

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ-ΦΥΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ

"ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΦΥΤΡΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ
ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ ΣΕ ΟΡΙΑΚΕΣ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ"

Πτυχιακή Διατριβή
της Δημητριάδου Μαρίας του Μιχαήλ



Υπ. Καθηγητής :
Χ.Κ.Γούλας Καθ. Γενετικής Βελτίωσης



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 101/1

Ημερ. Εισ.: 11-09-2003

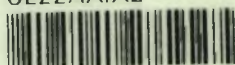
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΓΦΖΠ

1994

ΔΗΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070250

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ-ΦΥΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ

"ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΦΥΤΡΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ
ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ ΣΕ ΟΡΙΑΚΕΣ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ"

Πτυχιακή Διατριβή
της Δημητριάδου Μαρίας του Μιχαήλ

Υπ. Καθηγητής :
Χ.Κ.Γούλας Καθ. Γενετικής Βελτίωσης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελίδα
<u>I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	1
<u>II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	
1. ΓΕΝΙΚΑ	3
2. Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ	
2.1 Γενικά για την καλλιέργεια	5
2.2 Ανάγκες σε θερμοκρασία σε κάθε στάδιο (ιδιαίτερα για τη βλάστηση)	6
2.3 Η ανάγκη δημιουργίας ποικιλιών ανθεκτικών στις χαμηλές θερμοκρασίες. Σημασία στην χώρα μας.	9
3. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	10
4. ΣΚΟΠΟΣ	16
<u>III. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	
1. ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	17
2. ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	17
2.1 Έλεγχος σε χαμηλές θερμοκρασίες	18
2.2 Έλεγχος σε οριακές θερμοκρασίες	18
2.3 Ανάλυση-Επεξεργασία δεδομένων	19
3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ	
3.1 Θεωρητικό υπόβαθρο	19
3.2 Πειραματική διαδικασία	
3.2.1 Δημιουργία περαματικού υλικού	21
3.2.2 Ετοιμασία διαλυμάτων	21
3.2.3 Αναλυτική διαδικασία	24
<u>IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	
1. ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	30
2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	35
<u>V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	37
<u>VI. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</u>	39
(Πίνακες, Σχήματα και Εικόνες από παραπομπές του κειμένου)	

Ι.ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πρόβλημα της βλάστησης και πρώτης ανάπτυξης των φυτών σε θερμοκρασίες κάτω των κανονικών (οριακές ή χαμηλότερες) απασχόλησε και απασχολεί τους ασχολούμενους με τη βελτίωση των φυτών, ιδιαίτερα εκείνων των ειδών που κατάγονται από τροπικές περιοχές. Η δημιουργία γενοτύπων καλλιεργούμενων φυτών με ικανότητα βλάστησης και πρώτης ανάπτυξης σε συνθήκες θερμοκρασίας χαμηλότερες από τις κανονικές ή οριακές, έχει σημασία διότι :

- 1)θα μπορούν αυτά τα καλλιεργούμενα είδη να εγκατασταθούν σε περιοχές του κόσμου όπου οι καιρικές συνθήκες δεν είναι οι ευνοϊκότερες και
- 2)θα μπορεί να μετατοπίζεται, στις περιοχές όπου ήδη καλλιεργούνται, η σπορά τους σε πιο πρόωμη ημερομηνία με αποτέλεσμα μεγαλύτερη βλαστική περίοδο που συνεπάγεται μεγαλύτερη απόδοση.

Ειδικά το καλαμπόκι, που θεωρείται φυτό τροπικών περιοχών και καλλιεργείται σε μια συγκεκριμένη ζώνη, όπου το κλίμα χαρακτηρίζεται από θερμό καλοκαίρι και μεγάλο ύψος βροχόπτωσης, είναι ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας η καλλιέργειά του να επεκταθεί βορειότερα, π.χ. Β.Ευρώπη, ή να χρησιμοποιηθούν γενοτύποι μεγάλου βλαστικού κύκλου μετατοπίζοντας τη βλαστική περίοδο με σπορά πολύ πρόωμη, δηλαδή σε θερμοκρασίες ανοιξέως, που είναι κάτω από τις κανονικές. Σε περιοχές, όπως η Ελλάδα, όπου το καλαμπόκι καλλιεργείται με επιτυχία χωρίς οι συνθήκες να είναι οι πλέον ιδανικές, η δυνατότητα σποράς το Μάρτιο θα είχε ιδιαίτερη οικονομική σημασία. Θα επέτρεπε την επέκταση της καλλιέργειας στις βορειοδυτικές και άλλες ορεινές περιοχές της χώρας, με υβρίδια μεγάλου βλαστικού κύκλου, με αποτέλεσμα την αύξηση των αποδόσεων, ενώ στις πεδινές περιοχές δεν θα χρειαζόταν η κατανάλωση ενέργειας για ξήρανση.

Όλα τα πιά πάνω απαιτούν την ύπαρξη βελτιωμένων γενοτύπων καλαμποκιού.

Έγινε αξιολόγηση γενοτύπων καλαμποκιού (καθαρών σειρών και υβριδίων) για μιά πρώτη διερεύνηση διαφορών ως προς την ικανότητά τους να βλαστάνουν σε συνθήκες θερμοκρασίας χαμηλότερες από τις κανονικές. Η διερεύνηση έγινε με τη συμβατική μεθοδολογία, δηλαδή έγινε πείραμα σε δύο διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (8°C και 12°C), και μια προσέγγιση με τις σύγχρονες μεθόδους της Μοριακής Βιολογίας για διαφορές στο επίπεδο του DNA.

Παρατηρήθηκαν διαφορές στην βλάστηση και στην πρώτη ανάπτυξη, σε μη κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας, ανάμεσα στα υβρίδια και στις καθαρές σειρές, με κάποιο σαφές πλεονέκτημα των υβριδίων έναντι των καθαρών σειρών. Επίσης η βλάστηση και η πρώτη ανάπτυξη ήταν βραδύτερες κατά την χαμηλότερη θερμοκρασία (8°C), ενώ η ταχύτητά τους αυξήθηκε όταν αυξήθηκε η θερμοκρασία (12°C). Οι παρατηρήσεις από την μοριακή προσέγγιση δεν έδειξαν σαφή διαφορά στο επίπεδο DNA ανάμεσα στα υβρίδια και στις σειρές-γονείς.

II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΓΕΝΙΚΑ

Το καλαμπόκι καλλιεργείται σε 115 εκατομμύρια στρέμματα περίπου ή πάνω από 15% της παγκόσμιας καλλιεργούμενης έκτασης με σιτηρά. Η μέση παγκόσμια απόδοση πλησιάζει τα 300κιλά/στρέμμα. Σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να ξεπεράσει τα 1200 κιλά και έχουν επιτευχθεί αποδόσεις πάνω από 2000κιλά/στρέμμα (Σφήκας, 1991).

Η καλλιέργεια του αραβοσίτου στην Ελλάδα κατέχει ετησίως περί το 1,5 εκατομμύριο στρέμματα (700000 στη Μακεδονία, 200000 στη Στερεά Ελλάδα και 300000 στη Θράκη) με παραγωγή πάνω από 600000 τόννους. Οι οικολογικές συνθήκες της Ελλάδας δεν είναι πολύ ευνοϊκές για την αναπτύξη του. Ιδίως λείπει η βροχόπτωση, γι'αυτό απαιτείται άρδευση, η οποία εφαρμόζεται στα 2/3 περίπου της εκτάσεως. Σε 200000 περίπου στρέμματα εφαρμόζεται συγκαλλιέργεια καλαμποκιού, ιδίως με φασόλια (Σφήκας, 1991).

Το καλαμπόκι είναι το κυριότερο εαρινό σιτηρό της Ελλάδας, καλλιεργούμενο κυρίως για ζωοτροφή. Σπέρνεται και ως δεύτερη καλλιέργεια (επίσπορος) μέσα στο ίδιο έτος, αμέσως μετά από χειμερινά ψυχανθή ή σιτηρά. Στην περίπτωση αυτή εντατικής γεωργίας, χρησιμοποιούνται κατάλληλα υβρίδια μικρού βιολογικού κύκλου, ισχυρή λίπανση και άρδευση. Καλλιεργείται επίσης και για παραγωγή χλωρού χόρτου ή ενσίρωσης (σανοδοτικός). Γενικά με ευνοϊκές συνθήκες, δηλαδή μεγάλη βλαστική περίοδο, άζωτο, νερό και τα κατάλληλα απλά υβρίδια το καλαμπόκι αποτελεί το πιο παραγωγικό σιτηρό. Η απόδοσή του σε βιομάζα ανά μονάδα επιφανείας εδάφους με πυκνούς πληθυσμούς και άριστες συνθήκες καλλιέργειας είναι πολύ μεγάλη (Σφήκας, 1991).

Η σπορά του αραβοσίτου γίνεται την άνοιξη, ακόμα και στις θερμές περιοχές. Για την εκλογή της εποχής σποράς λαμβάνεται υπόψη η θερμοκρασία του εδάφους, η οποία πρέπει να περάσει τους 10°C. Στην Ελλάδα η σπορά γίνεται το Μάρτιο στη Νότια και τον Απρίλιο στη Β.Ελλάδα. Ως δεύτερη καλλιέργεια (επίσπορος αραβόσιτος) η σπορά γίνεται Ιούνιο-Ιούλιο. Η πρώτη σπορά πρέπει να προτιμάται γιατί εξασφαλίζει μεγαλύτερες αποδόσεις επειδή τα φυτά εκμεταλλεύονται τον δροσερό και υγρό καιρό στην περίοδο της βλαστικής αυξήσεως και τις μετέπειτα προσφορότερες συνθήκες επικονιάσεως (πριν τις μεγάλες ζέστες).

Γενικά, με την πρώιμη σπορά έχουμε καλύτερη εκμετάλλευση των ημερών και μετατόπιση της κριτικής περιόδου από τον Ιούλιο στον Ιούνιο, τότε που υπάρχει μεγαλύτερη επάρκεια σε νερό λόγω της υψηλότερης μέσης βροχόπτωσης κατά μέσον όρο τον μήνα αυτό. Επίσης με την πρώιμη σπορά έχουμε νωρίτερη ελευθέρωση του χωραφιού το φθινόπωρο και αποφυγή της χρήσης ξηραντηρίου επειδή ο σπόρος έχει την υγρασία που πρέπει να έχει για να αποθηκευτεί, κατά την περίοδο της συγκομιδής του. Στις ψυχρότερες περιοχές η πρώιμη σπορά εξασφαλίζει πρώιμη ωρίμανση και λιγότερους κινδύνους κατά τη συγκομιδή.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν μια πρώτη μελέτη της δυνατότητας γενοτύπων καλαμποκιού να αναπτυχθούν σε συνθήκες χαμηλότερες του ορίου.

2. Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ

2.1 Γενικά για την καλλιέργεια

Ο *William Cobbett*, διακεκριμένος συγγραφέας, γεωπόνος και αγρότης της Νέας Υόρκης κατά το πρώτο τέταρτο του 19ου αιώνα, περιέγραψε το φυτό του καλαμποκιού όχι μόνο σαν "την μεγαλύτερη ευλογία στη χώρα" αλλά επίσης ως "την μεγαλύτερη ευλογία που ο Θεός έδωσε ποτέ στον άνθρωπο" (*Stoskopf*, 1985). Η εξάπλωσή του ως σήμερα ανά τον κόσμο δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό αυτό.

Η καλλιέργεια του καλαμποκιού θεωρείται η πιο σημαντική αμέσως μετά την καλλιέργεια του σιταριού για όλο τον κόσμο. Η συνολική παγκόσμια παραγωγή υπερβαίνει τα 400 εκατομμύρια μετρικούς τόννους. Κατάγεται από την Αμερικάνικη ήπειρο όπου αποτελούσε το κύριο φυτό της διατροφής των Ινδιάνων οι οποίοι το καλλιεργούσαν επί πολλούς αιώνες πριν από την ανακάλυψη της Αμερικής. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου οι Ινδιάνοι δημιούργησαν αρκετούς τύπους καλαμποκιού (*Καλτσίκης*, 1992).

Το καλαμπόκι είναι φυτό με ευρύτατη διάδοση. Η καλλιέργειά του εκτείνεται από 58° Β.Π. στον Καναδά και στην πρώην Ε.Σ.Σ.Δ. μέχρι 40° Ν.Π. Καλλιεργείται σε περιοχές που βρίσκονται χαμηλότερα από την επιφάνεια της θάλασσας, κοντά στην Κασπία και σε περιοχές που έχουν υψόμετρο 4000 μ., πάνω στις Άνδεις του Περού (*Φασούλας-Σενλόγλου*, 1966).

Το μισό και παραπάνω από το καλαμπόκι που παράγεται στον κόσμο καλλιεργείται στις Η.Π.Α. Άλλες χώρες που παράγουν πολύ καλαμπόκι είναι η πρώην Ε.Σ.Σ.Δ., η Βραζιλία, το Μεξικό, η Αργεντινή, η Ιταλία, η Γιουγκοσλαβία, η Ουγγαρία, η Κίνα, η Ινδία (*Φασούλας-Σενλόγλου*, 1966).

Το καλαμπόκι ανήκει στα *Gramineae* στη φυλή *Maydeae* που περιλαμβάνει επτά γένη. Ένα από τα γένη αυτά είναι το γένος *Zea* στο οποίο υπάγεται το καλαμπόκι (*Zea mays*). Έχει σωματικό χρωμοσωμικό αριθμό $2n=20$. Είναι φυτό μόνοικο, δικλινές. Η ταξιανθία είναι φόβη στα αρσενικά άνθη και στάχυς ή σπάδικας στα θηλυκά άνθη. Το φυτό έχει 1-3 σπάδικες ανάλογα με τον τύπο του καλαμποκιού. Το μέγεθος και το σχήμα του κόκκου ποικίλει πάλι ανάλογα με τον τύπο (*Γαλιανοπούλου*, 1992, 2).

2.2 Ανάγκες σε θερμοκρασία σε κάθε στάδιο (ιδιαίτερα κατά τη βλάστηση και την πρώτη ανάπτυξη)

Τα αίτια της μεγάλης εξάπλωσης της καλλιέργειας του καλαμποκιού είναι δύο: 1) είναι ένα από τα πιο παραγωγικά φυτά και 2) έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται σε περιβάλλοντα με μήκος βλαστικής περιόδου που κυμαίνεται μέσα σε ευρύτατα όρια. Αν και η προσαρμοστικότητα του καλαμποκιού είναι μεγάλη και η καλλιέργειά του είναι δυνατή σε πολλές χώρες, οι ιδεώδεις εδαφοκλιματικές συνθήκες για το φυτό αυτό απαντώνται σε λίγες μόνο περιοχές του κόσμου. Στις υπόλοιπες περιοχές όπου καλλιεργείται το καλαμπόκι, είτε η βροχόπτωση δεν είναι αρκετή, είτε οι θερινές θερμοκρασίες είναι χαμηλότερες ή υψηλότερες από ότι χρειάζεται για την κανονική του ανάπτυξη. Χαρακτηριστική είναι η απουσία του καλαμποκιού από τη γεωργία της Β.Δ.Ευρώπης, όπου το δροσερό και σχετικά σύντομο καλοκαίρι δεν επιτρέπει στο καλαμπόκι να ανταγωνιστεί σε απόδοση τα χειμωνιάτικα σιτηρά. Ως φυτό τροπικών περιοχών που είναι, το καλαμπόκι, έχει αρκετά υψηλές απαιτήσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η ελάχιστη θερμοκρασία στην οποία είναι δυνατό να βλαστήσουν οι σπόροι είναι 10°C, αλλά η βλάστηση είναι βραδύτατη, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες η ταχύτητα του φυτρώματος αυξάνει. Μέχρις ότου τα φυτά αποκτήσουν ύψος 15εκ. περίπου, μπορούν να αντέξουν σε ελαφρούς παγετούς. Αργότερα, ο πιο ελαφρύς παγετός επιφέρει το θάνατο, τουλάχιστο στις περισσότερες ποικιλίες. Παρατεταμένες χαμηλές θερμοκρασίες μεταξύ 6°C και 7°C είναι επίσης θανατηφόρες για τις περισσότερες ποικιλίες (Φασούλας-Σενλόγλου, 1966) (βλέπε επίσης και σχήμα 1, παράρτημα).

Γενικά το καλαμπόκι είναι φυτό που αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε σχετικά ζεστά περιβάλλοντα. Περιοχές όπου η μέση θερμοκρασία του θέρους είναι κάτω από 19°C και η μέση νυχτερινή θερμοκρασία κάτω των 13°C δεν είναι πολύ κατάλληλες για το καλαμπόκι. Εξάλλου, πολύ ζεστές περιοχές, αυτές που έχουν μέση θερμοκρασία ανώτερη των 27°C, είναι επίσης ακατάλληλες, ιδίως όταν οι υψηλές θερμοκρασίες συνοδεύονται και από ξηρασία. Ιδιαίτερη ευαισθησία στις υψηλές θερμοκρασίες παρουσιάζει το καλαμπόκι κατά την εποχή της ανθίσεως. Πάντως, υπάρχουν μεγάλες διαφορές στο σημείο αυτό ανάμεσα στις διάφορες ποικιλίες (Φασούλας-Σενλόγλου, 1966).

Ειδικότερα, για κάθε στάδιο ξεχωριστά, οι ανάγκες σε θερμοκρασία θα αναφερθούν παρακάτω. Μεγαλύτερη ανάλυση θα γίνει όσον αφορά το στάδιο πριν από το φύτευμα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του κολεόπτυλου και την πρώτη ανάπτυξη.

1. Πριν από την σπορά

Η υγρασία που υπάρχει στο έδαφος πριν από την προετοιμασία του, την άνοιξη, εξαρτάται από τις καιρικές συνθήκες που επικράτησαν κατά τον χειμώνα, δηλαδή τις βροχοπτώσεις και τη θερμοκρασία. Η θερμοκρασία κατά τους χειμερινούς μήνες είναι επίσης σημαντική για τα έντομα και τις ασθένειες έτσι η κάλυψη του εδάφους με χιόνι είναι αποτελεσματική κατά των ασθενειών και των εντόμων εξαιτίας της ρυθμιστικής δράσης του στη θερμοκρασία του εδάφους. Επίσης, εκτός από τις βροχοπτώσεις του χειμώνα, πολύ σημαντικές μπορεί να είναι οι βροχοπτώσεις νωρίς την άνοιξη, όσον αφορά την αύξηση των αποθεμάτων νερού στο έδαφος. Φυσικά όσο προχωρά η άνοιξη και αυξάνουν οι θερμοκρασίες αυξάνει και η εξάτμηση, άρα αυξάνονται και οι ανάγκες του σπόρου σε νερό για να φυτρώσει (Shaw, 1988).

2. Από την σπορά ως το φύτερωμα

Η περίοδος από την σπορά ως το φύτερωμα εξαρτάται από τη θερμοκρασία, υγρασία, αερισμό του εδάφους καθώς και την ρύμη του σπόρου. Πρώτο στάδιο στη βλάστηση είναι η προσρόφηση νερού. Όταν ο σπόρος, εφόσον επικρατήσουν κατάλληλες συνθήκες, απορροφήσει επαρκή ποσότητα νερού, αρχίζει η δραστηριοποίηση ορισμένων ενζύμων με τα οποία γίνεται η υδρόλυση των αποθησαυριστικών ουσιών· ακολουθεί η μεταφορά των προϊόντων υδρόλυσης με διαπήδηση στα αυξανόμενα τμήματα του εμβρύου και η ανάπτυξη του εμβρύου σε νεαρό φυτό. Με την πρόσληψη νερού μαλακώνει το περίβλημα του σπόρου, επέρχεται διόγκωση του σπόρου και υδρόλυση των ουσιών (Γαλανοπούλου, 1992, 1). Με υψηλότερες θερμοκρασίες λιγότερο νερό χρειάζεται να απορροφηθεί και έτσι η βλάστηση αρχίζει νωρίτερα (Shaw, 1988).

Ο χρόνος από τη σπορά μέχρι τη βλάστηση ποικίλει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες κυρίως και λιγότερο με το βάθος σποράς. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου η ανάπτυξη επηρεάζεται άμεσα από τη θερμοκρασία εδάφους και έμμεσα από τη θερμοκρασία αέρος. Οι Benson και Thompson (1974) βρήκαν ότι οι υψηλότερες αποδόσεις στην Ιowa επιτεύχθηκαν με σπορά τον Απρίλιο ή πρώιμη τον Μάιο, έχοντας σημαντικά μειωμένες αποδόσεις με όψιμη σπορά τον Μάιο. Στις κύρια παραγωγικές περιοχές των Η.Π.Α., η σπορά του καλαμποκιού, μέχρι τα τελευταία χρόνια, ξεκινούσε όταν η μέση θερμοκρασία αέρα πλησίαζε τους 12°C με 14°C. Αυτό ξεκινούσε από νωρίς το Φεβρουάριο στα Νότια μέχρι τα μέσα Μαΐου στα Βόρεια. Αυτές οι ημερομηνίες αντιπροσωπεύουν τα χωράφια με την πρωιμότερη καλλιέργεια. Πρόσφατα έγινε μιά προσπάθεια για μιά κάπως πιο πρώιμη σπορά στα Βόρεια, όταν οι μέσες θερμοκρασίες αέρα ήταν κοντά στους 10°C με 12°C.

Οι *Nield* και *Richman* (1981) χρησιμοποίησαν 12,7°C για θερμοκρασία σποράς. Ιδανική βλάστηση και φύτευμα επιτυγχάνονται όταν οι θερμοκρασίες πλησιάζουν τους 20°C με 22°C. Η βλάστηση επηρεάζεται από την θερμοκρασία και την υγρασία εδάφους. Ο *Coffman* (1923) βρήκε ότι το καλαμπόκι βλαστάνει καλύτερα σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 10°C με μιά οξεία πτώση στη βλάστηση σε θερμοκρασίες μικρότερες από 10°C. Σύμφωνα με τους *Wallace* και *Bressman* (1937) το καλαμπόκι συνήθως φυτρώνει σε 8 με 10 ημέρες σε μιά μέση θερμοκρασία των 16°C με 18°C, αλλά χρειάζεται 18 με 20 ημέρες σε θερμοκρασίες 10°C με 13°C. Οι *Baker* και *Swan* (1966) βρήκαν ότι με μιά μέση θερμοκρασία αέρα των 10°C, η θερμοκρασία εδάφους στα 5 εκ. βάθος ήταν επίσης πολύ κοντά στους 10°C.

Όσον αφορά το φύτευμα στις συνθήκες που επικρατούν στην Ελλάδα, σύμφωνα με τον *Σφήκα* (1991), ο σπόρος του καλαμποκιού χρειάζεται θερμοκρασία πάνω από 10°C για να φυτρώσει. Με θερμοκρασία 21°C και επαρκή υγρασία ο σπόρος φυτρώνει σε 5-6 ημέρες. Σε θερμοκρασία 15-18°C το φύτευμα διαρκεί 8-10 ημέρες και σε 10-12°C διαρκεί 18-20 ημέρες.

3. Τα υπόλοιπα στάδια μετά το φύτευμα

Κατά το στάδιο από το φύτευμα μέχρι την διαφοροποίηση των ανθέων το φυτό είναι υποκείμενο σε δύο διαφορετικά περιβάλλοντα, την ατμόσφαιρα και το έδαφος. Η αντοχή του στο ψύχος είναι μεγαλύτερη σε μικρή ηλικία (ως ύψος 15 εκ. περίπου) και λιγοστεύει με την πάροδο του χρόνου. Νεαρά φυτά μπορούν να υποστούν ελαφρούς παγετούς, ενώ τα αναπτυγμένα αναστέλλουν την αύξησή τους κάτω από 13°C και παθαίνουν σοβαρές ζημιές αν η θερμοκρασία παραμείνει για αρκετές μέρες κάτω από 10°C (*Σφήκας*, 1991).

Κατά το στάδιο από την επιμήκυνση του βλαστού μέχρι την εμφάνιση των μεταξιών, θερμοκρασίες πάνω από το κανονικό μειώσαν την απόδοση, ενώ κάτω από τις κανονικές θερμοκρασίες έδωσαν κανονικές αποδόσεις. Ιδανική θερμοκρασία για αυτό το στάδιο είναι 21-25°C (*Shaw*, 1988).

Η άριστη θερμοκρασία της ημέρας για την αύξηση του αραβοσίτου είναι 24-30°C (μέση θέρους 24°C) και της νύκτας 14-15°C. Ζεστές νύχτες συντελούν σε απώλεια ξηράς ουσίας (αυξημένη αναπνοή) και συνεπώς μικρότερη απόδοση. Μέση θερμοκρασία θέρους κάτω από 19°C και νύκτας 13°C θεωρούνται όχι ευνοϊκές για την ανάπτυξη του αραβοσίτου. Και οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες, ιδίως με έλλειψη υγρασίας, μπορούν να ζημιώσουν τον αραβόσιτο. Έτσι, σε περίοδο ξηρασίας, θερμοκρασία υψηλότερη των 27°C συντελεί σε καθυστέρηση της αναπτύξεως του φυτού (*Σφήκας*, 1991).

2.3 Η ανάγκη δημιουργίας ποικιλιών ανθεκτικών στις χαμηλές θερμοκρασίες. Σημασία στην χώρα μας.

Γενικά η δημιουργία ποικιλιών με δυνατότητα βλάστησης και πρώτης ανάπτυξης σε χαμηλές (κάτω των οριακών) θερμοκρασίες έχει μεγάλη σημασία για πολλές καλλιέργειες. Ιδιαίτερα για την καλλιέργεια του καλαμποκιού που είναι αρκετά διαδεδομένη και θεωρείται φυτό τροπικών περιοχών, ένα τέτοιο επίτευγμα θα ήταν υψίστης οικονομικής σημασίας επειδή θα μπορούσε να καλλιεργηθεί το καλαμπόκι και σε περιοχές με πιο χαμηλές θερμοκρασίες όπου δεν καλλιεργείται σήμερα (περιοχές με χαμηλές μέσες θερμοκρασίες το καλοκαίρι). Ένας άλλος λόγος για την ύπαρξη τέτοιων ποικιλιών θα ήταν η πρωιμότερη σπορά του καλαμποκιού με αποτέλεσμα την αύξηση της βλαστικής περιόδου και μεγαλύτερη βλαστική περίοδος επιτρέπει τη χρησιμοποίηση υβριδίων μεγάλου βλαστικού κύκλου που συνήθως σημαίνει μεγαλύτερες αποδόσεις, χαμηλό ποσοστό υγρασίας στο σπόρο κατά τη συγκομδή (αποφυγή χρήσης ξηραντηρίου), ελευθέρωση του χωραφιού νωρίτερα για να γίνουν οι καλλιεργητικές εργασίες της επόμενης καλλιέργειας.

Συγκεκριμένα στην Ελλάδα η σπορά αρχίζει αρχές Απριλίου χωρίς να αποκλείονται και πρώιμες σπορές, τέλη Μαρτίου, στον μακεδονικό κάμπο. Η ύπαρξη όμως υβριδίων με δυνατότητα βλάστησης και πρώτης ανάπτυξης, σε συνθήκες θερμοκρασίας χαμηλότερες από τις κανονικές, θα παρείχε την δυνατότητα σποράς νωρίτερα με αποτέλεσμα καλύτερη βλαστική ανάπτυξη και επικονίαση, και μεταφορά της κριτικής περιόδου πριν από τον Ιούλιο.

Οι ποικιλίες του καλαμποκιού είναι υβρίδια και τα τελευταία χρόνια απλά (μεταξύ δύο καθαρών σειρών). Γίνεται έτσι εκμετάλλευση του φαινομένου της ετέρωσης ή ευρωστίας των υβριδίων (βλέπε επίσης εικόνα 1, παράρτημα). Η ευρωστία των υβριδίων τα επιτρέπει να βλαστάνουν γρηγορότερα σε σχέση με τις καθαρές σειρές. Η ανθεκτικότητα στις χαμηλές θερμοκρασίες, σύμφωνα με τον Καλτσίκη (1992), κληρονομείται και μεταδίδεται στα υβρίδια συνήθως από την μητέρα, ή και από τους δύο γονείς.

3. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η θερμοκρασία είναι ένας σημαντικός οικολογικός παράγοντας που ρυθμίζει την φυσική κατανομή των φυτών και περιορίζει την δυνητική απόδοσή τους. Πολλά από τα σημαντικότερα στον κόσμο καλλιεργούμενα φυτά καλλιεργούνται σήμερα και σε περιοχές πέρα από τις αρχικές της φυσικής τους επιλογής. Βέβαια αυτό έγινε δυνατό με την εργασία βελτιώσεως αλλά οπωσδήποτε η θερμοκρασία είναι περιοριστικός παράγοντας για την απεριόριστη εξάπλωση της καλλιέργειας σε όλα τα περιβάλλοντα. Η βλάστηση και εν συνεχεία η αύξηση και η ανάπτυξη περιορίζεται, στα περισσότερα είδη φυτών, από τις χαμηλές θερμοκρασίες (θερμικές καταπονήσεις-στρες) σε κάποια στάδια του κύκλου ζωής τους. Για να αντιμετωπίσουν αυτό το στρες τα φυτά ανέπτυξαν μηχανισμούς προσαρμοστικότητας, είτε μετά από τροποποίηση φυσιολογικών λειτουργιών, είτε με τη δράση γονιδίων. Η ικανότητα να συνεχίζεται η ανάπτυξη σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι ένας μηχανισμός προσαρμοστικότητας που παρέχει στο είδος ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα μακραίνοντας την περίοδο της αποτελεσματικής ανάπτυξης του ή υποχρεώνοντας το φυτό να αποθεματοποιεί σε ευνοϊκές καιρικές περιόδους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του.

Η διερεύνηση της ανθεκτικότητας των φυτών σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει απασχολήσει αρκετά την έρευνα. Κάποια πρόοδος έγινε αλλά τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας στη βελτίωση των φυτών δεν έχουν ακόμα αποδώσει όσα θα επιθυμούσαμε.

Καθώς οι βελτιωτές φυτών έχουν επιτυχώς διατηρήσει τα επίπεδα αντοχής σε χαμηλές θερμοκρασίες των καλλιεργούμενων φυτών μέσα σε γνωστές περιοχές παραγωγής, προσπάθειες για να εξαπλωθούν σε περιοχές που απαιτούν μεγαλύτερη αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες έχουν γίνει με περιορισμένη επιτυχία. Η αρχική αιτία για αυτή την έλλειψη πλήρους επιτυχίας περιλαμβάνει τα εξής (Fowler et al, 1993) :

(i) η εκμεταλλεύσιμη γενετική παραλλακτικότητα για αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει στο μεγαλύτερο μέρος αρκετά εξαντληθεί στο γνωστό γενετικό απόθεμα των περισσότερων ειδών,

(ii) ένας μεγάλος αριθμός από γονίδια και πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις ελέγχει την έκφραση αυτού του χαρακτηριστικού κάνοντας δύσκολη την επιλογή (ποσοτική κληρονομηση),

(iii) η κοινή μεθοδολογία βελτίωσης δεν επιτρέπει την ακριβή αναγνώριση των γενετικών διαφορών,

(iv) οι μετρήσεις της αντοχής σε χαμηλές θερμοκρασίες στερούνται ακρίβειας ενώ πολλές από αυτές είναι καταστροφικές για το φυτό κάνοντας την επιλογή πολύπλοκη

Η ανθεκτικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι ένα πολύπλοκο ποσοτικό χαρακτηριστικό που εκφράζεται μετά από την έκθεση των φυτών σε θερμοκρασίες οριακές ή χαμηλότερες. Ενώ έχουν γίνει πολλές μελέτες δεν υπάρχει συμφωνία μεταξύ των ερευνητών για τον τρόπο δράσης του γονιδίου που ελέγχει την έκφραση αυτού του χαρακτήρα. Κατά καιρούς έχουν διατυπωθεί διάφορες απόψεις όπως ότι η αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες καθορίζεται από γονίδια που δρουν ως υποτελή, ως αθροιστικά, ως μερικώς κυρίαρχα ή ακόμα και ως υπερκυρίαρχα.

Τα αποτελέσματα διαφόρων ερευνητικών εργασιών με φυτά μεγάλης καλλιέργειας μπορούν να συνοψιστούν στην παρακάτω γενική εικόνα για τον τρόπο κληρονομιάς, τη δράση των γονιδίων και τις υπάρχουσες πηγές γενετικής παραλλακτικότητας (Fowler et al, 1993).

1.Κυτοπλασματικοί παράγοντες έχουν αναφερθεί ότι ελέγχουν την αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες. Όμως σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες οι κυτοπλασματικές επιδράσεις είναι μικρότερης σημασίας.

2.Γονίδια που παρέχουν επίπεδα αντοχής σε χαμηλές θερμοκρασίες βρίσκονται στα καλλιεργούμενα είδη (υπάρχουσα παραλλακτικότητα), αλλά και σε συγγενή ή μη είδη. Βελτιωτές φυτών έχουν πετύχει ικανοποιητικά να χειριστούν αυτή την παραλλακτικότητα για να διατηρηθούν τα επίπεδα αντοχής στο κρύο των καλλιεργούμενων ποικιλιών.

3.Αν και υπάρχουν παραδείγματα μη αθροιστικής δράσης γονιδίων, η αντοχή στο ψύχος ανάμεσα στα είδη ελέγχεται κύρια από γονίδια με αθροιστική δράση.

4.Η ποσοτική και ποιοτική δράση των γονιδίων που ελέγχουν την ανθεκτικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες σχετίζεται και με το μέγεθος του κυττάρου. Έτσι τα μικρότερα σε μέγεθος κύτταρα αυξάνουν την έκφραση των υπόψιν γονιδίων κατά την διαδικασία εγκλιματισμού.

Η επιλογή για ποσοτικά χαρακτηριστικά, όπως η αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες, μπορεί να απλοποιηθεί, σε προγράμματα γενετικής βελτιώσεως, όταν αυτά είναι συνδεδεμένα με ποιοτικά χαρακτηριστικά (γονίδια σημάσεως). Αυτή η μέθοδος, της αναγνώρισης της γονιδιακής θέσεως των ποσοτικών χαρακτηριστικών (QTL), απαιτεί πλήρη χαρτογράφηση του γενώματος, γεγονός που απαιτεί γονίδια σημάσεως (ποιοτικά χαρακτηριστικά) ή μοριακούς δείκτες. Υπάρχουν δύο τύποι μοριακών δεικτών α) πολυμορφισμοί που προσδιορίζονται με κομμάτια DNA (200-1000 νουκλεοτίδια μήκος) που έχουν δημιουργηθεί από το κόψιμο του DNA με περιοριστικά ένζυμα που είναι γνωστοί ως RFLPs και

β) κομμάτια DNA που λαμβάνονται τυχαία και πολυμερίζονται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας τυχαία ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα DNA (10 νουκλεοτίδια μήκος) ως σημεία έναρξης, τους καλούμενους *primers*, και στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα γίνεται ο διαχωρισμός των ακολουθιών, αυτού του τύπου οι μοριακοί δείκτες είναι γνωστοί ως RAPDs (Fowler et al, 1993).

Συγκρινόμενοι με τους RFLPs που είναι κανονικά συγκυρίαρχοι, οι RAPDs συνήθως κληρονομούνται ως κυρίαρχα αλληλόμορφα. Η δημιουργία RAPD σε σχέση με RFLP έχει επίσης το πλεονέκτημα ότι είναι γρηγορότερη και δεν εμπλέκεται σ'αυτή ραδιενέργεια ή υβριδισμός (Fowler et al, 1993).

Αξιόπιστη εκτίμηση των γονιδιακών θέσεων των ποσοτικών χαρακτηριστικών με RFLPs και RAPDs δείκτες (θέσεις σημάνσεως) κανονικά απαιτεί τη διαθεσιμότητα ισογονιδιακών καθαρών σειρών. Γι'αυτό, εκτός αν είναι διαθέσιμη μια αποτελεσματική μέθοδος δημιουργίας διπλοαπλοειδών, απαιτούνται επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αυτογονιμοποίησης και επιλογής. Ακόμη και με την χρήση διπλοαπλοειδούς υπάρχει η ανάγκη για εκτενή συλλογή πληροφοριών από επαναλαμβανόμενους ελέγχους σε ποικίλα περιβάλλοντα, πριν να μπορέσει να αναγνωριστεί με ακρίβεια ο δείκτης που συνδέεται με την γονιδιακή θέση του ποσοτικού χαρακτηριστικού της αντοχής στις χαμηλές θερμοκρασίες (Fowler et al, 1993).

Μοριακοί δείκτες για γονίδια αντοχής σε χαμηλές θερμοκρασίες θα παρείχαν στους βελτιωτές φυτών νέα αποτελεσματικά εργαλεία για την εκτίμηση και εκμετάλλευση της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ και μέσα στα είδη. Η διαθεσιμότητα των μοριακών δεικτών θα μπορούσε σύμφωνα με τον Fowler (1993):

(i) να επιτρέψει περισσότερο αποτελεσματικά μέσα για την αναγνώριση γονιδίων που καθορίζουν διαφορές στην αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες στο γενετικό υλικό,

(ii) να μειώσει το χρόνο και τη δουλειά για κάθε γενιά ενός βελτιωτικού προγράμματος,

(iii) να απλοποιήσει τις διαδικασίες με το να επιτρέπει μεγαλύτερη χρήση της μεθόδου επαναδιασταύρωσης,

(iv) να επιτρέψει αποτελεσματικότερη επιλογή για απομάκρυνση ανεπιθύμητων συνδεδεμένων γονιδίων και

(v) να απλοποιήσει την επιλογή για επιθυμητές γονιδιακές αλληλεπιδράσεις.

Η γνώση που αποκτάται από γενετικές μελέτες που χρησιμοποιούν μοριακούς δείκτες θα μπορούσε επίσης να εφαρμοστεί (Fowler et al, 1993) για :

(i) να βοηθήσει στην εκτίμηση της θέσης των γονιδίων και του αριθμού των αντιγράφων τους στην έκφραση των γονιδίων στις χαμηλές θερμοκρασίες,

(ii) να βελτιώσει τον τρόπο με τον οποίο κατανοείται η σχέση των γονιδίων στις ομάδες σύνδεσης,

(iii) να διευκολύνει μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας στις χαμηλές θερμοκρασίες ανάμεσα σε συγγενή είδη,

(iv) να βοηθήσει την παραγωγή διαγονιδιακών (transgenics) εμπλέκοντας απομακρυσμένα συγγενή είδη, και

(v) να αναγνωριστούν οι γενετικές αλλαγές που είναι απαραίτητες προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης έκφραση των γονιδίων ανθεκτικότητας σε χαμηλές θερμοκρασίες σε ξένα γενετικά υπόβαθρα.

Εκτός από την προηγούμενη μεθοδολογία έγιναν και άλλες προσπάθειες σε σχέση με την αντοχή στο κρύο. Έτσι δοκιμάστηκε η μέτρηση των επιπέδων του φωσφορονουκλεσιδίου στον βλαστάνοτα σπόρο φυτικών υλικών. Μιά τεχνική εξαγωγής νουκλεσιδίων έχει συνδεθεί με υψηλής εκτέλεσης υγρή χρωματογραφία και εφαρμόζεται στη μέτρηση της τριφωσφορικής αδενοσίνης στα βλαστάνοτα έμβρυα του καλαμποκιού. Σύσχετιση των επιπέδων της ATP του εμβρύου με ποσοστά από έλεγχο βλάστησης στο κρύο επισήμαναν ότι τα επίπεδα της ATP στο έμβρυο ήταν ένας πιο αξιόπιστος τρόπος πρόβλεψης της αντοχής στο ψύχος από τον έλεγχο της βλάστησης σ'αυτό. Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) είναι ένας μεταβολίτης κλειδί που εκφράζεται πρώιμα στη βλάστηση του σπόρου. Είναι ο αρχικός φορέας της χημικής ενέργειας που χρειάζεται για να μεταφερθεί η βιοχημική δυνατότητα ενός σπόρου μέσα στη μεταβολική δράση από ένα δημιουργούμενο φυτό. Στους μη φωτοσυνθετικούς ιστούς ενός βλαστάνοτα σπόρου, η ATP μπορεί να παραχθεί όμοια από την αναπνοή και τη ζύμωση (Schell et al, 1991).

Η αντοχή στο κρύο είναι ένα κληρονομήσιμο αθροιστικό χαρακτηριστικό που είναι επιθυμητό στο καλαμπόκι, από τότε που παρουσιάστηκε η ανάγκη της πρώιμης καλλιέργειας και πολλοί παραγωγοί επιθυμούν να έχουν την σιγουριά ότι μπορούν να καλλιεργούν τους σπόρους του σε κρύα, υγρά εδάφη. Η μελέτη της αντοχής στο κρύο στις περιπτώσεις αγρού είναι δύσκολη γιατί χαμηλές θερμοκρασίες εδάφους και υπερβολική βροχόπτωση, που χρειάζονται για καλές εκτιμήσεις των φυτών, συνήθως απουσιάζουν. Συνεπώς, θα είναι πιο αποτελεσματικό και οικονομικό να εξετάζεται η αντοχή στο κρύο στο καλαμπόκι σε ελεγχόμενες συνθήκες εργαστηρίου.

Από δεδομένα του Schell et al (1991) βγήκε το συμπέρασμα ότι η βλάστηση του σπόρου σε θερμοκρασίες κάτω από τις ιδανικές μπορεί να είναι κρίσιμη στον έλεγχο των σχέσεων ανάμεσα στα επίπεδα της ATP και ακόλουθης βλάστησης ή βλαστικής ρώμης. Αυτά τα αποτελέσματα ήταν συνεπή με αυτά των Standard et al. (1983) που ανακοίνωσαν ότι οι συγκεντρώσεις της ATP σε έμβρυα σιταριού μεταβάλλονταν ανάλογα με τη ρώμη των ομάδων σπόρων όταν οι σπόροι είχαν βλαστήσει σε χαμηλές θερμοκρασίες. Γενικά, υπήρξε καλή συμφωνία μεταξύ των επιπέδων της ATP του εμβρύου και των ποσοστών του ελέγχου της βλάστησης στο κρύο για αυτά τα υβρίδια και οι πληροφορίες έδειξαν ότι η συγκέντρωση της ATP του εμβρύου, όταν αξιολογούνται σε χαμηλή θερμοκρασία βλάστησης, μπορεί να είναι χρήσιμη σαν βιοχημικό εργαλείο για αξιολόγηση της ποιότητας του σπόρου και πιθανόν της αντοχής στο κρύο του καλαμποκιού (Schell et al, 1991).

Οι McConnell και Gardner (1979) μελέτησαν το αποτέλεσμα επιλογής για βλάστηση σε χαμηλές θερμοκρασίες σε δύο πληθυσμούς καλαμποκιού. Σύμφωνα με τα δεδομένα παρουσιάστηκε ουσιώδης πρόοδος για την ικανότητα βλάστησης στους 7,2°C. Άλλα αγρονομικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων της θέσης του βλαστού, του αριθμού αυτιών ανά φυτό, το ύψος ώριμου φυτού, τον έλεγχο βάρους και την ποιότητα σπόρου, δεν μεταβλήθηκαν από την επιλογή για αντοχή στο κρύο.

Η εργασία των McConnell και Gardner (1979) έγινε στο εργαστήριο και στον αγρό. Αν και δεν παρατηρήθηκε βελτίωση όσον αφορά την αντοχή στο κρύο στο πείραμα που έγινε στον αγρό, αυτό δεν σημαίνει κατ'ανάγκη ότι η διαδικασία επιλογής στο εργαστήριο δεν συσχετίζεται με την αντίστοιχη στο χωράφι. Οι συνθήκες στο βλαστητήριο ήταν διατηρημένες σε συνεχή χαμηλή θερμοκρασία και υψηλή περιεχόμενη υγρασία και ήταν εύκολα αναπαραγόμενες, σε αντίθεση μ'αυτές στον αγρό. Συγκεκριμένα, αναφορές δείχνουν ότι η θερμοκρασία εδάφους και στα δύο χρόνια ήταν 10°C και υψηλότερη κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας του Απριλίου· και οποιαδήποτε περίοδος κρύου, υγρού καιρού μετά τη σπορά ήταν μικρής διάρκειας.

Βελτίωση στην ρώμη του σπορόφυτου δεν παρατηρήθηκε στις μελέτες στο χωράφι για κανένα από τους δύο πληθυσμούς, στο πιο πάνω πείραμα (McConnell & Gardner, 1979), και είναι πιθανό η ικανότητα για βλάστηση και η ικανότητα για ανάπτυξη μετά από βλάστηση σε χαμηλές θερμοκρασίες να ελέγχονταν από ξεχωριστούς γενετικούς μηχανισμούς. Δείγματα με την ίδια βλαστική ικανότητα, αλλά με διαφορετικά επίπεδα πρώτης ανάπτυξης, υπονοούν την ύπαρξη δύο διαφορετικών γενετικών συστημάτων.

Αν ο σκοπός ενός προγράμματος βελτίωσης είναι η δημιουργία γενοτύπων υψηλών αποδόσεων, ανθεκτικών στο κρύο, η απόδοση θα έπρεπε επίσης να συμμετέχει στον δείκτη επιλογής (Mock & Bakri, 1976).

Οι Mock και Eberhart (1972) ανακοίνωσαν ότι προβλεπόμενες αντιδράσεις επιλογής έδειξαν ότι η επιλογή στο χωράφι για αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες θα ήταν πιο αποτελεσματική από ότι η επιλογή σε θάλαμο ανάπτυξης. Η επιλογή στο χωράφι πιθανόν να ήταν πιο αποτελεσματική όταν ήταν υπό πλήρως ελεγχόμενες συνθήκες, αλλά επιλέγοντας για αντοχή στο κρύο στο χωράφι όταν το έδαφος δεν είναι κρύο είναι παρόμοιο με το να επιλέγεις για ανθεκτικότητα σε ασθένεια εν απουσία ασθενειών.

Στο χωράφι η επιλογή θα ήταν αποτελεσματική μόνο σε ένα χρόνο από τα τέσσερα ή πέντε, αλλά στο εργαστήριο το περιβάλλον μπορεί να ελέγχεται και προόδος μπορεί να γίνεται κάθε χρόνο. Η ιδανική πορεία στο εργαστήριο δεν έχει πιθανόν παραχθεί, αλλά αν μια τέτοια μπορεί να παραχθεί, υπό υψηλή συσχέτιση με την αντίδραση στο χωράφι κάτω από κρύες, υγρές συνθήκες, ταχύτερη προόδος θα ήταν αποτέλεσμα της πορείας στο εργαστήριο.

Βασισμένοι στα αποτελέσματα αυτού του πειράματος (McConnell & Gardner, 1979) συμπεράναν ότι προόδος μπορεί να αναμένεται, από επιλογή για αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες, σε βελτιωμένους πληθυσμούς καλαμποκιού. Επιλογή για βλάστηση σπόρου σε θερμοκρασίες κάτω από 10°C στο εργαστήριο μπορεί να είναι μία μέθοδος βελτίωσης του επιπέδου αντοχής στο κρύο των πληθυσμών για επακόλουθη βελτίωση των σειρών-γονέων και υβριδίων.

Σε σχήμα επιλογής με αξιολόγηση S1 οικογενειών για αντοχή στο κρύο (Hoard & Crosbie, 1986) μελετήθηκε η έμμεση επίδραση της ανθεκτικότητας σε χαμηλές θερμοκρασίες στα διάφορα αγρονομικά χαρακτηριστικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προηγούμενη επιλογή της S1 σειράς για αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες όχι μόνο βελτίωσε τα χαρακτηριστικά αντοχής στο κρύο, αλλά επίσης είχε σαν αποτέλεσμα σημαντικές αυξήσεις σε επιθυμητές αλληλικές συχνότητες για άλλα σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά. Επιλογή για αντοχή στο κρύο αύξησε τις συχνότητες των πλειοτροπικών ή συνδεδεμένων γονιδίων που ελέγχουν την απόδοση του σπόρου και την υγρασία του και οι αυξημένες συχνότητες ήταν εκφρασμένες όμοια σε πρώιμες και σε κανονικές ημερομηνίες καλλιέργειας.

Από τις παραπάνω αναφορές σε έρευνες φαίνεται η προσπάθεια που καταβάλλεται για βελτίωση στην αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες, σε σχέση με τα χαρακτηριστικά του γενώματος, την ATP και τα αγρονομικά χαρακτηριστικά.

4. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί η αντίδραση γενοτύπων καλαμποκιού (καθαρές σειρές και υβρίδια) σε συνθήκες βλάστησης σε χαμηλές (οριακές ή κάτω των οριακών) θερμοκρασίες και να γίνει μία προσπάθεια μελέτης του μηχανισμού ανθεκτικότητας σε μοριακό επίπεδο.

III. ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν έξι καθαρές σειρές και τρία απλά υβρίδια. Οι καθαρές σειρές ήταν οι B-73 προέλευσης Ιowa και η Mo-17 προέλευσης Missouri, γνωστές καθαρές σειρές που χρησιμοποιούνται σε πολλά από τα εμπορικά υβρίδια, οι ελληνικές καθαρές σειρές 14524 και 33537 δημιουργίες του Ινστιτούτου Σιτηρών. Οι προηγούμενες σειρές είναι όλες μεγάλου βλαστικού κύκλου (ανθοφορία 80-85 ημέρες από τη σπορά). Επίσης δύο καθαρές σειρές A-632 και W-10 προέλευσης Minnesota και Wisconsin αντίστοιχα που είναι μικρού βλαστικού κύκλου και έχοντας δημιουργηθεί σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα αναμένεται να έχουν κάποια ανθεκτικότητα στις χαμηλές θερμοκρασίες σε σχέση με τις προηγούμενες τέσσερις. Τα υβρίδια που χρησιμοποιήθηκαν, με γονείς τέσσερις από τις προηγούμενες σειρές, ήταν:

1. B-73 X Mo-17
2. B-73 X 14524
3. 14524 X 33537

2. ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Ο έλεγχος της ικανότητας των γενοτύπων να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν υπό συνθήκες χαμηλών ή οριακών θερμοκρασιών έγινε σε ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, σε θάλαμο-ψυγείο του εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας έγινε σπορά σε πλαστικά γλαστράκια, τετράγωνα διαστάσεων 10X10X15. Το χώμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν φυτόχωμα και ποσότητα περλίτη. Για να εξασφαλιστεί η ομοιομορφία (βάθος, κλπ.), η σπορά έγινε ως εξής :

Αρχικά στο κάθε γλαστράκι τοποθετήθηκε στρώμα περλίτη ύψους 1εκ. (75ml), για να υπάρχει δηήθηση. Έν συνεχεία τοποθετήθηκε φυτόχωμα 5εκ. (250ml) και πάνω σ' αυτό, στο κέντρο κάθε γλάστρας, ένας σπόρος/γλάστρα. Ο σπόρος σκεπάστηκε με στρώμα φυτοχώματος 1εκ. (50ml) και το κάθε γλαστράκι ποτίστηκε με 50ml νερού, το οποίο ήταν αρκετό για να διαβραχεί όλο το χώμα χωρίς να έχουμε εκροή (σημείο κορεσμού).

Τα γλαστράκια τοποθετήθηκαν σε πειραματική διάταξη, πλήρεις τυχαιοποιημένες ομάδες (RCB) με τέσσερις επαναλήψεις. Το κάθε πειραματικό τεμάχιο αποτελούνταν από πέντε γλαστράκια (βλέπε και εικόνες 2,3,4,5,9,10,11 & 12, παράρτημα).

2.1 Έλεγχος σε χαμηλές θερμοκρασίες

Η σπορά έγινε στις 28/12/93 και η θερμοκρασία στο θάλαμο ρυθμίστηκε στους 8°C. Τα φυτά ποτίζονταν με ίση ποσότητα νερού ανά 2-3 ημέρες.

Είκοσι ημέρες μετά τη σπορά (16/1/94) παρατηρήθηκε ανάπτυξη κολεόπτυλου (κέντρισμα) και στο θάλαμο στις εικοσιδύο ημέρες μετά τη σπορά (18/1/94) δόθηκε πλήρης φωτισμός καθ'όλη τη διάρκεια του 24ώρου.

Τριάντα ημέρες μετά από την σπορά (28/1/94) στις δυο από τις τέσσερις επαναλήψεις έγινε μέτρηση των σπόρων που είχαν αναπτύξει κολεόπτυλο, βαθμολογήθηκε το μέγεθος του κολεόπτυλου και συγχρόνως η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 12°C.

Εικοσιπέντε ημέρες αργότερα (23/2/94) τα φυτά είχαν αναπτυχθεί ανάλογα με τον γενότυπο από 1-15εκ (βλέπε εικόνες 6 & 7, παράρτημα). Έγινε εκτίμηση της πρώτης ανάπτυξης των φυτών (βλέπε εικόνα 8, παράρτημα).

Η εκτίμηση στις πιο πάνω περιπτώσεις έγινε με κριτήριο το μέγεθος (μήκος) του κολεόπτυλου ή το ύψος του σπορόφυτου. Χρησιμοποιήθηκε κλίμακα από το 1-5. Συγκεκριμένα για τα κολεόπτυλα οι σπόροι οι οποίοι ήταν διογκωμένοι με μικρό ή καθόλου κολεόπτυλο βαθμολογούνταν με 1, οι σπόροι που είχαν το μεγαλύτερο σε μήκος κολεόπτυλο βαθμολογούνταν με 5. Με 2,3 και 4 βαθμολογούνταν οι σπόροι που είχαν ενδιάμεσα μήκη κολεόπτυλου. Όσον αφορά το σπορόφυτο, αυτό βαθμολογούνταν ανάλογα με το ύψος. Έτσι όσα είχαν ύψος γύρω στα 1-2εκ. βαθμολογούνταν με 1. Τα σπορόφυτα με το μεγαλύτερο ύψος ή ακόμα κι αυτά που είχαν φύλλα, βαθμολογούνταν με 5. Με 2,3 και 4 βαθμολογούνταν τα σπορόφυτα με ενδιάμεσο ύψος.

2.2 Έλεγχος σε οριακές θερμοκρασίες

Η σπορά έγινε στις 25/2/94, με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως, και η θερμοκρασία στο θάλαμο ρυθμίστηκε στους 12°C. Τα φυτά ποτίζονταν με ίση ποσότητα νερού ανά 2-3 ημέρες.

Οκτώ ημέρες μετά τη σπορά (5/3/94) παρατηρήθηκε ανάπτυξη κολεόπτυλου (κέντρισμα) σε ορισμένους από τους σπόρους και στο θάλαμο δόθηκε πλήρης φωτισμός καθ'όλη τη διάρκεια του 24ώρου. Αξιολόγηση του κολεόπτυλου δεν έγινε αυτή τη φορά γιατί η ανάπτυξή τους ήταν ταχύτατη και δεν θέλαμε να την εμποδίσουμε με κάποια λανθασμένη επέμβαση.

Εικοσιτέσσερις ημέρες μετά τη σπορά (21/3/94) τα φυτά είχαν αναπτυχθεί ανάλογα με το γενότυπο από 1-15εκ (βλέπε εικόνες 13 & 14, παράρτημα). Έγινε εκτίμηση των φυτών, κατά τον ίδιο τρόπο που είχε γίνει και την προηγούμενη φορά, χρησιμοποιώντας και αυτή τη φορά την κλίμακα αξιολόγησης από το 1-5 (βλέπε εικόνα 15, παράρτημα).

2.3 Ανάλυση-Επεξεργασία δεδομένων

Στις παρατηρήσεις από την αξιολόγηση στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (8°C και 12°C) έγινε η ανάλυση παραλλακτικότητας σύμφωνα με το πειραματικό σχέδιο, πλήρεις τυχαιοποιημένες ομάδες (RCB) (Τζώρτζιος, 1991). Η ύπαρξη μικρού αριθμού παρατηρήσεων έκανε εύκολη την ανάλυση των δεδομένων με το χέρι, χωρίς τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή.

3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Απέβλεπε στη σύγκριση καθαρών σειρών και υβριδίων ως προς το γένωμα με την μέθοδο της σύγχρονης μοριακής βιολογίας. Ακολουθήθηκε η μέθοδος που εφαρμόστηκε με επιτυχία στην πατάτα (Gounaris, 1992 & 1993) για την εύρεση της αλληλουχίας των αμινοξέων της πρωτεΐνης που προκαλεί το μαύρισμα της πατάτας κατά την αποθήκευσή της σε χαμηλές θερμοκρασίες (3°C και 9°C). Ακολουθεί περιγραφή της μεθόδου.

3.1 Θεωρητικό υπόβαθρο

Η όλη διαδικασία βασίζεται στον αναδιπλασιασμό της αλυσίδας του DNA ο οποίος γίνεται στο κύτταρο υπό φυσιολογικές συνθήκες. Στη συγκεκριμένη μέθοδο προκαλείται τεχνητά ο αναδιπλασιασμός της αλυσίδας του DNA με τη διοχέτευση κάποιων τμημάτων DNA με 18 βάσεις που καλούνται *primers* και οι οποίοι δίνουν το σήμα έναρξης δημιουργίας νέας αλυσίδας DNA έχοντας σαν εκμαγείο την ήδη υπάρχουσα αλυσίδα και χρησιμοποιώντας για το κτίσιμο της αλυσίδας τα τριφωσφορικά-δεοξυ-νουκλεοτίδια τα οποία προστίθενται στο διάλυμα αντίδρασης.

Στους *primers* κάθε τρίτη βάση υπάρχει πλήθος βάσεων, έτσι ώστε αν το αμινοξύ κωδικοποιούνται από δύο κωδικόνια που διέφεραν στην τρίτη θέση, στην τρίτη θέση να υπάρχουν αυτές οι δύο βάσεις.

π.χ. Έστω η πρωτεΐνη

3' N-Leuk-Isoleuk-Ala-Threo- 5'

Μεταφράζονται σε

κωδ κωδ
T G

AA- G- AT -A- primer με 18 βάσεις

C 2 βάσεις σ'αυτή τη θέση

A

4 βάσεις σ'αυτή τη θέση

Μόνο η μια αλυσίδα χρησιμοποιείται για γένωμα, η άλλη είναι συμπληρωματική.

Ο ένας από τους primers καλείται sense και ο άλλος antisense (από την απέναντι συμπληρωματική αλυσίδα).



Έτσι αφού απομονώθηκε κάποιος πληθυσμός DNA, με τη βοήθεια των primers, έγινε προσπάθεια να βρεθεί το γονίδιο που αποδίδει την ιδιότητα της ανοχής στο κρύο (εύκολη βλάστηση στο κρύο). Για να γίνει η εργασία χρειάζονται πολλοί primers, εδώ υπήρχαν δύο, είναι οι ίδιοι που χρησιμοποιήθηκαν και στην πατάτα (Goumaris, 1992 & 1993), γιατί το κόστος τους είναι μεγάλο καθώς και η απόκτησή τους δύσκολη.

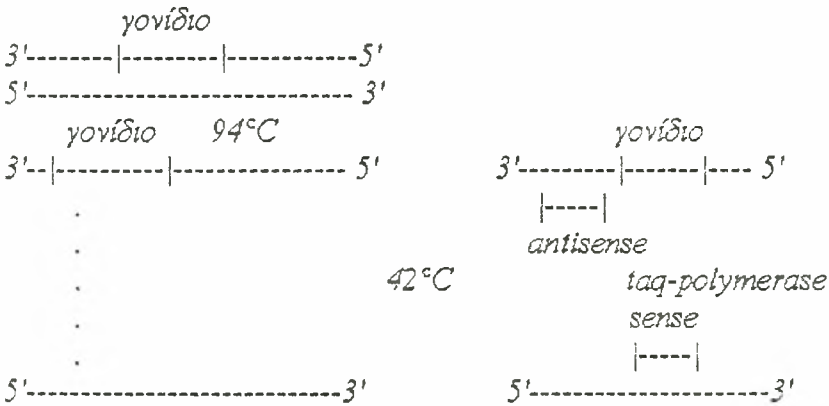
Έτσι ξεκινώντας από μια αρχική αλυσίδα DNA



που υπάρχει στο κύτταρο και που έχει συνήθως μήκος 200-50000 βάσεις. Έστω σ'ένα από τα τεμάχια υπάρχει το γονίδιο (τυχαία):



Βάζοντας το διάλυμα που περιέχει το DNA, εκχύλισμα φυτικών ιστών, υπό θερμοκρασία 94°C οι αλυσίδες του DNA αποχωρίζονται κι έτσι μετά κατεβαίνοντας στους 42°C οι primers βρίσκουν τις θέσεις στο γονίδιο και υβριδίζονται.



Με τη βοήθεια της taq-πολυμεράσης δημιουργούνται νέες διπλές αλυσίδες DNA.

Στους 72°C γίνεται η σύνθεση DNA με την πολυμεράση ξεκινώντας από τους primers. Η σύνθεση της αλυσίδας φτάνει μέχρι 2000-3000 βάσεις και μετά το ένζυμο της taq-πολυμεράσης αποχωρίζεται.

Αυτή η διαδικασία της αύξησης και της μείωσης της θερμοκρασίας γίνεται σε ειδική συσκευή και αυτός ο κύκλος επαναλαμβάνεται ξανά και ξανά αρκετές φορές ούτως ώστε να υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες νέο DNA, με την ύπαρξη σ' αυτό του γονιδίου που ζητείται να βρεθεί. Με τη διαδικασία αυτή πετυχαίνεται ο πολλαπλασιασμός της περιοχής του γονιδίου ανάμεσα στους δύο primers. Αυτό εξαρτάται από την απόσταση των δύο primers (πρέπει να είναι μικρότερη από 3000 βάσεις).

3.2 Πειραματική διαδικασία

3.2.1 Δημιουργία πειραματικού υλικού

Στις 4/3/94 τοποθετήθηκαν σε εννέα δοχεία Petri, πάνω σε διπλό διηθητικό χαρτί το οποίο είχε βραχεί με νερό μέχρι σημείου κορεσμού, 10 σπόροι από κάθε ποικιλία καλαμποκιού που είχαν χρησιμοποιηθεί στο πείραμα με τα γλαστράκια, μια ποικιλία ανά Petri. Τα Petri τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 8,3°C για την ανάπτυξη κολεόπτουλο υπό χαμηλή θερμοκρασία. Στις 23/3/94 που έγινε αλλαγή χαρτιού και νερού είχαν φυτρώσει όλα εκτός από την καθαρή σειρά A-632. Στις 7/4/94 οι σπόροι στα Petri είχαν αναπτύξει αρκετά μεγάλο μεγέθους κολεόπτουλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε αργότερα στο πείραμά (βλέπε εικόνες 16,17,18,19 & 20, παράρτημα).

3.2.2 Ετοιμασία διαλυμάτων

A. Διάλυμα καλούμενο Extraction buffer (δηλαδή διάλυμα εκχύλισης)

Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε σε όγκο 100ml και περιεκτικότητα σε διαλυμένες ουσίες :

50mM tris-HCl,

100mM Na₂-EDTA και

20mM Na-meta-bisulfate

Έγιναν οι αντίστοιχες αναγωγές στον όγκο των 100ml και έτσι χρησιμοποιήθηκαν τελικά :

α) 0,6γρ. tris-HCl το οποίο βρισκόταν σε μορφή σκόνης. Η ποσότητα 0,6γρ./100ml αντιστοιχεί σε 50mM εφόσον το MB της ένωσης είναι 121,

β) 3,72γρ. Na₂-EDTA το οποίο βρισκόταν σε μορφή σκόνης. Η ποσότητα των 3,72γρ./100ml αντιστοιχεί με 100mM εφόσον το MB της ένωσης είναι 372,

γ) περίπου 0,4γρ. Na-meta-bisulfate το οποίο βρισκόταν υπό μορφή σκόνης. Η ποσότητα των 0,4γρ. (0,38 για την ακρίβεια) στα 100ml αντιστοιχεί σε 20mM εφόσον το MB της ένωσης είναι 190.

B. Διάλυμα καλούμενο Lytic buffer (δηλαδή διάλυμα λύσης)
Παρασκευάζεται όμοια με το Extraction buffer αλλά χωρίς να περιέχει Na-meta-bisulfate.

Γ. Ρυθμιστικό διάλυμα (NH_4OH , 3M)

Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε σε όγκο 50ml. Επειδή το MB του NH_4OH είναι 77 και βρισκόταν υπό μορφή σκόνης χρησιμοποιήθηκαν 11,55γρ. ουσίας στον όγκο των 50ml για να υπάρχει τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 3M.

Αφού παρασκευάστηκαν τα διαλύματα 1 και 2 αποστειρώθηκαν όπως και το νερό μέσα στο οποίο θα παρασκευάζονταν το διάλυμα 3 (επειδή το NH_4OH καταστρέφεται σε μεγάλη θερμοκρασία) στους 121°C σε υγρό αποστειρωτήρα.

Η αποστείρωση γίνεται για τους εξής λόγους:

1) Για να καταστραφούν τυχόν DNAσες, ένζυμα που διασπούν το DNA.

2) Για να καταστραφεί τυχόν ξένο DNA.

3) Για να καταστραφούν τυχόν βακτηρίδια γιατί αυτά απελευθερώνουν DNA και DNAσες.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στα δύο πρώτα διαλύματα, το Extraction και το Lytic buffer, είχαν κάποια ιδιαίτερη σημασία για την ανάλυση με την μέθοδο που αναφέρθηκε.

1) Το tris είναι η βάση του διαλύματος. Δεν χρησιμοποιήθηκε HCl γιατί το pH ήταν 6 εκεί που έπρεπε.

2) Το $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ δεσμεύει δισθενή κατιόντα, χρησιμοποιείται για να ανενεργοποιήσει τις DNAσες.

3) Το Na-meta-bisulfate, που είναι άλας, είναι αναγωγικό και χρειάζεται για να κρατήσει τις κινόνες σε αναγωγική κατάσταση γιατί αν οξειδωθούν αντιδρούν με το DNA.

Όσον αφορά το τρίτο διάλυμα, το ρυθμιστικό, η χρήση του NH_4OH είναι καθαρά ως διαλυμένης ουσίας ενός ρυθμιστικού διαλύματος.

Όλα τα διαλύματα μετά την παρασκευή και την αποστείρωσή τους τοποθετήθηκαν στο ψυγείο, στη συντήρηση, όπου υπό σταθερές συνθήκες μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Δ. Διάλυμα καλούμενο Reaction buffer (διάλυμα αντίδρασης)
με 10πλάσια συγκέντρωση (10X). Αυτό αποτελείται από 200mM tris-HCl και 500mM KCl και έχει pH=8,4.

Ε. Διάλυμα καλούμενο T.B.E. (Tris-Boric-EDTA)

Παρασκευάστηκε σε όγκο 500ml και αποτελείται από τα εξής :

α) 900mM Tris (MB=121) δηλαδή 54γρ.

β) 20mM Na₂-EDTA (MB=372) δηλαδή 3,7γρ.

γ) 900mM Βορικό οξύ (Boric acid) (MB=62) δηλαδή 27γρ.

Το tris με το βορικό οξύ διατηρούν το διάλυμα με pH σταθερό. Επίσης το βορικό οξύ χρησιμοποιείται για κατιόν. Το EDTA χρησιμοποιείται για πρόσδεση σ' αυτό δισθενών ιόντων για να μην καταστρέφεται το DNA από DNAσες που χρειάζονται δισθενή ιόντα.

ΣΤ. Πήκτωμα αγαρόζης (gel) (1η προσπάθεια)

Παρασκευάστηκε ως εξής:

Για κάθε 60ml T.B.E. προσθέσαμε 1γρ. αγαρόζης σε σκόνη. Το μείγμα θερμάνθηκε για να γίνει παχύρευστο, σιρόπι. Επίσης στο μείγμα προστέθηκαν και 5μl βρωμούχου αιθιδίου (με αρχική συγκέντρωση 10mg/ml) για κάθε 100ml του πηκτώματος της αγαρόζης. Τελικά το πήκτωμα είχε συγκέντρωση 0,5mg/l σε βρωμούχο αιθίδιο.

Το βρωμούχο αιθίδιο προσδέεται στο DNA και όταν το ακτινοβολείται με υπεριώδη ακτινοβολία (U.V.) φθορίζει κι έτσι φαίνεται το DNA. Προχωρά αντίθετα από το DNA προς τον αρνητικό (-) πόλο. Φθορίζει περισσότερο όταν είναι συνδεδεμένο στο DNA.

Ζ. Διάλυμα καλούμενο Loading buffer (διάλυμα θέσεως)

(1η προσπάθεια)

Αποτελούνταν από:

50% v/v Lytic buffer και

50% v/v Γλυκερολή

Το pH του διαλύματος ήταν 8

Επίσης περιείχε 1-2 σταγόνες βρωμοφαινόλης για χρωματισμό του διαλύματος.

Η βρωμοφαινόλη (χρώματος μπλέ) προστίθεται για να φανεί αν έχει προχωρήσει το DNA.

Η. Πήκτωμα αγαρόζης (gel) (2η προσπάθεια)

Έγινε σε όγκο 500ml (50 ml T.B.E. μετατράπηκαν σε όγκο 500ml με προσθήκη νερού). Το T.B.E. ήταν όμοιο με την προηγούμενη φορά. Σ' αυτό προστέθηκαν 7,5γρ. αγαρόζης και 25μl βρωμούχο αιθίδιο (αρχική συγκέντρωση 10mg/ml, τελική συγκέντρωση 0,5mg/l).

Θ. Διάλυμα καλούμενο Loading buffer (2η προσπάθεια)

Περιείχε:

200μl T.B.E.

200μl γλυκερόλη και

ελάχιστη βρωμοφαινόλη για χρωματισμό

3.2.3 Αναλυτική διαδικασία

(1η προσπάθεια)

Μια εβδομάδα μετά από την παρασκευή των διαλυμάτων (7/4/94) και αφού οι σπόροι στα Petri είχαν αναπτύξει αρκετά μεγάλο μεγέθους κολεόπτυλο, προχώρησε η προετοιμασία για την ανάλυση του DNA ακόμα ένα στάδιο. Τοποθετήθηκαν σε μικροδοχεία erendorf τα κολεόπτυλα, τα οποία αποσπάστηκαν από τους σπόρους, κάθε ποικιλία σε διαφορετικό erendorf, και τα ομογενοποιήθηκαν με Extraction buffer. Τα erendorf μετά την ομογενοποίηση τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο για 2 ώρες σε θερμοκρασία 55°C. Μετά το υδατόλουτρο το ομογενές μείγμα των κολεόπτυλων με το Extraction buffer αδειάστηκε από τα erendorf σε δοκιμαστικούς σωλήνες (έναν για κάθε erendorf) φυγοκέντρου και προστέθηκαν επίσης 200μl χλωροφόρμιο σε κάθε σωλήνα (με μικροπιπέτα) για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που δεν χρειάζονται. Έγινε ανάδευση του κάθε σωλήνα σε συσκευή Voltex.

Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 4000στροφές Λεπτό. Μετά τη φυγοκέντρηση οι πρωτεΐνες βρίσκονταν ανάμεσα στο εναιώρημα και στο χλωροφόρμιο που ήταν στον πάτο του κάθε σωλήνα. Έτσι υπήρχαν μέσα στον κάθε σωλήνα τρεις φάσεις.

Ελήφθησαν 150μl (με τη μικροπιπέτα) από το εναιώρημα από κάθε σωλήνα και τοποθετήθηκαν σε νέα erendorf προσθέτοντας επίσης 15μl από το ρυθμιστικό διάλυμα NH₄OH, 3M, για να γίνει οξικό το διάλυμα και να έχει ορισμένη συγκέντρωση άλατος για να γίνει διαχωρισμός πρωτεϊνών.

Σε κάθε erendorf προστέθηκαν ακόμα και 400μl κρύας αιθανόλης για να αφαλατωθούν οι πρωτεΐνες και να συσσωματωθούν. Αφού κλείστηκαν τα erendorf τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους -20°C για τουλάχιστον μια ημέρα.

Στις 13/4/94 έγινε η ανάλυση της αλσιδαωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για την εφαρμογή της μεθόδου χρειάστηκαν πάλι μικροδοχεία erendorf (αποστειρωμένα). Μέσα στο κάθε ένα από αυτά προστέθηκαν τα εξής, πριν τοποθετηθούν στην συσκευή που θα γινόταν η PCR :

- 1) 1μl dNTP's τα οποία είναι μείγμα από dATP, dGTP, dCTP, dTTP (πηγές από όπου θα ληφθούν οι βάσεις για την δημιουργία νέου DNA). Το διάλυμα αυτό είχε συγκέντρωση 10mM και στο τελικό διάλυμα έπρεπε να είναι 0,2mM.
- 2) 5μl από το Reaction buffer
- 3) 1,5μl διαλύματος MgCl₂ με τελική συγκέντρωση 50mM.
- 4) 4μl primers με τελική συγκέντρωση 500 ngr.
(2μl από τον sense και 2 μl από τον antisense)
(2 primers μαζί συνολικά 500ngr. Αρχικό διάλυμα 125ngr/ml άρα 4μl primers)
- 5) 3,5μl DNA (από τα erendorf με την αλκοόλη στα οποία βρίσκεται το εκχύλισμα από τα κολεόπτυλα το οποίο περιέχει DNA)
- 6) 1μl taq-πολυμεράση που είναι το ένζυμο που θα δημιουργήσει τις νέες αλυσίδες DNA
- 7) 34μl νερό αποστειρωμένο
- 8) 30μl mineral oil (χρησιμοποιείται για να ανέβει η θερμοκρασία και να μην εξατμίζεται)

Αφού γεμίστηκαν τα erendorf με τα παραπάνω τοποθετήθηκαν στη συσκευή που είναι ειδική για την PCR. Η συσκευή καλείται Trio-thermoclock. Η όλη λειτουργία της συσκευής και η πορεία αντίστοιχα της αντίδρασης έχει ως εξής:

Πάνω στην συσκευή, η οποία έχει τρία τμήματα με υποδοχές στις οποίες χωρούν τα erendorf, τοποθετήθηκαν τα erendorf με τη σειρά και προγραμματίστηκε η συσκευή, μιάς κι έχει ενσωματωμένο ένα είδος μικρό-κομπιούτερ για την διευκόλυνση του χρήστη, έτσι ώστε να ακολουθεί από μόνη της την διαδικασία. Τα erendorf με το μείγμα των παραπάνω ουσιών θερμαίνονται κατ'αρχήν στους 94°C για 1,5 λεπτό έτσι ώστε να αποχωριστούν οι αλυσίδες του DNA, μετά κατεβαίνει η θερμοκρασία στους 42°C για 1,5 λεπτό όπου λειτουργούν οι primers οι οποίοι υβριδίζονται πάνω σε κάποιο τμήμα του DNA. Στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνει πάλι, αλλά μέχρι τους 72°C, για 3 λεπτά όπου γίνεται η αντίδραση της taq-πολυμεράσης.

Αυτή η πορεία επαναλαμβάνεται για 30-40 φορές έτσι ώστε να σχηματίζονται πολλά τμήματα DNA στα οποία βρίσκεται το ζητούμενο γονίδιο (περιοχή ανάμεσα στους δύο primers). Αν οι primers απέχουν μικρή απόσταση ο ένας από τον άλλο πολλαπλασιάζεται το τμήμα DNA μεταξύ των δύο primers, αλλιώς τα υπόλοιπα χάνονται κατά την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα της αγαρόζης.

Αφού τελείωσε η PCR προστέθηκαν 10μl από το Loading buffer (1η προσπάθεια) σε κάθε ένα ependorf με το DNA. Αφού έγινε μικρή ανάδευση για ομογενοποίηση των υλικών σε κάθε ependorf ήταν έτοιμα για τη χρήση τους στην ηλεκτροφόρηση. Τοποθετήθηκε το πήκτωμα, το οποίο είχε βράσει και ήταν υπό μορφή σιροπιού, στην πλάκα της συσκευής ηλεκτροφόρησης και με τις ειδικές "χτένες" που έχει η συσκευή δημιουργήθηκαν τρύπες σ'αυτό που διατηρούνταν όταν αυτό κρύωσε. Αφού σταθεροποιήθηκε καλά το πήκτωμα τοποθετήθηκαν στις τρύπες με τη μικροπιπέτα μικρές ποσότητες από το μείγμα DNA που ήταν στα ependorf. Η πλάκα με το πήκτωμα, αφού τοποθετήθηκαν στις τρύπες από όλα τα ependorf, τοποθετήθηκε στη συσκευή που περιείχε 2-3 λίτρα αποστειρωμένο νερό.

Τέθηκε σε λειτουργία η συσκευή μέσω του τροφοδότη (EC-3000-90) και διάρρηξε 1-2 ώρες για να μετακινηθεί το DNA μέσα στο πήκτωμα. Στην ηλεκτροφόρηση, τα διάφορα τεμάχια DNA οδεύοντας προς το θετικό(+) πόλο, η απόσταση που απομακρύνονται από την αφετηρία είναι αντιστρόφως ανάλογη με το $\log(l)$ (όπου l το μήκος των τμημάτων DNA σε βάσεις).

Στην συνέχεια αφαιρέθηκε το πήκτωμα από την πλάκα και το μεταφέρθηκε στην συσκευή υπεριώδους φωτός (U.V.) για να φανούν οι ζωνώσεις (μπάντες) και φωτογραφήθηκε με την προσαρτημένη στη συσκευή ειδική φωτογραφική μηχανή.

Η φωτογραφία που βγήκε δεν έδωσε αποτελέσματα. Πολλοί ήταν οι λόγοι στους οποίους αποδόθηκε η αποτυχία αυτής της προσπάθειας. Ένας ήταν ότι πιθανόν να μην εκχυλίστηκε DNA από τα κολεόπτυλα ή ήταν πολύ μικρή η ποσότητα που υποβλήθηκε στην PCR. Ένας άλλος ήταν ότι επειδή δεν συμπληρώθηκαν 40 κύκλοι στην PCR ίσως να μην υπήρχε μεγάλη παραγωγή τμημάτων DNA που να περιέχουν το γονίδιο προς αναγνώριση ή ότι, στην χειρότερη περίπτωση, μπορεί να έφταιγαν οι *primers* οι οποίοι δεν αναγνώρισαν το γονίδιο. Για όλους τους πιο πάνω λόγους το πείραμα επαναλήφθηκε κάνοντας κάποιες τροποποιήσεις, όσες ήταν δυνατό να γίνουν.

(2η προσπάθεια)

Έτσι στις 4/5/94 από τα ependorf που ήταν στο ψυγείο με το εκχύλισμα των κολεόπτυλων και την αλκοόλη, (είχαν περισσέψει από την προηγούμενη προσπάθεια) πάρθηκε αυτό το διάλυμα που περιείχε 70% αιθανόλης τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυγοκεντρήθηκε σε full speed για 30 λεπτά. Αδειάστηκαν οι σωλήνες και ξεπλύθηκαν με 100% κρύα αιθανόλη και φυγοκεντρήθηκαν πάλι για 5 λεπτά. Στεγνώσαν οι σωλήνες για μια ώρα σε απορροφητικό χαρτί. Προστέθηκαν 25μl αποστειρωμένο νερό και φυγοκεντρήθηκαν πάλι. Τα 25μl από τους σωλήνες τα μεταφέρθηκαν σε ependorf και αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

Στις 12/5/94 έγινε για δεύτερη φορά η PCR με τη μόνη διαφορά ότι τα *erendorff* περιείχαν :

- 1) 10μl Reaction buffer
- 2) 2μl dNTP's
- 3) 50 μl DNA
- 4) 3μl MgCl₂
- 5) 8μl primers (4 sense και 4 antisense)
- 6) 2μl taq-πολυμεράση
- 7) 25 μl νερό αποστειρωμένο

Η όλη διαδικασία της PCR και της ηλεκτροφόρησης έγινε όπως και την προηγούμενη φορά, αλλά ούτε και αυτή τη φορά είχε αποτέλεσμα. Αυτή τη φορά αποδόθηκε το πρόβλημα στη χρήση της απλής φυγοκέντρου αντί της μικροφυγοκέντρου. Επειδή η όλη εργασία σχετιζόταν με μικροποσότητες, η χρήση μικροφυγοκέντρου χαρακτηρίστηκε απαραίτητη. Έτσι έγινε και η τρίτη προσπάθεια η οποία είχε εκτός από την χρήση της μικροφυγοκέντρου και άλλες τροποποιήσεις.

(3η προσπάθεια)

Η απομόνωση αυτή τη φορά δεν έγινε από τα κολοκύτταρα που βλάστησαν από τους σπόρους, αλλά κατευθείαν από το σπόρο. Επιλέχθηκαν μόνο οι καθαρές σειρές 14524 και 33537 και το υβριδίο τους 14524X33537 για απομόνωση μιτοχονδριακού DNA αυτή τη φορά. Οι σπόροι ομογενοποιήθηκαν επί ένα λεπτό σε χαμηλή ταχύτητα σε έναν αναμεικτη και σε διάλυμα ομογενοποίησης με όγκο 250ml που περιείχε :

- α) 50 mM φωσφορικό διάλυμα με pH=7,5
- β) 300 mM σουκρόζη
- γ) 10 mM EDTA
- δ) 5% w/v PVP (πολυβινυλικό πυρολιδόνιο)
- ε) 1% w/v BSA (αλβουμίνη ορού βοοειδών)
- στ) 1% w/v κυστεΐνη

Μετά από φιλτράρισμα από τέσσερα στρώματα τυρόπανου, το άμυλο, άθραυστα κύτταρα, πυρήνες και άλλοι ιστοί απομακρύνθηκαν σαν ίζημα με φυγοκέντρηση σε 4000xg (g=επιτάχυνση της βαρύτητας) στροφές για 15 λεπτά. Τα μιτοχόνδρια απομονώθηκαν από το υπερκείμενο με φυγοκέντρηση στις 8000xg στροφές για 45 λεπτά. Το μιτοχονδριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1ml διάλυμα ομογενοποίησης και τέθηκε πάνω σε 10ml διαλύματος που περιείχε :

- α) 50mM φωσφορικού διαλύματος pH=7,5
- β) 10 mM EDTA
- γ) 1% w/v κυστεΐνης
- δ) 300 mM σουκρόζη
- ε) 1% w/v BSA και
- στ) 28% v/v Percoll

Μετά από φυγοκέντρηση στις 40000xg στροφές για 30 λεπτά δημιουργήθηκε μια κλίμακα συγκέντρωσης Percoll και τα μιτοχόνδρια σχημάτισαν ένα στρώμα που σταμάτησε σε μία πυκνότητα Percoll ίση με την πυκνότητα των μιτοχονδρίων.

Τα μιτοχόνδρια συνελέχθηκαν με μια πιπέτα Pasteur και φυγοκεντρήθηκαν στις 10000xg στροφές για 15 λεπτά μετά από πρόσθεση ενός ίσου όγκου διαλύματος ομογενοποίησης χωρίς PVP.

Το μιτοχονδριακό ίζημα διαλύθηκε σε 500 μl διαλύματος που περιείχε :

- α) 50 mM tris-HCl με pH=8
- β) 10 mM EDTA
- γ) 2% w/v SDS

και υποβλήθηκε σε τρεις εκχύλισεις με διάλυμα φαινόλης σε χλωροφόρμιο. Σύντομη μικροφυγοκέντρηση μετά από κάθε εκχύλιση διαχώριζε την υδατική φάση με το DNA από την κατώτερη φάση της φαινόλης.

Η τελική υδατική φάση μετά την τελευταία εκχύλιση με φαινόλη αναμείχθηκε με 1/10 του όγκου της 3M οξικό αμμώνιο και κατόπιν αναμείχθηκε με 3 όγκους κρύας αιθανόλης (-20°C). Η μέθοδος αυτή προκάλεσε καθίζηση του DNA που συλλέχθηκε μετά από 12 ώρες στους -20°C με μικροφυγοκέντρηση για 20 λεπτά. Το ίζημα του DNA στέγνωσε με ελαφρά ροή αζώτου μέσα στον μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και κατόπιν επαναυωρήθηκε σε 200 μl απεσταγμένου/αποστειρωμένου νερού. Έμεινε στους -20°C μέχρι επόμενης χρήσεως.

Το επόμενο στάδιο ήταν η αντίδραση πολυμεράσης. Έτσι 5μl διαλύματος κάθε DNA υποβλήθηκαν σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε ένα όγκο 50μl που περιείχε:

- α) 20 mM tris-HCl, pH=8,4
- β) 50 mM KCl
- γ) 2 mM MgCl₂
- δ) 200 μM κάθε ένα από τα dCTP, dATP, dGTP και dTTP
- ε) 1 μονάδα taq- πολυμεράσης και
- στ) 250 ngr. από κάθε ένα από τους δύο primers, 18 βάσεων ο κάθε ένας.

Οι δύο primers συνετέθησαν σαν συμπληρωματικοί της sense και antisense αλυσίδας ενός μιτοχονδριακού γονιδίου που εκφράζεται στην πατάτα σε χαμηλές θερμοκρασίες (3°C). Οι primers αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικές περιοχές του γονιδίου.



Η αντίδραση ήταν 40 κύκλων. Κάθε κύκλος ήταν 1,5 λεπτού στους 95°C για να αποχωριστούν οι αλυσίδες του DNA, 1,5 λεπτού στους 42°C για να προσδεθούν οι primers στις συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA και 2,5 λεπτών στους 72°C για να συνθέσει η taq-πολυμεράση νέο DNA χρησιμοποιώντας τους primers σαν αφετηρία και την συμπληρωματική αλυσίδα στην οποία προσδέθηκε ο primer σαν εκμαγείο. Η επανάληψη της αντίδρασης 40 φορές πολλαπλασίασε την περιοχή του γονιδίου μεταξύ των δύο primers με γεωμετρικό τρόπο. Το πολλαπλασιασμένο τμήμα DNA αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη.

Στα ependorf, αφού τελείωσε η PCR, προστέθηκε 1/10 του όγκου διαλύματος που περιείχε :

- α) 50% w/v γλυκερόλης
- β) 1% w/v μπλέ βρωμοφαινόλης
- γ) 10 mM EDTA
- δ) 10 mM tris-HCl ,pH=7,5

Το διάλυμα τέθηκε στις υποδοχές ενός πηκτώματος αгарόζης 1,5%w/v που έγινε με ηλεκτροφορητικό διάλυμα T.B.E. (περιεκτικότητα: 10 mM Tris, 10 mM Εορικό οξύ ,2 mM EDTA). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 125 Volt για 3 ώρες με το ίδιο διάλυμα T.B.E. Το πήκτωμα περιείχε 0,05% w/v βρωμούχο αιθίδιο. Το DNA έγινε ορατό κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία 360nm και φωτογραφήθηκε με ειδικό φιλμ. Αυτή τη φορά υπήρξε αποτέλεσμα που συζητείται στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

ΙV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Τα δεδομένα από το μέγεθος του κολεόπτυλου σε θερμοκρασία 8°C εμφανίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Εκτίμηση της δυνατότητας βλάστησης γενοτύπων καλαμποκιού σε θερμοκρασία 8°C

α/α Γενότυπος Προέλευση Μήκος

α/α	Γενότυπος	Προέλευση	Μήκος
1.	B-73	Iowa	1,7
2.	Mo-17	Missouri	1,8
3.	A-632	Minnesota	1,8
4.	W-10	Wisconsin	1,9
5.	14524	Ελληνική	1,5
6.	33537	Ελληνική	2,6
7.	B-73XMo-17		2,3
8.	B-73X14524		3,5
9.	14524X33537		3,1

Σημείωση : Τα μήκη κολεοπτύλων εκτιμήθηκαν με βάση την κλίμακα 1-5, βλέπε Υλικά και Μέθοδοι.

Στον πίνακα 2 δίδεται η πλήρης ανάλυση παραλλακτικότητας

Πίνακας 2. Πίνακας ανάλυσης παραλλακτικότητας δεδομένων του Πίνακα 1

Πηγή Παραλ.	B.E.	A.T.	M.T.	F
Επεμβάσεις	8	7,605	0,95	3,31 < 3,44 = F ₀₅
Επαναλήψεις	1	0,142	0,142	0,49 < 5,32 = F ₀₅
Πειρ. Σφάλμα	8	2,298	0,287	
Σύνολο	17	10,045		

$$C.V. = \frac{M\text{Τσφαλμ.}}{X} * 100 = \frac{0,287}{2,24} * 100 = 23,9\%$$

Σύμφωνα με τα δεδομένα τα υβρίδια αναπτύχθηκαν πιο γρήγορα σε σχέση με τις καθαρές σειρές. Παρόλο που από τα δεδομένα προέκυψε η ένδειξη ότι οι καθαρές σειρές δεν διαφέρουν, η 33537 έδειξε πιο ανθεκτική από τις άλλες.

Ο συντελεστής παραλλακτικότητας (C.V.) ήταν αρκετά υψηλός (23,9), αλλά αναμενόμενος για τέτοιου είδους παρατηρήσεις.

Χαρακτηριστική είναι η διαφορά των τριών υβριδίων σε σχέση με τους γονείς που είναι μια σαφής ένδειξη ότι είχαμε εμφάνιση ετέρωσης. Έτσι ήταν προφανές ότι τα υβρίδια αναπτύχθηκαν γρηγορότερα στις χαμηλές θερμοκρασίες σε σχέση με τις καθαρές σειρές. Οπωσδήποτε οι διαφορές δεν ήταν τέτοιες που να οδηγούν στο συμπέρασμα ότι στις καθαρές σειρές που αξιολογήθηκαν υπάρχουν γενετικές διαφορές ως προς την ικανότητα βλάστησης σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Στον πίνακα 3 εμφανίζεται η βαθμολόγηση των σποροφύτων της πρώτης ανάπτυξης σε θερμοκρασία 8°C

Πίνακας 3. Εκτίμηση πρώτης ανάπτυξης σποροφύτων γενοτύπων καλαμποκιού σε θερμοκρασία 8°C

α/α	Γενότυπος	Προέλευση	Μήκος
1.	B-73	Iowa	0,3
2.	Mo-17	Missouri	0
3.	A-632	Minnesota	1,1
4.	W-10	Wisconsin	0
5.	14524	Ελληνική	0
6.	33537	Ελληνική	0,3
7.	B-73XMo-17		0,8
8.	B-73X14524		0,7
9.	14524X33537		1,05

Σημείωση : Τα μήκη σποροφύτων εκτιμήθηκαν με βάση την κλίμακα 1-5, βλέπε Υλικά και Μέθοδοι.

Στον πίνακα 4 δίδεται η πλήρης ανάλυση παραλλακτικότητας

Πίνακας 4. Πίνακας ανάλυσης παραλλακτικότητας των δεδομένων του πίνακα 3

Πηγή παραλ.	B.E.	A.T.	M.T.	F
Επεμβάσεις	8	6,68	0,835	5,5422 **
Επαναλήψεις	3	1,087	0,362	2,35
Πειρ. σφάλμα	24	3,703	0,154	

Σύνολο 35 11,47
 $5,422 > 2,36 = F_{05}$ και επίσης $5,422 > 3,36 = F_{01}$

$$C.V = \frac{M.Τσφαλμ.}{X} * 100 = \frac{0,154}{0,483} * 100 = 81,24\%$$

Παρόλο που ο συντελεστής παραλλακτικότητας (C.V.) είναι υπερβολικά μεγάλος τα δεδομένα ήταν στατιστικώς σημαντικά, αλλά οπωσδήποτε δεν μπορούμε να τα δεχθούμε ως αξιόπιστα και τα συζητάμε μόνο ως απολύτως ενδεικτικά.

Ορισμένες σειρές όπως οι Mo-17, W-10 και 14524 δεν αναπτύχθηκαν καθόλου, ενώ η A-632 έδειξε την καλύτερη ανάπτυξη η οποία ήταν η ίδια μ' εκείνη των υβριδίων.

Όπως και στην προηγούμενη ανάλυση, φάνηκε ότι τα υβρίδια αναπτύχθηκαν γρηγορότερα σ' αυτή τη θερμοκρασία σε σχέση με τις καθαρές σειρές (ετέρωση). Οποιαδήποτε περαιτέρω συζήτηση των αποτελεσμάτων θα ήταν παρακινδυνευμένη λόγω της φύσεως των δεδομένων.

Τα δεδομένα από την αξιολόγηση των σποροφύτων πρώτης ανάπτυξης σε συνθήκες θερμοκρασίας 12°C εμφανίζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Εκτίμηση πρώτης ανάπτυξης σποροφύτων γενοτύπων καλαμποκιού σε θερμοκρασία 12°C

α/α	Γενότυπος	Προέλευση	Μήκος
1.	B-73	Iowa	1,15
2.	Mo-17	Missouri	0,5
3.	A-632	Minnesota	2,3
4.	W-10	Wisconsin	0,25
5.	14524	Ελληνική	0
6.	33537	Ελληνική	0,85
7.	B-73XMo-17		1,9
8.	B-73X14524		2,85
9.	14524X33537		2,15

Σημείωση : Τα μήκη σποροφύτων εκτιμήθηκαν με βάση την κλίμακα 1-5, βλέπε Υλικά και Μέθοδοι

Στον πίνακα 6 δίδεται η πλήρης ανάλυση παραλλακτικότητας

Πίνακας 6. Πίνακας ανάλυσης παραλλακτικότητας των δεδομένων του πίνακα 5

Πηγή Παραλ.	B.E.	A.T.	M.T.	F
Επεμβάσεις	8	32,543	4,067	9,327**
Επαναλήψεις	3	1,328	0,442	1,013
Πειρ.σφάλμα	24	10,462	0,436	
Σύνολο	35	44,333		

9,327 > 2,36 = F₀₅ και επίσης 9,327 > 3,36 = F₀₁

$$C.V. = \frac{M.T.σφαλμ.}{X} * 100 = \frac{0,436}{1,327} * 100 = 49,76\%$$

Όπως και στην προηγούμενη ανάλυση, ο συντελεστής παραλλακτικότητας (C.V.) είναι αρκετά μεγάλος, όμως τα δεδομένα ήταν στατιστικώς σημαντικά. Δεν μπορούμε όμως να τα δεχθούμε ως αξιόπιστα και θα τα συζητήσουμε ως απολύτως ενδεικτικά.

Τα υβρίδια αναπτύχθηκαν πιο γρήγορα από τις καθαρές σειρές και σ'αυτή τη θερμοκρασία, φαινόμενο ετέρωσης. Εξαίρεση από τις καθαρές σειρές αποτελεί η A-632 η οποία ακολουθεί στην ανάπτυξη τα υβρίδια.

Σε σύγκριση των εκτιμήσεων από τις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες φαίνεται η πιο γρήγορη ανάπτυξη των γενοτύπων του καλαμποκιού στην υψηλότερη από τις δύο (12°C). Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις, στους 8°C αναπτύχθηκε κολεόπτυλο στις είκοσι ημέρες μετά τη σπορά, ενώ στους 12°C είχαμε ανάπτυξη κολεοπύλου στις οκτώ ημέρες μετά τη σπορά. Αντίστοιχα, το στάδιο της πρώτης ανάπτυξης των σποροφύτων στους 8°C ήταν πενήνταπέντε (55) ημερών, ενώ στους 12°C ήταν εικοσιτεσσάρων (24) ημερών. Αυτή η διαφορά είναι αναμενόμενη σύμφωνα με τα δεδομένα για την βλάστηση και την πρώτη ανάπτυξη του καλαμποκιού.

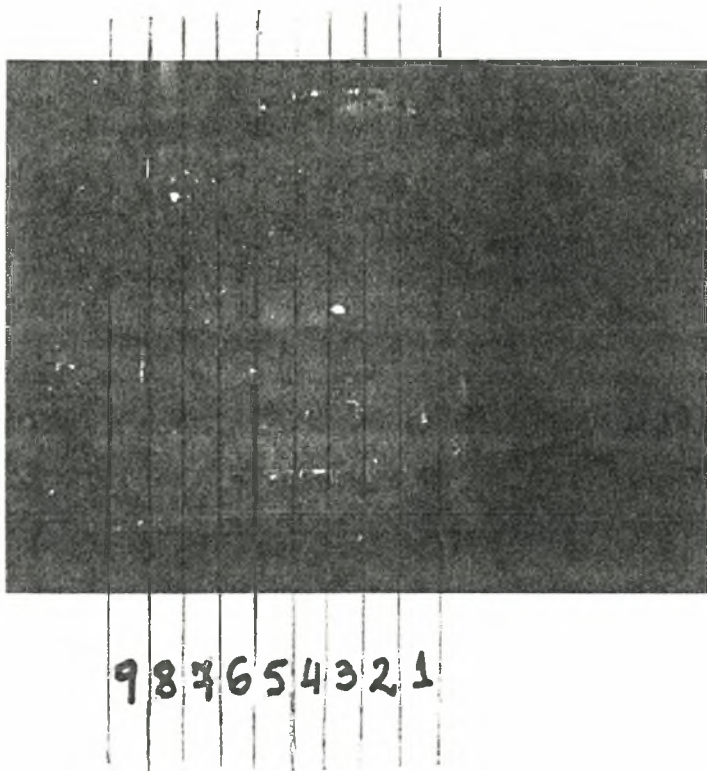
Παρατηρήθηκε, και στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (8°C και 12°C), ένα πλεονέκτημα, ως προς την βλάστηση και την πρώτη ανάπτυξη σε χαμηλές θερμοκρασίες, της καθαρής σειράς A-632, σε αντίθεση προς τις άλλες καθαρές σειρές. Η συμπεριφορά της, σε συνθήκες θερμοκρασίας κάτω από τις κανονικές, εμφανίζεται παρόμοια με αυτή των υβριδίων. Αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί ως αναμενόμενο εξαιτίας της καταγωγής της, από την Minnesota (B.Αμερική). Βέβαια αυτή η παρατήρηση είναι κάτι που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση του DNA εμφανίζονται στις φωτογραφίες 1 και 2.

Η φωτογραφία 1 αναφέρεται στην πρώτη προσπάθεια η οποία ήταν ανεπιτυχής. Σκοπός μας ήταν να συγκρίνουμε όλες τις ποικιλίες του πειράματος και να δούμε τις ζωνώσεις (μπάντες) που θα παρουσίαζε το DNA στο πηκτώμα της αгарόζης κατά την ακτινοβολία του με υπεριώδες φως (U.V.). Η φωτογραφία δεν μας έδωσε κάποια εμφανή διαφορά στο DNA. Παρατηρήθηκε μόνο μια φωτεινότερη περιοχή στις ποικιλίες W-10 και 14524 αμέσως μπροστά από το σημείο εκκίνησης. Πρόγμα το οποίο δεν μας κάλυψε ως αποτέλεσμα διότι αλλιώς αναμενόταν η φωτογραφία μετά από μιά τέτοια εργασία.

Το πείραμα αφού επαναλήφθηκε και δεύτερη φορά κατά τον ίδιο τρόπο, με απομόνωση DNA από τους ιστούς του κολεόπτου, δεν μας έδωσε πάλι αποτέλεσμα. Η φωτογραφία αυτή τη φορά δεν έδειχνε απολύτως τίποτα, ήταν μιά μαύρη φωτογραφία.

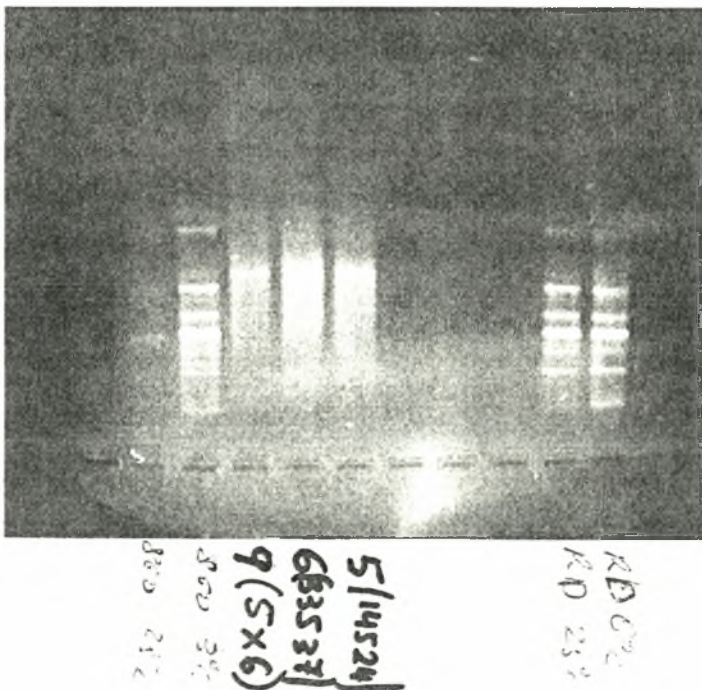


Φωτ.1. Φωτογραφία μετά από ακτινοβολία με U.V. του πηκτώματος της αгарόζης μετά από την PCR (οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ποικιλίες, βλέπε παράρτημα σελ. 40) 1η προσπάθεια

Γι' αυτό το λόγο η τρίτη επανάληψη δεν έγινε με απομόνωση DNA από το κολοκύτιλο αλλά απομονώθηκε DNA από τον σπόρο, χωρίς να βλαστήσει, και ιδιαίτερα από τα μιτοχόνδρια με ειδική επεξεργασία. Ήταν δύσκολο να γίνει απομόνωση από όλες τις ποικιλίες, γι' αυτό έγινε η ανάλυση αυτή τη φορά μόνο για τις 14524, 33537 και 14524X33537 που είναι δύο γονείς και το υβριδίο τους. Η φωτογραφία που πήραμε (φωτογραφία 2) μας έδωσε κάποιο αποτέλεσμα που μπορεί να γίνει δεκτό.

Οι 14524 και 33537 μας έδωσαν την ίδια ακριβώς ζώνωση ενώ η 14524X33537 μας έδωσε ζώνωση στις ίδιες ακριβώς περιοχές με τους γονείς αλλά μικρότερης φωτεινότητας. Αυτό όμως δεν αποτελεί κριτήριο, βασισμένοι και σε αποτελέσματα άλλων πειραμάτων, ότι υπάρχει διαφορά στο γένομα. Οι συγκεκριμένες τρεις ποικιλίες στο πείραμα που έγινε με τη συμβατική μέθοδο έδειξαν διαφορά στη βλάστηση σε χαμηλές θερμοκρασίες. Και στα δύο πειράματα (8°C και 12°C) οι 14524 και 33537 ήταν βραδείας ανάπτυξης σε θερμοκρασίες κάτω από τις κανονικές, ενώ το υβριδίο 14524X33537 ήταν γρήγορης ανάπτυξης σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το πείραμα με τη μοριακή ανάλυση, η διαφορά αυτή δεν μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη κάποιου γονιδίου ή στην διαφορά στο γένομα ανάμεσα στα υβρίδια και στις καθαρές σειρές.



Φωτ.2. Φωτογραφία μετά από ακτινοβολία με U.V. του ηλεκτόματος της αγκυρόζης μετά από την PCR. 2η προσπάθεια

V.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Baker, D.G. and J.B.Swan. 1966. *Climate of Minnesota Part IV Spring soil temperatures. Minnesota Agric. Exp. Stn. Misc. Rep.67*
- 2) Benson, G.O. and H.E.Thompson. 1974. *Corn planting dates. Iowa State Univ. Coop. Ext. Serv., PM-595*
- 3) Γαλανοπούλου-Σενδουκά, Στέλλα(1). 1992. Αύξηση και ανάπτυξη φυτών .σελ 25-33. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Γενικής Γεωργίας, Βόλος
- 4) Γαλανοπούλου-Σενδουκά, Στέλλα (2). 1992. Αραβόσιτος σελ 23-33. Σημειώσεις Ειδ. Γεωργία Ι, Βόλος
- 5) Coffman, F.A.1923. *The minimum temperature for germination of seed. J. Appl. Ecol. 2:221-239.*
- 6) Gounaris, Y. and J.R.Sowokinos. 1992. *Two-dimensional Analysis of Mitochondrial Proteins from Potato Cultivars Resistant and Sensitive to Cold-induced Sweetening. pp 611-616. J. Plant Physiol. Vol. 140*
- 7) Gounaris, Y. 1993. *Comparison of Restriction Mitochondrial DNA from Low and High Sugar Accumulating Cultivars/Selection. pp 423-427. J. Plant Physiol. Vol. 141*
- 8) Καλτσικής, Π. Ι. 1992. Η βελτίωση του καλαμποκιού. σελ 153-234 *Ειδική Βελτίωση Φυτών, Πειραιάς*
- 9) McConnell, R. L. and C. O. Gardner. 1979. *Selection for Cold Germination in Two Corn Populations. p 765-768. Crop Sci. Vol. 19*
- 10) Mock, J. J. and S. A. Eberhart. 1972. *Cold tolerance in adapted maize populations. Crop Sci. 12:466-469.*
- 11) Mock, J. J. and A. A. Bakri. 1976. *Recurrent Selection for cold tolerance in maize. Crop Sci. 16:230-233.*
- 12) Nield, R. E. and N. H. Richman. 1981. *Agroclimatic normals for maize. Agric. Meteorol. 24:83-95.*
- 13) Schell, L. P. et al. 1991. *Rapid Isolation and Measurement of Adenosine Triphosphate Levels in Corn Embryos Germinated at Suboptimal Temperatures. Crop Sci. 31:425-430.*
- 14) Shaw, R. H. 1988. *Climate Requirement. p 609-638. Corn and Corn Improvement. 3rd Edition. Agronomy No 18*
- 15) Standard, S. A. et al. 1983. *Nucleotide levels and loss of viability in germinating wheat embryos. J. Exp. Bot. 34:1047-1054.*
- 16) Stoskopf, N. C. 1985. *Corn. p 351-363. Cereal Grain Crops, Virginia*

- 17) Σφήκας, Α. Γ. 1991. Αραβόσιτος. σελ 85-123. Ειδική Γεωργία Τόμος Ι, Θεσσαλονίκη
- 18) Τζώρτζιος, Στ. Ι. 1991. Ανάλυση και ερμηνεία των σχεδιασμένων πειραμάτων. σελ 161-187. Διδακτικές σημειώσεις Βιομετρία, Βόλος
- 19) Φασούλας, Α. Κ. και Ν. Α. Σενλόγλου. 1966. Το καλαμπόκι. σελ 188-193. Η προσαρμοστικότητα των φυτών μεγάλης καλλιέργειας στην Ελλάδα, Θεσσαλονίκη
- 20) Fowler, D. B. et al. 1993. Breeding for Low-Temperature Tolerance in Field Crops. p357-362. International Crop Science, USA
- 21) Hoard, K. G. and T. M. Crosbie. 1986. Correlated Changes in Agronomic Traits from S1-line Recurrent Selection Tolerance in Two Maize Populations. p 519-522 Crop Sci. Vol. 26
- 22) Wallace, H. A. and E. N. Bressman. 1937. Corn and corn growing. John Willey and Sons, New York

УПАРАТНА

ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Κάθε τιμή σε κάθε πίνακα είναι ο μέσος όρος πέντε τιμών.

Επεμβάσεις=Καθαρές σειρές+Υβρίδια

Για την διευκόλυνση χειρισμών των αποτελεσμάτων κάθε ποικιλία (επέμβαση) αντιστοιχεί σε έναν αριθμό.

- | | | |
|----------|---------------|----------------|
| 1) B-73 | 5) 14524 | 9) 14524X33537 |
| 2) Mo-17 | 6) 33537 | |
| 3) A-632 | 7) B-73XMo-17 | |
| 4) W-10 | 8) B-73X14524 | |

ΠΕΙΡΑΜΑ 1ο ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 8°C

ΣΧΕΔΙΟ: ΠΛΗΡΕΙΣ ΤΥΧΑΙΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ ΚΟΛΕΟΠΤΥΛΟΥ ΣΤΙΣ 28/1/94

Ο πίνακας με τις επεμβάσεις ανα επανάληψη μετά από την αποτυχαιοποίηση έχει ως ακολουθεί:

Πίνακας 1.

Επένδυση	Επανάληψη	2	3	Σύνολα
1		1,2	2,2	3,4
2		1,8	1,8	3,6
3		2,2	1,4	3,6
4		1,8	2,0	3,8
5		1,6	1,4	3,0
6		2,4	2,8	5,2
7		1,8	2,8	4,6
8		4,0	3,0	7,0
9		2,6	3,6	6,2
Σύνολα		19,4	21,0	40,4

Ο διορθωτικός όρος για τους υπολογισμούς (Δ.Ο.) υπολογίζεται (Τζώρτζιος, 1991)

$$\Delta.Ο. = \frac{(\Sigma X)^2}{n} = \frac{40,4^2}{18} = 90,675$$

Τα αθροίσματα τετραγώνων (Τζώρτζιος, 1991) έχουν ως εξής :

A. T. Σύνολα = 100,72 - 90,675 = 10,045

A. T. Επεμβ. = 98,28 - 90,675 = 7,605

A. T. Επαν. = 90,817 - 90,675 = 0,142

ΠΕΙΡΑΜΑ 1ο ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 8°C
 ΣΧΕΔΙΟ : ΠΛΗΡΕΙΣ ΤΥΧΑΙΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΟΜΑΔΕΣ
 ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ ΣΠΟΡΟΦΥΤΩΝ ΣΤΙΣ 23/2/94

Ο πίνακας με τις επεμβάσεις ανά επανάληψη μετά την αποτοχαιοποίηση έχει ως ακολούθι:

Πίνακας 2.

Επένδυση	Επανάληψη				Σύνολα
	1	2	3	4	
1	0,4	0	0,8	0	1,2
2	0	0	0	0	0
3	0,8	1,4	1,4	0,8	4,4
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0,4	0	0	0,8	1,2
7	1,0	0	1,4	0,8	3,2
8	0,8	0,5	0,8	1,0	3,2
9	1,8	0	1,8	0,6	4,2
Σύνολα	5,2	2,0	6,2	4,0	17,4

$$Δ.Ο. = \frac{17,4^2}{35} = 8,41$$

$$Α.Τ.Συνολ = 19,88 - 8,41 = 11,47$$

$$Α.Τ.Επεμβ = 15,09 - 8,41 = 6,68$$

$$Α.Τ.Επαν = 9,497 - 8,41 = 1,087$$

ΠΕΙΡΑΜΑ 2ο ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 12°C
 ΣΧΕΔΙΟ: ΠΛΗΡΕΙΣ ΤΥΧΑΙΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΟΜΑΔΕΣ
 ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ ΣΠΟΡΟΦΥΤΟΥ ΣΤΙΣ 21/3/94

Ο πίνακας με τις επεμβάσεις ανά επανάληψη μετά την αποτυχαιοποίηση έχει ως ακολουθεί:

Πίνακας 3.

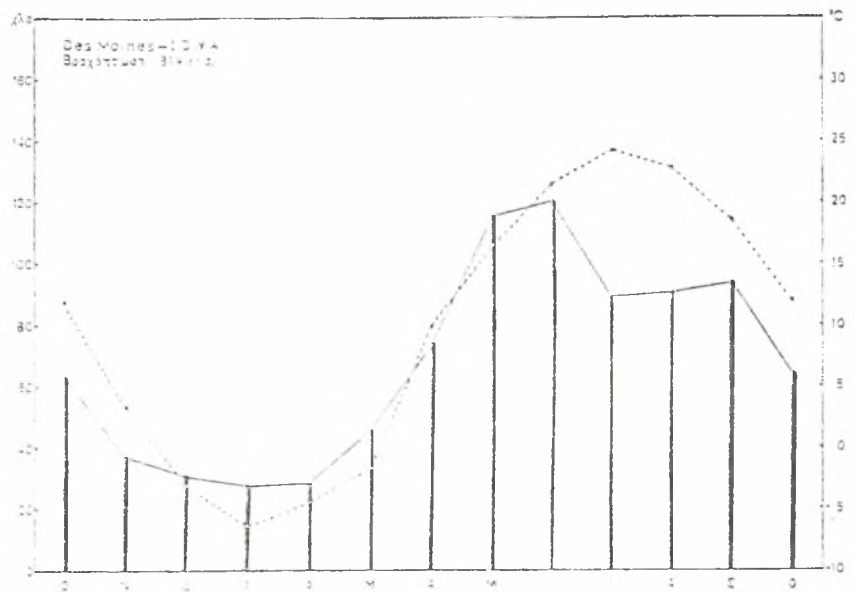
Επανάληψη Επέμβαση	1	2	3	4	Σύνολα
1	1,6	1,8	0	1,2	4,6
2	0,6	1,4	0	0	2,0
3	2,4	2,0	2,8	2,0	9,2
4	0	0,4	0	0,6	1,0
5	0	0	0	0	0
6	0,2	2,0	0,4	0,8	3,4
7	1,6	3,2	2,0	0,8	7,6
8	3,2	2,6	3,0	2,6	11,4
9	3,0	1,0	2,8	1,8	8,6
Σύνολα	12,6	14,4	11,0	9,8	47,8

$$\Delta.Ο. = \frac{47,8^2}{36} = 63,467$$

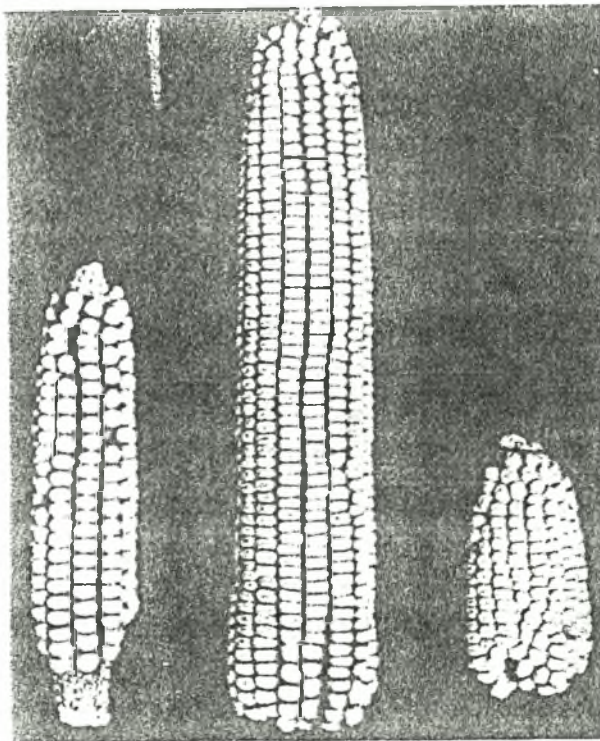
$$Α.Τ.Σύνολα = 107,8 - 63,467 = 44,333$$

$$Α.Τ.Επεμβ = 96,01 - 63,467 = 32,543$$

$$Α.Τ.Επαν = 64,795 - 63,467 = 1,328$$



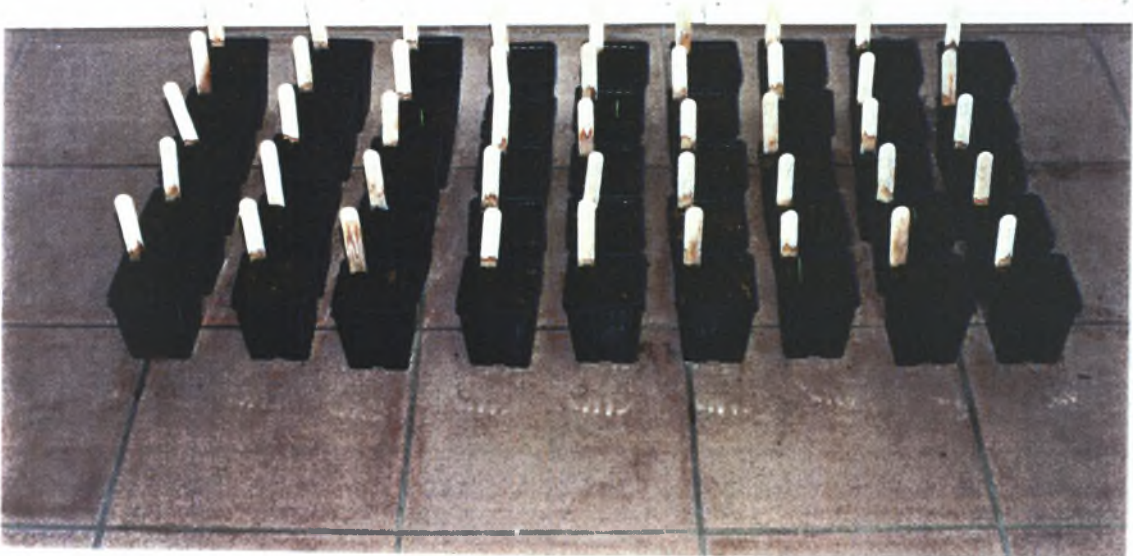
Σχ.1 Κατανομή θερμοκρασίας και βροχοπτώσεως στη ζώνη του καλαμποκιού (από Φασούλα-Σουλίου, 1966)



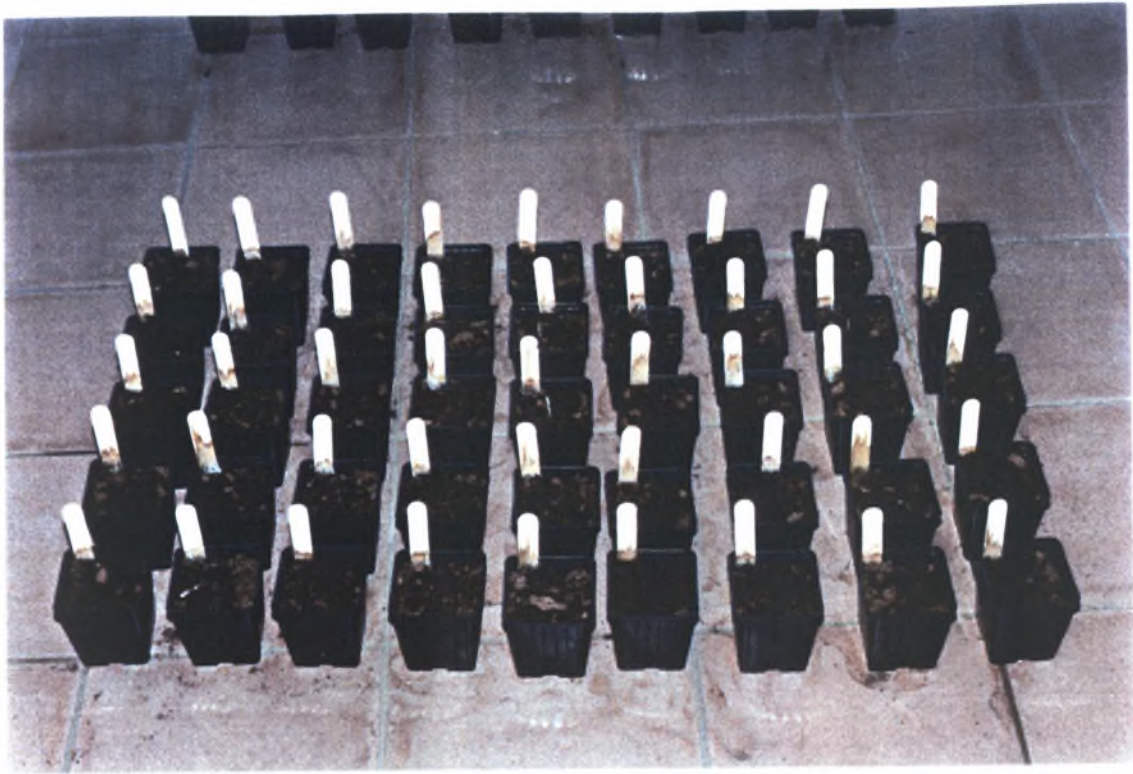
Εικ.1 Ηετέρωση στο καλαμπόκι. Στη μέση είναι η κόκα του υβριδίου και αριστερά και δεξιά οι κόκες των δύο γονέων του. (τροποποίηση από Roehlman, 1979) (από Π.Ι.Καλτσίκη, 1992)



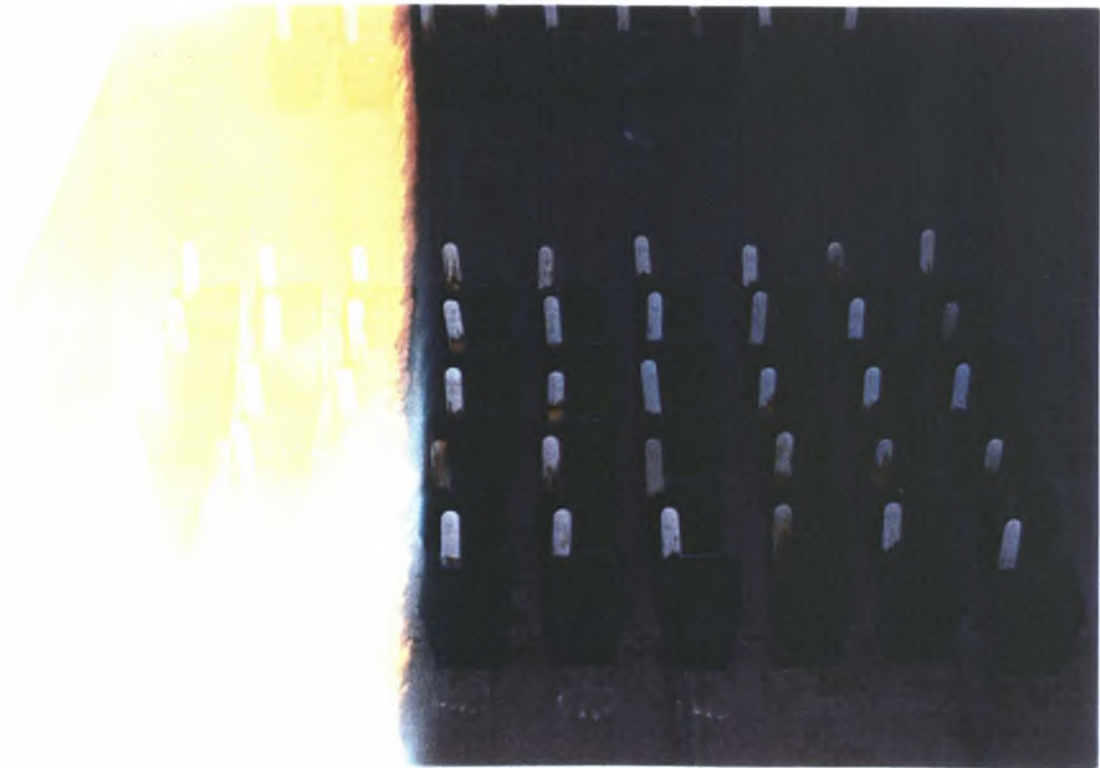
Εικόνα 2: Επικάλυψη παχύτητας στο πρώτο πείραμα θερμότητας 80°C



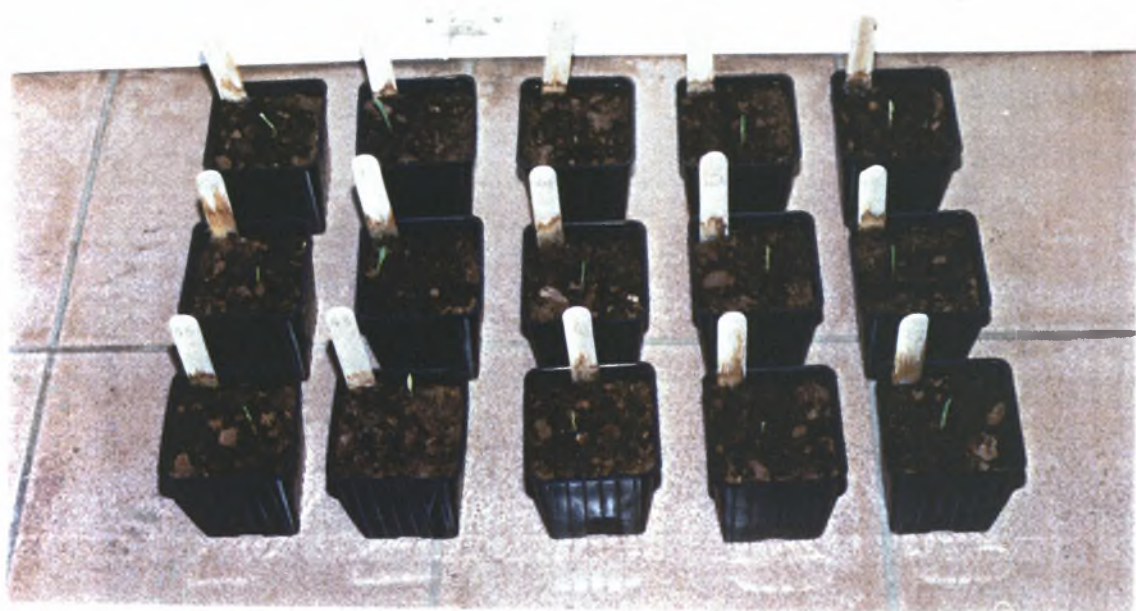
Εικόνα 3: Επικάλυψη λεπτότητας στο πρώτο πείραμα θερμότητας 80°C



Εικ. 4 Επανάδυση τρίτη στο πρώτο πείραμα θερμοκρασία 8°C



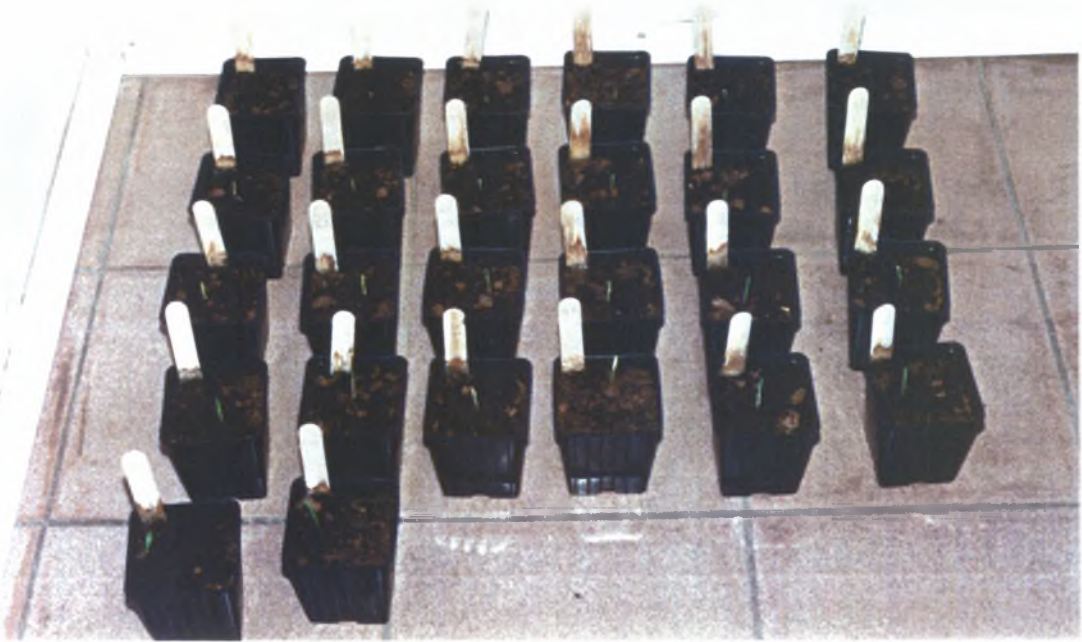
Εικ. 5 Επανάδυση τέταρτη στο πρώτο πείραμα θερμοκρασία 8°C



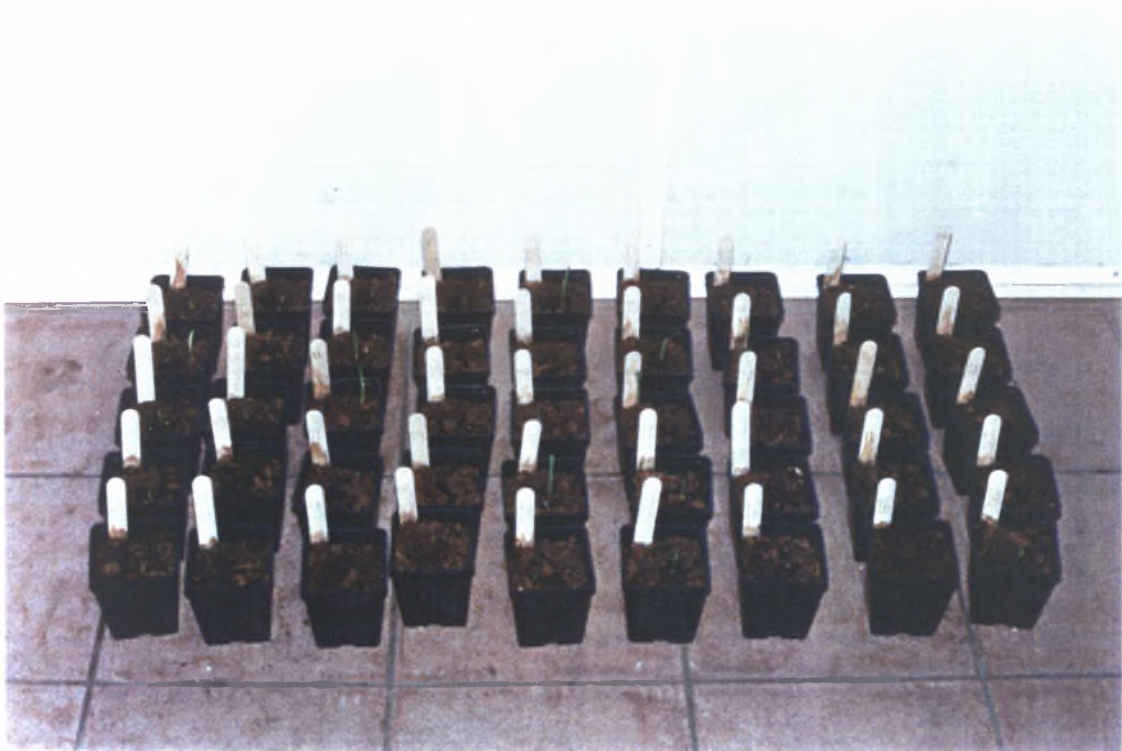
Εικόνα 6 Ανεπτυγμένα σπορόφυτα στις 23/2/94



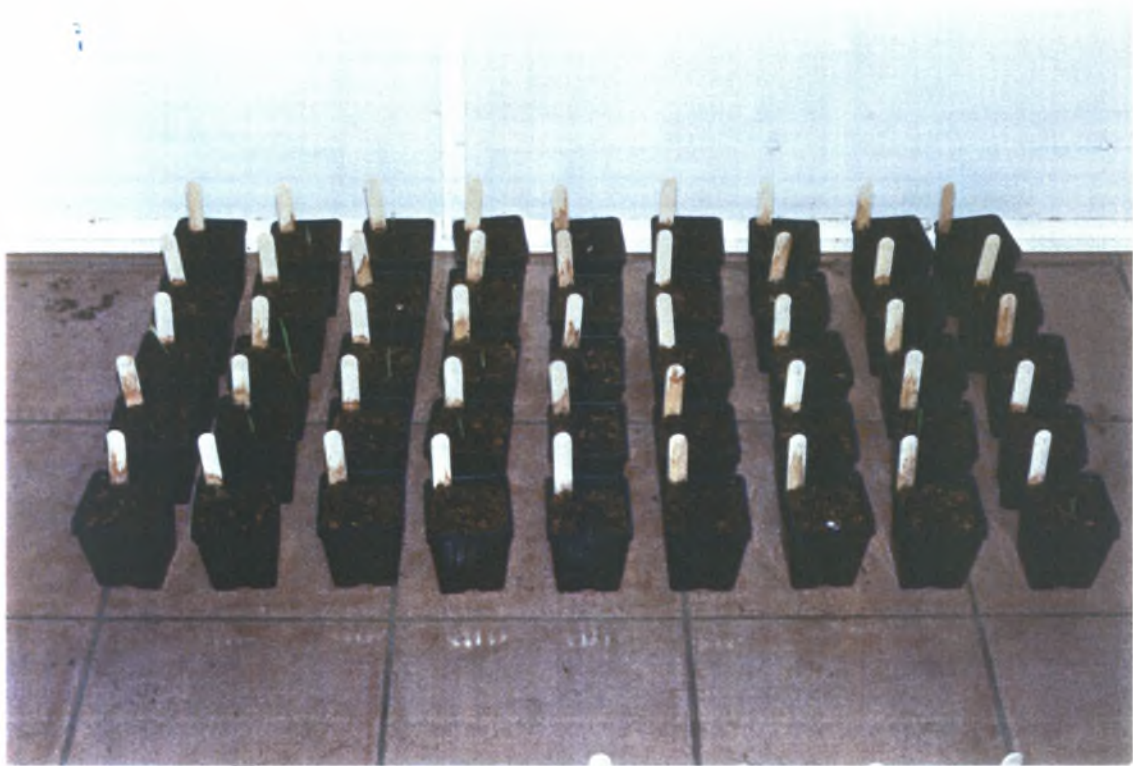
Εικόνα 7 Ανεπτυγμένα σπορόφυτα στις 23/2/94



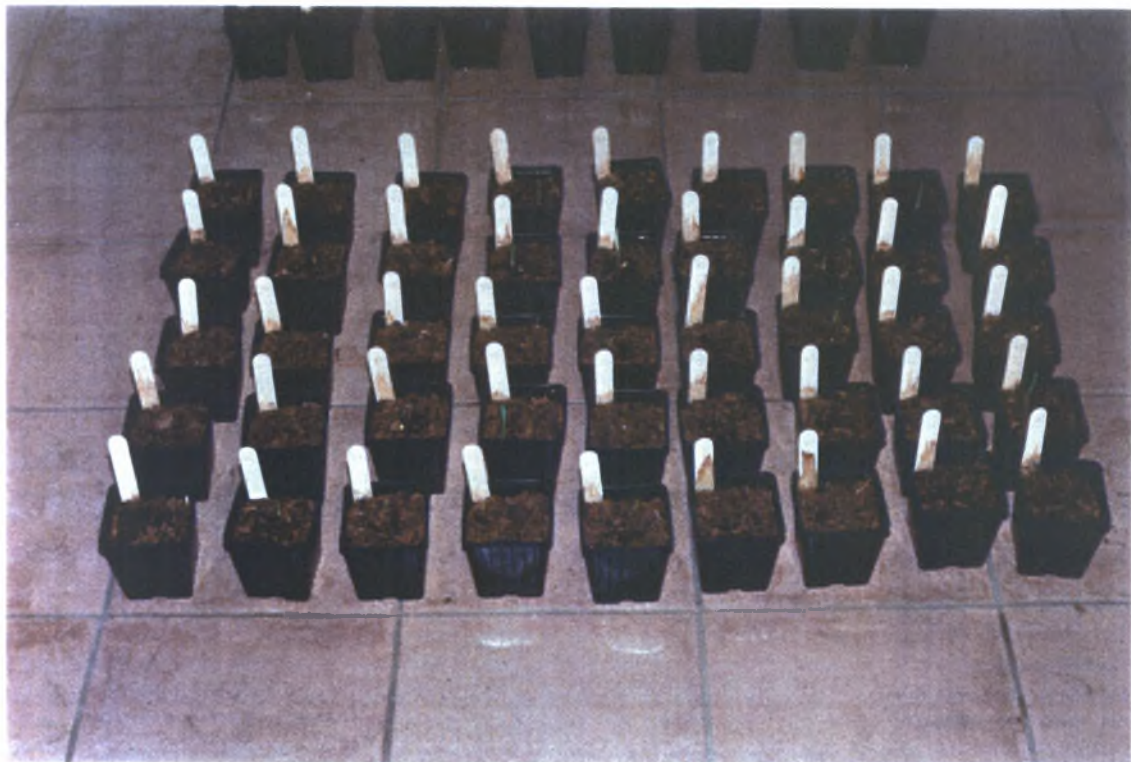
Εικ. 8. Αξιολόγηση σπυροφύτων στις 23/2/94, πρώτη σειρά: κελό πάνω, δεύτερη σειρά, 2, τρίτη σειρά, 3, τέταρτη σειρά, 4, πέντε, έξι σειρά, 5.



Εικ. 9. Επανεύληψη πρώτης στο δεύτερο πείραμα θερμοκηπίου 12/9/94.



Εικ. 10 Επανόληψη δεύτερη στο δεύτερο πείραμα θερμοκρασία 12°C



Εικ. 11 Επανόληψη τρίτη στο δεύτερο πείραμα θερμοκρασία 12°C



Εικ. 12 Επανάληψη τέταρτη στο δεύτερο πείραμα θερμοκοστίτη 12⁵⁰



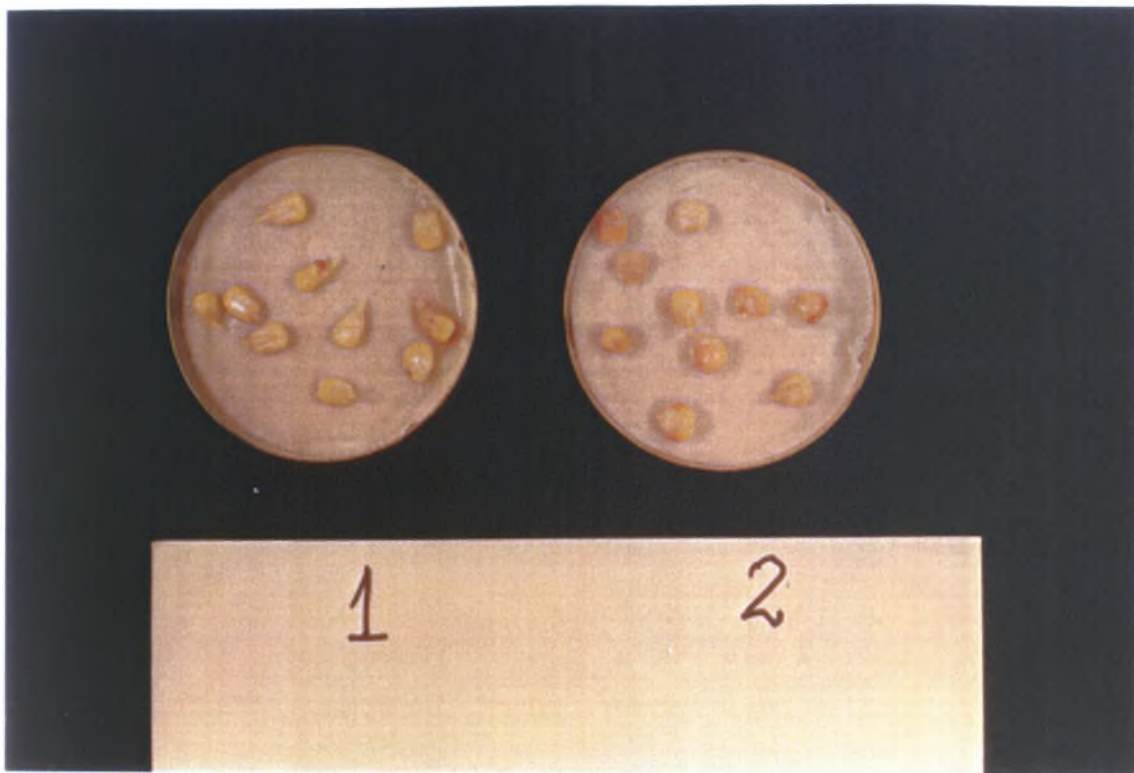
Εικ. 13 Αξιολόγηση σποροφύτων στις 2 1/3/94, ανά δύο σειρές από πάνω πρώτες βαθμ. 5, δεύτερες βαθμ. 4, τρίτες βαθμ. 3, τέταρτες βαθμ. 2, τελευταίες βαθμ. 1



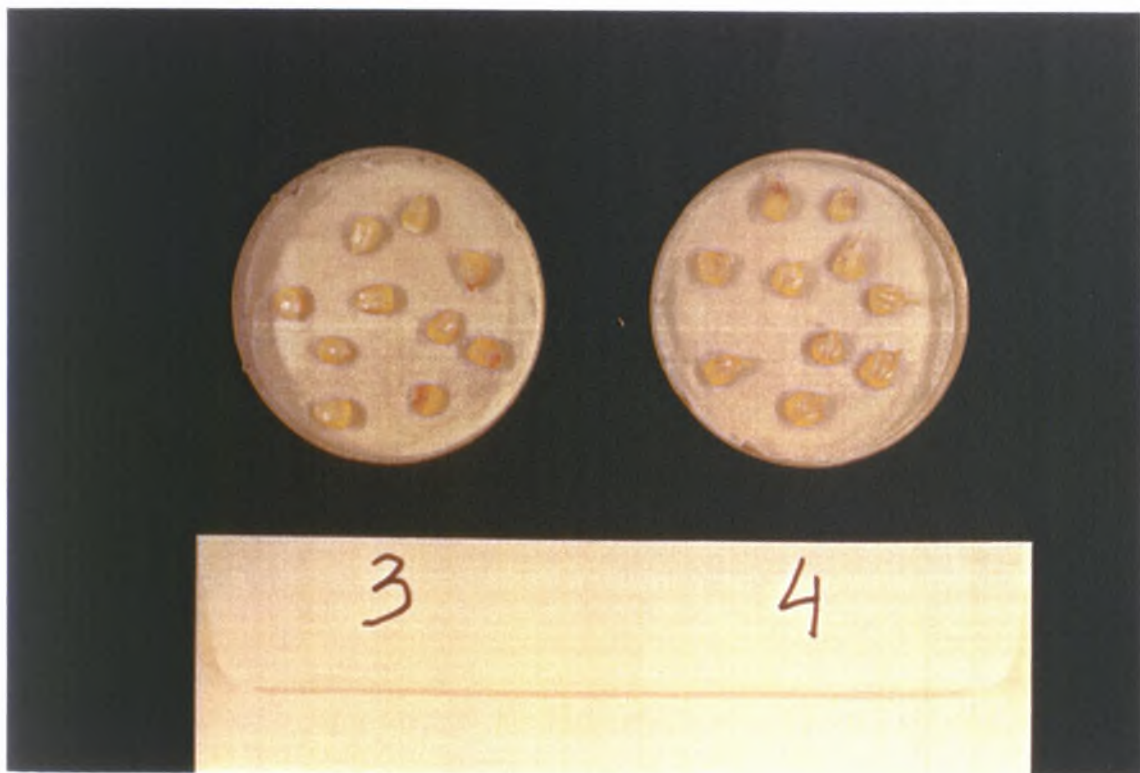
Εικ.14 Αξιολόγηση σποροφύτων στις 21/3/04, ανά δύο σειρές από δεξιά, πρώτες βαθμ.5, δεύτερες βαθμ.4, τρίτες βαθμ.3, τέταρτες βαθμ.2, πέμπτες βαθμ.1.



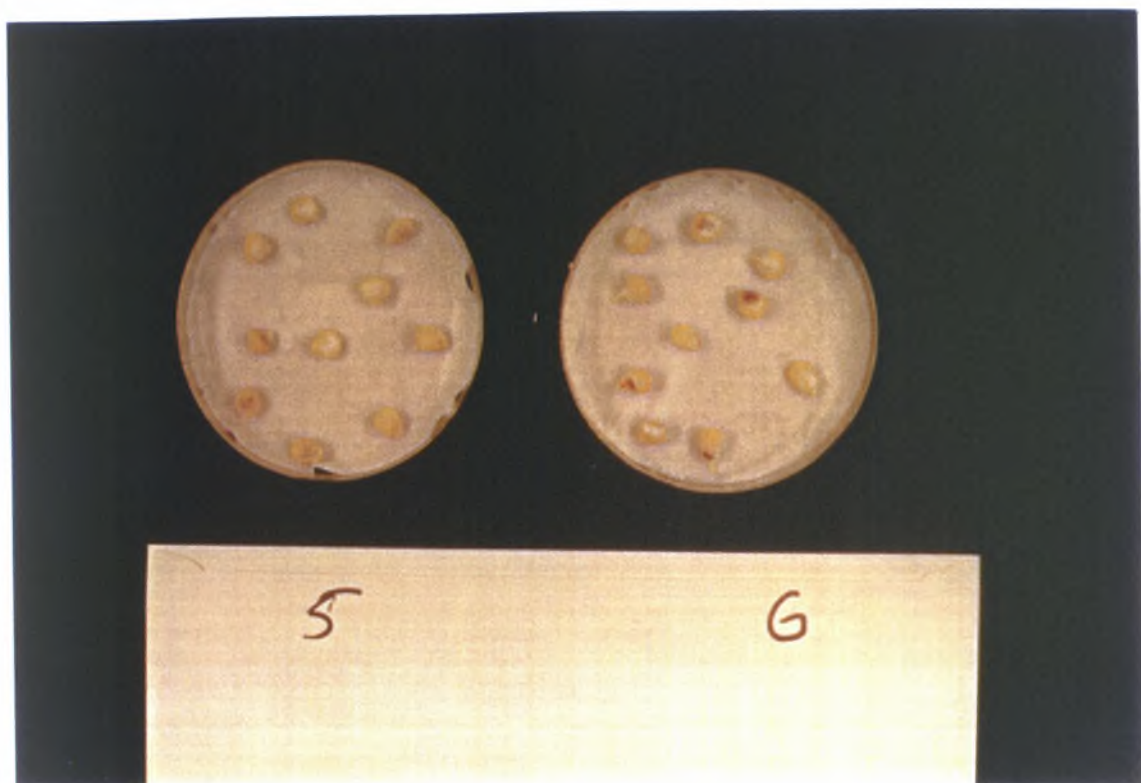
Εικ.15 Αξιολόγηση σποροφύτων στις 21/3/04, πρώτο από δεξιά βαθμ.1, δεύτερο βαθμ.2, τρίτο βαθμ.3, τέταρτο βαθμ.4, πέμπτο βαθμ.5.



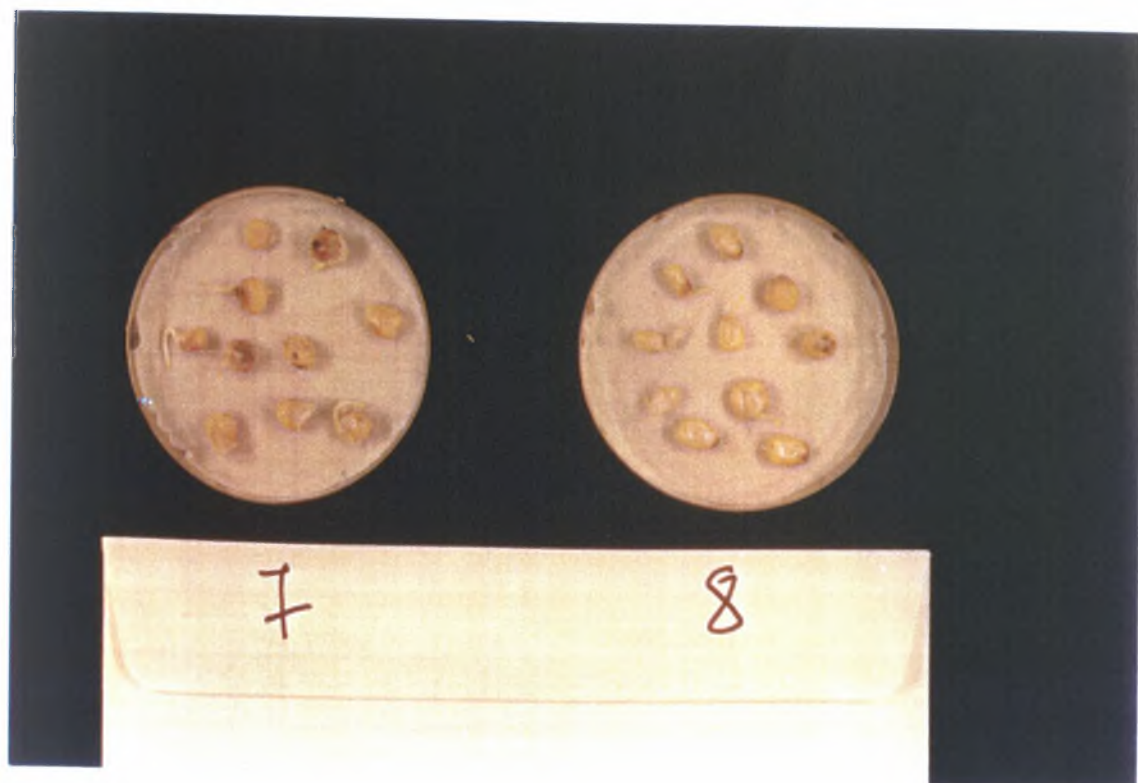
Εικ.16 Ανάπτυξη κολεόπτουλου σε Ρετρί, καθαρές σειρές (1) Β-73 και (2):Μο-17



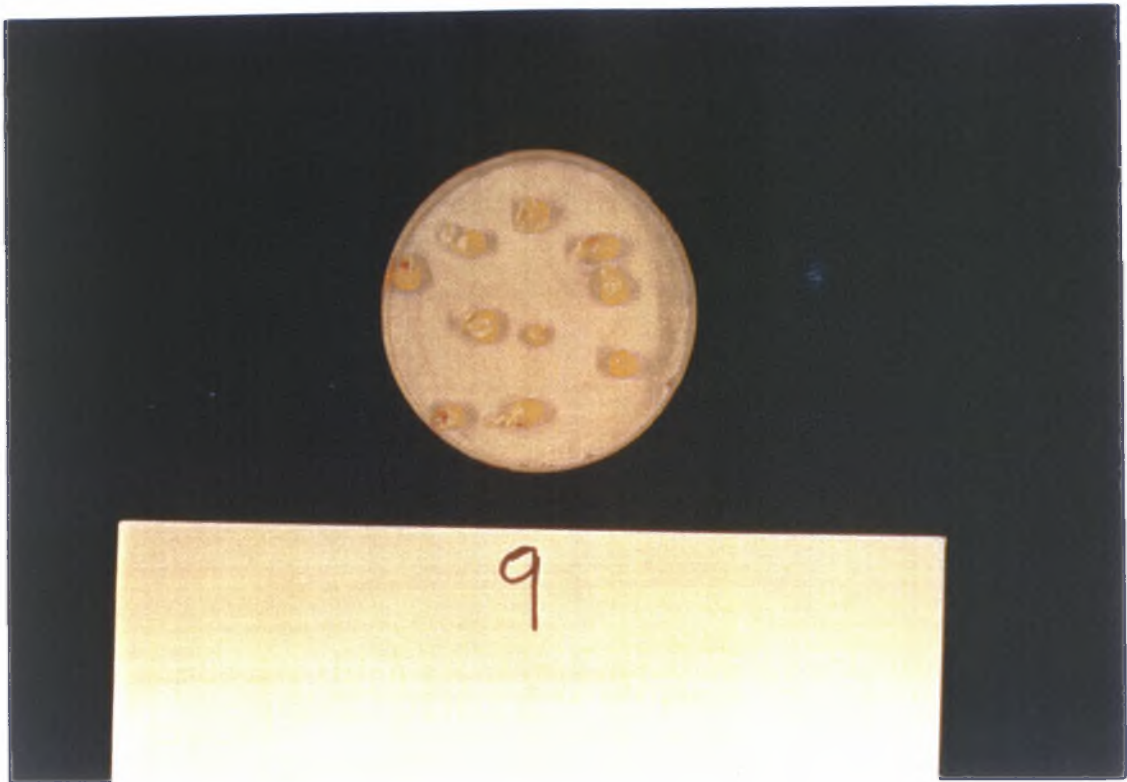
Εικ.17 Ανάπτυξη κολεόπτουλου σε Ρετρί, καθαρές σειρές (3) Α-052 και (4) W-10



Εικ. 18 Ανάπτυξη κοκκώπιου σε Ρετρί, καθαρού σπινός (5) 14524
και (6):33537



Εικ. 19 Ανάπτυξη κοκκώπιου σε Ρετρί, καθαρού σπινός (7) B-73X81/17
και (8) B-73X74524



Εικ.21 Ανάπτυξη καρκινοκυττάρων σε Petri. αριθμός (9). 14524333537

