

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ
& ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
Αριθ. Πρωτοκ. -7-
Ημερομηνία 12-9-1994

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΧΑΜΗΛΩΝ
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ ΣΤΟ ΦΥΤΡΩΜΑ
ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΤΗΣ ΛΥΧΝΑΡΑ ΔΗΜΗΤΡΑΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ Σ.

ΒΟΛΟΣ 1994



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

Αριθ. Εισ.: 107/1
Ημερ. Εισ.: 12-09-2003
Δωρεά:
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ – ΓΦΖΠ
1994
ΛΥΧ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070251

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Παίρνοντας το πτυχίο μπορεί ο δρόμος που θα ακολουθήσω να με οδηγήσει μακριά από το Πανεπιστήμιο. Όμως δε θα ξεχάσω ποτέ τους καθηγητές μου που με καθοδηγούσαν στα πέντε έτη της φοίτησης μου στο Πανεπιστήμιο. Τους ευχαριστώ θερμά! Ιδιαίτερα την κ. Σ. Γαλανοπούλου, καθηγήτρια Γεωργίας και τον Χ. Γούλα καθηγητή Γενετικής Βελτίωσης Φυτών για την καθοδήγηση και την και υποστήριξή τους στην εργασία μου. Επίσης οφείλω ένα θερμό ευχαριστώ στον κ. Ι. Γούναρη για τη μεγάλη του βοήθεια και καθοδήγηση στα πειράματα μοριακής μεθόδου. Ευχαριστώ επίσης θερμά τον τρίτο βαθμολογητή καθηγητή μου κ. Π. Λόλα. Τέλος εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον κ. Φ. Ξανθόπουλο και το ινστιτούτο Βάμβακος για την παροχή των σπόρων βαμβακιού για τα πειράματα της εργασίας μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	11
Α) ΣΥΜΒΑΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	11
Β) ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	14
Πηγή DNA.....	14
Εξαγωγή DNA.....	14
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	16
Ηλεκτροφόρηση σε ζελέ αγαρόζης.....	18
Εξαγωγή ολικού DNA και DNA κυρίως μιτοχονδριακού.....	19
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	20
Α) ΣΥΜΒΑΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	20
Β) ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	23
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	33
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	34
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	4F

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το βαμβάκι (*Gossypium spp*) καλλιεργούνται στις θερμές περιοχές του κόσμου από τους προϊστορικούς χρόνους. Στην Ελλάδα καλλιεργείται από την εποχή του Πausανία και χάρη στις βελτιωτικές προσπάθειες των επιστημόνων, το βαμβάκι είναι το πρώτο γεωργοβιομηχανικό εθνικό προϊόν της χώρας μας. Η Ελλάδα περιλαμβάνεται μεταξύ των πέντε χωρών με τη μεγαλύτερη στρεμματική απόδοση μολονότι βρίσκεται στα όρια της καλλιέργειας του φυτού.

Το βαμβακόφυτο στον τόπο μας, για να συμπληρώσει τον κύκλο του, από τη σπορά μέχρι το τέλος της συγκομιδής χρειάζεται 170 - 210 ημέρες περίπου ανάλογα με τις συνθήκες που θα επικρατήσουν. Η περίοδος αυτή χωρίζεται σε πέντε στάδια:

α) *Στάδιο φυτρώματος*: Είναι η περίοδος από τη σπορά μέχρι την εμφάνιση των κοτυληδόνων στην επιφάνεια. Διάρκει συνήθως 8-10 μέρες, όταν όμως οι συνθήκες είναι δυσμενείς μπορεί να παραταθεί μέχρι 30 ημέρες.

β) *Στάδιο πρώτης ανάπτυξης*: Είναι η περίοδος από το φύτεμα μέχρι την εμφάνιση των πρώτων ανθοφόρων καταβολών (χτενιών) και διαρκεί 35 με 50 ημέρες ανάλογα με τις καιρικές συνθήκες και κυρίως τη θερμοκρασία και υγρασία.

γ) *Στάδιο προ-άνθησης*: Είναι η περίοδος που μεσολαβεί από το σχηματισμό των πρώτων χτενιών μέχρι την εμφάνιση των πρώτων λουλουδιών. Διάρκει 20 - 25 μέρες περίπου. Το φυτό στο στάδιο αυτό αναπτύσσεται ταχύτατα.

δ) *Στάδιο ανθοφορίας - καρποφορίας*: Μπορεί να χαρακτηριστεί ως παραγωγική περίοδος. Διάρκει 45 - 50 ημέρες περίπου. Η μέγιστη ανθοφορία παρατηρείται στο μέσο αυτής της περιόδου. Ο ρυθμός και η διάρκεια αυτού του σταδίου διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες και ειδικότερα την υγρασία, τη θερμοκρασία και το φωτισμό.

ε) *Στάδιο ωρίμανσης*: Είναι η περίοδος που μεσολαβεί από την άνθηση μέχρι την ωρίμανση του καρυδίου (άνοιγμα της κάψας). Διάρκει 45 - 70 ημέρες ανάλογα με την ποικιλία, καιρικές συνθήκες και τη θέση που βρίσκεται το καρύδι πάνω στο φυτό. Ο χρόνος ωρίμανσης είναι μικρότερος στις πρώιμες ποικιλίες καθώς και στα καρύδια που προέρχονται από τα πρώτα άνθη. (Τόλη, 1992).

Όλα τα στάδια του βαμβακόφυτου, δηλαδή από τη σπορά μέχρι το τέλος της συγκομιδής επηρεάζονται από τη θερμοκρασία, υγρασία, αερισμό, φωτισμό και ηλιοφάνεια. Ιδιαίτερα η θερμοκρασία σε συνδυασμό με την υγρασία παίζουν αποφασιστικό ρόλο κατά το στάδιο του φυτρώματος και της αρχικής ανάπτυξης του βαμβακόφυτου. (Wanjura, 1969) εξαιτίας και της μεγαλύτερης ευαισθησίας

που παρουσιάζει το βαμβακόφυτο κατά το στάδιο αυτό. (Christiansen 1967, Thomas και Christiansen 1971).

Το κλίμα της χώρας μας χαρακτηρίζεται από περίοδο βλάστησης περιορισμένης διάρκειας και για το λόγο αυτό επιδιώκεται πρώιμη καλλιέργεια.

Οι χαμηλές θερμοκρασίες που επικρατούν συχνά κατά την περίοδο της βλάστησης του σπόρου και της αρχικής ανάπτυξής του, καθώς και οι απρόβλεπτες καιρικές μεταβολές με πρώιμες βροχές και πτώσεις θερμοκρασίας κατά την ωρίμανση και συγκομιδή είναι βασικοί περιοριστικοί παράγοντες της παραγωγής (Γαλανοπούλου, 1993). Σε πολλά βελτιωτικά προγράμματα των ποικιλιών βαμβακιού τύπου Upland το στοιχείο της πρωιμότητας έχει γίνει τα τελευταία χρόνια μια αυξανόμενη προτεραιότητα. Αυτή η έμφαση στην πρωιμότητα έχει υποβληθεί, εν μέρη, από τη σκέψη διαχείρισης των εχθρών και σε μια αναπτυσσόμενη προσπάθεια να αυξηθεί η παραγωγή μειώνοντας τις εισροές των λιπασμάτων νερού, προστατευτικά καλλιέργειας και ενέργειας (Niles και Feaster, 1984). Με πρώιμη σπορά θεωρητικά έχουμε πρώιμο φύτερωμα, τα φυτά επωφελούνται από τις ευνοϊκές κλιματολογικές συνθήκες και έχουν αρκετό χρόνο στη διάθεσή τους για να αναπτυχθούν και να καρποφορήσουν ακόμη και η ποιότητα του προϊόντος είναι καλύτερη γιατί τα καρύδια ωριμάζουν με ευνοϊκότερες καιρικές συνθήκες (Γαλανοπούλου, 1993). Παρατηρείται ουσιαστικά πρώιμιση κι αύξηση της παραγωγής. (Γαλανοπούλου, 1977). Οποιαδήποτε, οι κλιματικές συνθήκες νωρίς την άνοιξη μπορεί να μην είναι οι άριστες για σπορά (Wanjum 1969, Quisenberry και Gipson 1974, Kerby 1989). Είναι προτιμότερο όμως να γίνει πρώιμη σπορά και να διακινδυνεύσουμε μια επανασπορά παρά να σπείρουμε όψιμα (Γαλανοπούλου, προσωπική επικοινωνία). Η εποχή σποράς διαμορφώνει σημαντικά την πρωιμότητα της παραγωγής. Είναι δύσκολος όμως ο καθορισμός της άριστης εποχής σποράς για το βαμβάκι γιατί οι καιρικές συνθήκες την άνοιξη είναι απρόβλεπτες. Ωστόσο, η σπορά γίνεται από τέλη Μαρτίου ως το πρώτο δεκαήμερο του Μαρτίου. Μετά από πολυετή πειράματα, όμως, το Ινστιτούτο Βάμβακος κατέληξε ότι είναι προτιμότερο να γίνεται η σπορά στο πρώτο δεκαήμερο του Απριλίου (Γαλανοπούλου, 1976).

Η ελάχιστη θερμοκρασία εδάφους για βλάστηση των σπόρων είναι 15 °C (Christiansen, 1964). Ενώ ο Arndt (1945) καθόρισε ότι η άριστη θερμοκρασία αύξησης ριζιδίων και υποκοτύλης του βαμβακιού παρουσιάζεται μεταξύ 33 °C και 36 °C. αργότερα βρέθηκε ότι η άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη της κορυφής της ρίζας ήταν 30 °C (Cooper, 1973, Munro, 1987, Bradow, 1990a, Mc Michael κ.α., 1990).

Το μέγεθος και το είδος της επίδρασης των χαμηλών θερμοκρασιών εξαρτάται πρώτα από όλα από το στάδιο του φυτού, έπειτα από το επίπεδο, τη διάρκεια και την κύμανση της θερμοκρασίας και τέλος από τις συνθήκες που θα ακολουθήσουν την περίοδο του ψύχους (Christiansen και Thomas 1969, Steward 1969, Mc Carter και Roncaddon 1971, Jividen 1972, Levitt 1972). Γενικά σταδιακή αποκατάσταση των καιρικών συνθηκών είναι πιο ευνοϊκή για το φυτό (Γαλανοπούλου, 1993). Οι Wanjura κ.α. (1969) βρήκαν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ θερμοκρασίας και του χρόνου που χρειάζεται για να συμπληρωθεί το 45% του τελικού φυτρώματος. Η ύπαρξη υπερβολικής υγρασίας εμποδίζει την κυκλοφορία του οξυγόνου στο έδαφος με αποτέλεσμα την επιδείνωση της δυσμενούς επίδρασης του ψύχους (Jividen, 1972). Όταν, όμως, η υγρασία του εμβρύου κατά τη διάρκεια του ψύχους είναι μεγαλύτερη από 12-13% τότε το μέγεθος της ζημιάς είναι μικρότερο (Christiansen και Lewis 1973).

Η βλάστηση του βαμβακόσπορου και η ανάπτυξή του ζημιώνονται στις χαμηλές θερμοκρασίες. Μπορεί να ανασταλθεί τελείως η βλάστηση του σπόρου ή να προκληθούν μορφολογικές διαφορές που είναι επιζήμιες στην ανάπτυξη του φυτού (Benedict, 1984). Στο παρελθόν μελέτες στην ευαισθησία του βαμβακιού στο ψύχος έχουν επικεντρωθεί στις επιδράσεις των χαμηλών θερμοκρασιών (5-10 °C) στη βλάστηση του σπόρου (Christiansen 1963, Guim 1971, Buxton κ.α., 1976) και στο φυτόρωμά του (Fowler 1979, Wanjura και Minton 1981). Αυτές οι μελέτες έχουν δείξει ότι θερμοκρασίες αέρα μικρότερες των 16 °C ουσιαστικά σταματούν την ανάπτυξη των φυταρίων βαμβακιού (Murho, 1987).

Ο βαμβακόσπορος είναι ευπαθής στις χαμηλές θερμοκρασίες κατά την έναρξη εμποτισμού του κι όταν η βιοχημική πορεία του σπόρου είναι μεταξύ 18 και 30 ωρών από τη βλάστηση στους 31 °C (Christiansen, 1964, 1967). Αυτή είναι η περίοδος όπου οι σπόροι είναι μεταβολικά ευαίσθητοι στο ψύχος κι έχει ως αποτέλεσμα φτωχή βλάστηση (Christiansen, 1964, 1967, Buxton, 1976, Leffler, 1976). Αν η βλάστηση έχει αρχίσει, τα φυτάρια που εκτέθηκαν σε θερμοκρασίες μικρότερες των 14,4 °C δε μειώνουν την ανάπτυξη αμέσως όταν οι θερμοκρασίες αυξάνουν. (Wanjura, 1970). Ο Steiner (1992), Jacobsen (1992) βρήκαν σε αντιδιαστολή με τα ευρήματα των Thomas και Christiansen (1971) και Colle και Wheeler (1974), ότι οι σπόροι που βλάστησαν αρχικά στο χωράφι κάτω από θερμές συνθήκες εδάφους μπορεί να γίνουν περισσότερο ευαίσθητοι σε χαμηλότερες από τις άριστες θερμοκρασίες κατά τη μετέπειτα ευαίσθητη περίοδο (143 ώρες μετά τη σπορά). Επιπλέον του φυτρώματος ταχεία ανάπτυξη του φυτού και εγκατάσταση είναι σημαντική. Σπόροι που εκτίθενται αρχικά σε

καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών μπορεί αρχικά να φυτρώσουν αλλά να μην εγκατασταθούν (να φθάσουν το στάδιο του πρώτου πραγματικού φύλου). Ο ρυθμός ανάπτυξης των φυταρίων γενικά δε σχετίζεται με το ποσοστό φυτρώματος (Steiner, 1992, Jacobsen, 1992).

Σύμφωνα με αποτελέσματα πειραμάτων, θερμοκρασίες $\leq 20^{\circ}\text{C}$ αναστέλλουν σημαντικά την επιμήκυνση της ρίζας του βαμβακόφυτου. Μέτρια ψυχρή καταπόνηση επίσης αλλάζει τις σχέσεις νερού και ριζών και βλαστών, μειώνοντας την περιεκτικότητα νερού στο βλαστό κι αυξάνοντας την περιεκτικότητα νερού στη ρίζα (Bradow, 1991). Τα ριζίδια απαιτούν τέσσερις φορές περισσότερο χρόνο για να προβάλλουν σε θερμοκρασία 15.6°C απ'ότι σε άριστη θερμοκρασία εδάφους (Wanjuga και Buxton, 1992). Χαμηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια εμποτισμού έχει ως αποτέλεσμα την απόρριψη της κορυφής του ριζιδίου και χαμηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια πρώιμης ανάπτυξης φυταρίων προκαλεί βλάβη στο φλοιό της ρίζας ώστε ο κεντρικός κορμός παραμένει βιώσιμος, αλλά οι πλευρικές ρίζες ξεκινούν πρόωρα (Christiansen, 1964). Αποδείχτηκε ότι στους 5°C τα δύο εκατοστά των ριζιδίων βλαστημένου βαμβακόσπορου, χάνουν αμέσως την υγρασία τους (Christiansen, 1970).

Οι χαμηλές θερμοκρασίες μπορεί να επηρεάζουν τη διαπερατότητα των μεμβρανών η οποία μπορεί να αναστραφεί με ασβέστιο (Ca) ή Μαγνήσιο (Mg). Ο βαμβακόσπορος που εκτίθεται σε χαμηλές θερμοκρασίες υπόκεινται σε χάσιμο της οξειδωσης του ηλεκτρικού οξέος (Lyons και Raison, 1970) και σε μια συμπίεση της ενεργότητας της ισοκιτρικής λυάσης (Mohapatra κ.α., 1970). Ο Smith (1971) απέδειξε ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες επιδρούν μόνο στην ισοκιτρική λυάση ενώ τα επίπεδα των άλλων γλυοξυσωμικών ενζύμων δεν επηρεάζονται. Η συμπίεση της ισοκιτρικής λυάσης στον ευαίσθητο στο κρύο σπόρο είναι αποτέλεσμα μιας αλλαγμένης διαπερατότητας της μεμβράνης του γλυοξυσωματίου η οποία οδηγεί σε μείωση της διαπερατότητας ενώπιον του ηλεκτρικού οξέος. Το ηλεκτρικό οξύ ενεργεί ως ένας μη ανταγωνιστικός αναστολέας της ισοκιτρικής λυάσης μέσα στο γλυοξυσωματίο (Godavari 1973).

Χαμηλές θερμοκρασίες όχι μόνο επηρεάζουν αντίθετα την αύξηση, αλλά επίσης μειώνουν την απορρόφηση νερού και θρεπτικών στοιχείων ιδιαίτερα του φωσφόρου (P). Παρατηρείται επίσης εντονότερη προσβολή από μύκητες που προκαλούν σήψη του λαιμού (Mc Carter και Roncadori 1971, Mc Michael κ.α. 1990).

Για τον περιορισμό των δυσμενών επιδράσεων της θερμοκρασίας καταβάλλονται προσπάθειες που αποβλέπουν στη δημιουργία ανθεκτικών στο ψύχος ποικιλιών (Buxton κ.α. 1976, Mc Arthur κ.α. 1974, Muramoto κ.α. 1971, Smith κ.α.

1972) και στην εφαρμογή διαφόρων τεχνικών που προσδίδουν στα φυτά επίκτητη αντοχή στο ψύχος. Ενδιαφέρουσα τεχνική είναι η διαβροχή με νερό και στη συνέχεια αποξήρανση του σπόρου.(Christiansen 1968, Nogle 1971, Mc Arthur κ.α 1974), η εφαρμογή στο σπόρο ρυθμιστικών ουσιών όπως γιββεριλινών ή μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) (Cole και Wheeler, 1974) και η προσκληραγωγή του σπόρου ή των νεαρών φυτών για ένα χρονικό διάστημα σε χαμηλές θερμοκρασίες για παράδειγμα στους 15 °C (Guinn, 1971).

Ο βαμβακόσπορος μπορεί να γίνει λιγότερο ευαίσθητος σε σπορά σε κρύο έδαφος αν αρχικά γίνει εμποτισμός του σπόρου στους 30 °C (Cole και Wheeler, 1974). Η βλάστηση προεμποτισμένων σπόρων παρουσιάζεται με ταχύτετους ρυθμούς και σε ευρύτερο φάσμα θερμοκρασιών απ' ό,τι σπόροι που δεν έχουν λάβει τέτοια προσπατική μεταχείριση. Οι προ-εμποτισμένοι σπόροι είναι περισσότερο ανθεκτικοί σε μετέπειτα ψυχρή καταπόνηση (Thomas και Christiansen 1971, Cole και Wheeler 1974). Η μηχανική ή χημική αποχνόωση του σπόρου οδηγεί το περίβλημα, όταν βρεθεί σε επιθυμητές συνθήκες, στην ευκολότερη και γρηγορότερη απορρόφηση υγρασίας και βοηθά το έμβρυο να αναπτυχθεί. (Mc Michael, 1990). Τέλος υπάρχει δυνατότητα ελέγχου της εξέλιξης της καλλιέργειας με την εφαρμογή τεχνικών μέσων όπως είναι η κάλυψη της γραμμής σποράς με πολυαιθυλένιο. Η κάλυψη της γραμμής από τη σπορά μέχρι το φύτευμα, με φύλο λευκού πολυαιθυλενίου ανεβάζει τη θερμοκρασία εδάφους κατά 2 °C περίπου, με αποτέλεσμα να επιταχυνθεί και το ποσοστό φυτρώματος κατά 9% και να περιορίζεται η διάρκειά του από 18 σε 11 ημέρες (Γαλανοπούλου κ.α.,1978).

Η ανθεκτικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι σύμπλοκο ποσοτικό χαρακτηριστικό που εκφράζεται μετά από την έκθεση των φυτών σε θερμοκρασίες που πλησιάζουν το ψύχος. Ενώ ένας μεγάλος αριθμός ερευνητών έχει ασχοληθεί, δεν υπάρχει γενική συμφωνία στον τρόπο της δράσης των γονιδίων που ελέγχουν την έκφραση αυτού του χαρακτήρα. Υποτελής, αθροιστικός, μερικά κυρίαρχος και υπερκυρίαρχος έλεγχος έχουν αναφερθεί για γονίδια που καθορίζουν την αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες (Stushnoff κ.α.,1984).

Τα αποτελέσματα πολλαπλών ερευνητικών μελετών (Grafius,1981, Stushnoff κ.α.,1984, Blum,1988,Limin και Fowler,1991) με φυτά μεγάλης καλλιέργειας μπορούν να συνοψιστούν για να παρέχουν μια γενική εικόνα της γενετικής για την αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες, το επίπεδο της γενετικής παραλλακτικότητας για γενετικό υλικό μέσα στα είδη, τις δυναμικές πηγές της νέας εκμεταλλεύσιμης

γενετικής παραλλακτικότητας και την έκφραση των κυρίαρχων ξένων γονιδίων με αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες. i) Κοιτοπλασματικοί παράγοντες έχουν διερευνηθεί για τον έλεγχο της αντοχής σε χαμηλές θερμοκρασίες. Οπωσδήποτε, όμως, οι περισσότερες μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι παίζουν δευτερεύοντα ρόλο στον έλεγχο αυτού του μηχανισμού. ii) Μικρότερο μέγεθος κυττάρων αυξάνει την έκφραση των γονιδίων με αντοχή στο ψύχος κατά τη διάρκεια διαδικασίας εγκλιματισμού (Limin και Fowler, 1991). iii) Γονίδια που παρέχουν διάφορα επίπεδα αντοχής σε χαμηλές θερμοκρασίες βρίσκονται εντός και μεταξύ των ειδών (Brule – Babel και Fowler, 1988, Sutka και Snape, 1989). Η προσαρμογή του βαμβακιού στις εύκρατες χώρες οφείλεται στη μεγάλη κληρονομική παραλλακτικότητα ως προς το χαρακτηριστικό της αντοχής στο ψύχος που χρησιμοποιήθηκε από τους βελτιωτές και φαίνεται πως δεν έχει ακόμη εξαντληθεί. Το χαρακτηριστικό της αντοχής στο ψύχος που βρέθηκε σε μερικά εξαπλοειδή (Muramoto κ.α., 1971) και άγρια είδη βαμβακιού θα μπορούσε να μεταφερθεί με κατάλληλες μεθόδους βελτίωσης σε καλλιεργούμενες ποικιλίες (Mc Arthur κ.α., 1974). Προσπάθειες όμως στις ενδοειδικές και ενδογενετικές μεταφορές έχουν φέρει αποθαρρυντικά αποτελέσματα.

iv) Συγκεκριμένες γενετικές αλληλεπιδράσεις, όπως ομοαλληλική κυριαρχία (Limin και Fowler, 1991) πιθανόν παίζουν ένα ρόλο στην τελική έκφραση από ξένα γονίδια με αντοχή στο ψύχος εισαγόμενο σε γενετικό υπόβαθρο των ειδών δέκτες. Για παράδειγμα, η μέγιστη αντοχή στο ψύχος της βρίζας (*Secale cereale*) επισκιάζεται όταν διασταυρώνεται με τετραπλοειδές (Limin κ.α., 1985) κι εξαπλοειδές σιτάρι (Dvorak και Fowler, 1978). Τέτοιες παρατηρήσεις οδηγούν σε προσπάθειες ώστε να παρέχουν βελτιωτικά προγράμματα με ισχυρότερα γονίδια με αντοχή στο ψύχος μέσα από ενδοειδικές και διαγενωτικές μεταφορές χρησιμοποιώντας κυτογενετικές ή βιοτεχνολογικές διαδικασίες.

Οι μελέτες των βελτιωτικών προγραμμάτων γίνονται στον αγρό, σε ελεγχόμενα περιβάλλοντα και με μοριακές μεθόδους. Η ευκαιρία για επιλογή στον αγρό κανονικά εμφανίζεται μόνο την άνοιξη, καθώς η ανάπτυξη έχει ολοκληρωθεί. Συνεπώς, η ταχύτητα που μπορεί να μετακινηθεί η ύλη μέσα από ένα πρόγραμμα βελτίωσης συνήθως περιορίζεται σε ένα μέγιστο μιας γενιάς κάθε χρόνο. Μια χαμηλή συχνότητα χειμώνων με θερμοκρασίες κριτικής επιλογής και μη ομοιόμορφα επίπεδα καταπόνησης μέσα στα πειράματα με αποτέλεσμα υψηλά πειραματικά σφάλματα δίνουν πρόσθετους περιορισμούς σε αποτελεσματική επιλογή στον αγρό (Sandie κ.α., 1991). Μολονότι ελεγχόμενα περιβάλλοντα θα έπρεπε θεωρητικά να επιτρέπουν περισσότερο αυστηρό έλεγχο

των συνθηκών των πειραμάτων ωστόσο συγκριτικές μελέτες έχουν δείξει ότι είναι λιγότερο επαναλήψιμα και με υψηλότερα πειραματικά σφάλματα από τα πειράματα στον αγρό (Fowler κ.α., 1981). Οι συνυπάρχοντες περιορισμοί στα πειράματα επιβίωσης στον αγρό και σε ελεγχόμενες συνθήκες έχουν παράσχει ένα συνεχές ερέθισμα για έρευνες που να ψάχνουν για γρήγορες πιο αποτελεσματικές μεθόδους πρόβλεψης αντοχής στο ψύχος. Οι πολλές αλλαγές που συμβαίνουν σε μορφολογικά, βιοχημικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια εγκλιματισμού στο κρύο έχουν οδηγήσει τους ερευνητές στην ανάπτυξη βιοχημικών ελέγχων (Stushnoff κ.α. , 1984, Blum, 1988). Οι Ching (1973) Standard (1983) και Van Toai (1988) πρότειναν ότι οι συγκεντρώσεις τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) πρέπει να εκτιμηθούν ως ένας βιοχημικός δείκτης της ανεκτικότητας του καλαμποκιού στο κρύο. Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) είναι ένα μεταβολικό κλειδί κατά την έναρξη της βλάστησης των σπόρων. Στους μη φωτοσυνθετικούς ιστούς ενός βλαστημένου σπόρου η ATP μπορεί να παραχθεί από την αναπνοή και τη ζύμωση. Με χρωματογραφική τεχνική μελετούνται τα επίπεδα τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) στα βλαστημένα έμβρυα και με πειράματα στον αγρό μελετάται το ποσοστό φυτρώματος, το ξηρό βάρος 30 ημέρες μετά τη σπορά και ο ρυθμός φυτρώματος. Η συγκέντρωση ATP στο έμβρυο αποδείχτηκε πιο ακριβής μέθοδος πρόβλεψης του ποσοστού φυτρώματος και του ρυθμού φυτρώματος παρά οι κλασικοί έλεγχοι βλάστησης στο κρύο.

Έρευνες στη μοριακή βάση της αντοχής στις χαμηλές θερμοκρασίες αποκτούν χάρτη με λεπτομερείς σημάνσεις στη σύνδεση των γονιδίων και σε πολλά καλλιεργούμενα είδη υπάρχει έλλειψη γονιδίων σημάνσεων (*marker genes*). Δύο τύποι μοριακών σημάνσεων, πολυμορφισμοί στον περιορισμό του μεγέθους των θραυσμάτων (RFLPS) (O' Brien, 1990) και τυχαίο αυξανόμενο πολυμορφικό DNA (RAPD) (Williams κ.α., 1990, Welsh και Mc Celland, 1990) έδωσαν μια ευκαιρία για γρήγορη χαρτογράφηση και μεταχείριση του γενώματος. Ένας μάρκερ RFLP είναι ένας DNA πολυμορφισμός αναγνωρισμένος με ένα ένζυμο περιορισμού κι ένα μαρκαρισμένο τμήμα DNA που είναι συνήθως από 200 σε 1000 νουκλεοτίδια μακρύ. Οι RAPD μάρκερς είναι ακολουθίες πολυμορφικών DNA που έχουν μεγεθυνθεί από αντίδραση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας τυχαία Οολιγονουκλεοτιδικά τεχνητά τεμάχια DNA, 18 βάσεων ακολουθούμενα από ηλεκτροφόρηση σε ζελέ κι αυξανόμενος διαχωρισμός ακολουθιών (Hayes κ.α., 1993). Στην πατάτα βρέθηκε, με τη βοήθεια των τεχνητών

τεμαχίων DNA, η σειρά των αμινοξέων της πρωτεΐνης που προκαλεί μαύρισμα στο ψύχος (Gounaris.Y. και J.R.Sowokinos,1992).

Η παρούσα εργασία ασχολείται με το στάδιο του φυτρώματος του βαμβακιού σε χαμηλότερες από τις ελάχιστες θερμοκρασίες. Δύο είναι οι σκοποί αυτής της εργασίας. i) Να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν γενεοτυπικές διαφορές ως προς την ικανότητα φυτρώματος του βαμβακιού σε χαμηλότερες από τις ελάχιστες θερμοκρασίες. Το βαμβάκι μεταχειρίστηκε με πλαστικά γλαστράκια, τρυβλία petri και Jiffy-7 σε ελεγχόμενες συνθήκες. ii) Εάν η γενεοτυπικές διαφορές, οι οποίες επαληθεύονται με τις παραπάνω μεθόδους συνδέονται με χαρακτηριστικά του DNA. Να διαπιστωθεί δηλαδή εάν γενότυποι που έχουν την ικανότητα να φυτρώνουν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες μπορούν να αναγνωριστούν με τη μοριακή μέθοδο. Υπάρχει ένας πληθυσμός DNA και με τη βοήθεια τεχνητών τεμαχίων DNA αναζητούνται τα γονίδια που συνδέονται με την εύκολη βλάστηση σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η μέθοδος αυτή είναι λιγότερο χρονοβόρος και επίπονη από τις συμβατές μεθόδους ενώ ελάχιστοι σπόροι είναι αρκετοί για εξαγωγή συμπερασμάτων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το 1994 στο εργαστήριο Γεωργίας και Γενετικής Βελτίωσης Φυτών του τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έγιναν τα παρακάτω πειράματα.

Α) ΣΥΜΒΑΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το πείραμα. Διαφοροποίηση γενοτύπων βαμβακιού ως προς την ικανότητα φυτρώματος σε θερμοκρασία 13 °C με πλαστικά γλαστράκια. Το σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν πλήρως τυχαιοποιημένες ομάδες. Η τυχαιοποίηση έγινε με χαρτάκια. Χρησιμοποιήθηκαν 7 ποικιλίες βαμβακιού. Η προέλευση των σπόρων είναι η εξής:

1. Αυτογονιμοποιημένο φυτό από το γενεαλογικό "ΕΥΑ" του έτους 1991.
2. Απόγονους του προηγούμενου φυτού (1), αυτογονιμοποιημένους το 1992.
3. Απόγονος του (1), αυτογονιμοποιημένος το 1992.
4. Απόγονος του (1), αυτογονιμοποιημένος το 1992.
5. P1 θηλυκός γονέας του υβριδίου, μια ελληνική ποικιλία.
6. P2 αρσενικός γονέας του υβριδίου, η ποικιλία McNair.
7. F1, υβρίδιο.

Η "ΕΥΑ" προήλθε από διασταύρωση της ελληνικής ποικιλίας EXD με την ανεκτική στην αδρομύκωση, αμερικανική ποικιλία Delcot. Είναι πρώιμη ποικιλία, ανεκτική στην αδρομύκωση και διαθέτει κατάλληλο τύπο φυτού για μηχανοσυλλογή (Γαλανοπούλου, 1993).

Η McNair είναι αμερικανικής προέλευσης. Επιτυγχάνει ομοιόμορφο άνοιγμα καρυδιών και παρουσιάζει ιδιαίτερη αντοχή στην ξηρασία.

Οι επαναλήψεις ήταν τέσσερις (4) με πέντε (5) γλαστράκια ανά ποικιλία σε κάθε επανάληψη εκτός του υβριδίου όπου ο σπόρος δεν επαρκούσε και χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα (4) γλαστράκια. Σε κάθε γλαστράκι τοποθετήθηκε πρώτα πλαστική σήτα, για αποφυγή απωλειών περλίτη, έπειτα περλίτης, φυτόχωμα, σπόρος και πάλι φυτόχωμα για την κάλυψη του σπόρου. Τέλος το κάθε ένα ποτίστηκε με 50ml νερό. Το κάθε γλαστράκι έφερε αριθμημένο γλωσσοπίεστρο. Μετά το πέρας αυτής της εργασίας τα γλαστράκια τοποθετήθηκαν στον ψυχρό θάλαμο θερμοκρασίας 13 °C και σχετικής υγρασίας 90% (εικόνα 1). Το κάθε γλαστράκι ποτίζονταν με 25 ml νερό ανά 2 ημέρες περίπου. 21 ημέρες μετά τη σπορά έγινε συμπίεση του χώματος από κάθε γλαστράκι.

2ο πείραμα. Σύγκριση της βλάστησης των εν λόγω ποικιλιών σε θερμοκρασία 13 °C, με τρυβλία. 21 ημέρες από την έναρξη του 1ου πειράματος, τοποθετήθηκαν 10 σπόροι από τις ποικιλίες 1 έως 6 σε αντίστοιχα αριθμημένα τρυβλία με διπλό διηθητικό χαρτί κορεσμένο σε υγρασία. Από το υβρίδιο λόγω έλλειψης σπόρων τοποθετήθηκαν μόνο 6 σπόροι όπου συμπληρώθηκαν με άλλους 4 μετά από 5 ημέρες. Η μέθοδος αυτή θεωρείται ότι επιτρέπει τη βλάστηση του βαμβακιού. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον ίδιο θάλαμο με τα πλαστικά γλαστράκια (εικόνα 2).

3ο πείραμα. Διαφοροποίηση γενοτύπων βαμβακιού ως προς την ικανότητα φυτρώματος σε θερμοκρασία 16 °C, με πλαστικά γλαστράκια 34 ημέρες μετά την έναρξη του 1ου πειράματος. Το σχέδιο ήταν πλήρως τυχαιοποιημένες ομάδες. Η τυχαιοποίηση έγινε από πίνακα τυχαιοποίησης. Τα υλικά και οι μέθοδοι ήταν ίδια με το πρώτο πείραμα. Χρησιμοποιήθηκαν οι παραπάνω σπόροι σε 4 επαναλήψεις με 4 γλαστράκια ανά ποικιλία σε κάθε επανάληψη. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, αλλά το χώμα συμπιέστηκε αρκετά. Το κάθε γλαστράκι ποτίζονταν με ογκομετρικό σωλήνα ανά 2 με 4 ημέρες περίπου.

4ο πείραμα Σύγκριση της βλάστησης των εν λόγω ποικιλιών σε θερμοκρασία 16 °C. 20 σπόροι από κάθε ποικιλία τοποθετήθηκαν σε αντίστοιχα αριθμημένα τρυβλία με διπλό διηθητικό χαρτί κορεσμένο με νερό.

Τα γλαστράκια και τα τρυβλία εισήχθησαν στον ίδιο ψυχρό θάλαμο με το πρώτο πείραμα, αλλά η θερμοκρασία ανέβηκε από το θερμοστάτη στους 16 °C με σχετική υγρασία 89% (εικόνα 7).

Το πείραμα της διαφοροποίησης γενοτύπων βαμβακιού ως προς την ικανότητα φυτρώματος σε θερμοκρασία 13°C με πλαστικά γλαστράκια επαναλήφθηκε με Jiffy-7 στο

5ο πείραμα. Το σχέδιο ήταν πλήρως τυχαιοποιημένες ομάδες. Η τυχαιοποίηση έγινε με τη χρησιμοποίηση χαρτιών της τράπουλας. Χρησιμοποιήθηκαν οι πρώτες έξι από τις επτά παραπάνω ποικιλίες σε 4 επαναλήψεις με 5 Jiffy-7 ανά ποικιλία κι επανάληψη. Τα Jiffy-7 είναι συμπιεσμένη τύρφη (διάμετρο = 4 cm, ύψος = 0.70 cm). Βυθίζονται σε πλατικά λεκάνη με νερό, εμποτίζονται με νερό κι αποκτούν τελικό ύψος 3.5 cm (εικόνα 10). Η τύρφη περιβάλλεται από μια μορφή πλαστικού διχτιού. Στο κέντρο υπάρχει μια οπή όπου τοποθετείται ο σπόρος. Έπειτα τοποθετήθηκαν σε δίσκους με υπερυψωμένα χείλη και εισήχθησαν στον ψυχρό θάλαμο θερμοκρασίας 13°C και σχετικής υγρασίας 90% (εικόνα 6). Ανά 10 ημέρες περίπου γινόταν πλήρωση των δίσκων με νερό για επανύγρανση των Jiffy-7.

6ο πείραμα. Διαφοροποίηση γενοτύπων βαμβακιού ως προς την ικανότητα φυτρώματος σε θερμοκρασία 13°C. Το σχέδιο, τα υλικά και οι μέθοδοι ήταν ίδια με το πέμπτο πείραμα. Χρησιμοποιήθηκαν 6 ποικιλίες βαμβακιού σε 4 επαναλήψεις με 10 Jiffy-7 ανά ποικιλία σε κάθε επανάληψη. Οι ποικιλίες ήταν 3 υβρίδια και οι γονείς των υβριδίων. Το πρώτο υβρίδιο προήλθε από τη διασταύρωση Acala Σίνδου με την Τασκένδη 4, το δεύτερο από τη διασταύρωση Τασκένδη 4 με την Acala Σίνδου και το τρίτο με την Τασκένδη 6 με την Acala Σίνδου.

Η Acala Σίνδου είναι ελληνική ποικιλία η οποία προέκυψε από επιλογή κάτω από ελληνικές συνθήκες στην αμερικανική ποικιλία Acala SJ1. Μεσοπρώιμη ποικιλία με καλά ποιοτικά χαρακτηριστικά και ειδική προσαρμοστικότητα ιδιαίτερα για την περιοχή της Λαμίας.

Οι Τασκένδη 4 και Τασκένδη 6 είναι ρωσικής προέλευσης ποικιλίες από την ομώνυμη περιοχή. Πρώιμες ποικιλίες με ανθεκτικότητα στις αδρομυκώσεις, καλή παραγωγικότητα, με ικανοποιητικό μορφολογικό τύπο φυτών που προσαρμόζεται στη μηχανοσυλλογή, αλλά με ποιοτικά χαρακτηριστικά ίνας που υστερούν σε σχέση με τις ελληνικές ποικιλίες. Μετά το τέλος της προετοιμασίας τα Jiffy-7 εισήχθησαν στον ίδιο ψυχρό θάλαμο με τα Jiffy-7 του πέμπτου πειράματος.

Β) ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιδιώχτηκε η εξαγωγή DNA προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι γενοτυπικές διαφορές ως προς την ικανότητα φυτρώματος σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι δυνατόν να διακριθούν με τη μοριακή μέθοδο.

Πηγή DNA

Χρησιμοποιήθηκαν οι ποικιλίες που παρουσιάζονται στον πίνακα 1 και το υβρίδιο που προήλθε από τη διασταύρωση Τασκένδη 4 με την Acala Σίνδου και οι γονείς του. Η πηγή DNA είναι είτε σπόρος είτε ριζίδιο, υποκοτύλη ή κοτυληδόνες βλαστημένων σπόρων βαμβακιού.

Εξαγωγή DNA

Πριν την εξαγωγή του DNA παρασκευάστηκαν τα διάφορα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή. Το Extraction buffer αποτελείται από 50 mM tris-HCl, 100 mM Na_2 -EDTA και 20mM Na-metabisulfate. Το Lytic buffer αποτελείται από 50 mM tris-HCl κι 100 mM Na_2 -EDTA ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα είναι 50ml NH_4OH 3M. Το Extraction και Lytic buffer μετά την παρασκευή αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 20 min καθώς επίσης και το νερό του ρυθμιστικού διαλύματος διότι σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C το NH_4OH καταστρέφεται. Η αποστείρωση γίνεται για να i) καταστραφούν τυχόν DNAσες ii) καταστραφεί τυχόν ξένο DNA και iii) καταστραφούν τυχόν βακτηρίδια που θα απελευθερώσουν DNA και DNAσες (Γούναρης, προσωπική επικοινωνία). Το tris είναι η βάση του διαλύματος και με το HCl καθορίζεται το pH του διαλύματος. Το Na_2 -EDTA δεσμεύει δυσμενή κατιόντα για ανεργοποίηση τυχόν DNAσών που χρειάζονται διοθενή κατιόντα. Το Na-metabisulfate είναι αναγωγικό άλας και χρειάζεται για να κρατήσει τους κινόνες σε αναγωγική κατάσταση για αποφυγή αντίδρασης με το υπό εξέταση DNA. Τα παραπάνω διαλύματα αποθηκεύονται στο ψυγείο για περαιτέρω χρήση. Η εξαγωγή DNA έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Neuburger (1985).

Σωλήνες μικροφυγοκέντρου αριθμήθηκαν από το 1 μέχρι το 9 όσες και οι υπό εξέταση ποικιλίες. Μέσα σε κάθε σωλήνα ομογενοποιήθηκε μικρή ποσότητα ριζιδίου ή υποκοτύλης ή κοτυληδόνες με extraction buffer. Έπειτα ο κάθε σωλήνας με το ομογενοποίημα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για 2 ώρες στους 55°C. Μετά το πέρας των 2 ωρών το ομογενοποίημα μεταβιβάστηκε σε αριθμημένους σωλήνες φυγόκεντρου και προστέθηκαν 200 ml χλωροφορμίου (CHCl_3) για την απομάκρυνση πρωτεϊνών που δε χρειάζονται. Έγινε ανάδευση

στο Voltex κι έπειτα φυγοκέντριση για για 15 min στους 4000xg. Από το εναιώρημα κάθε σωλήνα απομακρύνθηκαν 150 ml και μεταβιβάστηκαν σε αριθμημένους σωλήνες μικροφυγοκέντρου. Επίσης προστέθηκαν 15 ml NH_4OH 3M για να υπάρχει ορισμένη συγκέντρωση άλατος για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Τέλος προστέθηκαν 400 ml κρύας αιθανόλης, για την αφαλάτωση και συσσωμάτωση των πρωτεϊνών κι αποθήκεύθηκαν στο ψυγείο στους -20°C για περισσότερο από 1 ημέρα.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μικροφυγοκέντρου από την παραπάνω διαδικασία, μεταβιβάστηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυγοκεντρήστηκε στη μέγιστη ταχύτητα για 30 min. Έπειτα οι σωλήνες αδειάστηκαν, ξεπλύθηκαν με 100% κρύα αιθανόλη κι ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min. Ο κάθε σωλήνας γυρίστηκε ανάποδα σε απορροφητικό χαρτί και στεγνώθηκε για 1 ώρα. Προστέθηκαν 25 ml αποστειρωμένο νερό σε κάθε σωλήνα κι ακολούθησε φυγοκέντρηση. Τέλος το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρθηκε σε αντίστοιχους σωλήνες μικροφυγοκέντρου.

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρειάζεται για τον κάθε σωλήνα 50 ml διαλύματος που θα περιέχει: 1 μl dNTP 2,2 mM, 5 μl 10x reaction buffer το οποίο αποτελείται από 200 mM τρις-HCl pH 8,4 και 500 mM KCl, $MgCl_2$ 1,5 ml, δύο primers (τεχνητά τεμάχια DNA) 4 μl, 3,5 μl DNA από κάθε δείγμα, 1 ml taq-πολυμεράση, 34 ml αποστειρωμένο νερό και 30 μl mineral oil για παρεμπόδιση της εξάτμισης. Η taq-πολυμεράση είναι ένζυμο όπου χρειάζεται για τη δημιουργία DNA και απομονώθηκε από βακτήριο που ζεί σε θερμοπηγές. Μετά ο κάθε σωλήνας μικροφυγοκέντρου εισήχθη στη συσκευή "Trio-thermoblock" για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η συσκευή ρυθμίστηκε ως εξής: στους 94°C για 1,5 min στους 72°C για 3 min. Ο κύκλος αυτός επαναλήφθηκε 30 έως 40 φορές. Μετά τα δείγματα ήταν έτοιμα για την ηλεκτροφόρηση σε ζελέ.

Στην πατάτα βρέθηκε η πρωτεΐνη που σχηματίζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Βρέθηκε λοιπόν η αλληλουχία των αμινοξέων από το άμινο άκρο. Δημιουργήθηκαν τεχνητά τεμάχια DNA (primers) όπου στην ακολουθία των βάσεων σε κάθε 3η βάση τοποθετούνται όλες οι βάσεις. Για το λόγο αυτό ο πληθυσμός των primers είναι μεγάλος.

Στους σωλήνες μικροφυγοκέντρου υπήρχαν διάφορα τεμάχια του υπό εξέταση DNA από 50Kb έως 200b. Θεωρήθηκε ότι σε ένα από τα τεμάχια υπήρχε το γονίδιο που συνδέεται με την εύκολη βλάστηση σε χαμηλές θερμοκρασίες και γι'αυτό εισήχθηκαν οι δύο primers ο ένας "sense" και ο άλλος "anti-sense". Ο ένας "sense" αυτός που έχει νόημα δηλαδή και είναι ίδιος με την 3'-5' αλυσίδα του υπό εξέταση DNA και ο άλλος "anti-sense" ίδιος με την 5'-3' αλυσίδα του υπό εξέταση DNA.

Κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ακολουθούνται οι εξής διαδικασίες. Στους 94°C το υπό εξέταση DNA αποχωρίζεται. Έπειτα στους 42°C οι primers βρίσκουν ένα τεμάχιο DNA και υβριδίζονται. Ο "sense" υβριδίζεται στην αντίθετη αλυσίδα ενώ ο "anti-sense" στο ίδιο το γονίδιο. Τέλος στους 72°C

η taq-polymerase ξεκινώντας από τους primers και χρησιμοποιώντας σαν εκμαγείο το υπό εξέταση DNA, θα συνθέσει νέο DNA χρησιμοποιώντας τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια. Η σύνθεση DNA φθάνει 2000 έως 3000 βάσεις κι έπειτα η taq-polymerase αποχωρίζεται. Εάν οι primers είναι κοντά λιγότερο από 1000 βάσεις πολλαπλασιάζεται το τμήμα DNA μεταξύ των δύο primer, διαφορετικά τα υπόλοιπα χάνονται μέσα στο ζελέ της αγαρόζης.

Ηλεκτροφόρηση σε ζελέ αγαρόζης

Μετά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, το DNA αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε ζελέ αγαρόζης. 7,5 γραμμάρια αγαρόζης μαζί με 500 ml διαλύματος TBE (50 ml 10x TBE) το οποίο αποτελείται από 90 mM tris, 2mM Na₂-EDTA και 90 mM βορικό οξύ, θερμαίνονται ώσπου να γίνουν σιρόπι. Στο σιρόπι έπειτα προσθέτονται μερικά ml βρωμιούχο αιθίδιο και το σιρόπι αδειάζεται σε πλάκα όπου τοποθετούνται ειδικές "χτένες" για τη δημιουργία εσοχών. Το βρωμιούχο αιθίδιο χρειάζεται για την πρόσδεση του DNA έτσι ώστε όταν ακτινοβολείται με UV να φθορίζει πολύ έντονα η περιοχή που βρίσκεται το DNA. Το σιρόπι αφήνεται να στερεοποιηθεί. Έπειτα απομακρύνονται οι "χτένες" και το ζελέ τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει 2 έως 3 λίτρα αποστειρωμένο νερό.

Από το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μικροφυγοκέντρου, μετά από το PCR, απομακρύνονται με μικροπιπέτα 50ml και μεταβιβάζονται σε νέους σωλήνες μικροφυγοκέντρου. Σε αυτούς προσθέτονται 10 μl loading buffer το οποίο αποτελείται είτε από 50% lytic buffer, 50% γλυκερόνη και 0,5% βρωμοφαινόλη μπλε, είτε από 200 ml 10x TBE, 200 μl γλυκερόνη και μικρή ποσότητα βρωμοφαινόλης μπλε. Η βρωμοφαινόλη μπλε χρειάζεται για να ξέρουμε πότε θα σταματήσουμε την ηλεκτροφόρηση διότι είναι μπλε και μετακινείται πιο γρήγορα από το DNA. Στο ζελέ της αγαρόζης, σε κάθε εσοχή που δημιουργήθηκε από τη "χτένα", εισάγεται με την μικροπιπέτα μικρή ποσότητα από το παραπάνω μίγμα. Όταν η διαδικασία αυτή τελειώσει, η συσκευή μπαίνει σε λειτουργία κι αναμένουμε 1 έως 2 ώρες για να μετακινηθεί το DNA μέσα στο ζελέ. Στην ηλεκτροφόρηση τα διάφορα τεμάχια DNA οδεύουν προς το θετικό (+) ηλεκτρόδιο και η απόσταση που απομακρύνονται από την αφετηρία είναι αντιστρόφως ανάλογη με το λογάριθμο του μήκους των βάσεων. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το ζελέ μεταφέρεται στη συσκευή UV για την ανίχνευση των μπάντων και τη φωτογράφησή τους.

Οι συσκευές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρησης φαίνονται στην εικόνα 13.

Εξαγωγή ολικού DNA και DNA κυρίως μιτοχονδριακού

Η πηγή DNA ήταν 30 σπόροι βαμβακιού από κάθε ποικιλία από τις ποικιλίες 1 έως 6 του πίνακα 1. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι η εξής: 30 σπόροι από τις παραπάνω ποικιλίες ομογενοποιήθηκαν στο μίξερ με 130 ml διαλύματος 100 ml 3-CN-μορφολινο)-πρόπανο-σουλφονικό οξύ (MOPS) pH 7.2, 10 mM EDTA, 3mM μερκαπτοαιθανόλη, 0.5% β/ο πολυβινυλπυρρόλιδόνη (PVP), 0.1% β/ο αλβουμίνης από ορό βοδινού (BSA) για 45 δευτερόλεπτα. Το ομογενοποίηση διηθήθηκε από 4 στόματα τυρόπανου. Το διήθημα φυγοκεντρήθηκε στους 3000 χg για 10 λεπτά σε 4°C για να απομακρυνθούν σαν ίζημα κύτταρα, πυρήνες, χλωροπλάστες και άλλα άχρηστα υλικά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης επιτεύχθηκε ισορροπία μεταξύ υπερκείμενου και ιζήματος (σχήμα 1α). Από το υπερκείμενο κρατήθηκε 1 ml από κάθε δείγμα για εξαγωγή ολικού DNA. Τα δείγματα αυτά ονομάστηκαν S. Το υπόλοιπο υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε στους 10.000 χg για 30 λεπτά στους 4°C για να απομακρυνθούν τα μιτοχόνδρια. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης τα μιτοχόνδρια ήταν πλέον στο ίζημα (σχήμα 1β). Το μιτοχονδριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 ml διάλυμα ομογενοποίησης. Τα δείγματα ονομάστηκαν P και περιείχαν κυρίως μιτοχονδριακό DNA, αλλά όμως και μικρά ποσά χλωροπλαστικού και πυρηνικού DNA. Στα P και S δείγματα προστέθηκαν 20 ml διαλύματος SDS 10% β/ο για να διαλυθούν οι μεμβράνες και να απελευθερωθεί το DNA κι εκχυλίστηκαν δύο φορές με 1 ml φαινόλης. Το εκχύλισμα υπέστη σύντομη μικροφυγοκέντρηση και η υδατινή φάση που περιείχε το DNA αποχωρίστηκε από τη φαινολική (σχήμα 1γ). Στην υδατινή φάση προστέθηκε 1/10 του όγκου διάλυμα οξικού νατρίου (NaCOOH) 3M με pH 5.2 και 2.5 όγκοι κρύα αιθανόλη θερμοκρασίας -20°C. Έγινε ανάμιξη κι όλο το μίγμα διατηρήθηκε στους -70°C για 2 ώρες. Το DNA συγκεντρώθηκε ως ίζημα με μικροφυγοκέντρηση για 2 λεπτά. Το DNA πλύθηκε με κρύα αιθανόλη (-20°C) και στεγνώθηκε με ροή αζώτου. Έπειτα επαναιωρήθηκε σε 200 μl απεσταγμένου αποστειρωμένου νερού. Από το αιώρημα χρησιμοποιήθηκαν 3 μl για την αντίδραση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Οι υπόλοιπες τεχνικές είναι οι ίδιες όπως έχουν περιγραφεί παραπάνω.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Α) ΣΥΜΒΑΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Είκοσι μία μέρες μετά τη σπορά δεν παρατηρήθηκε φύτευμα πιθανόν γιατί δεν ήρθε σε άμεση επαφή ο σπόρος με το χώμα. Το περίβλημα του βαμβακόσπορου δε βρέθηκε σε επιθυμητές συνθήκες ώστε να απορροφήσει υγρασία από το περιβάλλον και να βοηθήσει το έμβρυο να αναπτυχθεί. Επίσης είκοσι πέντε ημέρες μετά την σπορά παρατηρήθηκε έναρξη φυτρώματος στο υβρίδιο που προήλθε από τη διασταύρωση μιας Ελληνικής ποικιλίας με την Mc Nair. Τελικά μετά από τριάντα τέσσερις ημέρες παραμονής σε θερμοκρασία 13°C καμιά ποικιλία δεν ολοκλήρωσε το στάδιο φυτρώματος. Πέντε ημέρες μετά την άνοδο της θερμοκρασίας στους 16°C παρατηρήθηκε έναρξη φυτρώματος στις ποικιλίες 1 και 2 του πρώτου πειράματος, ενώ σε δώδεκα ημέρες μετά την άνοδο της θερμοκρασίας φύτευσε το 15% της ποικιλίας 1 το 20% της ποικιλίας 2 και το 5% των ποικιλιών 3, 4, 6 και 7. Οι ποικιλίες αναφέρονται στον πίνακα 1. Μολονότι οι προαναφερθείσες ποικιλίες φύτευσαν, κανένα φυτάριο δεν εγκαταστάθηκε. Οι κοτυληδόνες ήταν κοντά στο έδαφος, χλωρώτικες και όχι πλήρως ανεπτυγμένες.

Τα αποτελέσματα της βλάστησης ποικιλιών βαμβακοσπόρου σε θερμοκρασία 13°C σε τρυβλία, παρουσιάζονται στον πίνακα 1 και στις εικόνες 3 έως 6. Η έναρξη βλάστησης ήταν σε 6 μόλις ημέρες ενώ σε δέκα επτά ημέρες ολοκληρώθηκε. Μετά από δώδεκα ημέρες σε θερμοκρασία 13°C η βλάστηση των ποικιλιών ήταν μεταξύ πρώτου και δεύτερου υποσταδίου του σταδίου φυτρώματος που φαίνονται στην εικόνα 14.

Τα αποτελέσματα του τρίτου πειράματος παρουσιάζονται στον πίνακα 4 και στις εικόνες 7 και 8. Η έναρξη βλάστησης ήταν σε δέκα ημέρες από διασταύρωση σπορά. Τελικά σε τριάντα ημέρες από τη σπορά φύτευσε το 19% της ποικιλίας 1, το 6% των ποικιλιών 3 και 5, το 12.5% της ποικιλίας 4 και το 31% της ποικιλίας Mc Nair και του υβριδίου που προήλθε από τη διαστάβρωση μιας Ελληνικής ποικιλίας με την Mc Nair.

Τα αποτελέσματα της βλάστησης ποικιλιών βαμβακοσπόρου σε θερμοκρασία 16°C, σε τρυβλία παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Σε τρεις μόλις ημέρες ξεκίνησε η βλάστηση και σε δεκατέσσερις ημέρες ολοκληρώθηκε. Το ποσοστό του αριθμού των σπόρων που εμφάνισαν κοτυληδόνες στο σύνολο των βλαστημένων σπόρων είναι το εξής: 60% της ποικιλίας 1, το 53% της

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΒΑΜΒΑΚΟΣΠΟΡΟΥ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 13°C, ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ.

ΗΜΕΡΕΣ	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ						
	1	2	3	4	5	6	7
0							
6	1						
8	6	4	2			2	
10	8	6	2			2	2
12	8	6	2			2	3
13	8	6	2			2	5
17	8	6	2			2	6

Η προέλευση των ποικιλιών είναι η εξής:

1. Αυτογονιμοποιούμενο φυτό από γενεαλογικό "ΕΥΑ" του έτους 1991.
2. Απόγονος του προηγούμενου φυτού (1), αυτογονιμοποιημένος το 1992.
3. Απόγονος του (1), αυτογονιμοποιημένος το 1992.
4. Απόγονος του (1), αυτογονιμοποιημένος το 1992.
5. P1 θηλυκός γονέας του υβριδίου, μια Ελληνική ποικιλία.
6. P2 αρσενικός γονέας του υβριδίου, η ποικιλία Mc Nair.
7. F1 υβρίδιο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΒΑΜΒΑΚΟΣΠΟΡΟΥ ΣΕ
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 16°C ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ

ΗΜΕΡΕΣ	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ						
	1	2	3	4	5	6	7
0							
3						1	7
4	8	5	3	2	4	5	11
5	18	10	7	4	10	9	12
6	19	17	7	4	10	10	12
10	19	18	8	5	10	10	13
12	19 18*	18 11*	10 5*	7	11	10	16
				2* 2**	6* 2*	8*	4* 9**
14	20	19	11	7	11	10	16
	7* 12**	3* 10**	3* 3**	1* 2**	2* 7**	2* 6**	12**

Οι ποικιλίες αναφέρονται στον πίνακα 1

* Έναρξη κοτυληδόνων

** Κοτυληδόνες

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. ΥΠΟΣΤΑΔΙΑ* ΤΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΦΥΤΡΩΜΑΤΟΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ
70 ΗΜΕΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΠΟΡΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 13°C (34 ημέρες)
ΚΑΙ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 16°C (36 ημέρες), ΣΕ ΓΛΑΣΤΡΑΚΙΑ.

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ				ΣΥΝΟΛΟ	Μ.Ο. (χ)
	I	II	III	IV		
1 **	22	18	28	22	9.0	225
2	16	14	24	16	7.0	175
3	18	10	22	12	6.2	155
4	18	12	20	10	6.0	15
5	20	10	20	14	6.4	16
6	22	10	24	24	8.0	20
7	125	275	175	225	8.0	20

CV= 25.66%

Ε.Σ.Δ $\alpha=0.5=0.260$

* Τα υποστάδια παρουσιάζονται στην εικόνα 14.

** Οι ποικιλίες αναφέρονται στον πίνακα 1.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Πηγή	Β.Ε.	ΑΤ	Μ.Τ.	F	F ₀₅
Παρ/τητας					
Ποικιλίες	6	1.109	0.318	1497	2.66
Επανάληψεις	3	2.152			
Σφάλμα	18	3.868	0.215		
Σύνολο	27	7.929			

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. ΥΠΟΣΤΑΔΙΑ* ΤΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΦΥΤΡΩΜΑΤΟΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ
 ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ 35 ΗΜΕΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΠΟΡΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 16°C,
 ΣΕ ΓΛΑΣΤΡΑΚΙΑ.

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ				ΣΥΝΟΛΟ	Μ.Ο. (χ)
	I	II	III	IV		
1**	1.5	2.75	1.5	1.5	7.25	1.813
2	2.0	2.25	1.75	2.0	8.0	2.0
3	2.0	1.75	1.5	1.5	6.75	1.688
4	1.5	2.25	1.5	2.0	7.25	1.813
5	1.25	2.0	1.5	1.25	6.0	1.5
6	3.0	1.75	2.25	2.0	9.0	2.25
7	1.75	2.25	3.25	2.0	9.25	2.313

CV= 24.207%

Ε.Σ.Δ 0.5=0.260

* Τα υποστάδια παρουσιάζονται στην εικόνα 14.

** Οι ποικιλίες αναφέρονται στον πίνακα 1

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Πηγή	Β.Ε.	ΑΤ	Μ.Τ.	F	F ₀₅
Παρ/τητας					
Ποικιλίες	6	2.09	0.348	1.626	2.66
Επανάληψεις	3	0.581			
Σφάλμα	18	3.856	0.214		
Σύνολο	27	6.527			

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. ΥΠΟΣΤΑΔΙΑ* ΤΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΦΥΤΡΩΜΑΤΟΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ
 ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ 30 ΗΜΕΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΠΟΡΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 13°C,
 ΣΕ Jiffy-7.

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ				ΣΥΝΟΛΟ	Μ.Ο. (χ)
	I	II	III	IV		
1 **	12	18	12	16	5.8	1.45
2	12	12	14	18	5.6	1.4
3	16	10	14	18	5.8	1.45
4	16	12	12	10	5.0	1.25
5	14	20	12	14	6.0	1.5
6	12	16	12	14	5.4	1.35

CV= 21.89%
 Ε.Σ.Δ $\alpha_{.5}$ =0.182

* Τα υποστάδια παρουσιάζονται στην εικόνα 14.

** Οι ποικιλίες αναφέρονται στον πίνακα 1.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Πηγή	Β.Ε.	ΑΤ	Μ.Τ.	F	F ₀₅
Παρ/τητας					
Ποικιλίες	5	0.16	0.032	0.364	2.90
Επαναλήψεις	3	0.20			
Σφάλμα	15	1.32	0.088		
Σύνολο	23	1.68			

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. ΥΠΟΣΤΑΔΙΑ* ΤΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΦΥΤΡΩΜΑΤΟΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ
 ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ 30 ΗΜΕΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΠΟΡΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 13°C,
 ΣΕ Jiffy-7.

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ				ΣΥΝΟΛΟ	Μ.Ο. (χ)
	I	II	III	IV		
Acala Σίνδου	1.5	1.4	1.667	1.433	6.8	1.45
Task 4	1.15	1.0	1.25	1.05	4.45	1.13
Task 6	1.0	1.0	1.4	1.0	4.4	1.1
Acala Σ. X Task 4	1.7	1.3	1.2	1.2	5.4	1.35
Task 4 X Acala Σ.	1.5	1.7	1.1	1.5	5.8	1.45
Task 6 X Acala Σ.	1.2	1.3	1.7	1.1	5.3	1.35

CV= 16.061%

Ε.Σ.Δ σ_s=0.129

* Τα υποστάδια παρουσιάζονται στην εικόνα 14.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Πηγή	Β.Ε.	ΑΤ	Μ.Τ.	F	F ₀₅
Παρ/τητας					
Ποικιλίες	5	0.562	0.112	2.545	2.90
Επανάληψεις	3	0.100			
Σφάλμα	15	0.667	0.044		
Σύνολο	23	1.329			

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. ΜΗΚΟΣ ΡΙΖΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΥΠΟΚΟΤΥΛΗΣ ΣΕ cm ΒΛΑΣΤΗΜΕΝΩΝ
ΣΤΟΡΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 13°C.

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ				ΣΥΝΟΛΟ	Μ.Ο. (x)
	I	II	III	IV		
Acala	1.669	1.775	2.108	1.72		
Σίνδου	11.669	11.775	12.108	11.72	47.272	1.818
Task 4	1.2			2.0		
	11.2	1.0	1.675	12.0	44.875	1.219
			11.675			
Task 6			1.0			
	1.0	1.0	11.0	1.0	41.00	0.250
Acala Σ.		0.967	1.6	1.65		
X	1.0	10.967	11.6	11.65	44.217	1.054
Task 4						
Task 4	2.70	2.0	2.4	2.48		
X	5	12.0	12.4	12.48	49.630	2.402
Acala Σ.	12.75					
Task 6	1.45	2.6	3.1	1.7		
X	11.45	12.6	13.1	11.7	48.850	2.213
Acala Σ.						

CV= 36.686%

Ε.Σ.Δ 0,5=0.337

* Τα στοιχεία παρουσιάζονται με κωδικοποίηση.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Πηγή	B.E.	AT	M.T.	F	F ₀₅
Παρ/τητας					
Ποικιλίες	5	13.090	2.618	8.727	2.90
Επαναλήψεις	3	2.514			
Σφάλμα	15	4.5	0.300		
Σύνολο	23	20.104			

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. ΜΗΚΟΣ ΡΙΖΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΥΠΟΚΟΤΥΛΗΣ ΣΕ cm ΒΛΑΣΤΗΜΕΝΩΝ
ΣΠΟΡΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 13°C.

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ				ΣΥΝΟΛΟ	Μ.Ο. (χ)
	I	II	III	IV		
1 *	20	2.2	1.5	2.45	48.150	2.038
	12.0*	12.2	11.5	12.45		
2	2.6	2.7	1.5	3.4	50.2	2.550
	12.6	12.7	11.5	13.4		
3	2.1	10	1.150	2.6	45.850	1.463
	12.1		11.150	1012.6		
4	1.7	0.6	2.2	10	44.50	1.125
	11.7	10.6	12.2			
5	2.6	2.223	1.1	1.35	47.273	1.818
	12.6	12.223	11.1	11.35		
6	1.6	2.0	2.2	2.7	48.50	2.125
	11.6	12.0	12.2	12.7		

CV= 36.686%

Ε.Σ.Δ 0.5=0.337

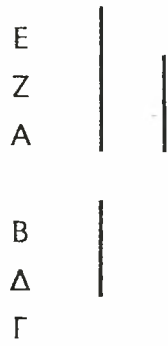
** Τα στοιχεία παρουσιάζονται με κωδικοποίηση.

* Οι ποικιλίες αναφέρονται στον πίνακα 1.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Πηγή	Β.Ε.	ΑΤ	Μ.Τ.	F	F ₀₅
Παρ/τητας					
Ποικιλίες	5	5.110	1.022	1.523	2.90
Επανάληψεις	3	1.368			
Σφάλμα	15	10.071	0.671		
Σύνολο	23	16.549			

Πίνακας 9. ΜΗΚΟΣ ΡΙΖΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΥΠΟΚΟΤΥΛΗΣ ΣΕ cm. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΣΩΝ ΟΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΕΛΑΧΙΣΤΟ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΕΥΡΟΣ (ΜΕΘΟΔΟΣ Duncan).



A: Acala Σίνδου

B: Task 4

Γ: Task 6

Δ: Acala Σίνδου X Task 4

E: Task 4 X Acala Σίνδου

Z: Task 6 X Acala Σίνδου

ποικιλίας 2, 27% της ποικιλίας 3, 28.5% της ποικιλίας 4, το 63.5% της ποικιλίας 5, το 60% της ποικιλίας 6, και το 75% του προαναφερθέντος υβριδίου. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα φυτάρια του υβριδίου ήταν πιο εύρωστα από τα υπόλοιπα και παρουσίαζαν τάση ταχείας ολοκλήρωσης του σταδίου φυτρώματος.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων με τα γλαστράκια και με τρυβλία, τα γλαστράκια θεωρήθηκαν ανεπιτυχής μέθοδος για τον έλεγχο της φυτρωτικής ικανότητας γενοτύπων βαμβακιού. Το χώμα δε συμπιέζεται ικανοποιητικά ώστε μεγάλη επιφάνεια του σπόρου να έρχεται σε άμεση επαφή με αυτό.

Τα αποτελέσματα του πέμπτου πειράματος δηλαδή της διαφοροποίησης γενοτύπων με Jiffy-7 παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Έντεκα μέρες μετά τη σπορά παρατηρήθηκε έναρξη βλάστησης. Βλάστησαν το 15% των ποικιλιών 1 και 4, το 10% των ποικιλιών 2, 3, και 5, το 12.5% της ποικιλίας 6. Είκοσι μία μέρες μετά τη σπορά τα ποσοστά ανέρχονται σε 25% στη ποικιλία 1, σε 17.5% στις ποικιλίες 2 και 3, σε 12.5% στη ποικιλία 4 και 22.5% στις ποικιλίες 5 και 6.

Τελικά ούτε με τη μέθοδο με τα γλαστράκια ούτε με τα Jiffy-7 ούτε με τα τρυβλία δεν ολοκληρώθηκε το στάδιο φυτρώματος σέ θερμοκρασία 13°C.

Τα αποτελέσματα του έκτου πειράματος παρουσιάζονται στον πίνακα 6 και στις εικόνες και . Έντεκα ημέρες μετά τη σπορά βλάστησε το 5% της Acala Σίνδου, της Τασκένδης 4 και της Τασκένδης 6, το 22.5% του υβριδίου που προήλθε από τη διασταύρωση Acala Σίνδου με την Τασκένδη 4, το 7.5% του υβριδίου που προήλθε από τη διασταύρωση Τασκένδη 4 με την Acala Σίνδου και το 17.5% του υβριδίου που προήλθε από τη διασταύρωση Τασκένδη 6 με την Acala Σίνδου. Είκοσι μία ημέρες μετά τη σπορά το ποσοστό ανήλθε για την Acala Σίνδου στο 27%, την Τασκένδη 4 στο 6%, την Τασκένδη 6 στο 5%, το υβρίδιο Acala Σίνδου X Τασκένδη 4 στο 35%, το υβρίδιο Τασκένδη 4 X Acala Σίνδου στο 25% και το υβρίδιο Τασκένδη 6 X Acala Σίνδου στο 25%.

Το στάδιο του φυτρώματος χωρίζεται σε τέσσερα υποστάδια (εικόνα 14). Ονομάστηκε 1 το υποστάδιο όπου ο σπόρος δεν έχει βλαστήσει, 2 το υποστάδιο όπου ο σπόρος έχει απλώς βλαστήσει και σχηματίζεται η καμπούρα της υποκοτύλης, 3 το υποστάδιο όπου η καμπούρα εμφανίζεται στην επιφάνεια του εδάφους και 4 την εμφάνιση των κοτυληδόνων στην επιφάνεια του εδάφους. Σύμφωνα με τα υποστάδια αυτά έγινε ανάλυση παραλλακτικότητας στο πρώτο, τρίτο, πέμπτο και έκτο πείραμα.

Σε κανένα από τα προαναφερθέντα πειράματα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές σημαντικές διαφορές δηλαδή δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των γενοτύπων ως προς το φυτόωμα ούτε στους 13°C ούτε στους 16° C.

Υπάρχει μερική συνέπεια ως προς τη φυτρωτική ικανότητα των γενοτύπων βαμβακιού στις διάφορες μεθόδους.

Τέλος μετρήθηκε το μήκος ριζιδίου και υποκοτύλης των βλαστημένων σπόρων στο πέμπτο και έκτο πείραμα, κι έγινε ανάλυσή τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 7 και 8. Στατιστικές σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο στο έκτο πείραμα. Η σύγκριση των μέσων όρων έγινε με τη μέθοδο Duncan και παρουσιάζεται στον πίνακα 9.

Τελικά ο βαμβακόσπορος στους 13°C βλαστάνει, αλλά δεν ολοκληρώνει το στάδιο φυτώματος. Δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση γενοτύπων ως προς τη φυτρωτική ικανότητα στους 13°C. Υπάρχουν ενδείξεις υπεροχής των υβριδίων ως προς την ταχύτητα φυτώματος και ευρωστίας των φυτών. Κατά γενικό κανόνα τα υβρίδια έχουν μεγαλύτερο μήκος ριζιδίου και υποκοτύλης από τους γονείς τους.

Β) ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Λόγω παρουσίας της γκοσσουπόλης, η οποία είναι μια πολυφαινολική χρωστική ουσία (Boatner κ.α., 1947, Adams κ.α., 1960, Markman και Rzhekhina, 1965, Berardi και Cololblatt, 1980), στην πηγή DNA κατά την εξαγωγή DNA δεν πήραμε αποτελέσματα. Οι χημικές ουσίες των διαλυμάτων δεσμεύονταν από την γκοσσουπόλη με αποτέλεσμα την απώλεια του DNA.

Κατά την εξαγωγή ολικού και DNA κυρίως μιτοχονδριακού, τα δείγματα S δεν έδειξαν σημαντικές εικόνες. Προφανώς το ποσό του DNA ήταν πολύ μικρό και δεν έδωσε ορατά προϊόντα πολλαπλασιασμού (εικόνες 15 και 16).

Τα δείγματα P έδωσαν ένα μεγάλο αριθμό πολλαπλασιασθέντων τεμαχίων, μεγέθους από 70000 βάσεις μέχρι 600 βάσεις (εικόνα 17). Προφανώς οι primers αναγνωρίζουν πολλές περιοχές του DNA. Αυτό είναι φυσικό διότι το DNA είναι ολικό και όχι μόνο μιτοχονδριακό. Όλα τα P δείγματα έχουν μια ομάδα τεμαχίων 100 - 200 βάσεις ατελώς χωρισμένων το ένα από το άλλο λόγω της μικρής διαφοράς μεγέθους των. Το δείγμα P6 αποτελεί εξαίρεση. Δεν φαίνεται να έχει όλα τα μέλη της ομάδας αυτής των μικρών πολλαπλασιασμένων τεμαχίων. Ίσως μόνο ένα τεμάχιο 100 βάσεων (εικόνα 18).

Άρα στην παρούσα εργασία δεν κατέστη δυνατό να εξαχθούν συμπεράσματα για τη διαφοροποίηση γενοτύπων ως προς τη φυτρωτική ικανότητα και τη μοριακή μέθοδο. Δεν πρέπει να απογοητευόμαστε όμως και οι προσπάθειες πρέπει να συνεχιστούν. Η κατεύθυνση πρέπει να γίνει προς τις ποικιλίες "gladless" σε εργαστήρια κατάλληλα εξοπλισμένα για τη μέθοδο αυτή και ίσως εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα για τη διαφοροποίηση γενοτύπων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διαφοροποίηση γενοτύπων βαμβακιού ως προς τη φυτρωτική ικανότητα σε θερμοκρασία 13°C και 16°C, ελέγχθηκε με πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο Γεωργίας και Γενετικής Βελτίωσης Φυτών του τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το 1994. Τα πειράματα έγιναν με ελεγχόμενες συνθήκες σε πλαστικά γλαστράκια, τρυβλία petri και Jiffy-7. Έξι ποικιλίες βαμβακιού κι ένα υβρίδιο μελετήθηκαν σε πλαστικά γλαστράκια και τρυβλία σε θερμοκρασία 13°C και 16°C. Δώδεκα ποικιλίες, εκ των οποίες οι πρώτες έξι είναι οι προαναφερόμενες, μελετήθηκαν σε Jiffy-7 σε θερμοκρασία 13°C.

Σε κανένα από τα πειράματα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των γενοτύπων ως προς το φύτρωμα ούτε στους 13°C ούτε στους 16°C με κανένα μέσο. Ο βαμβακόσπορος στους 13°C βλαστώνει, αλλά δε φαίνεται να ολοκληρώνει το στάδιο του φυτρώματος. Υπάρχουν ενδείξεις υπεροχής των υβριδίων ως προς την ταχύτητα φυτρώματος κι ευρωστίας των φυτών και κατά γενικό κανόνα έχουν μεγαλύτερο μήκος ριζιδίου και υποκοτύλης.

Επίσης επιχειρήθηκε η διαφοροποίηση γενοτύπων βαμβακιού ως προς τη φυτρωτική ικανότητα με τη μοριακή μέθοδο. Επιχειρήθηκε εξαγωγή ολικού και κυρίως μιτοχονδριακού DNA από σπόρους ριζίδια και κοτυληδόνες οκτώ ποικιλιών κι ενός υβριδίου. Δυστυχώς δεν κατέστη δυνατό να εξαχθούν συμπεράσματα για τη διαφοροποίηση γενοτύπων ως προς τη φυτρωτική ικανότητα εξαιτίας της παρουσίας γκοσσυπόλης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, R., T.A. Geissman, και J.D. Edwards. 1960.
Gossypol, apigment of cottonseed. Chem. Rev. 60: 555-574.
- Arndt, C.H. 1945. Temperature-growth relationships of the roots and hypocotyls of cotton seed lings. Plant Physiol. 20: 200-220
- Benedict, C.R. 1984. Physiology in Cotton. Argon J. 24:1 51-192.
- Berardi, L.C. και L.A. Goldblatt. 1980. Gossypol p. 183-237.
In I. Liener(ed) Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press, Inc., N.Y.
- Blum, A. 1988. Plant breeding for stress environments.
CRC Press, Boca Raton, FL
- Boatner, C.H. C.M. Hall, M.L. Rollings, και L.E. Castillon. 1947. Pigment of glands of cottonseed. II Nature and properties of gland walls. Bot. Gaz. 108: 484-494.
- Bradow, J.M. 1990a. Chilling sensitivity of photosynthetic oil seedlings : I.Cotton and Sunflower. J. Exp Bot. 41: 1585-1593.
- Bradow, J.M. 1991. Cotton altivar responses to suboptimal postemergent temperatures. Crop Sci. 31: 1595-1599.
- Brute - Babel, A.L. και D.B. Fowler, 1988. Genetic Control of cold hardiness and vernalization requirement in winter wheat. Crop Sci. 23: 879-884.
- Buxton, D.R., P.J. Sprenger, E.J. Pegelow, Jr. 1976. Periods of chilling sensitivity in erminating cottonseed. Crop Sci. 16: 471-474.
- Buxton, D.R. και Sprenger, P.J., 1976. Genetic variability for cottonseed germination at favourable and low temperatures. Crop Sci., 16: 243-246.

- Γαλανοπούλου, Σ.Σ. 1976. Επίδραση της εποχής σποράς και του πυκνού πληθυσμού φυτών στο βαμβάκι. Μεταπτυχιακή διατριβή. 9-Π. Α.Π.Θ.
- Γαλανοπούλου, Σ.Σ. 1977. Αύξηση και ανάπτυξη βαμβακιού (*Gossypium hirsutum* L.) με διάφορο πληθυσμό φυτών και εποχή σποράς. Διδακτορική διατριβή. 1-5 Α.Π.Θ.
- Γαλανοπούλου, Σ.Ν., Μαρκούση, Σ.Γ. και Χλίχλια, Α.Γ. 1978. Επίδραση της εποχής σποράς και της κάλυψης με πολυαιθυλένιο στο βαμβάκι (*Gossypium hirsutum* L.) Γεωρ. Ερ. 2: 176-178.
- Γαλανοπούλου, Σ.Σ. 1993. Ειδική γεωργία II. Πανεπιστημιακές σημειώσεις. 2-70. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Ching, T.M. 1973. Adenosine triphosphate content and seed vigor. *Plant Physiol.* 51: 400-402.
- Christiansen, M.N. 1963. Influence of chilling upon seedling development of cotton. *Plant Physiol.* 38: 520-522.
- Christiansen, M.N. 1964. Influence of chilling upon subsequent growth and morphology of cotton seedling *Crop Sci.* 4:584-586.
- Christiansen, M.N. 1967. Periods of sensitivity to chilling in germinating cotton. *Plant Physiol.* 42: 431-433
- Christiansen, M.N. 1968. Induction and prevention of chilling injury to radicle tips of imbibing cotton seed. *Plant Physiol.* 43: 743-6.
- Christiansen, M.N. and R.O. Thomas. 1969. Season long effects of chilling treatments applied to germinating cottonseed. *Crop Sci.* 9:672-673.
- Christiansen, M.N. , H.R. Carns, and D.J. Slayter. 1970. Stimulation of soluble loss from radicles of *Gossypium*. *Plant Physiol.* 46:53-56.



- Christiansen, M.N. και C.F. Lewis. 1973. Reciprocal differences in tolerance to seed-hydration chilling in F1 progeny of *Gossypium hirsutum* L. *Crop. Sci.* 13: 210-212
- Cole, D.F. και J.E. Wheeler, 1974. Effect of pre-germination treatment on germination and growth of cotton seed at suboptimal temperature. *Crop Sci.* 14 : 451-4.
- Cooper, A.J. . 1973. Root temperature and plant growth *Res. Rev.* 4. Commonwealth Bur. of Horti. and plantation Crops, East, Malling, Maidstone, Kent, UK. .
- Dvorak, J. και D.B. Fowler. 1978. Cold hardiness potential of triticale and tetraploid rye. *Crop. Sci.* 17 : 477-478 .
- Fowler, J.L. . 1979. Laboratory and field response of perconditioned upland cottonseed to minimal germination temperatures. *Argon, J.* 71 : 223-228 .
- Godovari, H.R. , S.S. Badour, και E.R. Waygood. 1973. Isocitrate lyase in green leaves. *Plant Physiol.* 51 : 863-867.
- Grafius, J.E. . 1981. Breeding for winter hardiness. p. 161-174. In C.R. Olien and M.N. Smith(ed) *Analysis and improvement of plant cold hardiness.* CRC Press, Boca Raton, FL.
- Guinn, G. 1971. Chilling injury in cotton seedlings. Changes in permeability of cotyledons. *Crop. Sci.* 11 : 101-102.
- Guinn, G. 1971. Changes in sugars, starch, R.N.A., protein and lipid soluble phosphate in leaves of cotton plants at low temperature. *Crop. Sci.* 11 : 262-5.
- Jividen, G.M. . 1972. Temperature and anaerobic effects upon normal germination of cotton and the differentiation of periods of chilling as a function of internal oxygen utilization. *Diss. Abstr.* 33-B (3) 1032.

Kerby, T.A., M. Keely, και S. Johnson. 1989. Weather and seed quality variables to predict cotton seedling emergence. *Argon. J.* 81 : 415-419.

Leffter, H.R. . 1976. Altered development of ribonuclease activity and formation of polyribosomes in chilled cotton cotyledons. *Crop. Sci.* 16 : 71-75.

Levitt, J. . 1972. Responses of plants to environmental stresses. *Physiological ecology. A series of monographs, texts and treatises* : 1-45.

Limin, A.E., J. Dvorak και D.B. Fowler. 1985. Cold hardiness in hexaploid triticale. *Can. J. Plant Sci.* 65 : 487-490.

Limin, A.E. και D.B. Fowler. 1991. Breeding for cold hardiness in winter wheat. Problems, progress and alien gene expression. *Field Crops Res.* 27 :201-218.

Lyons, J.M. και J.K. Reason. 1970. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.* 45 : 386-389.

MarkMan, A.L., και V.P. Rzhekhin. 1965. *Gossypol and its derivatives*. IPST Press Binding: Wiener Bindery Ltd., Jerusalem, Israel.

Mc Arthur, J.A., Hesketh, J.D. και Baker, D.N., 1974. *Cotton Crop Physiol.* Cambridge Univ. Press., London. Edited by L.T. Evans. Cotton (10) 297-325.

Mc Carter, S.M. και R.W. Roncadori. 1971. Influence of low temperature during cottonseed germination on growth and diseases susceptibility. *Phytopathology* 61 : 1426-1429.

Mc Michael, B.L., Maham, J.R. και Quisenberry, J.E. 1990. Thermal dependence of root systems, growth and enzyme functions, *Proceedings of Beltwide Cotton Conferences*, National Cotton Council of America, Post Box 12285, Memphis, Tennessee 38182, USA.

- Mohapatra, N., E. W. Smith, R.C. Fites, και G.R. Noggle 1970. Chilling temperature depression of isocitratase activity from cotyledons of germinating cotton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40: 1253-1258.
- Munro, J.M. 1987, *Cotton* 2nd ed. Langman-Wiley, New York.
- Muramoto, H., Hesketh, J.D. και Baker, D.N. 1971. Cold tolerance in hexaploid cotton. *Crop Sci*, 11: 589-591.
- Neuburger, M. 1985. Preparation of plant mitochondria, criteria for assessment of mitochondrial integrity and purity, survival *in vitro*. In: Douce, R. και D.A., Day(eds.): *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Higher Plant Cell Respiration. 18: 7-24. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N.Y.
- Niles, G.A., και C.V. Feaster. 1984. Breeding in cotton *Agronomy* 24: 202-229.
- Nogle, G.R. 1971. Getting and maintaining a stand seed germination and seedling emergence. *Proc. Beltwide Cott. Prod. Res. Conf*: 72-3.
- O'Brien, S.J. 1990. *Genetic maps: Locus maps of complex genomes*. 5th ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Quisenberry, J.E., και J.R. Gipson. 1974. Growth and productivity of cotton grown from seed produced under four high temperatures. *Crop. Sci.* 14: 300-302.
- Savdie, I., R. Whitewood, R.L. Raddatz, και D.B. Fowler, 1991. Potential for winter wheat production on the Canadian prairies : A CERES model winterkill risk assessment. *Can. J. Plant Sci.* 71 : 21-30.
- Smith, E.W., Fites, R.C., και Noggle, G.R., 1971. Effects of chilling temperature on isocitratase and malate synthetase levels during cottonseed germination. *Proc. Beltwide Cotton Prod. Res. Conf.* 11-13.

Wanjura, D.F., Hudspeth, E.B. και Bilbro, J.D., 1969. Temperature effect on emergence rate of cotton under field situations Arg. J. , 61: 387-389.

Wanjura, D.F., D.R. Buxton, και H.N. Stapleton. 1970. A temperature model for predicting initial cotton emergence. Agron J. 62: 741-743.

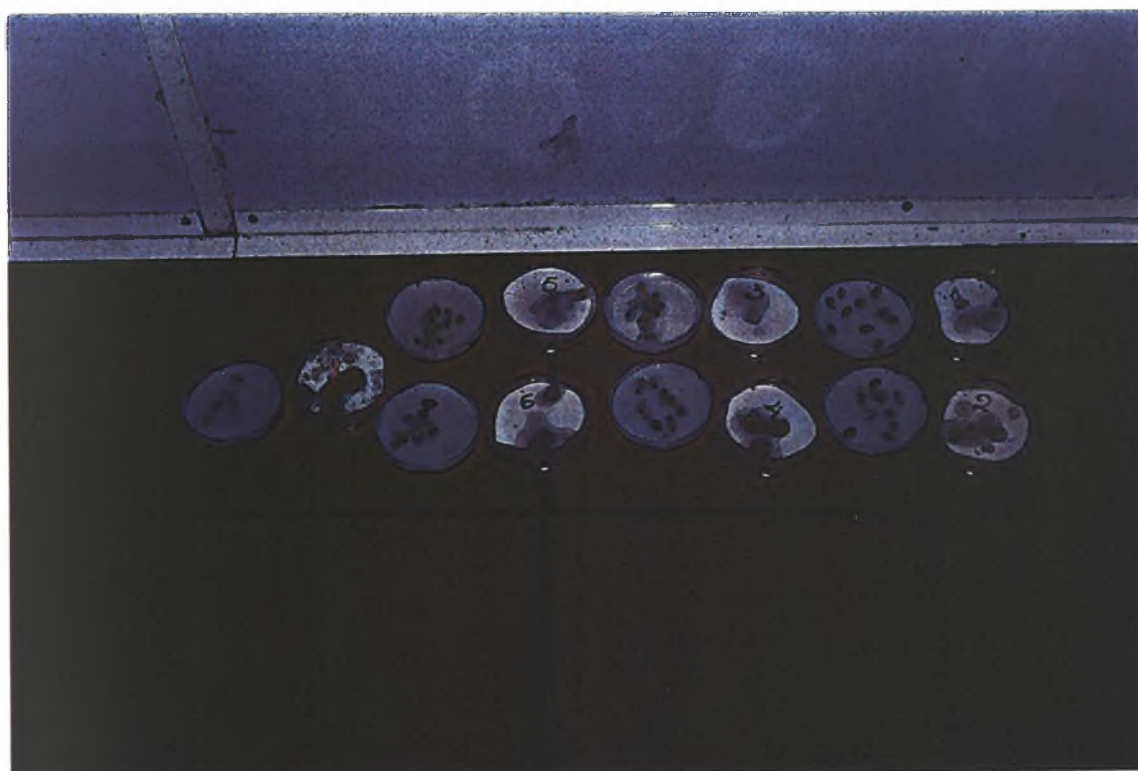
Wanjura, D.F., και D.R. Buxton. 1972. Hypocotyle and radicle ebugation of cotton as affected by soil environment. Agron. J. 64: 431-434.

Wanjura, D.F., και E.B. Minton. 1981. Delayed emergence and temperature influences on cotton seedling vigor. Agron. J. 73: 594-597.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



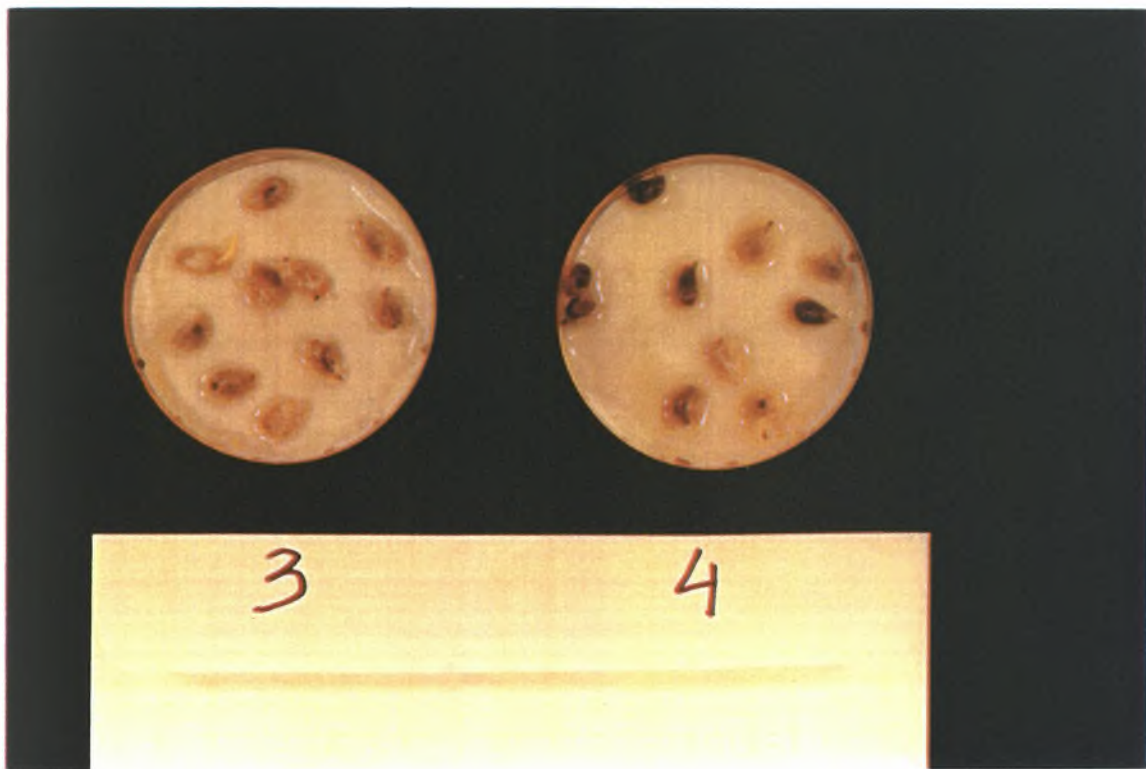
Εικόνα 1. Διαφοροποίηση γενοτύπου βαμβακιού σε θερμοκρασία 13°C με γλαστράκια.



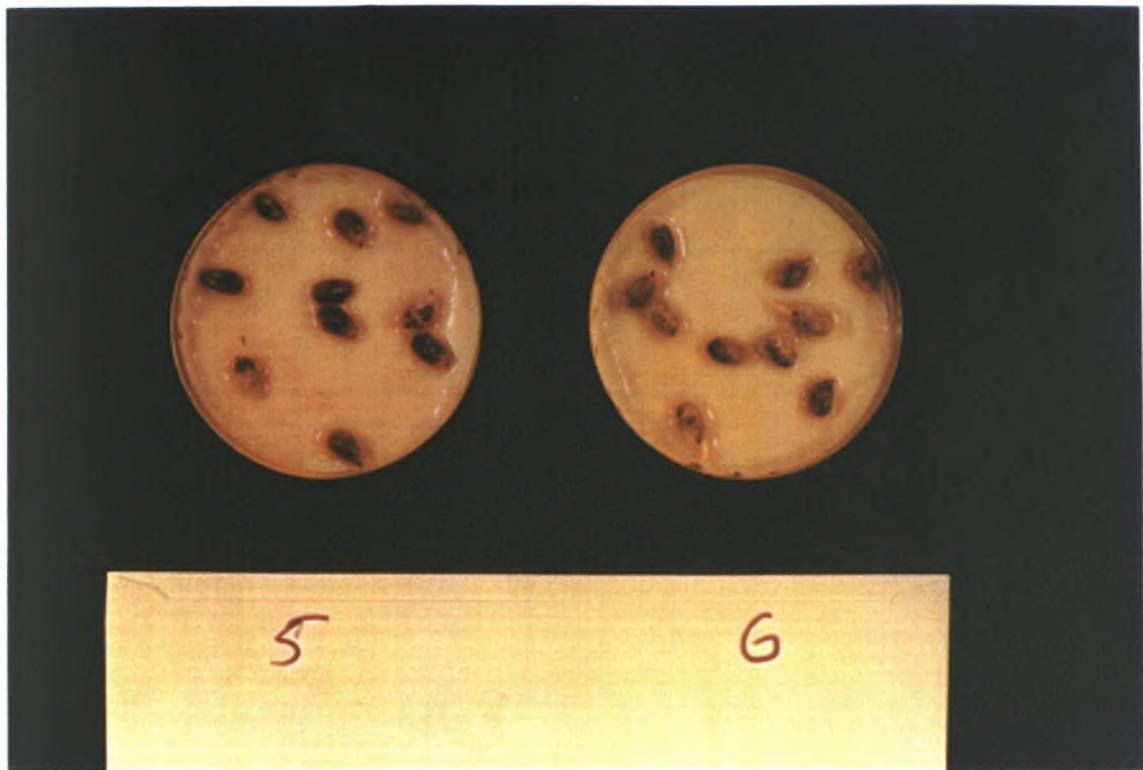
Εικόνα 2. Βλάστηση ποικιλιών βαμβακοσπόρου σε θερμοκρασία 13 °C. Οι ποικιλίες αναφέρονται στον πίνακα 1.



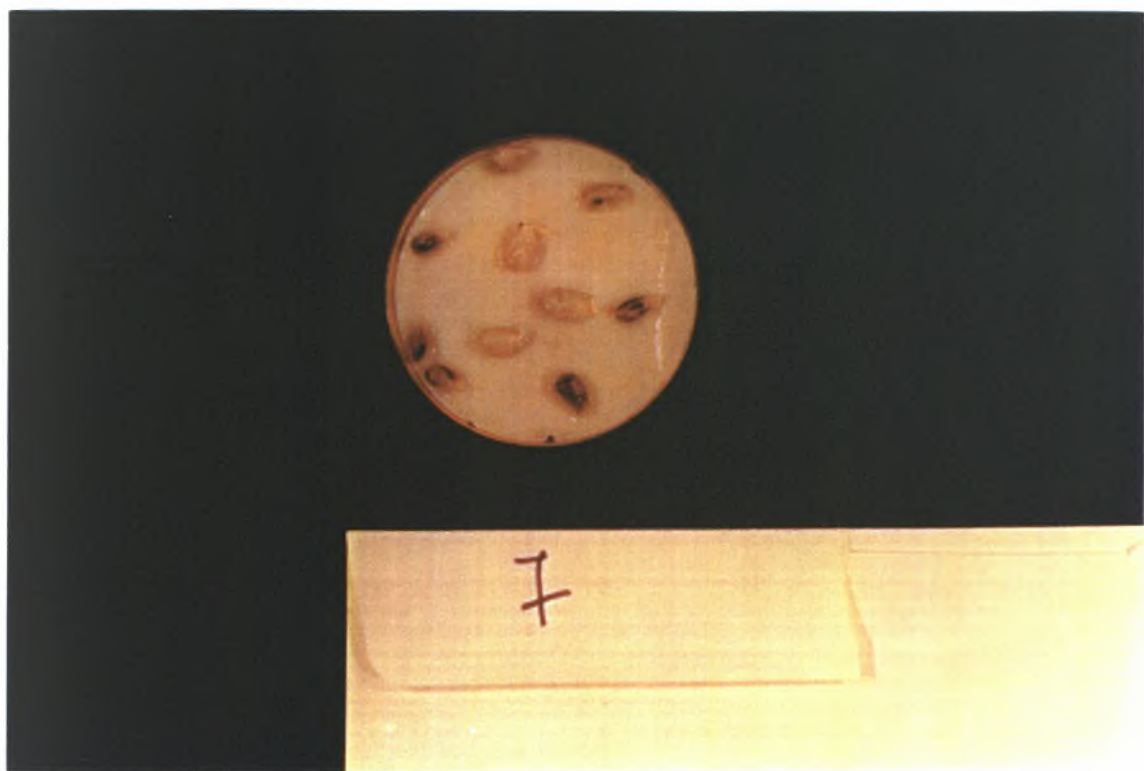
Εικόνα 3. Βλάστηση ποικιλίας 1 (αριστερά) και ποικιλίας 2 (δεξιά) σε θερμοκρασία 13 °C. 12 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος.



Εικόνα 4. Βλάστηση ποικιλίας 3 (αριστερά) σε θερμοκρασία 13 °C. 12 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος. = ποικιλία 4 (δεξιά) σε θερμοκρασία 15 °C.



Εικόνα 5. Βλάστηση ποικιλίας 6 (δεξιά) σε θερμοκρασία 13 °C, 12 ημέρες, μετά την έναρξη του πειράματος, - ποικιλία 5 (αριστερά) δε βλάστησε.



Εικόνα 6. Βλάστηση ποικιλίας 7 σε θερμοκρασία 13 °C, 12 ημέρες, μετά την έναρξη του πειράματος. Οι ποικιλίες αναφέρονται στον πίνακα 1.



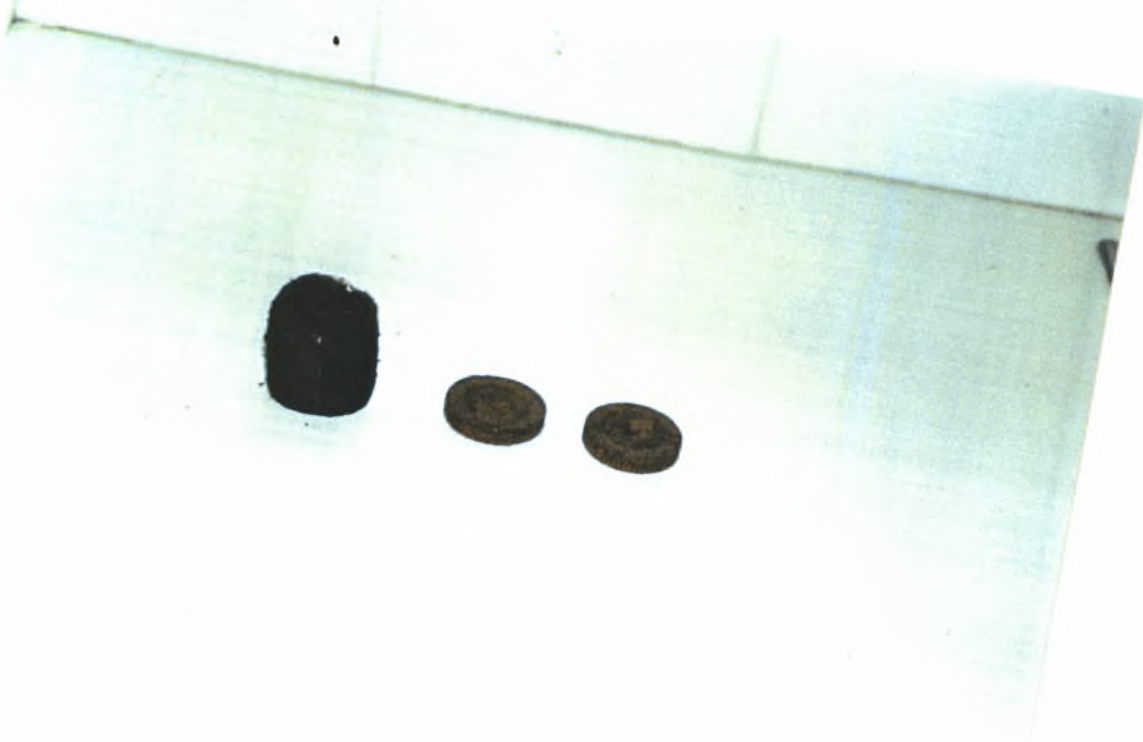
Εικόνα 7. Το (αριστερά) και 3ο (δεξιά) πείραμα διαφοροποίησης γενοτύπων βαμβακιού σε θερμοκρασία 16 °C, με πλαστικά γλαστράκια



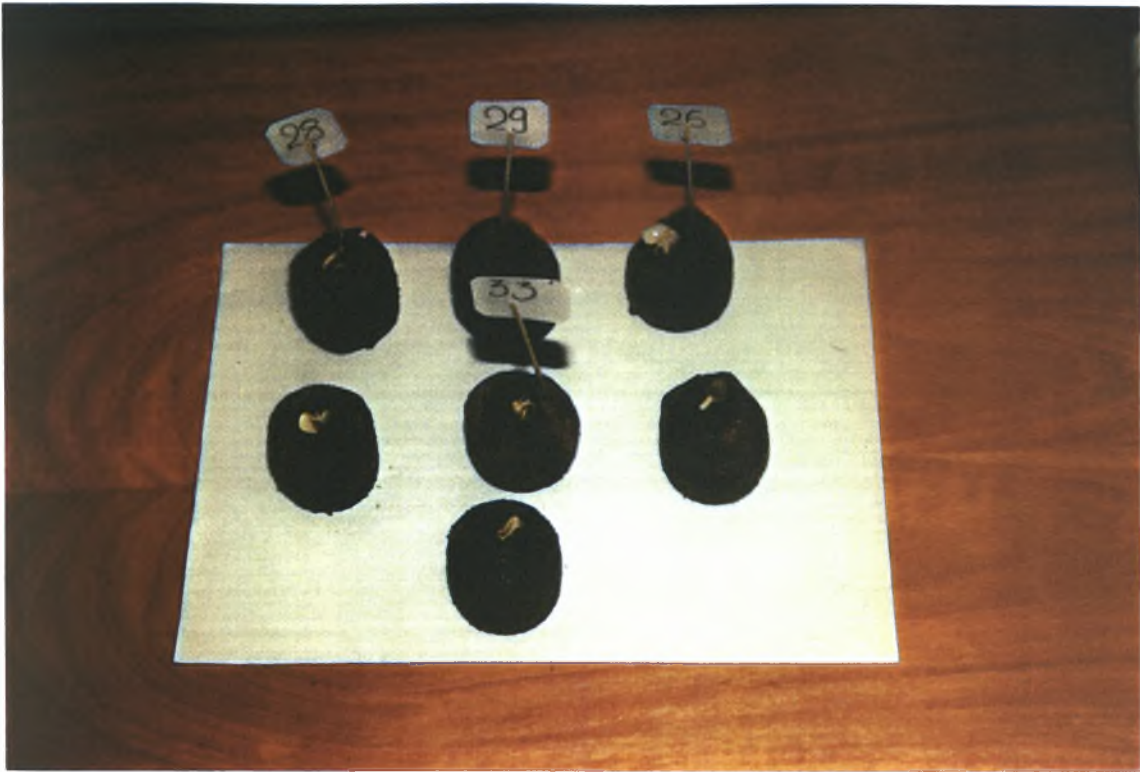
Εικόνα 8. Φύτρωμα βαμβακιού σε θερμοκρασία 16 °C



Εικόνα 9. Διαφοροποίηση γενοτύπου βαμβάκιου σε θερμοκρασία 13°C με Jiffy-7



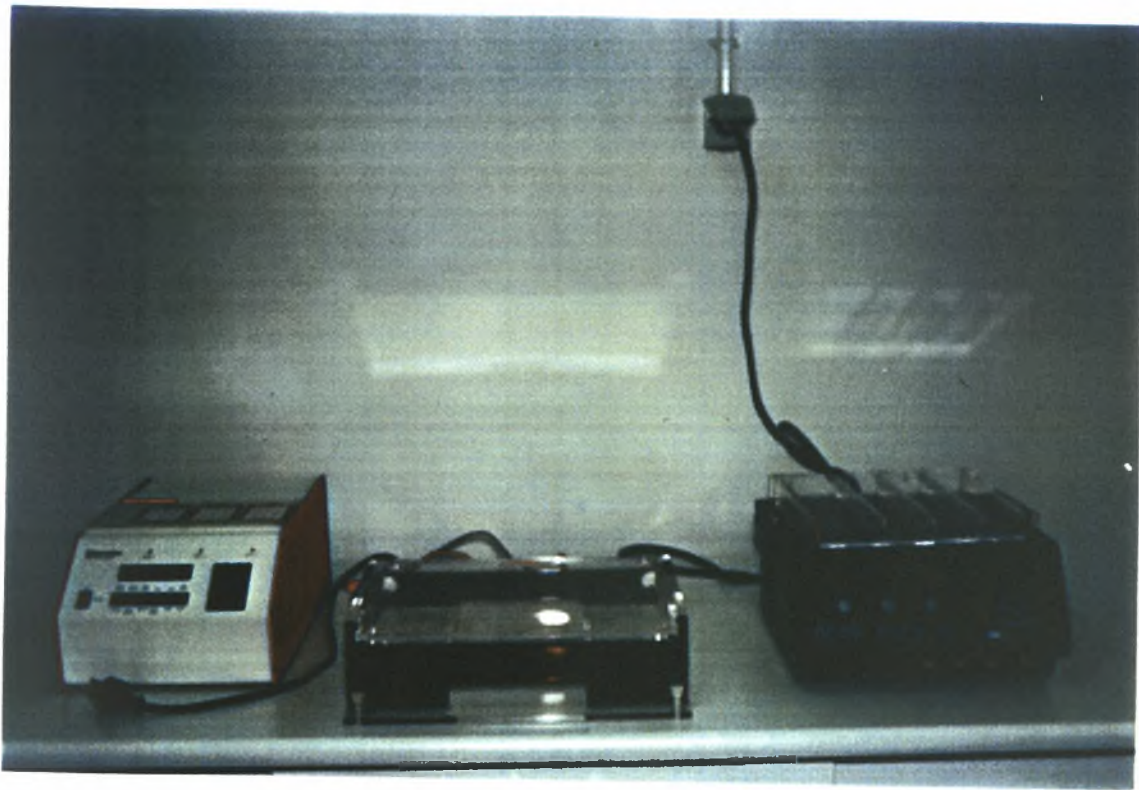
Εικόνα 10. Ανεπτυγμένο (δεξιά) κι εμπετοκισμένο (αριστερά) Jiffy 7



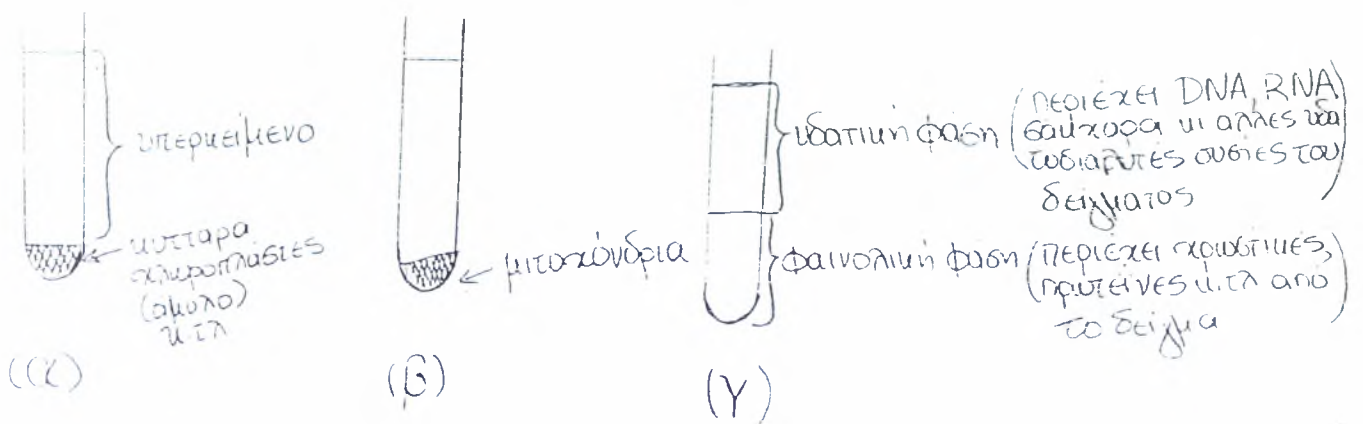
Εικόνα 11. Αποτελέσματα της επίδρασης των 13 °C στο φύτρωμα του βαμβακοσπόρου



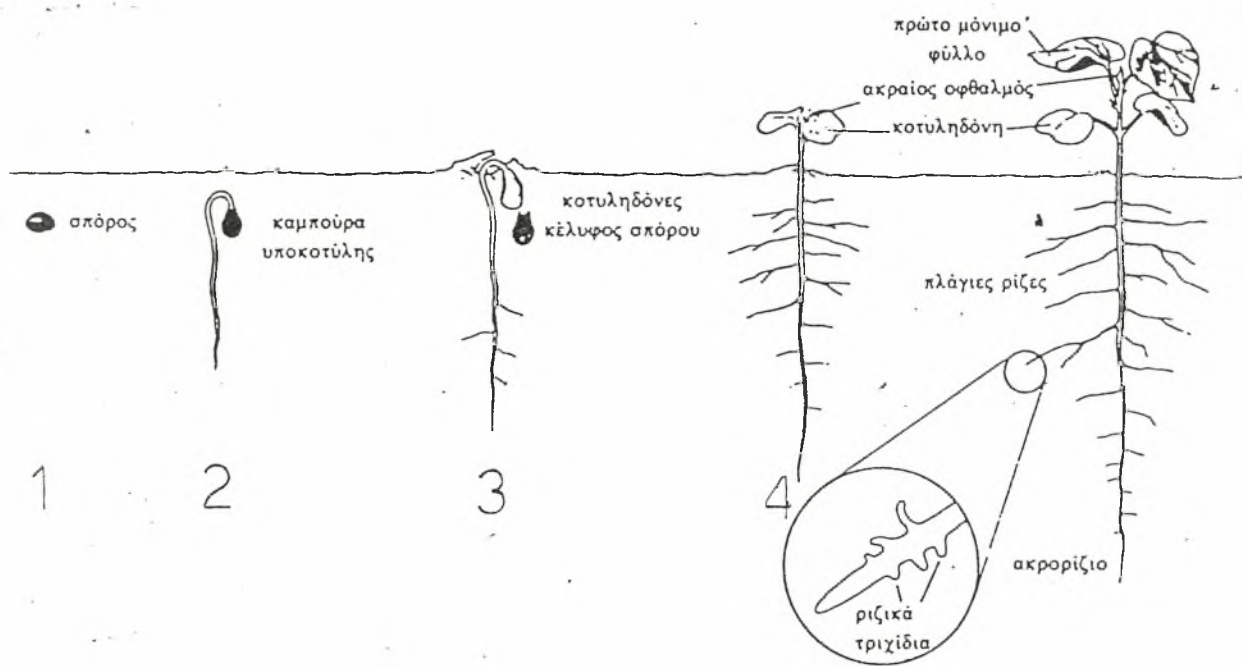
Εικόνα 12. Βλαστημένοι, βαμβακόσπορος, σε θερμοκρασία 13 °C



Εικόνα 13. Συσκευές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR (αριστερά) και ηλεκτροφόρης αγοράζης (δεξιά)

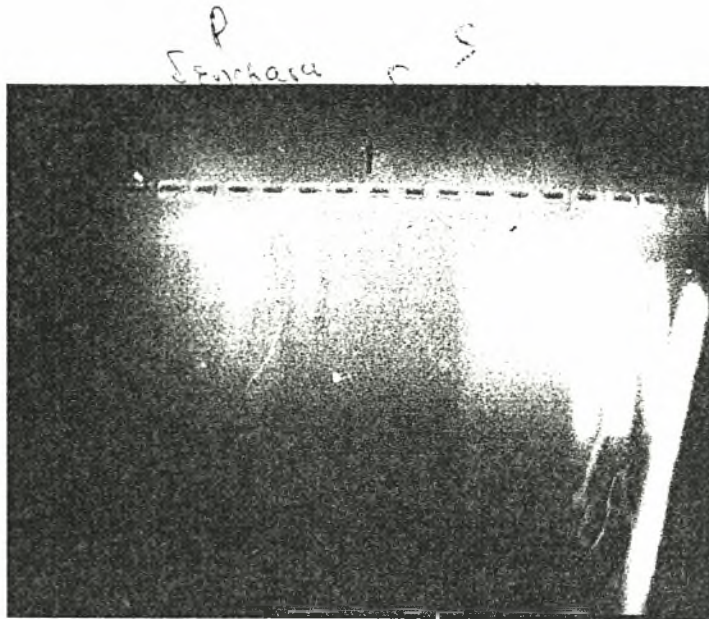


Σχ.1 Σχηματική παράσταση μέρους της διαδικασίας εξαγωγής ολικού και κυρίως μιτοχονδριακού DNA.



Στάδια βαμβακιού. Φύτρωμα σπόρου, έξοδος νεαρού φυτού και πρώτη ανάπτυξη (από έκδοση 3305-Integrated pest management for COTTON in the western region of the United States - University of California).

εικόνα 14



Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση P και S δειγμάτων DNA βαμβακιού. Τα 5 δεν έδειξαν σημαντικές εικόνες.



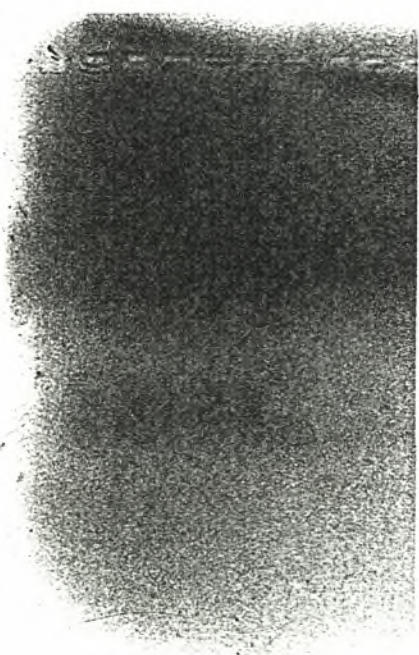
Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση P δειγμάτων, των ποικιλιών 1-6, που παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Τα P έδωσαν ένα μεγάλο αριθμό πολλαπλασιασθέντων τεμαχίων μεγέθους από 70 χιλ έως 600 βάσεις.

100
χιλιάδες
βάσεων →

450
βάσεις →

P₁ P₂ P₃ P₄ P₅ P₆

Εικόνα 17. Όλα τα P δείγματα έχουν μια ομάδα τεμαχίων στελώς χωρισμένες μεταξύ τους



100-200
τεμάχια
βάσεων

Εικόνα 18. Το δείγμα P₆ δε φαίνεται να έχει όλα τα μέλη της ομάδας των μικρών πολλαπλασιασμένων τεμαχίων ίσως μόνο ένα τεμάχιο 100 βάσεων.

