6).

Ωστόσο, και τα έκφυτα μίσχου παρουσίασαν ικανοποιητικά ποσοστά επαγωγής κάλου κατά τις 5 επαναλήψεις που πραγματοποιηθήκαν, με υψηλότερο ποσοστό το 91,11% κατά τον μήνα Απρίλιο. Την άνοιξη, που ουσιαστικά αρχίζουν να δημιουργούνται καινούρια βλαστικά μέρη και να αναπτύσσονται τα πιο παλιά, υπάρχει υψηλή συγκέντρωση αυξίνης στα καινούρια όργανα, όπως τα επάκρια τμήματα των βλαστών και τα φύλλα στα οποία μεταφέρεται μέσω των μίσχων. Έτσι, η αυξημένη περιεκτικότητα σε ενδογενή αυξίνη που υπάρχει ήδη στα μικρομοσχεύματα που χρησιμοποιούνται αυξάνει τα ποσοστά επιτυχίας επαγωγής κάλου.



Διάγραμμα 2: Ποσοστό επαγωγής κάλου από έκφυτα βλαστού (■), φύλλον (■) και μίσχου (■) κατά τις 5 διαφορετικές περιόδους λήψης μοσχευμάτων.

1.2.Μολύνσεις-Νεκρώσεις ιστών

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν όσον αφορά τις μολύνσεις και τις νεκρώσεις των ιστών που υπήρξαν κατά την πειραματική διαδικασία επαγωγής κάλου φαίνονται στον πίνακα 6. Τα έκφυτα βλαστών παρουσιάζουν αρκετά μεγαλύτερα ποσοστά μολύνσεων και στις 5 επαναλήψεις της διαδικασίας, ανεξάρτητα από τη μεθοδολογία απολύμανσης που εφαρμόστηκε, ενώ αυτά των φύλλων και των μίσχων έχουν σημαντικά μικρότερη προσβολή μολύνσεων. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευτεί και να συνδεθεί με τη διαθέσιμη προς απολύμανση επιφάνεια του κάθε είδους εκφύτου και την ευκολία με την οποία εισχωρεί παντού το απολυμαντικό μέσο (Teixeira da Silva et al., 2015). Τα αποτελέσματα ως προς τις δύο μεθοδολογίες απολύμανσης που εφαρμόστηκαν μας δείχνουν πως και στις δύο μεταχειρίσεις οι μίσχοι ήταν αυτοί που παρουσίασαν σημαντικά μικρότερα ποσοστά μολύνσεων κατά μέσο όρο, σε σχέση με τους βλαστούς και τα φύλλα, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 6: Ποσοστά μολύνσεων και νεκρώσεων στο κάθε βλαστικό μέρος ανά εποχή λήψης μοσχευμάτων.

		Φεβρουάριος	Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος	Οκτώβριος
Βλαστός	Μόλυνση έως την 7η μέρα (%)	12	20	0	0	2,78
	Μόλυνση από την 8η μέρα έως την τελική (%)	28	0	4,44	30	2,78
	Συνολική Μόλυνση (%)	40	20	4,44	30	5,56
	Νέκρωση (%)	0	15	0	0	8,33
Φύλλο	Μόλυνση έως την 7η μέρα (%)	4	10	0	0	0
	Μόλυνση από την 8η μέρα έως την τελική (%)	20	10	6,67	20	0
	Συνολική Μόλυνση (%)	24	20	6,67	20	0
	Νέκρωση (%)	0	0	93,33	20	0
Μίσχος	Μόλυνση έως την 7η μέρα (%)	0	2,5	0	0	0
	Μόλυνση από την 8η μέρα έως την τελική (%)	6,67	22,5	8,89	5	0
	Συνολική Μόλυνση (%)	6,67	25	8,89	5	0
	Νέκρωση (%)	0	40	0	50	40

Οι μολύνσεις των καλλιεργούμενων σε θρεπτικό υπόστρωμα ιστών αποτελούν από τα βασικότερα προβλήματα στην *in vitro* καλλιέργεια. Συμβολή στη δημιουργία τέτοιων συνθηκών στην ιστοκαλλιέργεια έχουν διάφοροι παράγοντες. Η εποχή λήψης των μικρομοσχευμάτων έχει βρεθεί πως παίζει ρόλο στο μικροβιακό φορτίο των εκφύτων καθώς το καλοκαίρι λόγω των υψηλότερων θερμοκρασιών που επικρατούν δημιουργούνται ευνοϊκότερες συνθήκες αύξησής του (Κίντζιος, 2015), ενώ τον χειμώνα τα φυτά είναι λιγότερο εύρωστα και ευπαθή. Οι κλιματικές συνθήκες και το περιβάλλον στον οποίο αναπτύσσεται η μητρική φυτεία επηρεάζουν άμεσα και την επιτυχία της απολύμανσης των εκφύτων (George, 1993; Te-chato et al., 2006). Η απολύμανση των μικρομοσχευμάτων αποτελεί το πρώτο και πιο σημαντικό βήμα για την εγκατάσταση μιας ασηπτικής καλλιέργειας *in vitro*. Η μέθοδος απολύμανσης που θα ακολουθηθεί συνδέεται με την αδυναμία επιβίωσης ή επαρκούς απολύμανσης των εκφύτων, και μπορεί να εξαρτάται από το είδος που θέλουμε να απολυμάνουμε, αν είναι βλαστός, φύλλο ή μίσχος (Teixeira da Silva et al., 2015).

Έτσι, μια εκτίμηση ως προς την αποτελεσματικότητα των δύο μεθόδων απολύμανσης θα μπορούσε να γίνει εάν παρατηρηθεί ο χρόνος που χρειάστηκε μέχρι να εμφανιστεί η μόλυνση στην κάθε μεταχείριση. Το μεγαλύτερο ποσοστό των μολύνσεων εμφανίστηκε πολύ πιο μετά από το πέρας των πρώτων ημερών της εγκατάστασης της καλλιέργειας, δηλαδή μετά τις πρώτες 7 ημέρες, γεγονός που ίσως υποδηλώνει πως η μόλυνση οφείλεται στους υπόλοιπους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω και όχι στη μη αποτελεσματική απολύμανση. Όπως φαίνεται στον πίνακα 6 τα ποσοστά μόλυνσης και στα τρία είδη εκφύτων κατά τις πρώτες 7 ημέρες μετά την τοποθέτησή τους στο θρεπτικό υπόστρωμα ήταν πολύ μικρά ή μηδενικά σε σχέση με τα αντίστοιχα ποσοστά μέχρι το τέλος των παρατηρήσεων. Μόνο στην περίπτωση του βλαστού κατά το μήνα Μάρτιο (πρώτη μέθοδος απολύμανσης) το σύνολο των μολύνσεων εμφανίστηκε τις πρώτες ημέρες, κι έτσι θα μπορούσαν να αποδοθούν σε ανεπαρκή απολύμανση.

Η νέκρωση των καλλιεργούμενων ιστών επηρεάζεται επίσης από την υψηλή περιεκτικότητα φαινολικών που εκκρίνονται από τα έκφυτα της τριανταφυλλιάς (Ambros et al., 2016), καθώς τα οξειδωτικά προϊόντα των φαινολικών ενώσεων μειώνουν το pH του μέσου καλλιέργειας, αναστέλλοντας έτσι την περαιτέρω ανάπτυξη και αύξηση (Vijayan et al., 2011). Αποτέλεσμα είναι να παρατηρούνται νεκρώσεις των εκφύτων ή σε κάποιες περιπτώσεις επαγωγή του κάλου στα έκφυτα αυτά και στη συνέχεια μεταχρωματισμός και νέκρωση αυτού. Η προσθήκη ενεργού άνθρακα (Mhatre et al., 1985) και η υποκαλλιέργεια κάθε 20-25 ημέρες (Narayan et al. 1989; Vijayan et al. 1998) έχουν βρεθεί αποτελεσματικά μέτρα για την αποφυγή των μολύνσεων λόγω της έκκρισης φαινολικών ουσιών. Ακόμα, το ενδογενές επίπεδο αυξίνης των μικρομοσχευμάτων μπορεί να είναι ανεπαρκές ώστε να μπορέσει να τα βοηθήσει στην επαγωγή του κάλου με αποτέλεσμα να προκαλείται τελική νέκρωση (Roy and Banerjee, 2003).

2.Αποτελέσματα έμμεσης και άμεσης οργανογένεσης

2.1.Πρασίνισμα κάλου

Κατά την διάρκεια της εργασίας δεν επετεύχθη οργανογένεση από κάλο που προήλθε από διάφορα βλαστικά μέρη του φυτού, αλλά ούτε και άμεσα από έκφυτα.

Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν το ποσοστό του κάλου που μεταχρωματίστηκε από υπόλευκος που ήταν αρχικά σε πράσινο, καθώς και οι ημέρες που μεσολάβησαν μέχρι τον μεταχρωματισμό του, σε όσες από τις μεταχειρίσεις αυτό συνέβη. Με βάση τις μακροσκοπικές παρατηρήσεις που έγιναν όσον αφορά τον μεταχρωματισμό, παρουσιάστηκε ένα εύρος της απόχρωσης από πολύ ανοιχτό πράσινο έως αρκετά πιο βαθύ, σκούρο πράσινο.

Αυτή η αλλαγή στο χρώμα του καλλιεργούμενου κάλου είναι δείγμα σχηματισμού χλωροφύλλης στον ιστό και η αυξανόμενη διαβάθμιση της απόχρωσης του, σε κάποιες περιπτώσεις, υποδηλώνει την αύξηση της συγκέντρωσής της συναρτήσει της ηλικίας του κάλου (Tarrahi and Rezanejad, 2013). Σε αυτό συμβάλει η εφαρμογή της φωτοπεριόδου στο θάλαμο καλλιέργειας, καθώς απουσία φωτός δεν παρατηρείται δημιουργία μορίων χλωροφύλλης, και η παρουσία αυξινών και κυτοκινινών σε κατάλληλη αναλογία στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης (Hinnawy and Pierrot Dr., 1974; Parsaeimehr et al., 2010).

2.2. Έμμεση οργανογένεση

Όπως και στις μεταχειρίσεις επαγωγής κάλου έτσι και σε αυτές που αφορούσαν την έμμεση οργανογένεση, μετά την τοποθέτηση του κάλου στα θρεπτικά υποστρώματα (2-20) και τη μεταφορά στο θάλαμο καλλιέργειας γινόταν καταγραφή της εξέλιξης τους κάθε 2-3 ημέρες. Τα αποτελέσματα των κάλων που παρουσίασαν εξέλιξη φαίνονται στους πίνακες 7-9. Παρουσιάζονται τα ποσοστά των κάλων που εμφάνισαν πράσινο μεταχρωματισμό ανά είδος εκφύτου από το οποίο προέρχονταν και ανά θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας, καθώς και το σύνολο των ημερών που χρειάστηκαν ώστε να επιτευχθεί αυτό. Στην εικόνα 18 παρατηρούμε την εμφάνιση χλωροφύλλης σε κάλο βλαστού που τοποθετήθηκε στο ΘΥ 10 για την επαγωγή έμμεσης οργανογένεσης.

Πίνακας 7: Ποσοστό κάλων από έκφυτα βλαστού.

Κάλος Βλαστού				
ΘΥ	Ημέρες καλλιέργειας εώς την πρώτη παρατήρηση πρασινίσματος	Ποσοστό πράσινων δειγμάτων κατά την πρώτη παρατήρηση (%)	Ημέρες καλλιέργειας εώς την τελική παρατήρηση	Ποσοστό πράσινων δειγμάτων κατά την τελική παρατήρηση (%)
6	17	37,5	57	0
9	7	8	120	0
10	35	62,5	188	31,25
11	57	40	208	20
17	9	12,5	51	70,83
18	16	75	51	100

Πίνακας 8: Ποσοστό κάλων από έκφυτα φύλλου.

Κάλος Φύλλου				
ΘΥ	Ημέρες καλλιέργειας εώς την πρώτη παρατήρηση πρασινίσματος	Ποσοστό πράσινων δειγμάτων κατά την πρώτη παρατήρηση (%)	Ημέρες καλλιέργειας εώς την τελική παρατήρηση	Ποσοστό πράσινων δειγμάτων κατά την τελική παρατήρηση (%)
4	35	8	120	0
6	17	50	57	50
9	35	4	120	0
17	31	15	51	20
18	49	30	51	30
19	36	3,33	51	0
20	16	8	51	20

Πίνακας 9: Ποσοστό κάλων από έκφυτα μίσχου.

Κάλος Μίσχου				
ΘΥ	Ημέρες καλλιέργειας εώς την πρώτη παρατήρηση πρασινίσματος	Ποσοστό πράσινων δειγμάτων κατά την πρώτη παρατήρηση (%)	Ημέρες καλλιέργειας εώς την τελική παρατήρηση	Ποσοστό πράσινων δειγμάτων κατά την τελική παρατήρηση (%)
7	92	12,5	177	12,5
8	92	40	244	10
17	31	20	51	20
18	16	5	51	20

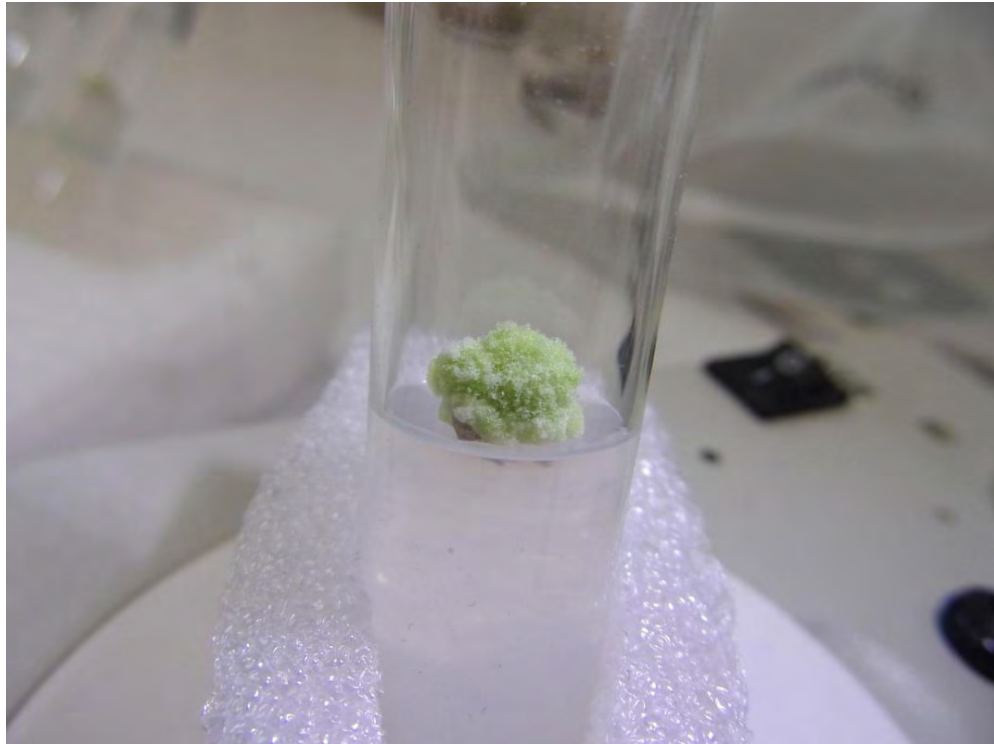
Ο επαγόμενος κάλος από έκφυτα βλαστού που χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή οργανογένεσης παρουσίασε εξέλιξη στα 6 από τα 13 θρεπτικά υποστρώματα που δοκιμάστηκε. Ο κάλος από έκφυτα φύλλου και ο κάλος από έκφυτα μίσχου είχαν

εξέλιξη στα 7 από τα 11 και στα 4 από τα 14 υποστρώματα, αντίστοιχα. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο κάλος φύλλων ανταποκρίνεται θετικά στα περισσότερα από τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν στην παρούσα εργασία.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε κάλος βλαστού τα αποτελέσματα δείχνουν πως πιο αποτελεσματικά είναι το ΘΥ17 και το ΘΥ18. Αυτά τα θρεπτικά υποστρώματα είχαν αυξημένο λόγο κυτοκινίνης : αυξίνη, που είναι βασική προϋπόθεση για την εξέλιξη του κάλου σε βλαστικό όργανο. Η χρήση αυτών των υποστρωμάτων οδήγησε στην σύνθεση χλωροφύλλης στα καλικά κύτταρα σε σύντομο χρονικό διάστημα και το τελικό ποσοστό των πρασινισμένων κάλων είναι πολύ μεγαλύτερο σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές έχει επιτευχθεί οργανογένεση από κάλο χρησιμοποιώντας τα εν λόγω υποστρώματα, όμως με μικρά ποσοστά αναγέννησης (Li et al., 2002; Pati et al., 2004).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα στις μεταχειρίσεις με έκφυτα φύλλων, η σύσταση του ΘΥ 6 δίνει τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Σύμφωνα με τους Pati et al. (2006) η βλαστογένεση επιτυγχάνεται τουλάχιστον 8-10 μέρες γρηγορότερα και με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Παρότι δεν παρατηρήθηκε τελικά οργανογένεση στη μεταχείριση αυτή, διαπιστώθηκε εμφάνιση πράσινου χρώματος στον κάλο που τοποθετήσαμε σε αυτό το θρεπτικό υπόστρωμα σε συντομότερο χρονικό διάστημα.

Τέλος, η σύνθεση του ΘΥ 18 δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα για τον κάλο που προέρχεται από μίσχο, καθώς στο συντομότερο χρονικό διάστημα επιτυγχάνεται το υψηλότερο ποσοστό πράσινων καλικών κυττάρων. Παρότι το ίδιο ποσοστό επιτυγχάνεται και με το ΘΥ 17 απαιτείται ωστόσο ο διπλάσιος χρόνος σε σχέση με αυτό που απαιτείται με τη χρήση του υποστρώματος 18 για την έναρξη δημιουργίας πράσινων καλικών κυττάρων.



Εικόνα 16: Κάλλος από έκφυτο βλαστού που έχει πρασινίσει στο θρεπτικό υπόστρωμα 10.

2.3.Άμεση οργανογένεση

Η διερεύνηση επίτευξης άμεσης οργανογένεσης από έκφυτα βλαστικών στελεχών τριανταφυλλιάς έγινε με τη χρήση των ΘΥ 17 έως ΘΥ 20 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 10-12. Παρατίθενται μόνο οι περιπτώσεις στις οποίες υπήρξε εξέλιξη στα δείγματα και τα αποτελέσματα εξάχθηκαν έπειτα από λήψη παρατηρήσεων ανά 2-3 ημέρες.

Πίνακας 10: Ποσοστό επαγωγής κάλου βλαστού και σύνθεσης χλωροφύλλης.

Βλαστός	
Σύνθεση Θρεπτικού Υποστρώματος	17
Ημέρες καλλιέργειας έως την πρώτη παρατήρηση επαγωγής κάλου	7
Ποσοστό εκφύτων με κάλο (%)	87,5
Ημέρες καλλιέργειας έως την πρώτη παρατήρηση πρασινίσματος κάλου	31
Ποσοστό δειγμάτων με πράσινο κάλο (%)	87,5
Ημέρες καλλιέργειας έως την τελική παρατήρηση	51
Ποσοστό εκφύτων με κάλο (%)	100
Ποσοστό δειγμάτων με πράσινο κάλο (%)	100

Πίνακας 11: Ποσοστό επαγωγής κάλου φύλλου και σύνθεσης χλωροφύλλης.

Φύλλο	
Σύνθεση Θρεπτικού Υποστρώματος	17
Ημέρες καλλιέργειας έως την πρώτη παρατήρηση επαγωγής κάλου	21
Ποσοστό εκφύτων με κάλο (%)	15
Ημέρες καλλιέργειας έως την πρώτη παρατήρηση πρασινίσματος κάλου	31
Ποσοστό δειγμάτων με πράσινο κάλο (%)	15
Ημέρες καλλιέργειας έως την τελική παρατήρηση	51
Ποσοστό εκφύτων με κάλο (%)	20
Ποσοστό δειγμάτων με πράσινο κάλο (%)	20

Πίνακας 12: Ποσοστό επαγωγής κάλου μίσχου και σύνθεσης χλωροφύλλης.

Μίσχος	
Σύνθεση Θρεπτικού Υποστρώματος	17
Ημέρες καλλιέργειας έως την πρώτη παρατήρηση επαγωγής κάλου	16
Ποσοστό εκφύτων με κάλο (%)	30
Ημέρες καλλιέργειας έως την πρώτη παρατήρηση πρασινίσματος κάλου	26
Ποσοστό δειγμάτων με πράσινο κάλο (%)	40
Ημέρες καλλιέργειας έως την τελική παρατήρηση	51
Ποσοστό εκφύτων με κάλο (%)	70
Ποσοστό δειγμάτων με πράσινο κάλο (%)	40

Κατά τη μεταχείριση αυτή δεν υπήρξε έκπτυξη βλαστικού τμήματος σε κάποιο από τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Μόνο στο θρεπτικό υπόστρωμα 17 παρατηρήθηκαν σημάδια εξέλιξης και στα τρία είδη εκφύτου. Συγκεκριμένα, στα έκφυτα βλαστού ξεκίνησε η επαγωγή κάλου από την 7^η ημέρα μετά την τοποθέτησή του και το πρασίνισμα του από την 31^η ημέρα σε ποσοστό

87,5%, σημειώνοντας 100% επιτυχία επαγωγής και πρασινίσματος κάλου στο τέλος των παρατηρήσεων, την 51^η ημέρα. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει εν μέρη με τα αποτελέσματα των Maurya et al. (2013), όπου σημειώθηκε 100% επιτυχία άμεσης οργανογένεσης από έκφυτα βλαστού σε μόλις 11,9 ημέρες. Η αποτυχία αναγέννησης στην περίπτωση μας πιθανόν οφείλεται στη χρήση διαφορετικής ποικιλίας από αυτή που χρησιμοποίησαν οι Maurya et al. (2013) και στη μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα που εμφανίζεται μεταξύ των διαφόρων ποικιλιών της τριανταφυλλιάς (Castillon and Kamo, 2002). Τα έκφυτα φύλλου και μίσχου χρειάστηκαν περισσότερες μέρες για την ανάπτυξη κάλου και πράσινων καλικών κυττάρων, αφού 51 ημέρες μετά την τοποθέτησή τους στο υπόστρωμα παρατηρήθηκε δημιουργία πράσινων καλικών κυττάρων σε ποσοστό 20% στο φύλλο και 40% στο μίσχο.

2.3.1.Αποτελέσματα σε καλλιέργεια έκφυτου με κάλου

Σε αυτή τη μεταχείριση έγινε η προσπάθεια να διερευνηθεί η πιθανότητα οργανογένεσης, αφού πρώτα γίνει η επαγωγή του κάλου πάνω στο έκφυτο τοποθετώντας το στο θρεπτικό υπόστρωμα 1 κι έπειτα μεταφέροντας το σύνολό τους (κάλος + έκφυτο) στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Όπως φαίνεται και στους παρακάτω πίνακες (13-15) καμία από αυτές τις μεταχειρίσεις δεν οδήγησαν τελικά σε οργανογένεση. Ο κάλος που παρήχθη από τη συγκεκριμένη μεταχείριση έφτασε μέχρι το στάδιο του πράσινου μεταχρωματισμού του.

Πίνακας 13: Ποσοστό πράσινων καλικών κυττάρων από καλλιέργεια έκφυτου βλαστού με κάλο.

Βλαστός Κάλος+Έκφυτο				
Σύνθεση Θρεπτικού Υποστρώματος	Ημέρες καλλιέργειας έως την πρώτη παρατήρηση πρασινίσματος	Ποσοστό δειγμάτων με πράσινο κάλο (%)	Ημέρες καλλιέργειας έως την τελική παρατήρηση	Ποσοστό δειγμάτων με πράσινο κάλο (%)
17	7	100	51	100
18	9	60	51	100
20	7	80	51	40

Πίνακας 14: Ποσοστό πράσινων καλικών κυττάρων από καλλιέργεια έκφυτου φύλλου με κάλο.

Φύλλο Κάλος+Έκφυτο				
Σύνθεση Θρεπτικού Υποστρώματος	Ημέρες καλλιέργειας έως την πρώτη παρατήρηση πρασινίσματος	Ποσοστό δειγμάτων με πράσινο κάλο (%)	Ημέρες καλλιέργειας έως την τελική παρατήρηση	Ποσοστό δειγμάτων με πράσινο κάλο (%)
17	31	60	51	40
18	9	60	51	80
19	16	60	51	60
20	9	20	51	40

Πίνακας 15: Ποσοστό πράσινων καλικών κυττάρων από καλλιέργεια έκφυτου μίσχου με κάλο.

Μίσχος Κάλος+Έκφυτο				
Σύνθεση Θρεπτικού Υποστρώματος	Ημέρες καλλιέργειας έως την πρώτη παρατήρηση πρασινίσματος	Ποσοστό δειγμάτων με πράσινο κάλο (%)	Ημέρες καλλιέργειας έως την τελική παρατήρηση	Ποσοστό δειγμάτων με πράσινο κάλο (%)
17	16	60	51	80
18	16	60	51	80
20	9	20	51	40

Η περίπτωση της καλλιέργειας έκφυτου με κάλο, δεδομένου ότι χρησιμοποιείται και το ίδιο το έκφυτο, θα μπορούσε να θεωρηθεί άμεση οργανογένεση. Βλέπουμε πως και στις δύο περιπτώσεις δίνει θετικές ενδείξεις το θρεπτικό υπόστρωμα 17. Στην περίπτωση του βλαστού παρατηρούμε πως το τελικό ποσοστόν κάλου με πράσινο μεταχρωματισμό είναι το ίδιο και για τις δύο περιπτώσεις, ενώ στο φύλλο και το μίσχο η μεταχείριση "έκφυτο με κάλο" αποφέρει το διπλάσιο ποσοστό πρασινίσματος σε σχέση με τη χρήση μόνο εκφύτου. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του φύλλου ως προς την πρώτη εμφάνιση πρασινίσματος στον κάλο παρατηρούμε ότι οι δύο μεταχειρίσεις χρειάστηκαν τις ίδιες ακριβώς ημέρες ώστε να εμφανιστεί ο μεταχρωματισμός.

Δ.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε οδηγούν στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Μικρομοσχεύματα που λαμβάνονται κατά τις περιόδους βλαστικής ανάπτυξης του μητρικού φυτού παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανταπόκριση στην ιστοκαλλιέργεια πιθανώς λόγω της αυξημένης κυκλοφορίας αποθησαυριστικών ουσιών στο φυτό και μεγαλύτερου ποσοστού ενδογενών ορμονών.
- Το ποσοστό του κάλου που θα επαχθεί τελικά έχει άμεση εξάρτηση με το είδος του εκφύτου που χρησιμοποιείται για αυτό το σκοπό, καθώς στο κάθε ένα υπάρχει διαφορετική συγκέντρωση ορμονών άρα και διαφορετική απόκριση στα ερεθίσματα αποδιαφοροποίησης. Παρόλο που δεν μετρήθηκε το νωπό βάρος του κάλου από το κάθε είδος, βάση της μακροσκοπικής παρατήρησης που έγινε φαίνεται πως τα έκφυτα βλαστού παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα κάλου σε σχέση με τα υπόλοιπα.
- Επίσης, στα έκφυτα βλαστού έχουμε πολύ πιο άμεση επαγωγή κάλου, όπως και στα έκφυτα μίσχου, σε σχέση με αυτά των φύλλων.
- Η εποχή λήψης των μικρομοσχευμάτων καθορίζει την επιτυχία επαγωγής κάλου. Ωστόσο, όταν πρόκειται για θερμοκηπιακή καλλιέργεια, όπως στην περίπτωση μας, ο παράγοντας αυτός δεν είναι τόσο περιοριστικός καθώς τα φυτά έχουν μεγαλύτερο εύρος παραγωγικών περιόδων.
- Και οι δύο μέθοδοι απολύμανσης θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν αποτελεσματικές για την απολύμανση των βλαστικών μερών της τριανταφυλλιάς για τις εποχές λήψης μοσχευμάτων που αντίστοιχα εφαρμόστηκαν. Η προσθήκη ενεργού άνθρακα στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας προτείνεται σε συνδυασμό με τις συνεχείς υποκαλλιέργειες για τη μείωση του ποσοστού μολύνσεων.

- Σε σχέση με τα τρία είδη εκφύτων, προτιμάται ο κάλος που προέρχεται από μικρομοσχεύματα βλαστού για την περαιτέρω διερεύνηση έμμεσης οργανογένεσης.
- Σε σχέση με τα τρία είδη εκφύτων, προτιμάται ο βλαστός ως φυτικό μέρος για την περαιτέρω διερεύνηση άμεσης οργανογένεσης.
- Τα θρεπτικά υποστρώματα που επάγουν το πρασίνισμα και στα τρία είδη εκφύτων ήταν αυτά που στη σύνθεση τους περιείχαν: 2 mL/L BA + 0,1 mg/L NAA (17) και 1 mg/L BA + 0,3 mg/L NAA + 0,1 mg/L TDZ (18).
- Για την έμμεση οργανογένεση από έκφυτα του βλαστού και του μίσχου ενδείκνυται το θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει 1 mg/L BA + 0,3 mg/L NAA + 0,1 mg/L TDZ (18), καθώς με αυτό επιτεύχθηκε μεγαλύτερο ποσοστό δειγμάτων με εμφάνιση χλωροφύλλης στα καλικά κύτταρα.
- Για την έμμεση οργανογένεση από έκφυτα του φύλλου ενδείκνυται το θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει 2 mg/L BA + 0,5 mg/L GA₃ (6), καθώς με αυτό επιτεύχθηκε μεγαλύτερο ποσοστό δειγμάτων με εμφάνιση χλωροφύλλης στα καλικά κύτταρα.
- Τα θρεπτικά υποστρώματα 17 και 18 δίνουν θετικά αποτελέσματα και στα τρία είδη εκφύτων, στις περιπτώσεις της έμμεσης και άμεσης οργανογένεσης, με τη χρήση έκφυτου με κάλο. Επιπλέον, το θρεπτικό υπόστρωμα 17 δίνει θετικά αποτελέσματα και στην περίπτωση της άμεσης οργανογένεσης και στα τρία είδη εκφύτων.
- Η αυξημένη συγκέντρωση κυτοκινινών επάγει το σχηματισμό χλωροφύλλης στον κάλο και την οργανογένεση. Το γεγονός ότι υπήρξε πρασίνισμα του κάλου, άρα σχηματισμός χλωροφύλλης, είναι μια θετική ένδειξη η οποία χρήζει περαιτέρω μελέτης των συγκεκριμένων συνθέσεων θρεπτικών υποστρωμάτων ώστε να εξελιχθεί σε οργανογένεση.

- Η προσθήκη ουσιών στο υπόστρωμα που θα μπορούσαν να μειώσουν την δράση των φαιολικών ίσως βοηθούσε στην εξέλιξη του κάλου. Ακόμη, η μέτρηση των φαιολικών σε διάφορα υποστρώματα πιθανώς μπορεί να συσχετιστεί με την ανάπτυξη και το πρασίνισμα του κάλου.

E.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Abbasi, B., Khan, M., Mahmood, T., Ahmad, M., Chaudhary, F., Khan, M. (2010) ‘Shoot regeneration and free-radical scavenging activity in *Silybum marianum* L’, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101, pp. 371–376. doi: 10.1007/s11240-010-9692-x.
- Altman, A. and Goren, R. (1971) ‘Promotion of Callus Formation by Abscisic Acid in Citrus Bud Cultures’, *Plant Physiology*, 47, pp. 844–846.
- Ambros, E. V., Vasilyeva, O. Y. and Novikova, T. I. (2016) ‘Effects of *In vitro* propagation on ontogeny of *Rosa canina* L. micropropagated plants as a promising rootstock for ornamental roses’, *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 17(2), pp. 72–78.
- Arene, L., Pellegrino, C. and Gudin, S. (1993) ‘A comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida* L. cv Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues’, *Euphytica*, 71(1–2), pp. 83–90. doi: 10.1007/BF00023470.
- Attia, A. O., EL Dessoky S. Dessoky and El-Tarras, A. E. (2012) ‘*In vitro* propagation of *Rosa hybrida* L. cv. Al-Taif Rose plant’, *African Journal of Biotechnology*, 11(48), pp. 10888–10893. doi: 10.5897/AJB12.781.
- Avilés, F., Ríos, D., González, R. and Sánchez-Olate, M. (2009) ‘Effect of culture medium in callogenesis from adult walnut leaves (*Juglans regia* L.)’. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69:460-467.
- Azadi, P., Kermani, M. J. and Samiei, L. (2018) ‘Somatic Embryogenesis in *Rosa hybrida*’, in *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*. Forestry Sciences, pp. 161–170. doi: 10.1007/978-3-319-79087-9_13.
- Azadi, P., Zadeh, E. B. and Ntui, V. O. (2013) ‘A simple protocol for somatic embryogenesis in *Rosa hybrida* L. cv. Apollo’, *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. Headley Brothers Ltd, 88(4), pp. 399–402. doi: 10.1080/14620316.2013.11512982.
- Bao, Y., Liu, G., Shi, X., Xing, W., Ning, G., Liu, J. and Bao, M. (2012) ‘Primary and repetitive secondary somatic embryogenesis in *Rosa hybrida*

- “Samantha”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(3), pp. 411–418. doi: 10.1007/s11240-011-0105-6.
- Bhojwani, S. S. and Dhawan, V. (1989) ‘Acclimatization of Tissue Culture-Raised Plants for Transplantation to the Field’, in *Applications of Biotechnology in Forestry and Horticulture*. Boston: Springer, Boston, MA, pp. 249–256. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1321-2_19.
 - Bloch, R. (1941) ‘Wound healing in higher plants’, *The Botanical Review*, 7(2), p. 110. doi: 10.1007/BF02872446.
 - Boodley, J. (1998) ‘Συλλογή κομμένων λουλουδιών’, in *Επιχειρηματική Ανθοκομία-Ανθοκηπευτικές Καλλιέργειες*. Ίων, pp. 341–345.
 - Borissova, A., Tsoлова, V., Angeliev, V. and Atanassov, A. (2000) ‘Somatic embryogenesis of rosa hybrida l.’, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 14(2), pp. 44–51. doi: 10.1080/13102818.2000.10819087.
 - Britannica, Encyclopedia (2019) *Rose*, *Encyclopædia Britannica, inc.* Available at: <https://www.britannica.com/plant/rose-plant> (Accessed: 21 January 2020).
 - Brunda, S. M., Rani, C. L., Rajendran, P., Smitha, R. and Priya, L. (2017) ‘*In vitro* propagation of Rosa hybrida “Golden Fairy” through nodal explants’, in *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science, Leuven, Belgium, pp. 87–90. doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1165.13.
 - Canlı, F. A. and Kazaz, S. (2009) ‘Biotechnology of roses: progress and future prospects.’, *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi Seri A*, (No.1), pp. 167–183.
 - Carelli, B. P. and Echeverrigaray, S. (2002) ‘An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars’, *Scientia Horticulturae*, 92(1), pp. 69–74. doi: 10.1016/S0304-4238(01)00280-1.
 - Castellón, J. and Kamo, K. (2002) ‘Maturation and conversion of somatic embryos of three genetically diverse rose cultivars’, *HortScience*, 37(6), pp. 973–977. doi: 10.21273/hortsci.37.6.973.
 - Curir, P., Damiano, C. and Cosmi, T. (1986) ‘*In vitro* propagation of some rose cultivars’, in *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science, Leuven, Belgium, pp. 221–224. doi: 10.17660/ActaHortic.1986.189.27.

- Dai, C., Lambeth, V. N., Taven, R. and Mertz, D. (1987) 'Micropropagation of *Rhododendron prinophyllum* by ovary culture', *HortScience (USA)*, 22(3), pp. 493–493.
- Debergh, P. C. and Maene, L. J. (1981) 'A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture', *Scientia Horticulturae*, 14(4), pp. 335–345. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(81\)90047-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(81)90047-9).
- Dhawan, V. and Bhojwani, S.S., (1986) 'Micropropagation in crop plants', *Glimpses in Plant Res.*, 7: 1–98.
- Dubois, L. A. M. Vries, D. P. and Koot, A. (1988) 'Comparison of the growth and development of dwarf rose cultivars propagated *in vitro* and *in vivo* by softwood cuttings', *Scientia Horticulturae*, 35(3), pp. 293–299. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(88\)90123-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(88)90123-9).
- Dubois, L. A. M., Vries, D. P. and Koot, A. (2000) 'Direct shoot regeneration in the rose: Genetic variation of cultivars', *Gartenbauwissenschaft*, 65, pp. 45–49.
- Engelke, A. L., Hamzi, H. Q. and Skoog, F. (1973) 'Cytokinin-gibberellin regulation of shoot development and leaf form in tobacco plantlets', *American Journal of Botany*, 60, pp. 491-495. doi: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1973.tb05949.x>.
- Elliott, R. F. (1970) 'Axenic Culture of Meristem Tips of *Rosa multiflora*', *Planta*. Springer, 95(2), pp. 183–186. Available at: <http://www.jstor.org/stable/23368856>.
- Evans, D. E., Coleman, J. O. D. and Kearns, A. (2003) *Plant Cell Culture, Plant Cell Culture*. London: BIOS Scientific Publishers.
- Fehér, A. (2019) 'Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology?', *Frontiers in Plant Science*, 10, p. 536. doi: [10.3389/fpls.2019.00536](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536).
- Fereol, L., Chovelon, V., Causse, S., Triaire, D., Arnault, I., Auger, J. and Kahane, R. (2005) 'Establishment of embryogenic cell suspension cultures of garlic (*Allium sativum* L.), plant regeneration and biochemical analyses', *Plant Cell Reports*, 24(6), pp. 319–325. doi: [10.1007/s00299-005-0937-9](https://doi.org/10.1007/s00299-005-0937-9).

- Ferreira, F. J. and Kieber, J. J. (2005) ‘Cytokinin signaling’, *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, pp. 518–525. doi: 10.1016/j.pbi.2005.07.013.
- Frank, M., Rupp, H., Prinsen, E., Motyka, V., Van Onckelen, H. and Schmillig, T. (2000) ‘Hormone Autotrophic Growth and Differentiation Identifies Mutant Lines of Arabidopsis with Altered Cytokinin and Auxin Content or Signaling’, *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists, 122(3), pp. 721–730. doi: 10.1104/pp.122.3.721.
- GAIAPedia (2016) ‘Τριανταφυλλιά’ Available at: <http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/Τριανταφυλλιά> (Accessed: 21 January 2020).
- Gaillochot, C. and Lohmann, J. U. (2015) ‘The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity’, *Development*. The Company of Biologists Ltd, 142(13), pp. 2237–2249. doi: 10.1242/dev.117614.
- George, E. F. (1993) ‘Plant Propagation by Tissue Culture’, 2nd Edition., Exegetics Ltd., England.
- George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk, G.-J. (2008a) ‘Micropropagation: Uses and Methods’, in *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Springer, pp. 29–64.
- George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk, G.-J. (2008b) ‘Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors’, in *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Springer, pp. 175–204.
- George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk, G.-J. (2008c) ‘Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Inhibitors’, in *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Springer, pp. 205–226.
- George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk, G.-J. (2008d) ‘Plant Tissue Culture Procedure-Background’, in *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Springer, pp. 1–28.
- Ginova, A., Tsvetkov, I. and Kondakova, V. (2012) ‘Rosa damascena Mill.-an overview for evaluation of propagation Methods’, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18(4), pp. 545–556. Available at: <http://extension.missouri.edu/p/G6970>.
- Grout, J. M. and Read, P. E. (1987) ‘Influence of stock plant propagation method on tissue culture and leaf-bud propagation of “Northblue” blueberry’,

Journal of the American Society for Horticultural Science (USA), 111(3), pp. 368–371.

- Guo, B., Abbasi, H., Zeb, A., Xu, L. L. and Wei, Y. H. (2011) ‘Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator’, *African Journal of Biotechnology*. Academic Journals, pp. 8984–9000. doi: 10.5897/ajb11.636.
- Gupta, R. and Chakrabarty, S. K. (2013) ‘Gibberellic acid in plant’, *Plant Signaling & Behavior*. Taylor & Francis, 8(9), p. e25504. doi: 10.4161/psb.25504.
- Hameed, N., Shabbir, A., Ali, A. and Bajwa, R. (2006) ‘*In vitro* micropropagation of disease free rose (*Rosa indica* L .)’, *Mycopath*, 4(2), pp. 35–38.
- Harms, C. L. and Oplinger, E. S. (1988) ‘Plant Growth Regulators: Their Use in Crop Production’, *North Central Region Extension Publication 303*, Wisconsin.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. and Geneve, R.L. (2014) *Hartmann & Kester’s Plant Propagation: Pearson New International Edition : Principles and Practices*. 8th edn. Pearson Higher Ed USA.
- Hinnawy, E. El and Pierrot, H. (1974) ‘Effect of some growth regulating substances and carbohydrates on chlorophyll production in *Melilotus alba* (Desr.) callus tissue cultures’, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 74(2), pp. 95–105. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(74\)80163-7](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(74)80163-7).
- Howell, S. H., Lall, S. and Che, P. (2003) ‘Cytokinins and shoot development’, *Trends in Plant Science*, 8(9), pp. 453–459. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00191-2.
- Huang, X., Liu, J., Feng, H., Ma, Y., Zhang, L. and Han, H. (2018) ‘Effects of different plant hormones on callus induction and plant regeneration of miniature roses (*Rosa hybrida* L.)’, *Horticulture International Journal* . MedCrave Group, LLC, 2(4). doi: 10.15406/hij.2018.02.00053.
- Ibrahim, A. (1994) ‘Effect of gelling agent and activated charcoal on the growth and development of *cordyline terminalis* cultured *in vitro*’, in *Proceedings of the first conference of ornamental horticulture*, pp. 55–67.
- Ibrahim, R. and Debergh, P. C. (2001) ‘Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants

- of roses (*Rosa hybrida* L.)', *Scientia Horticulturae*, 88(1), pp. 41–57. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00189-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00189-8).
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A. (2013) 'Plant callus: Mechanisms of induction and repression', *Plant Cell*, pp. 3159–3173. doi: 10.1105/tpc.113.116053.
 - Iqbal, M. and Ashraf, M. (2013) 'Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: Growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis', *Environmental and Experimental Botany*, 86, pp. 76–85. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.06.002>.
 - Ishioka, N. and Tanimoto, S. (1990) 'Plant regeneration from Bulgarian rose callus', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22(3), pp. 197–199. doi: 10.1007/BF00033636.
 - Jacob, G., Allan, P. and Bornman, C. H. (1969) 'Tissue culture studies on rose: use of shoot tip explants: I Auxin: cytokinin effects', *Agroplantae*, 1, pp. 179–188.
 - Jacob, G., Allan, P. and Bornman, C. H. (1970a) 'Tissue culture studies on rose: use shoot tip explants: II. Cytokinin: gibberellin effects', *Agroplantae*, 2, pp. 25–28.
 - Jacob, G., Allan, P. and Bornman, C. H. (1970b) 'Tissue culture studies on rose: use shoot tip explants: III. Auxin: gibberellin effects', *Agroplantae*, 2, pp. 45–50.
 - Jaskani, M. J., Qasim, M., Sherani, J., Hussain, Z. and Abbas, H. (2005) 'Effect of growth hormones on shoot proliferation of rose cultivars', *Pakistan Journal of Botany*, 37(4), pp. 875–881.
 - Kanchanapoom, Kantamaht, Nonlapan, P. and Kanchanapoom, Kamnoon (2010) 'In vitro Flowering from Cultured Nodal Explants of Rose (*Rosa hybrida* L.)', *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37, pp. 161–164. doi: 10.15835/nbha3723077.
 - Kazaz, S. (2009) 'Biotechnology of Roses: Progress and Future Prospects', *Turkish Journal of Forestry*, 1(0), pp. 167-183–183. doi: 10.18182/tjf.23486.
 - Khan, I. A. and Shaw, J. J. (1988) 'Biotechnology in Agriculture', *Punjab Agricultural Research Coordination Board*, p. 2.

- Khosh-Khui, M. and Sink, K. C. (1981) 'Rooting-enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation', *Scientia Horticulturae*, 17(4), pp. 371–376. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(82\)90118-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(82)90118-2).
- Khosh-Khui, M. and Sink, K. C. (1982a) 'Callus induction and culture of *rosa*', *Scientia Horticulturae*, 17, pp. 361–370.
- Khosh-Khui, M. and Sink, K. C. (1982b) 'Micropropagation of New and Old World Rose Species', *Journal of Horticultural Science*. Taylor & Francis, 57(3), pp. 315–319. doi: 10.1080/00221589.1982.11515058.
- Khosh-Khui, M. and Teixeira Da Silva, J. A. (2006) '*In vitro* Culture of the *Rosa* Species', in *Rosa in vitro*. Global Science Books, UK, pp. 514–526. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/283300527>.
- Kim, C.-K., Oh, J.-Y., Jee, S.-O. and Chung, J.-D. (2003) '*In vitro* Micropropagation of *Rosa* hybrid L.', *Journal of Plant Biology*, 5(2), pp. 115–119.
- Kintzios, S., Manos, C. and Makri, O. (1999) 'Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa* sp.)', *Plant Cell Reports*, 18(6), pp. 467–472. doi: 10.1007/s002990050605.
- Konstas, J. and Kintzios, S. (2003) 'Developing a scale-up system for the micropropagation of cucumber (*Cucumis sativus* L.): the effect of growth retardants, liquid culture and vessel size', *Plant Cell Reports*, 21(6), pp. 538–548. doi: 10.1007/s00299-002-0566-5.
- Kou, Y., Yuan, C., Zhao, Q., Liu, G., Nie, J., Ma, Z., Cheng, C., Teixeira da Silva, J. A. and Zhao, L. (2016) 'Thidiazuron Triggers Morphogenesis in *Rosa canina* L. Protocorm-Like Bodies by Changing Incipient Cell Fate', *Frontiers in plant science*. Frontiers Media S.A., 7, p. 557. doi: 10.3389/fpls.2016.00557.
- Kumud, S., Hem, P. and Vijay, R. (2015) 'Micropropagation of rose cultivars : biotechnological application to floriculture', *Journal of Environmental Research And Development*, 10(01), pp. 40–46.
- Lansing, E. and Mi, U. S. A. (1982) 'Production of callus from various plant tissues and organs of different species is now feasible . The genus *Rosa* has been used widely in various physiological and related studies (Weinstein et al., 1962; Jacobs et al., 1968; Nesius et al., 1972; Ne', 17(1962), pp. 361–370.

- Leghari, A. J., Leghari, U. A., Leghari, A. F. and Bhutto, T. A. (2016) ‘Cultivation of rose (*Rosa indica* L.)’, *Journal of Floriculture and Landscaping*, 2, pp. 1–4. doi: 10.19071/jfcl.2016.v2.3044.
- Li, X., Krasnyanski, S. F. and Korban, S. S. (2002) ‘Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*’, *Journal of Plant Physiology*, 159(3), pp. 313–319. doi: 10.1078/0176-1617-00688.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S. and Terzi, M. (1989) ‘DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs’, *Theoretical and Applied Genetics*, 77(3), pp. 325–331. doi: 10.1007/BF00305823.
- Magyar-Tábori, K., Dobránszki, J., da Silva, J. A.-T., Bulley, S. M. and Hudák, I. (2010) ‘The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple’, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101(3), pp. 251–267. doi: 10.1007/s11240-010-9696-6.
- Mahmoud, I. M. A. and Hassanein, A. M. A. (2018) ‘Essential factors for *in vitro* regeneration of rose and a protocol for plant regeneration from leaves’, *Horticultural Science*, 45(2), pp. 83–91. doi: 10.17221/12/2017-HORTSCI.
- Marcelis-Van Acker, C. A. M. and Scholten, H. J. (1995) ‘Development of axillary buds of rose *in vitro*’, *Scientia Horticulturae*, 63, pp. 47–55.
- Martin, C., (1985) ‘Plant breeding *in vitro*’, *Endeavour*, 9, 81–86. doi:10.1016/0160-9327(85)90041-9
- Maurya, P. R., Yadav, C. R., Godara, N. R. and Beniwal, V. S. (2013) ‘*In vitro* plant regeneration of rose (*Rosa hybrida* L.) cv. “Benjamin Paul” through various explants’, *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 1.
- Mhatre, M., Bapat, V. A. and Rao, P. S. (1985) ‘Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.)’, *Plant cell reports*. Germany, 4(2), pp. 78–80. doi: 10.1007/BF00269211.
- Murashige, T. (1974) ‘Plant Propagation Through Tissue Cultures’, *Annual Review of Plant Physiology*, 25(1), pp. 135–166. doi: 10.1146/annurev.pp.25.060174.001031.

- Murashige, T. (1964) 'Analysis of the Inhibition of Organ Formation in Tobacco Tissue Culture by Gibberellin', *Physiologia Plantarum*, 17, pp. 636–643.
- Nak-Udom, N., Kanchanapoom, Kantamaht and Kanchanapoom, Kamnoon (2009) 'Micropropagation from cultured nodal explants of rose (*Rosa hybrida* L. cv. 'Perfume Delight')', *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 31(6), pp. 583–586.
- Narayan, P., Chakraborty, S. and Subba Rao, G. (1989) 'Regeneration of plantlets from the callus of stem segments of mature plants of *Morus alba* L.', *Indian National Science Academy*, 55, pp. 469–472.
- Nickell, L. G. and Tulecke, W. (1959) 'Responses of Plant Tissue Cultures to Gibberellin', *Botanical Gazette*, 120(4), pp. 245–250. doi: 10.1086/336032.
- Nissen, S. and Sutter, E. (1990) 'Stability of IAA and IBA in Nutrient Medium to Several Tissue Culture Procedures', *HortScience*, 25(7), pp. 800–8002. doi: 10.21273/HORTSCI.25.7.800.
- O'Brien, C., Hiti-Bandaralage, J., Hayward, A. and Neena, M. (2018) 'Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Chapter 24 Avocado (*Persea americana* Mill.)', 85, pp. 305–328. doi: 10.1007/978-3-319-79087-9.
- Osugi, A. and Sakakibara, H. (2015) 'Q and A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance?', *BMC Biology*. BioMed Central Ltd., 13(1). doi: 10.1186/s12915-015-0214-5.
- Parsaeimehr, A., Sargsyan, E. and Javidnia, K. (2010) 'Influence of plant growth regulators on callus induction, growth, chlorophyll, ephedrine and pseudoephedrine contents in *Ephedra procera*', *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(13), pp. 1308–1317.
- Pati, P. K., Sharma, M., Sood, A. and Ahuja, P. S. (2004) 'Direct shoot regeneration from leaf explants of *Rosa damascena* Mill.', *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40(2), pp. 192–195. doi: 10.1079/IVP2003503.
- Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M., Sood, A. and Ahuja, P. S. (2006) 'In vitro propagation of rose - A review', *Biotechnology Advances*, 24(1), pp. 94–114. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.07.001.

- Pourhosseini, L., Kermani, M. J., Habashi, A. A. and Khalighi, A. (2013) 'Efficiency of direct and indirect shoot organogenesis in different genotypes of *Rosa hybrida*', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112(1), pp. 101–108. doi: 10.1007/s11240-012-0210-1.
- Rademacher, W. (2015) 'Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production', *Journal of Plant Growth Regulation*. Springer US, 34(4), pp. 845–872. doi: 10.1007/s00344-015-9541-6.
- Ram, M., Prasad, K. V., Kaur, C., Singh, D., Arora, A. and Kumar, S. (2011) 'Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrida* L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels', *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104(2):171-179. doi: 10.1007/s11240-010-9814-5.
- Razavizadeh, R. and Ehsanpour, A. (2008) 'Optimization of *in vitro* propagation of *Rosa Hybrida* L. Cultivar Black Red', *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, 3(1), pp. 96–99.
- Read, P. E. and Preece, J. E. (2003) 'Environmental management of optimizing micropropagation', *Acta horticulturae*, (616), pp. 129–133.
- Reich, L. (2013) 'Plant hormones, natural or synthetic, can help cuttings take root' *The Associated Press*. Available at: http://www.huffingtonpost.ca/2013/07/09/plant-hormones-natural-o_n_3567961.html (Accessed January 10, 2020).
- Roy, J. and Banerjee, N. (2003) 'Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f.', *Scientia Horticulturae*. Elsevier, 97(3–4), pp. 333–340. doi: 10.1016/S0304-4238(02)00156-5.
- Salehi, H. and Khosh-Khui, M. (1997) 'A simple procedure for disinfection of "Baby Masquerade" miniature rose explants', *Scientia Horticulturae*, 68(1), pp. 145–148. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00978-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00978-8).
- Salehi, H. and Khosh-Khui, M. (1996) 'Micropropagation of miniature rose cultivars', *Iran Agricultural Research*, 15, pp. 51–67.
- Van der Salm, T. P. M., Van der Toorn, C. J. G., Hänisch ten Cate, C. H., Dubois, L. A. M., De Vries, D. P. and Dons, H. J. M. (1994) 'Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L.

“Moneyway”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37(1), pp. 73–77. doi: 10.1007/BF00048120.

- Seema, N., Khan, K. Y., Zakaria, M. and Fazal, H. (2012) ‘Efficient callogenesis and Shoot organogenesis from nodal explants of *Rosa hybrida* L. (Lovely girl)’, *Journal of research in Biology*, 2(4), pp. 296–302. Available at: www.ficuspublishers.comwww.jresearchbiology.comhttp://jresearchbiology.com/.
- Senapati, S. K. and Rout, G. R. (2008) ‘Study of culture conditions for improved micropropagation of hybrid rose’, *Horticultural Science*, 35(1), pp. 27–34.
- Shabbir, A., Hameed, N., Ali, A. and Bajwa, R. (2009) ‘Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa Indica* L.)’, *Pakistan Journal of Botany*, 41(6), pp. 2877–2882.
- Shirdel, M. and Matloobi, M. (2013) ‘Effects of Nodal Position and Growth Regulators on *In vitro* Growth of Dog Rose (*Rosa canina*)’, *Journal of Ornamental Plants*, 3(1), pp. 9–17.
- da Silva, J., Winarto, B., Dobránszki, J. and Zeng, S. (2015) ‘Disinfection procedures for *in vitro* propagation of Anthurium’, *Folia Horticulturae*, 27(1), pp. 3–14. doi: 10.1515/fhort-2015-0009.
- Skoog, F. and Miller, C.O. (1957) ‘Chemical regularion of growth and organ formation in plant fissue cultured’, *In vitro Symposia of the Society for Experimental Biology*, v.11, p.118-131.
- Small, C. C. and Degenhardt, D. (2018) ‘Plant growth regulators for enhancing revegetation success in reclamation: A review’, *Ecological Engineering*, 118, pp. 43–51. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.04.010>.
- Smith, R. H. (2013) ‘Media components and preparation’, in *Plant Tissue Culture*. Academic Press, pp. 31–43.
- Sugiyama, M. (2015) ‘Historical review of research on plant cell dedifferentiation’, *Journal of Plant Research*. Springer-Verlag Tokyo, 128(3), pp. 349–359. doi: 10.1007/s10265-015-0706-y.
- Tafazoli, M., Mohammad, S., Nasr, H., Jalilvand, H. and Bayat, D. (2013) ‘Plant regeneration through indirect organogenesis of chestnut (*Castanea*

sativa Mill.)’, *African Journal of Biotechnology*, 12(51), pp. 7063-7069–7069. doi: 10.5897/AJB11.2696.

- Tarrahi, R. and Rezanejad, F. (2013) ‘Callogenesis and production of anthocyanin and chlorophyll in callus cultures of vegetative and floral explants in *Rosa gallica* and *Rosa hybrida* (Rosaceae)’, *Turkish Journal of Botany*, 37, pp. 1145–1154. doi: 10.3906/bot-1205-42.
- Tawfik, A., Ibrahim, O., Abdul-Hafeez, E. and Ibrahim, S. (2018) ‘Optimizing micropropagation protocol for *Rosa hybrida* cv. Eiffel Tower with improved *in vitro* rooting ability’, *Egyptian Journal of Horticulture*. Egypt’s Presidential Specialized Council for Education and Scientific Research, 45(2), pp. 323–335. doi: 10.21608/ejoh.2018.4906.1075.
- Te-chato, S., Thanyaporn, S. and Sontikul, Y. (2006) ‘Cultivar, explant type and culture medium influencing embryogenesis and organogenesis in *Anthurium* spp’, *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 28(4), pp. 712–722.
- Teixeira da Silva, J. A., Winarto, B., Dobránszki, J. and Zeng, S. (2015) ‘Disinfection procedures for *in vitro* propagation of *Anthurium*’, *Folia Horticulturae, The Journal of Polish Society for Horticultural Sciences*, 27(1), pp. 3-14. doi: 10.1515/fhort-2015-0009.
- Thorpe, T. A. and Stasolla, C. (2001) ‘Somatic embryogenesis’, in *Current trends in the embryology of angiosperms*. Kluwer Academic Publishers, pp. 279–336.
- Tulecke, W. and Nickell, L. G. (1959) ‘Production of Large Amounts of Plant Tissue by Submerged Culture’, *Science*. American Association for the Advancement of Science, 130(3379), pp. 863–864. doi: 10.1126/science.130.3379.863.
- Unknown (2013) *Dibujo de Rosal de Te Mister Lincoln Hybrid para colorear*. Available at: <http://www.supercoloring.com/es/dibujos-para-colorear/rosal-de-te-mister-lincoln-hybrid> (Accessed: 22 January 2020).
- Valles, M. and Boxus, P. (1987a) ‘Micropropagation of several *Rosa hybrida* L. cultivars’, *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science, Leuven, Belgium, (212), pp. 611–618. doi: 10.17660/ActaHortic.1987.212.102.

- Valles, M. and Boxus, P. (1987b) ‘Regeneration from rosa callus’, *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science, Leuven, Belgium, (212), pp. 691–696. doi: 10.17660/ActaHortic.1987.212.118.
- Vijayan, K., Tikader, A., Teixeira da Silva, J. A. and Teixeira, J. A. (2011) ‘Application of Tissue Culture Techniques for Propagation and Crop Improvement in Mulberry (*Morus* spp.)’, *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 5(1), pp. 1–13.
- Vijayan, K., Chakraborti, S. P. and Roy, B. N. (1998) ‘Regeneration of plantlets through callus culture in mulberry’, *Indian Journal of Plant Physiology*, 3, pp. 310–313.
- Wikipedia (2019a) *1-Naphthaleneacetic acid*. Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/1-Naphthaleneacetic_acid (Accessed: 21 January 2020).
- Wikipedia (2019b) *Indole-3-butyric acid*. Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Indole-3-butyric_acid (Accessed: 21 January 2020).
- Wikipedia (2020) *Rose*. Available at: <https://en.wikipedia.org/wiki/Rose> (Accessed: 21 January 2020).
- Zimmerman, J. L. (1993) ‘Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants.’, *The Plant Cell*. American Society of Plant Biologists, 5(10), pp. 1411–1423. doi: 10.1105/tpc.5.10.1411.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Γαλάτης, Β., Γανωτάκης, Δ., Γκανή - Σπυροπούλου, Κ., Καραμπουρνιώτης, Γ., Κοτζαμπάσης, Κ., Κωνσταντινίδου, Ε. Ι., Μανέτας, Ι. και Ρουμπελάκη - Αγγελάκη, Κ. (2003) ‘Βιοτεχνολογία Φυτών’, *Φυσιολογία φυτών: Από το μόριο στο περιβάλλον*. 1^η Έκδοση, Αθήνα: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σσ. 621–658.

- Γιαγνάμ Ταράση, Μ. (2015) *Προοπτικές ανάπτυξης διεθνούς κόμβου εφοδιασμού και εμπορίας ανθέων και φυτών στην Ελλάδα*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Κίντζιος, Σ. (2015) 'Εισαγωγή στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών', σσ. 10–40, 50–59.
- Taiz, L., Zeiger, E. and Thanos, C. (2012) 'Φυσιολογία Φυτών (Plant Physiology, student textbook in Greek)'. Utopia, σσ. 547–597, 661–778.