

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Αριθμ. Πρωτοκ. 80

Ημερομηνία 8-7-2005

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

***IN VITRO* ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΣΤΗΝ ΜΠΑΝΑΝΑ (*Musa spp.*)  
ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΚΛΩΝΙΚΗΣ  
ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ  
ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ**

Πτυχιακή διατριβή που υποβλήθηκε στο τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μερική υποχρέωση για τη λήψη του πτυχίου του Γεωπόνου.

**ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΟΥ ΜΙΧΑΛΙΑ**

**ΒΟΛΟΣ 2005**





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

Αριθ. Εισ.: 4903/1  
Ημερ. Εισ.: 12-09-2006  
Δωρεά: Συγγραφέα  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΦΠΑΠ  
2005  
ΣΑΚ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

***IN VITRO* ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΣΤΗΝ ΜΠΑΝΑΝΑ (*Musa spp.*)  
ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΚΛΩΝΙΚΗΣ  
ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ  
ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ**

Πτυχιακή διατριβή που υποβλήθηκε στο τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μερική υποχρέωση για τη λήψη του πτυχίου του Γεωπόνου.

**ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΟΥ ΜΙΧΑΛΙΑ**

**ΒΟΛΟΣ 2005**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

*IN VITRO* ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΣΤΗΝ ΜΠΑΝΑΝΑ (*Musa* spp.)  
ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΚΛΩΝΙΚΗΣ  
ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ  
ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

**Σακελλαρίου Μιχαλία**

**ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Α. ΜΑΥΡΟΜΑΤΗΣ**

(Επιβλέπων)

Λέκτορας

**Γ. ΝΑΝΟΣ**

(Μέλος)

Επικ. Καθηγητής

**Ν. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ**

(Μέλος)

Επικ. Καθηγητής

Βόλος, 2005

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη .....	6
Εισαγωγή .....	7
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας</b>	
1.1 Γενικά .....	10
1.2 Καταγωγή και ταξινόμηση ειδών μπανάνας .....	10
1.3 Μορφολογία και ανάπτυξη της μπανάνας .....	12
1.4 Πολλαπλασιασμός .....	13
1.4.1 Πολλαπλασιασμός με ριζώματα ή τεμάχια αυτών .....	14
1.4.2 Πολλαπλασιασμός με παραφυάδες .....	14
2. <i>In vitro</i> καλλιέργεια κυττάρων .....	15
2.1 Συνθήκες <i>in vitro</i> καλλιέργειας .....	15
2.2 <i>In vitro</i> καλλιέργεια μπανάνας .....	17
3. Βελτίωση μπανάνας .....	19
3.1 Γενικά .....	19
3.2 Στόχοι βελτίωσης .....	20
3.3 Κλασσική βελτίωση .....	21
3.3.1 Η τεχνική 2χ/3χ .....	21
3.3.2 Η τεχνική 4χ/2χ .....	22
3.4 Σύγχρονες μέθοδοι βελτίωσης .....	24
3.4.1 Σωματική εμβρυογένεση .....	24
3.4.2 Γενετική μηχανική .....	26
3.5 Γενετικός χάρτης μπανάνας .....	27
3.6 Μοριακά γενετικά τροποποιημένα μπανάνα (G.M.O) .....	28
4. Σωματοκλωνική παραλλακτικότητα .....	29
4.1 Προέλευση σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας.....	31
4.2 Παράγοντες που επιδρούν στην εμφάνιση σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας .....	32



4.3 Εμφάνιση σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας στην μπανάνα .....	32
--	----

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: Υλικά και Μέθοδοι**

2.1 Γενετικό υλικό .....	36
2.2 Διαδικασία παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού μπανάνας .....	37
2.3 Καταγραφή μορφολογικών χαρακτηριστικών .....	39
2.4 SPAD .....	40
2.5 Απομόνωση γενωμικού DNA .....	40
2.6 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός DNA .....	41
2.7 Ανάλυση με μοριακούς δείκτες τύπου RAPD's .....	42
2.8 Εκτίμηση επιπέδου πλοειδίας .....	43
2.9 Στατιστική ανάλυση .....	44

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: Αποτελέσματα και Συζήτηση**

3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά .....	47
3.2 SPAD .....	48
3.3 Μοριακή ανάλυση .....	54
3.3.1 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός DNA .....	54
3.3.2 Ανάλυση με μοριακούς δείκτες τύπου RAPD's .....	55
3.4 Κυτταρομετρία Ροής .....	64
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>68</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>69</b>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήταν παράβλεψη από μέρους μου να μην ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν και με στήριξαν κατά τη την εκπόνηση της προπτυχιακής διατριβής μου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Αθανάσιο Μαυρομάτη, Λέκτορα γενετικής φυτών του εργαστηρίου γενετικής βελτίωσης φυτών του πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την συνολική συμβολή του τόσο κατά τη διάρκεια των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής Επίκουρο καθηγητή κ. Νάνο και Επίκουρο καθηγητή κ. Παπαδόπουλο για τις εύστοχες και γόνιμες παρατηρήσεις τους, καθώς επίσης τον Δρ. κ. Αυγελή του Ινστιτούτου Αμπέλου και Λαχανοκομίας Ηρακλείου Κρήτης και τη Δρ. κ. Γραμματικάκη του εργαστηρίου γεωργίας και πολλαπλασιαστικού υλικού, σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Κρήτης για την ευγενική χορήγηση του φυτικού υλικού.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Δρ. Αθανάσιο Κορκόβελο και στην κ. Μίνα Πανάγου, γεωπόνο για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές που μου πρόσφεραν.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η δυνατότητα παραγωγής εγγυημένου πολλαπλασιαστικού υλικού μπανάνας της ποικιλίας Grand Naine δια μέσου του *in vitro* πολλαπλασιασμού και έγινε προσπάθεια για ανίχνευση ενδεχόμενης σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας με τη βοήθεια μοριακών και κυτταρογενετικών τεχνικών.

Η απομόνωση του DNA έγινε από τα φύλλα των αναγεννημένων φυτών με τη μέθοδο του τροποποιημένου CTAB. Για την μοριακή ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 24 εκκινητές (primers) με τυχαία νουκλεοτιδική ακολουθία. Η μέτρηση του επιπέδου πλοειδίας των αναγεννημένων φυτών έγινε με κυτταρομετρητή ροής (Flow cytometer – PARTEC II).

Δεκαεννιά από τους χρησιμοποιούμενους εκκινητές έδωσαν πολυμορφικές ζώνες με συνέπεια τη δυνατότητα για γενετική ταυτοποίηση και διάκριση των διαφοροποιημένων κλώνων. Τα δείγματα των φυτών που παρέμειναν στο υπόστρωμα καλλιέργειας περισσότερο χρόνο, επέδειξαν αποκλίσεις με την απουσία μίας ή δύο πολυμορφικών ζωνών που συνδυάστηκαν με φαινόμενα ανευπλοειδίας ( $2n=3x-1$ ) όπως επιβεβαιώθηκε από τις κυτταρογενετικές αναλύσεις με τον κυτταρομετρητή ροής.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μπανάνα είναι φυτό ιθαγενές των τροπικών χωρών. Κατάγεται από την Ινδοκίνα, από όπου διαδόθηκε στις θερμές χώρες της Αφρικής και Αμερικής και στη συνέχεια σε περιοχές της εύκρατης ζώνης που γειτονεύουν με τις τροπικές και είναι προφυλαγμένες από ψυχρούς ανέμους. Τα κυριότερα κέντρα παραγωγής της μπανάνας (από όπου προέρχεται και το 50% περίπου των εξαγόμενων μπανανών) είναι: Αφρική (Καμερούν, Κανάρια νησιά, Κονγκό, Νιγηρία, Σομαλία), ακολουθεί η Ασία (Λίβανος) και τέλος η κεντρική και νότια Αμερική.

Η μπανάνα καλλιεργείται κυρίως για τον καρπό της, ο οποίος είναι πολύ εύγευστος, εύοσμος και εύπεπτος, πλούσιος σε υδατάνθρακες, ανόργανα στοιχεία, βιταμίνες και πρωτεΐνες.

Ανήκει στο γένος *Musa* της οικογένειας *Musaceae*. Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες ανήκουν στο είδος *M. acuminata*. Είναι πολυετής πόα με δενδρομόρφη εμφάνιση, που οφείλεται στο σχηματισμό ψευδοκορμού από τους παραμένοντες κολεούς των φύλλων. Το ύψος του μπορεί να φτάσει τα 6-10m ενώ τα φύλλα του έχουν μήκος 3-4 m, πλάτος 60 cm και είναι ακέραια κατ' εναλλαγή. Οι καρποί της μπανάνας είναι ράγες και λέγονται «δάκτυλα». Είναι άσπερμοι, γιατί παράγονται χωρίς γονιμοποίηση των θηλυκών μερών του άνθους (παρθενοκαρπικά).

Η μπανάνα σε εμπορική κλίμακα πολλαπλασιάζεται αγενώς, καθώς όλες σχεδόν οι ποικιλίες που καλλιεργούνται διεθνώς είναι τριπλοειδείς, άσπερμες ή παράγουν άγονους σπόρους. Τα φυτικά μέρη που χρησιμοποιούνται για το συμβατικό πολλαπλασιασμό είναι κυρίως ριζώματα και παραφυάδες. Τα φυτικά αυτά μέρη ωστόσο δεν αποτελούν ιδανικό πολλαπλασιαστικό υλικό καθώς συχνά είναι προσβεβλημένα από μυκητολογικές ασθένειες και ιώσεις. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως πλέον για τον πολλαπλασιασμό της μπανάνας, η τεχνική της

ιστοκαλλιέργειας. Ωστόσο ο μαζικός αναπολλαπλασιασμός και σε αυτήν την περίπτωση συναντά αυξημένες δυσκολίες εξαιτίας της συχνής εμφάνισης φαινομένων σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας στην μπανάνα.

Η γενετική αυτή αστάθεια αποτελεί σοβαρό πρόβλημα στην περίπτωση που στοχεύουμε στη διατήρηση ορισμένου γενετικού υλικού μέσω του *in vitro* πολλαπλασιασμού. Ωστόσο η σωματοκλωνική παραλλακτικότητα μπορεί να αποτελέσει μια νέα και χρήσιμη πηγή γενετικής παραλλακτικότητας. Σε κάθε άλλη περίπτωση, η εμφάνιση σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας στην μπανάνα είναι ανεπιθύμητη, καθότι οδηγεί στη δημιουργία φυτών με φαινοτυπικές εκτροπές από το μητρικό γενότυπο. Οι εκτροπές αυτές δεν γίνονται αντιληπτές, παρά μόνο σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης (όταν τα φυτά έχουν εγκατασταθεί στον αγρό) και αφορούν τόσο σε νανισμό όσο και γιγαντισμό των φυτών αυτών. Η συχνή λοιπόν εμφάνιση "off-type" φυτών σε μια καλλιέργεια έχει σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο στους παραγωγούς. Για το λόγο αυτό υπάρχει αυξημένη ανάγκη για ανάπτυξη μεθόδων έγκαιρου εντοπισμού των παραγώγων της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας.

Η σταθερότητα εμφάνισης των "off-type" φυτών μετά από σειρά κύκλων αναπολλαπλασιασμού υποδηλώνει ότι η σωματοκλωνική παραλλακτικότητα στην μπανάνα έχει γενετική βάση.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανίχνευση και η μελέτη της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας σε φυτά μπανάνας με χρήση μοριακών μεθόδων και κυτταρομετρία ροής.

# I. Ανασκόπηση της Βιβλιογραφίας



## 1.1 Γενικά

Η καλλιέργεια της μπανάνας (*Musa spp.*) αποτελεί βασική καλλιέργεια των τροπικών χωρών. Με την παγκόσμια παραγωγή να ανέρχεται σε περίπου 95 εκατομμύρια τόνους ετησίως (FAO 2000), κατατάσσεται στην τέταρτη θέση ως προς μέγεθος παραγωγής, μετά το ρύζι, το σιτάρι και τον αραβόσιτο. Η οικονομική της σημασία είναι ιδιαίτερα υψηλή καθώς αποτελεί βασική τροφή για τον πληθυσμό των αναπτυσσόμενων χωρών ενώ επιπλέον εξασφαλίζει ένα σημαντικό εισόδημα για το σύνολο των εμπλεκόμενων στην παραγωγή και εμπορία της. Αναφέρεται ότι στην Α. Αφρική η ετήσια, κατά κεφαλή, κατανάλωση μπανάνας ανέρχεται σε περίπου 300kg και αποτελεί την υψηλότερη κατανάλωση παγκοσμίως (Onguso *et al.*, 2004).

Η μπανάνα καλλιεργείται πρωτίστως για τον καρπό της, ο οποίος διακρίνεται για την υψηλή διατροφική του αξία αφού είναι πλούσιος σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, φώσφορο, κάλιο, ασβέστιο και βιταμίνες Α και C. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ένας καρπός μπανάνας περιέχει το 15% της ημερήσιας συνιστώμενης δόσης βιταμίνης C, και το 11% της αντίστοιχης ποσότητας καλίου (ΙΠΑ).

Η μπανάνα καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα στην περιοχή της Κρήτης (1925-1927) από μοναχούς, πιθανόν στο μοναστήρι της Αρβης. Τα τελευταία χρόνια η καλλιέργεια της εντοπίζεται κυρίως στην Κρήτη (98% της ελληνικής ετήσιας παραγωγής), ενώ πολύ μικρές εκτάσεις υπάρχουν και στο νομό Μεσσηνίας (Ταμπούκου, 1991).

## 1.2 Καταγωγή και ταξινόμηση ειδών μπανάνας

Η μπανάνα (*Musa spp.*) είναι φυτό ιθαγενές των τροπικών χωρών. Η καταγωγή της τοποθετείται στην νοτιοανατολική Ασία, στις ζούγκλες της Μαλαισίας, Ινδονησίας ή των Φιλιππίνων, όπου συναντάται ακόμα και

σήμερα πληθώρα άγριων ποικιλιών. Οι πρώτοι ευρωπαίοι που ήρθαν σε επαφή με το φυτό αυτό, ήταν οι στρατιώτες του Μ. Αλεξάνδρου κατά την εκστρατεία τους στην Ινδία (327 π.Χ). Αργότερα οι Άραβες διέδωσαν την καλλιέργεια στην Αφρική και οι Πορτογάλοι στα Κανάρια Νησιά. Η μπανάνα διαφοροποιήθηκε κατά τη διάρκεια αυτών των μετακινήσεων, αυξάνοντας τη γενετική της παραλλακτικότητα και μειώνοντας σημαντικά την ικανότητα της για εγγενή αναπαραγωγή.

Η μπανάνα (*Musa spp.*) ανήκει στη οικογένεια Musaceae. Το γένος *Musa* περιλαμβάνει 30-40 είδη περίπου και χωρίζεται σε 5 ομάδες : *Australimusa*, *Callimusa*, *Eumusa*, *Ingetimusa* και *Rhodochlamys*, με βάση το χρωμοσωμικό αριθμό (Ude *et al.*, 2002). Ειδικότερα οι ομάδες *Australimusa* και *Callimusa* αποτελούνται από 6 είδη η καθεμία με βασικό χρωμοσωμικό αριθμό  $\chi = 10$  ενώ οι ομάδες *Eumusa*, και *Rhodochlamys* αποτελούνται από 15 και 16 είδη αντίστοιχα, με βασικό χρωμοσωμικό αριθμό  $\chi = 11$ . Το είδος *Musa ingens* Simmonds είναι το μοναδικό της ομάδας *Ingetimusa* με  $\chi = 14$  (Nwakamna *et al.*, 2003).

Η ομάδα *Eumusa* είναι η αρχαιότερη και παρουσιάζει μεγάλη παραλλακτικότητα. Ανάμεσα στα είδη της, συγκαταλέγονται και οι διπλοειδείς, άγριοι πρόγονοι των σημερινών καλλιεργούμενων ειδών, *Musa acuminata* Colla (AA) και *Musa balbisiana* Colla (BB) (Baurens, 1996). Η περιοχή προέλευσης της *M. acuminata* είναι η Μαλαισία, ενώ της *Musa balbisiana* αντίστοιχα θεωρείται η Ινδία. Ένδο- και δι-ειδικές διασταυρώσεις μεταξύ αυτών των προγόνων, δημιούργησαν: αυτοπλοειδή, ομοζύγωτα υβρίδια (AAA) (beer bananas) και αλλοπλοειδή ετεροζύγωτα υβρίδια (AAB, ABB) (cooking bananas), ενώ με την παρέμβαση του ανθρώπου δημιουργήθηκαν περισσότεροι γενωμικοί τύποι μπανάνας (Ortiz & Vuylsteke, 1998).

### 1.3 Μορφολογία και ανάπτυξη της μπανάνας

Η μπανάνα (*Musa spp.*) είναι πολυετής πόα με δενδρόμορφη εμφάνιση, η οποία οφείλεται στο σχηματισμό «ψευδοκορμού» από τους παραμένοντες κολεούς των φύλλων. Το ύψος του φυτού μπορεί να φτάσει τα 6-10m. Τα φύλλα του φύονται κατ' εναλλαγή, είναι ακέραια και έχουν μήκος 3-4m και πλάτος 60cm (Ταμπούκου, 1991).

Το υπόγειο μέρος του φυτού είναι πολυετές ριζώμα, το οποίο στο ανώτερο τμήμα του φέρει τον κύριο οφθαλμό, που είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος. Στην πλευρική επιφάνεια του ριζώματος υπάρχουν οι δευτερεύοντες οφθαλμοί που δίνουν γένεση στις παραφυάδες, οι οποίες μετά από την ανάπτυξη 16-18 φύλλων γίνονται αυτοδύναμες, αποκτώντας δικό τους ριζικό σύστημα. Από τη βάση του ριζώματος ξεκινούν σαρκώδεις,

χοντρές ρίζες με μικρότερες διακλαδώσεις. Στη βάση του ψευδοκορμού βρίσκεται ο ανθοφόρος οφθαλμός, που μετά από ορισμένη ανάπτυξη του φυτού εξελίσσεται σε ανθοταξία ονομαζόμενη ως «σταφύλι» (Εικ. 1). Όταν η ανθοταξία βγει έξω από τον ψευδοκορμό προχωρεί με κατεύθυνση προς τα



**Εικ.1 Ανθοταξία**

κάτω και αποτελείται από ένα κεντρικό άξονα και πολλά βράκτια φύλλα. Τα φύλλα αυτά, καλύπτουν ομάδες ανθέων που καλούνται «παλάμες» ή «χέρια». Καθώς μεγαλώνει το «σταφύλι», τα βράκτια τυλίγονται προς τα πίσω αποκαλύπτοντας τα άνθη που εν συνεχεία πέφτουν. Τα άνθη είναι



ατελή και κυμαίνονται από 75 έως 400 ανά ταξιανθία , αναλόγως με την ποικιλία.

Οι καρποί της μπανάνας είναι ράγες και λέγονται «δάκτυλα» (Εικ. 2). Είναι άσπερμοι καθώς αναπαράγονται χωρίς γονιμοποίηση των θηλυκών μερών του άνθους (παρθενοκαρπικά). Ο αριθμός των καρπών στην παλάμη, των παλαμών στην ταξικαρπία αλλά και το μέγεθος των καρπών, αποτελούν διακριτά χαρακτηριστικά της κάθε ποικιλίας, που επηρεάζονται όμως σε μεγάλο βαθμό και από τις κλιματολογικές συνθήκες κάτω από τις οποίες έγινε η διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών.



Εικ.2. Καρποφορία μπανάνας

#### 1.4 Πολλαπλασιασμός

Η μπανάνα σε εμπορική κλίμακα πολλαπλασιάζεται αγενώς, καθώς όλες σχεδόν οι ποικιλίες που καλλιεργούνται διεθνώς είναι τριπλοειδείς, άσπερμες ή παράγουν άγονους σπόρους. Τα φυτικά μέρη που χρησιμοποιούνται για το συμβατικό πολλαπλασιασμό είναι κυρίως ριζώματα και παραφυάδες. Τα φυτικά αυτά μέρη ωστόσο δεν αποτελούν ιδανικό πολλαπλασιαστικό υλικό καθώς συχνά είναι προσβεβλημένα από μυκητολογικές ασθένειες και ιώσεις ενώ γενικότερα χαρακτηρίζονται από αργούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού (Gübük, 2004).

#### **1.4.1 Πολλαπλασιασμός με ριζώματα ή τεμάχια αυτών**

Τα ριζώματα ή τεμάχια αυτών που χρησιμοποιούνται ως πολλαπλασιαστικό υλικό, θα πρέπει να προέρχονται από μεγάλα κυρίως φυτά και να περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα οφθαλμό. Το μέγεθος του ριζώματος πρέπει να είναι μέτριο, έως μεγάλο και να ζυγίζει 1,5-2kg.

Το βάθος φύτευσης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 30cm. Με αυτόν τον τρόπο πολλαπλασιασμού η πρώτη παραγωγή παίρνεται μετά από χρονικό διάστημα πλέον του 1,5 χρόνου, γι' αυτό δεν προτιμάται από τους καλλιεργητές (χάνεται η παραγωγή του πρώτου χρόνου).

#### **1.4.2 Πολλαπλασιασμός με παραφυάδες**

Σαν πολλαπλασιαστικό υλικό χρησιμοποιούνται παραφυάδες, δηλαδή μπανανόφυτα διαφορετικής ηλικίας, που προέρχονται από φυτείες ελεγχόμενης φυτοϋγειονομικής κατάστασης. Η ηλικία των παραφυάδων που θα επιλεγούν για φύτευση αποτελεί συνάρτηση της περιόδου που θα γίνει η εγκατάσταση της φυτείας, σε συνδυασμό με την εποχή που προγραμματίζεται η παραγωγή. Στην πράξη χρησιμοποιούνται παραφυάδες με λιγότερα από 16-18 εκπτυχθέντα ανοικτά φύλλα. Σε ορισμένες περιοχές (Κύπρος), η επιλογή της κατάλληλης παραφυάδας γίνεται με τα παρακάτω κριτήρια:

- ❖ Να έχει ύψος γύρω στο 1,2m (ηλικία συνήθως 9-11 μηνών).
- ❖ Ο ψευδοκορμός του φυτού να έχει κωνικό σχήμα.
- ❖ Το φυτό θα πρέπει να έχει ανεπτυγμένο ρίζωμα (εμφάνιση οφθαλμών που θα δώσουν νέα φυτά).

Η φύτευση γίνεται Μάρτιο-Απρίλιο, ενώ η ταξιανθία αναμένεται να εμφανιστεί κατά την περίοδο από μέσα Ιουλίου μέχρι τέλος Σεπτεμβρίου.

## 2. *In vitro* καλλιέργεια

Ο όρος ιστοκαλλιέργεια ή *in vitro* καλλιέργεια, αναφέρεται στην διαδικασία κατά την οποία μικρά κομμάτια φυτικού ιστού, όργανα ή κύτταρα, απομονώνονται από το μητρικό φυτό κάτω από ασηπτικές συνθήκες και καλλιεργούνται σε ειδικά δοχεία που περιέχουν αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα και φυλάσσονται σε χώρους με ελεγχόμενο περιβάλλον. Τα καλλιεργούμενα φυτικά μέρη καλούνται εκφύτα, ανεξάρτητα από τον τύπο ή την προέλευσή τους. Οι χειρισμοί του εκφύτου, η ρύθμιση της σύνθεσης του θρεπτικού υποστρώματος, αλλά και των παραμέτρων του περιβάλλοντος καλλιέργειας, μπορούν να προσανατολίσουν τη συμπεριφορά του εκφύτου προς ποικίλους δρόμους διαφοροποίησης, ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό (Μαυρομάτης, 1996).

Οι μέθοδοι της ιστοκαλλιέργειας χρησιμοποιούνται για διάφορους σκοπούς:

- Πολλαπλασιασμός φυτών που πολλαπλασιάζονται δύσκολα με τις κλασσικές μεθόδους
- Δημιουργία και αναπολλαπλασιασμός φυτών απαλλαγμένων από ιώσεις
- Δημιουργία και πολλαπλασιασμός ανθεκτικών τύπων φυτών
- Δημιουργία απλοειδών φυτών
- Δημιουργία νέων γενοτύπων με μεταλλάξεις
- Διάσωση εμβρύων

### 2.1 Συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας

Οι απαραίτητες προϋποθέσεις για την *in vitro* καλλιέργεια ιστών και κυττάρων είναι οι εξής:



#### ❖ Το είδος του καλλιεργούμενου εκφύτου.

Η καταλληλότητα ενός εκφύτου σχετίζεται με τον επιδιωκόμενο σκοπό και επιλέγεται με βάση το μέγεθος, τη φυσιολογική ηλικία και το είδος του ιστού από τον οποίο προέκυψε.

#### ❖ Η χρησιμοποίηση του κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος.

Το θρεπτικό μέσο έχει ως σκοπό την κάλυψη των αναγκών της καλλιέργειας σε θρεπτικά στοιχεία και ενέργεια. Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση του υποστρώματος διακρίνονται σε αυτά που είναι απαραίτητα για την επιβίωση και κανονική ανάπτυξη του εκφύτου και σε εκείνα που κατευθύνουν την αντίδραση του εκφύτου ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό. Τα ανόργανα στοιχεία και η πηγή ενέργειας, που συνήθως είναι η σακχαρόζη, αποτελούν απαραίτητα συστατικά για την επιβίωση και ανάπτυξη των κυττάρων. Οι βιταμίνες, τα οργανικά στοιχεία και οι ρυθμιστές ανάπτυξης κατευθύνουν το έκφυτο προς μία συγκεκριμένη μορφογενετική αντίδραση. Οι βιταμίνες συμμετέχουν σε πολλές βιοχημικές αντιδράσεις, ενώ οι ρυθμιστές ανάπτυξης σε χαμηλές συγκεντρώσεις επηρεάζουν την φυσιολογική εξέλιξη της αύξησης, της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης. Συνήθεις ρυθμιστές ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται στην *in vitro* καλλιέργεια είναι οι αυξίνες, οι κυτοκινίνες και οι γιββεριλλίνες. Επίσης, ιδιαίτερη σημασία έχει η ποσότητα του σταθεροποιητικού μέσου (άγαρ) που χρησιμοποιείται καθώς και η αντίδραση pH του υποστρώματος.

#### ❖ Η δημιουργία και η διατήρηση ασηπτικών συνθηκών.

Οι υπό ασηπτικές συνθήκες τεχνικές εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια της απομόνωσης του ιστού και την καλλιέργεια του στο θρεπτικό υπόστρωμα. Για τους παραπάνω λόγους χρησιμοποιείται η απολύμανση και η μεταφορά τους σε ειδικά αποστειρωμένα δοχεία, υπό τις ασηπτικές

συνθήκες που δημιουργεί ο θάλαμος νηματικής ροής. Η περαιτέρω ασηπτική καλλιέργεια τους στα ειδικά δοχεία, που περιέχουν αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα, πραγματοποιείται σε χώρους με ελεγχόμενο περιβάλλον.

❖ **Η παροχή των κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης.**

**A) Θερμοκρασία.** Έχει αποδειχθεί ότι ο ρυθμός ανάπτυξης και διαφοροποίησης των κυττάρων είναι στενά συνδεδεμένος με τη θερμοκρασία της καλλιέργειας. Η άριστη θερμοκρασία για τα περισσότερα είδη βρίσκεται συνήθως ανάμεσα στους 20-28°C. Ωστόσο υπάρχουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των ειδών και των καλλιεργούμενων ιστών. Σε πολλές περιπτώσεις οι *in vitro* καλλιέργειες ευνοούνται από την σταθερή θερμοκρασία, ενώ άλλες απαιτούν διαφορετική θερμοκρασία ημέρας και νύχτας.

**B) Φωτισμός (ένταση και διάρκεια).** Το φως είναι απαραίτητο στοιχείο για τη φωτοσύνθεση και κατά συνέπεια την ανάπτυξη των καλλιεργειών. Σε μερικές περιπτώσεις όμως, η παρουσία του δεν είναι απαραίτητη, όπως στην καλλιέργεια εναιωρήματος κυττάρων ή ακόμη και αρνητική κατά τα πρώτα στάδια της καλλιέργειας ανθέρων, ωαρίων και την ανάπτυξη κάλλου. Τα καλύτερα αποτελέσματα για την παραγωγή καλώς αναπτυγμένων και προσαρμοσμένων ώριμων φυτών έχει συνήθως ο συνδυασμός λαμπτήρων φθορίου και πυράκτωσης. Η συνήθης φωτοπερίοδος, στις περιπτώσεις που κρίνεται απαραίτητος ο φωτισμός, είναι 16 ώρες.

## **2.2 *In vitro* καλλιέργεια μπανάνας**

Η μπανάνα σε εμπορική κλίμακα πολλαπλασιάζεται αγενώς, καθώς όλες σχεδόν οι ποικιλίες που καλλιεργούνται διεθνώς είναι τριπλοειδείς,

άσπερμες ή παράγουν άγονους σπόρους. Τα φυτικά μέρη που χρησιμοποιούνται για το συμβατικό πολλαπλασιασμό είναι κυρίως ριζώματα και παραφυάδες. Τα φυτικά αυτά μέρη ωστόσο δεν αποτελούν ιδανικό πολλαπλασιαστικό υλικό καθώς συχνά είναι προσβεβλημένα από μυκητολογικές ασθένειες και ιώσεις ενώ γενικότερα χαρακτηρίζονται από αργούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού (Gübük *et al.*, 2004).

Από το 1985 αρχίζει να χρησιμοποιείται ευρέως η καλλιέργεια *in vitro* βλαστικών μερών, ως εναλλακτική λύση στο συμβατικό τρόπο πολλαπλασιασμού. Από τις πρώτες χώρες που εφάρμοσαν την τεχνική ήταν το Ισραήλ, τα Κανάρια Νησιά, η Ταϊβάν και Ν. Αφρική. Η *in vitro* αναπαραγωγή της μπανάνας παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της κλασσικής μεθόδου, μερικά από τα οποία είναι: ο υψηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού, η ομοιομορφία των αναπαραγόμενων φυτών, η παραγωγή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους φυτών απαλλαγμένων από ασθένειες και ιώσεις, η εύκολη και γρήγορη διακίνηση νέων φυτικών υλικών, το μικρό χρονικό διάστημα μεταξύ των διαδοχικών καλλιεργειών *in vitro* και η ταχύτερη ανάπτυξη των φυτών κυρίως κατά τα πρώτα στάδια (Madhulatha, 2004). Τέλος, η ιστοκαλλιέργεια παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση, διάδοση και ανταλλαγή γενετικού υλικού καθώς και την ταχεία αναπαραγωγή των επιλεγμένων κλώνων (Gübük *et al.*, 2004).

Ειδικότερα αναφέρεται ότι η *in vitro* καλλιέργεια, χρησιμοποιείται για τη βελτίωση ποικιλιών μπανάνας που υπολείπονται εγγενούς αναπαραγωγής για τη δημιουργία γενετικής παραλλακτικότητας. Η τεχνική συνδυάζεται με τη πρόκληση κατευθυνόμενων μεταλλάξεων και η όλη διαδικασία συνοψίζεται στον όρο *in vitro* μεταλλαξογένεση (*in vitro* mutagenesis). Η μέθοδος επισκιάζεται από το γεγονός ότι η *in vitro* μεταλλαξογένεση πολυκυτταρικών μεριστωμάτων του γένους *Musa* spp. παρουσιάζει σε μεγάλο βαθμό φαινόμενα χειμαιρισμού (Roux *et al.*, 2001).

### 3. Βελτίωση μπανάνας

#### 3.1 Γενικά

Η μπανάνα παρουσιάζει αυξημένες δυσκολίες στη βελτίωση, καθώς στην πλειοψηφία τους οι πιο σημαντικές και διαδεδομένες ποικιλίες, είναι στείρες και κατά συνέπεια δεν παράγουν σπόρους (Εικ.3). Η βελτίωση της μπανάνας είναι αρκετά δαπανηρή και χρονοβόρα κυρίως λόγω του μεγάλου χώρου που απαιτείται για την καλλιέργεια των φυτών (6m<sup>2</sup>/φυτό) και του μεγάλου κύκλου αναπαραγωγής της.



Εικ.3 *Musa balbisiana*, πρόγονος των σημερινών ποικιλιών – παράγει σπόρους

Επιπλέον, συγκριτικά με άλλες καλλιέργειες, υπάρχει περιορισμένη γνώση σε θέματα γενετικής της μπανάνας. Ωστόσο, παρά τα προαναφερθέντα εμπόδια, τα προγράμματα βελτίωσης που εκτελούνται σε διάφορες χώρες του κόσμου, έχουν σημειώσει μεγάλη πρόοδο τα τελευταία χρόνια και έτσι νέες, βελτιωμένες ποικιλίες, ως αποτέλεσμα αυτών των προγραμμάτων, έχουν προκύψει (Crouch *et al.*, 1999).

Βασικός στόχος σε όλα τα προγράμματα βελτίωσης της μπανάνας, αποτελεί η παραγωγή υβριδίων τα οποία θα είναι υψηλοαποδοτικά στο χώρο και το χρόνο, ανθεκτικά σε εχθρούς και ασθένειες ενώ θα χαρακτηρίζονται από καλή μετασυλλεκτική συμπεριφορά και υψηλή ποιότητα καρπών (Tenkuano *et al.*, 1998). Για το λόγο αυτό, υπάρχει μια αυξημένη ανάγκη για την εύρεση πηγών ανθεκτικότητας σε εχθρούς και ασθένειες καθώς και γονιδίων που καθορίζουν την ποιότητα και ποσότητα της παράγωγής. Επιπλέον κρίνεται αναγκαίο για τους βελτιωτές να αυξήσουν τη γνώση τους σε θέματα γενετικής σύστασης της



μπανάνας, ώστε να είναι σε θέση να ελέγξουν τους μηχανισμούς κληρονομής των επιθυμητών χαρακτηριστικών.

Για τους σκοπούς της βελτίωσης στην μπανάνα, ακολουθείται τόσο η κλασική μεθοδολογία όσο και η χρήση νέων τεχνικών της βιοτεχνολογίας, οι οποίες πλεονεκτούν, κυρίως λόγω των φαινομένων στειρότητας που παρουσιάζει το συγκεκριμένο φυτικό είδος.

### 3.2 Στόχοι της βελτίωσης

Την καλλιέργεια της μπανάνας απασχολούν μυκητολογικές, βακτηριολογικές και ιολογικές ασθένειες, ενώ σοβαρές προσβολές προκαλούν ακόμη νηματώδεις, έντομα και ακάρεα. Για το λόγο αυτό οι περισσότερες προσπάθειες στον τομέα της βελτίωσης στρέφονται προς την δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών στους παραπάνω παράγοντες. Ειδικότερα επιδιώκεται ανθεκτικότητα των ποικιλιών:

- ❖ Στον μύκητα *Mycosphaerella fijensis*, υπεύθυνο για την ασθένεια “Black sigatoka”, η οποία είναι η πιο καταστροφική για τη καλλιέργεια της μπανάνας (απώλειες έως και 50% της παραγωγής).
- ❖ Στον μύκητα *Fusarium oxysporum* f. *Sp. cubense*.
- ❖ Στο βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*.
- ❖ Στον ιό BBTV (*Banana Bunchy Top Virus*).
- ❖ Στον ιό CMV (*Cucumber Mosaic Virus*).
- ❖ Στον ιό BBrMV (*Banana Bract Mosaic Virus*).
- ❖ Στον ιό BSV (*Banana Steak Virus*).
- ❖ Σε νηματώδεις.

Ως προς την ποιότητα των καρπών, η βελτίωση στοχεύει:

- ❖ Στην αύξηση της θρεπτικής τους αξίας.

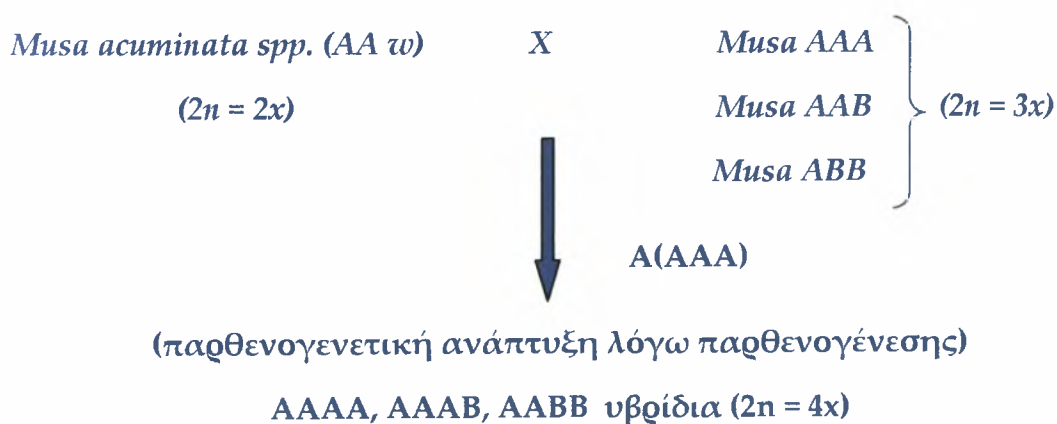
- ❖ Στη βελτίωση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (γεύση, χρώμα, άρωμα, συνεκτικότητα κ.τ.λ.).
- ❖ Στη γρήγορη μετασυλλεκτική ωρίμανση.
- ❖ Στην αύξηση της διάρκειας ζωής των προϊόντων.
- ❖ Στην αντοχή κατά την αποθήκευση.

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποκτά η δημιουργία ποικιλιών χαμηλών σε σάκχαρα (κατάλληλες για διαβητικούς) καθώς και η ενσωμάτωση εμβολίων στο καρπό της μπανάνας, με ιδιαίτερη σημασία για τις χώρες της Αφρικής.

### 3.3 Κλασσική Βελτίωση

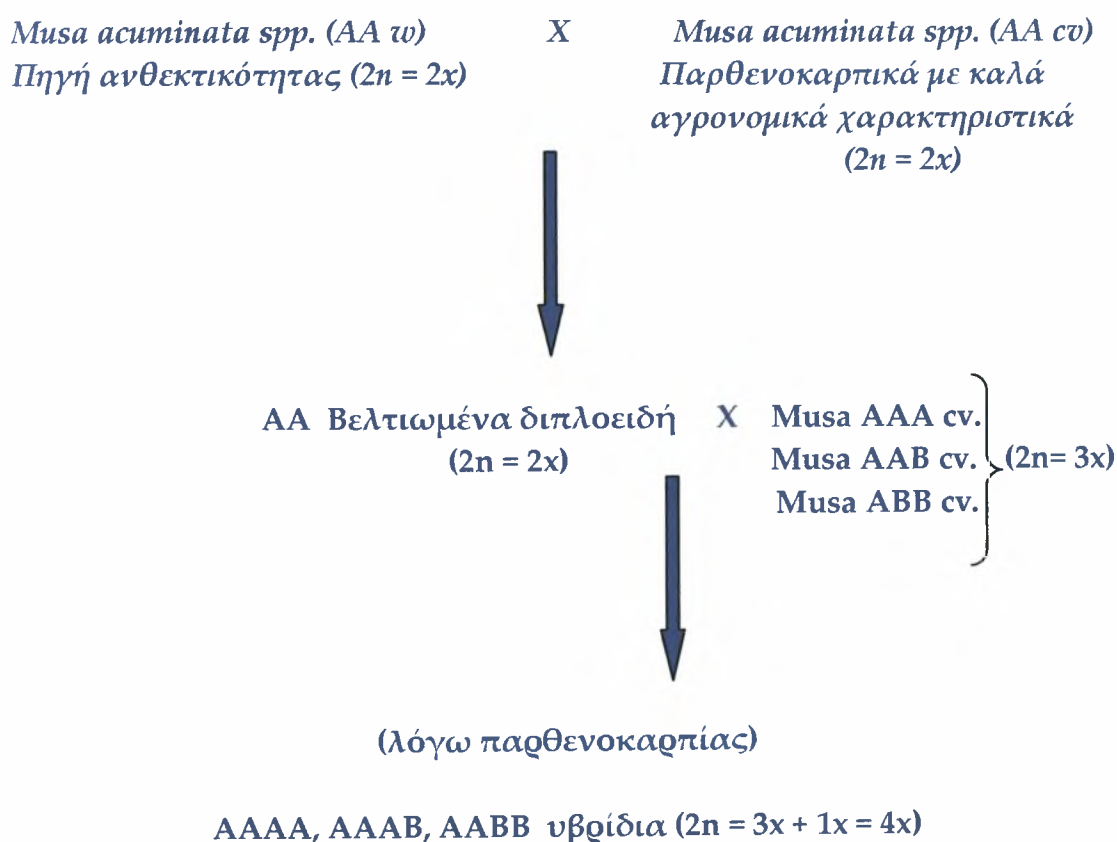
#### 3.3.1 Η τεχνική 2x/3x

Μέχρι τις αρχές του 1970 όλα τα προγράμματα κλασσικής βελτίωσης βασίζονταν στην υπολειπόμενη (θηλυκή) γονιμότητα που εντοπίστηκε σε συγκεκριμένες τριπλοειδείς ποικιλίες, τις οποίες και διασταύρωναν με άγρια διπλοειδή είδη που χαρακτηρίζονταν από ανθεκτικότητα σε εχθρούς και ασθένειες, για την παραγωγή τετραπλοειδών υβριδίων ( $3n + 1n$ ), (Εικ.4). Τα διπλοειδή είδη, σε αντίθεση με τα τριπλοειδή, είναι γόνιμα και χαρακτηρίζονται από σημαντική γενετική παραλλακτικότητα.



Εικ 4. Σχήμα παραγωγής τετραπλοειδών υβριδίων

Το γεγονός ότι τα άγρια διπλοειδή είδη υστερούσαν σε αγρονομικά χαρακτηριστικά, οδήγησε τα βελτιωτικά προγράμματα να στραφούν στην βελτίωση αυτών, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως άρρενες γονείς σε διασταυρώσεις με τις επιθυμητές τριπλοειδείς ποικιλίες. Για τη παραγωγή βελτιωμένων διπλοειδών, διασταυρώνονταν άγρια είδη που αποτελούσαν πηγές ανθεκτικότητας, με παρθενοκαρπικά διπλοειδή είδη που έφεραν επιθυμητά αγρονομικά χαρακτηριστικά (Εικ.5).

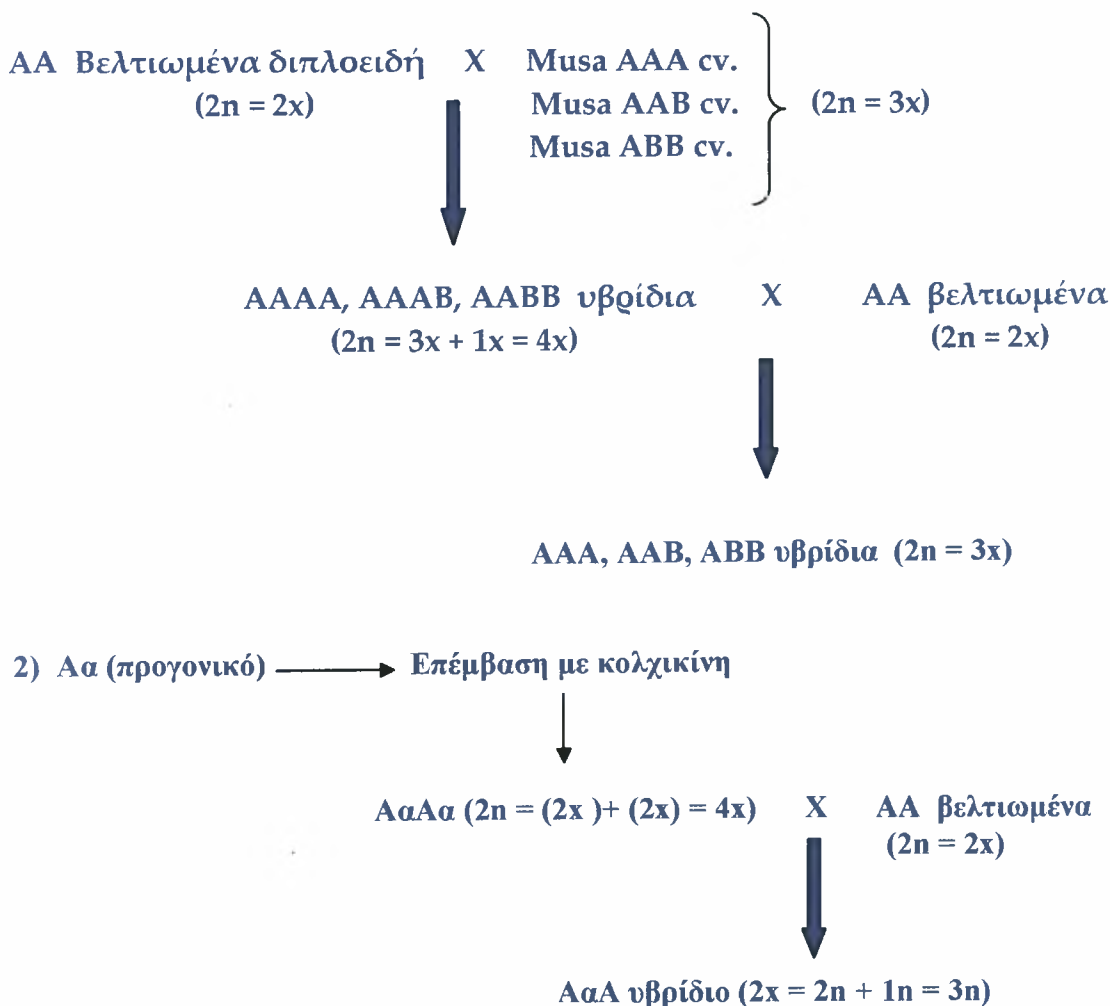


Εικ.5 Σχήμα παραγωγής τετραπλοειδών υβριδίων

### 3.3.2 Η τεχνική $4x/2x$

Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται η παραγωγή τριπλοειδών υβριδίων. Ειδικότερα, βελτιωμένα τετραπλοειδή υβρίδια διασταυρώνονται με βελτιωμένα διπλοειδή υβρίδια. Εναλλακτικά δύναται να χρησιμοποιηθούν αρχέγονα διπλοειδή είδη που έχουν υποστεί επέμβαση με κολχικίνη για

διπλασιασμό του χρωμοσωμικού τους αριθμού (Εικ.6). Η μέθοδος αυτή συμβάλλει στη διεύρυνση της γενετικής βάσης για βελτιωτικούς σκοπούς. Η επιλογή των προγονικών ειδών βασίζεται σε φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ποικιλιών και των ειδών αυτών. Η τεχνική αυτή μιμείται τη φυσική εξέλιξη της μπανάνας, καθώς οι τριπλοειδείς ποικιλίες προέκυψαν από αρχέγονα διπλοειδή είδη, όταν τυχαία κάποια στιγμή ο ένας γονέας (διπλοειδής) παρήγαγε κατά την υβριδοποίηση, γαμέτες που δεν είχαν υποστεί μείωση. Το σφάλμα κατά τη διάρκεια της μείωσης, που συνετέλεσε στην παραγωγή αμείωτων γαμετών, αντικαθίσταται στην περίπτωση αυτή με το διπλασιασμό των χρωμοσώμων του ενός γονέα, κατόπιν επεμβάσεως με κολχικίνη.



Εικ.6. Σχήμα παραγωγής τριπλοειδών υβριδίων



### 3.4 Σύγχρονες μέθοδοι βελτίωσης

Η πρόοδος που έχει σημειωθεί στον τομέα της βιοτεχνολογίας τα τελευταία χρόνια, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τα βελτιωτικά προγράμματα, καθώς με τις νέες τεχνολογίες και τεχνικές που προσφέρονται οι βελτιωτές είναι σε θέση να επαναπροσδιορίσουν τους στόχους τους, να εκτιμήσουν καλύτερα και ακριβέστερα τα αποτελέσματά τους και κατά συνέπεια να επιταχύνουν τη δημιουργία κατάλληλων ποικιλιών.

Τα διάφορα βελτιωτικά προγράμματα διαφοροποιούνται ανάλογα με την τεχνική στην οποία βασίζονται:

- ❖ *In vitro* τεχνικές (πολλαπλασιασμός, εμβρυογένεση, διάσωση εμβρύων).
- ❖ Τεχνικές βασιζόμενες στην Μοριακή Βιολογία (προσδιορισμός γονιδίων ανθεκτικότητας, επιλογή μέσω μοριακών δεικτών- MAS, δημιουργία γενετικών χαρτών).
- ❖ Παράγωγα Σωματοκλωνικής Παραλλακτικότητας.

#### 3.4.1 Σωματική εμβρυογένεση

Οι τεχνικές της σωματικής εμβρυογένεσης αναπτύχθηκαν αρχικά για να συνδυάσουν δύο βασικούς στόχους: το μαζικό αναπολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη του υλικού εκκίνησης για γενετική βελτίωση (γενετική τροποποίηση, σύμπτυξη πρωτοπλαστών). Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στη χρήση συνθετικών ρυθμιστών αύξησης (αυξίνες) στο υπόστρωμα καλλιέργειας, για την πρόκληση διαφοροποίησης των ιστών και τη δημιουργία κάλλου. Ο κάλλος αποτελεί το αρχικό υλικό για την ανάπτυξη καλλιεργειών εμβρυογενετικών κυττάρων. Από τις καλλιέργειες αυτές παράγονται έμβρυα τα οποία εν συνεχεία θα δώσουν αναγεννημένα φυτά.

Παρά το μεγάλο δυναμικό αναπαραγωγής της μεθόδου, η τεχνική της καλλιέργειας εμβρυογενετικών κυττάρων δεν ενδείκνυται για μαζικό αναπολλαπλασιασμό. Κύριο λόγο αποτελεί η αυξημένη σωματοκλωνική παραλλακτικότητα που παρατηρείται στα αναγεννημένα φυτά συγκριτικά με τη κλασσική *in vitro* καλλιέργεια βλαστικών μερών. Στην μπανάνα χρησιμοποιείται ήδη στην περίπτωση της γενετικής τροποποίησης και της σύμπτυξης πρωτοπλαστών. Τα φυτά που προκύπτουν από μια τέτοια καλλιέργεια προέρχονται συνήθως από ένα μόνο κύτταρο. Στην περίπτωση των γενετικά τροποποιημένων φυτών, το στοιχείο αυτό επιλύει το πρόβλημα των χιμαιρικών φυτών (φυτά που περιέχουν τόσο τροποποιημένα όσο και μη-τροποποιημένα κύτταρα), που προκύπτει όταν χρησιμοποιούνται βλαστικές κορυφές ως υλικό εκκίνησης.

Ως αρχικό έκφυτο θεωρείται το έκφυτο από το οποίο θα παραχθεί ο κάλλος και στην περίπτωση της μπανάνας, μπορεί να είναι ένα αρσενικό άνθος ή το ακραίο μερίστωμα νεαρού φυτού που αναπτύχθηκε επίσης σε *in vitro* καλλιέργεια (Εικ. 7, 8). Τα έκφυτα κατόπιν προσεκτικής απομόνωσης τοποθετούνται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα που ευνοεί τη δημιουργία κάλλου. Η επιτυχία της μεθόδου βασίζεται στην σωστή επιλογή κάλλων που φέρουν λίγα και καλώς ανεπτυγμένα έμβρυα, που στη συνέχεια θα δώσουν μια υψηλής ποιότητας καλλιέργεια εμβρυογενετικών κυττάρων. Τα έμβρυα

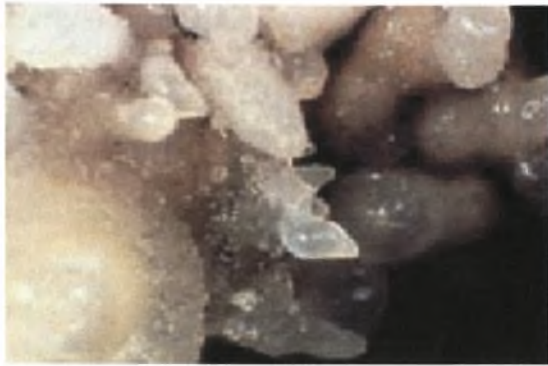


**Εικ.7. Τμήμα ακραίου μεριστώματος**

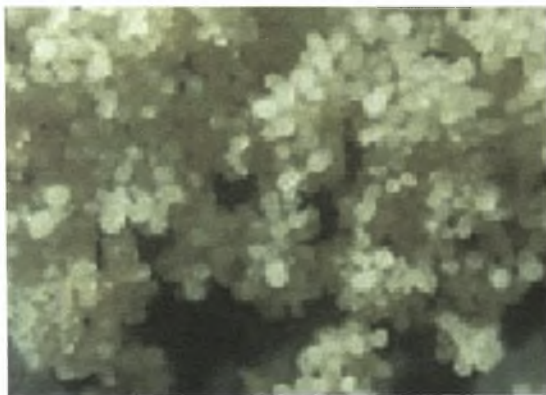


**Εικ 8. Αρσενικά άνθη μπανάνας**

στη συνέχεια αποκόπτονται προσεχτικά και μεταφέρονται σε ειδικό διάλυμα, όπου και διατηρούνται. Στο στάδιο αυτό πρωταρχικό στόχο αποτελεί η διατήρηση μια ομογενούς καλλιέργειας. Για το λόγο αυτό όταν το υλικό είναι αρκετό, ένα δείγμα εξετάζεται στο μικροσκόπιο και όλα τα ανεπιθύμητα στοιχεία απομακρύνονται με τη βοήθεια μιας πιπέτας. Από μία καλής ποιότητας καλλιέργεια, γρήγορα αναγεννιούνται σωματικά έμβρυα και στη συνέχεια ολόκληρα φυτά (Εικ. 9,10,11).



**Εικ.9** Τμήμα κάλλου με ανεπτυγμένα έμβρυα



**Εικ.10** Καλλιέργεια εμβρύων



**Εικ.11** Αναγεννημένα φυτά μπανάνας

### **3.4.2 Γενετική Μηχανική**

Στα πλαίσια των σύγχρονων βελτιωτικών προγραμμάτων έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που επιτρέπουν την απομόνωση και μεταφορά γονιδίων που ελέγχουν συγκεκριμένα, επιθυμητά γνωρίσματα. Για την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων φυτών μπανάνας πρέπει να ακολουθηθούν συγκεκριμένα βήματα:

- Καθορισμός των επιθυμητών χαρακτηριστικών, εντοπισμός των γονιδίων ελέγχου και απομόνωση αυτών.

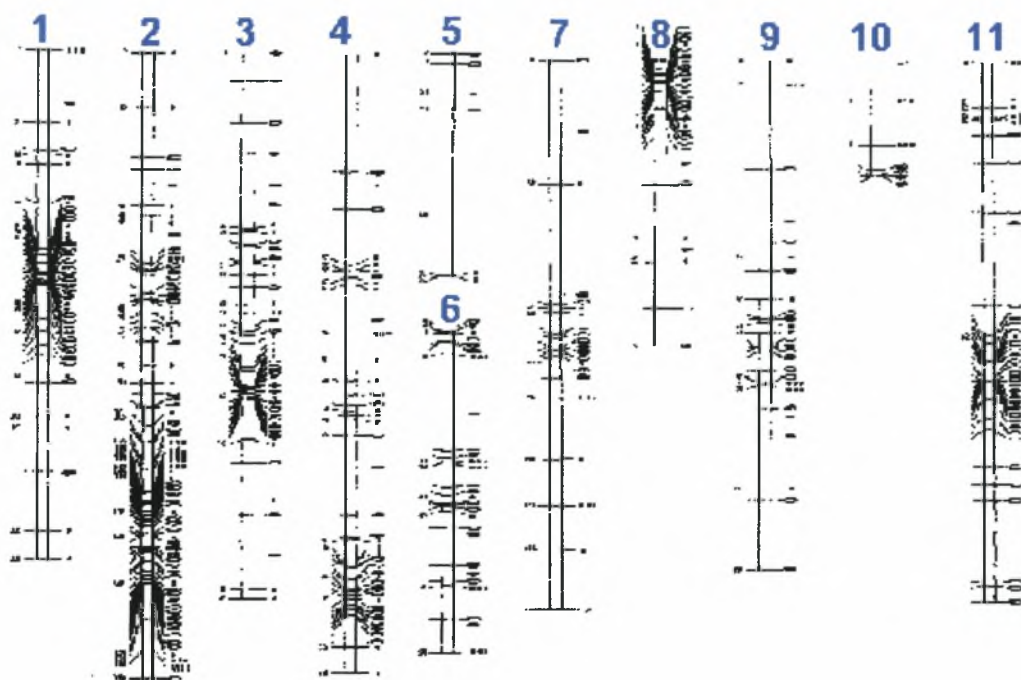
- Μεταφορά των απομονωμένων γονιδίων απευθείας (βιοβαλλιστική μέθοδος) ή μέσω ενός φορέα (*Agrobacterium tumefaciens*).
- Η μεταφορά θεωρείται επιτυχής όταν οι ακολουθίες των γονιδίων που εισάγονται στα φυτικά κύτταρα, καταφέρουν να ενσωματωθούν στο γένωμα του φυτού, να εκφραστούν και να διατηρηθούν σε όλες τις ακόλουθες κυτταρικές διαιρέσεις.
- Από τα μεταμορφωμένα κύτταρα κατόπιν αναγεννιούνται ολόκληρα φυτά.
- Τέλος η συμπεριφορά των γενετικά τροποποιημένων φυτών θα πρέπει να ελεγχθεί σε συνθήκες αγρού.

### 3.5 Γενετικός χάρτης μπανάνας

Πρωταρχικό βήμα για τον εντοπισμό των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την έκφραση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών που ενδιαφέρουν, αποτελεί η χαρτογράφηση του γενώματος της μπανάνας (Εικ. 12). Η προσπάθεια διεξάγεται από συγκεκριμένα ινστιτούτα (CIRAD, IEB, QDPI) σε διάφορες χώρες και ήδη έχουν αναγνωριστεί γονίδια υπεύθυνα για ανθεκτικότητα στους ιούς BLSV, *Fusarium*, σε νηματώδεις καθώς και γονίδια που καθορίζουν την ποιότητα των καρπών. Η έρευνα συνεχίζεται έως ότου ολοκληρωθεί η αποκωδικοποίηση όλων των γονιδίων. Για τα είδη *M. acuminata* και *M. balbisiana* έχουν ήδη δημιουργηθεί οι αντίστοιχες βιβλιοθήκες βακτηριών (BAC libraries).

Η αποκωδικοποίηση του γενώματος της μπανάνας και η κατασκευή των αντίστοιχων γενετικών χαρτών, θα βελτιώσουν την επιλογή για ποσοτικά γνωρίσματα, όπως η απόδοση, καθώς και των κατάλληλων γονέων για προγράμματα διασταυρώσεων.





Εικ. 12 Γενετικός χάρτης μπανάνας

### 3.6 Μοριακά Γενετικά Τροποποιημένη μπανάνα (G.M.O)

Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται σήμερα για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών μπανάνας: α) η μέθοδος βομβαρδισμού με μικροβλήματα (gene gun) και β) η μέθοδος του *Agrobacterium tumefaciens*. Η δεύτερη μέθοδος πλεονεκτεί έναντι της πρώτης καθώς επιτρέπει τη μεταφορά μεγαλύτερων τμημάτων DNA, που περιέχουν περισσότερα του ενός γονίδια. Καθώς έχει βρεθεί ότι η ανθεκτικότητα σε μύκητες και ιούς ελέγχεται από πολλά διαφορετικά γονίδια, η μέθοδος αυτή είναι πολλά υποσχόμενη. Και οι δύο μέθοδοι ωστόσο βασίζονται σε εμβρυογενετικές καλλιέργειες κυττάρων, ως αρχικό υλικό, οι οποίες είναι πολύ δύσκολο να δημιουργηθούν και να διατηρηθούν (βλ. 2.4.1 Σωματική εμβρυογένεση).

#### 4. Σωματοκλωνική Παραλλακτικότητα

Πολλές φορές παρατηρείται, σε αναγεννημένα φυτά που προέρχονται μετά από την καλλιέργεια ιστών *in vitro* με ή χωρίς τη μεσολάβηση της φάσης του κάλλου, μια παραλλακτικότητα τόσο μεταξύ των αναγεννημένων φυτών όσο και σε σχέση με το μητρικό φυτό από το οποίο προήλθαν. Η νεοδημιουργούμενη αυτή παραλλακτικότητα αναφέρεται σε γενετικές και άρα κληρονομήσιμες αλλαγές και ονομάζεται σωματοκλωνική παραλλακτικότητα (Μαυρομάτης, 1996).

Οι αλλαγές που παρατηρούνται μπορεί να αναφέρονται στο γένωμα των φυτών και εστιάζονται σε:

- ✓ Αλλαγές στο χρωμοσωμικό αριθμό (ανευπλοειδία, ευπλοειδία, πολυπλοειδία κ.τ.λ.)
- ✓ Αλλαγές στη δομή και διάταξη των χρωμοσώμων (ελλείμματα, διπλασιασμοί, αναστροφές και μετατοπίσεις.)
- ✓ Αλλαγές στο περιεχόμενο των κυττάρων σε DNA.
- ✓ Σημειακές γονιδιακές αλλαγές.
- ✓ Μιτωτικούς ανασυνδυασμούς ή ενδομίτωση.
- ✓ Αλλαγές στο DNA των μιτοχονδρίων ή των χλωροπλαστών.
- ✓ Μετακινήσεις των μεταθετών στοιχείων.
- ✓ Μεθυλιώσεις της αλληλουχίας του πυρηνικού DNA.

Επιπλέον οι αλλαγές αυτές μπορεί να εκδηλώνονται στο φαινότυπο και ειδικότερα αφορούν:

- ✓ Μορφολογικά χαρακτηριστικά
- ✓ Βιοχημικούς χαρακτήρες
- ✓ Ποιοτικά γνωρίσματα
- ✓ Ποσοτικά γνωρίσματα
- ✓ Ομοζύγωτες μεταλλάξεις στα αναγεννημένα φυτά (πρώτης γενιάς)
- ✓ Ετεροζύγωτες μεταλλάξεις στα αναγεννημένα φυτά

- ✓ Μεταλλάξεις σε μεμονωμένα άτομα
- ✓ Μεταλλάξεις στο σύνολο των ατόμων ενός πληθυσμών

Το ποια είναι όμως η μοριακή βάση και οι μηχανισμοί που οδηγούν στην εμφάνιση αυτών των μεταλλάξεων, δεν είναι απόλυτα γνωστό. Με βάση τους τρόπους εμφάνισης της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας, υπεύθυνοι θα πρέπει να είναι δύο κύριοι μηχανισμοί. Ένας που διευθύνει την πρόκληση μιας γονιδιακής μετάλλαξης και ένας δεύτερος που λειτουργεί με τέτοιο τρόπο ώστε να κάνει την επιφερόμενη μετάλλαξη ομοζύγωτη και άρα εμφανή στα αναγεννημένα φυτά.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι διαφορές μεταξύ των σωμακλωνικών προϊόντων βρίσκονται σε άμεση σχέση με το είδος του φυτικού ιστού που χρησιμοποιείται για την *in vitro* καλλιέργεια.

Ωστόσο η σωμακλωνική παραλλακτικότητα δεν είναι επιθυμητή όταν στοχεύουμε στη:

- Παραγωγή ολόκληρων φυτών με κλωνική αναπαραγωγή, που έχει σαν στόχο την ομοιομορφία.
- Διατήρηση κάποιου δύστροπου γενετικού υλικού κάτω από *in vitro* συνθήκες σε κάποια τράπεζα γενετικού υλικού.
- Παραγωγή συγκεκριμένων δευτερογενών προϊόντων μετά από συνεχή καλλιέργεια κυττάρων ή ιστών.
- Δημιουργία σωματικών υβριδίων.

Σε κάθε άλλη περίπτωση η σωματοκλωνική παραλλακτικότητα είναι επιθυμητή, γιατί δημιουργεί μια νέα και σε πολλές περιπτώσεις, χρήσιμη παραλλακτικότητα που θα ήταν αδύνατο να δημιουργηθεί με οποιοδήποτε άλλο τρόπο. Καθιστά επίσης δυνατή την *in vitro* επιλογή σε καλλιέργειες κυττάρων κάτω από ποικίλες εντάσεις επιλογής, όπου υπάρχει συσχέτιση συμπεριφοράς μεταξύ κυττάρων και αναγεννημένων φυτών. Με τον τρόπο αυτό επιτεύχθηκαν σημαντικά αποτελέσματα αντοχών σε παθοτοξίνες, ζιζανιοκτόνα, βαριά μέταλλα κ.α.

#### 4.1 Προέλευση της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας

Για την προέλευση αυτής της νεοδημιουργημένης παραλλακτικότητας έχουν προταθεί τρεις πιθανές εξηγήσεις. Σύμφωνα με την πρώτη, η παραλλακτικότητα προϋπάρχει στους φυτικούς ιστούς και απλά εκδηλώνεται μετά το πέρασμα από τις *in vitro* συνθήκες. Η δεύτερη άποψη υποστηρίζει ότι η παραλλακτικότητα εισάγεται εξαιτίας της μεταλλαξογόνου δράσης των συστατικών του θρεπτικού υποστρώματος. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ρυθμιστικών ουσιών που υπάρχουν στο υπόστρωμα καλλιέργειας και επηρεάζουν προς συγκεκριμένες κατευθύνσεις τη γενετική αστάθεια που υπάρχει στο γένωμα του φυτικού οργανισμού, εξαιτίας του δυναμικού των κυττάρων, οδηγώντας έτσι σε νέες κάθε φορά ισορροπίες. Η τρίτη άποψη συνοψίζει τις δύο προηγούμενες και φαίνεται να είναι η επικρατέστερη. Σύμφωνα με αυτήν, η παραλλακτικότητα που δημιουργείται είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης του φυτικού γενώματος στις συνθήκες καταπόνησης που δημιουργούνται συνολικά από το περιβάλλον της ιστοκαλλιέργειας.

Οι υποστηρικτές της πρώτης άποψης πιστεύουν ότι, οι μεταλλάξεις συσσωρεύονται στα κύτταρα των καλλιεργούμενων *in vitro* φυτικών κυττάρων με το πέρασμα από τη φάση του κάλου. Τα μεταλλαγμένα κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και μεταφέρουν το σύνολο ή μέρος αυτών των αλλαγών στα νεοδημιουργούμενα κύτταρα, προκαλώντας νέες αλλαγές σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της ανάπτυξης του κάλου. Το ότι η παραλλακτικότητα προϋπάρχει στους ιστούς, ενισχύεται από τη παρατήρηση ότι ο νεανικός ιστός έχει εξαρχής διαφορετική μορφογενετική ικανότητα από τον ώριμο. Επίσης η διαφοροποίηση στο νεανικό κάλο γίνεται γρηγορότερα και έχει σαν αποτέλεσμα μικρότερο ποσοστό αλλαγών, ενώ σε ακραίες περιπτώσεις ο ηλικιωμένος κάλος δυσκολεύεται να διαφοροποιηθεί και οι



συσσωρευμένες μεταλλαξογόνες επιδράσεις που φέρει, μεταφέρονται αυτούσιες και σε μεγάλο ποσοστό στα αναγεννημένα φυτά. Η τελευταία παρατήρηση ωστόσο ενισχύει και τις άλλες δύο απόψεις για την εξήγηση του φαινομένου της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας.

#### **4.2 Παράγοντες που επιδρούν στην εμφάνιση της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας**

Η εκμετάλλευση της αστάθειας στο φυτικό γένωμα με την επίδραση των ρυθμιστικών ουσιών του θρεπτικού μέσου, του περιβάλλοντος καλλιέργειας και των χειρισμών πριν, κατά και μετά την απόσπαση του εκφύτου από το μητρικό φυτό, οδηγεί πιθανότατα στην εκπομπή μηνυμάτων που φτάνουν μέχρι το γενετικό υλικό.

Ειδικότερα, ο γενότυπος, το έκφυτο και η προέλευση του, η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος, η μέθοδος αλλά και η συχνότητα μεταφορών, τα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας έναρξης (ο πληθυσμός των κυττάρων, ο ρυθμός ανάπτυξής τους), η ηλικία της καλλιέργειας, είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν δυναμικά την εμφάνιση της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας.

#### **4.3 Εμφάνιση σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας στην μπανάνα**

Ο πολλαπλασιασμός με την τεχνική της ιστοκαλλιέργειας, έκανε δυνατή τη μαζική αναπαραγωγή φυτών μπανάνας, απαλλαγμένων από ιώσεις και μύκητες, ενώ επιπλέον διεύρυνε τη γενετική παραλλακτικότητα του φυτού εξαιτίας των συχνών φαινομένων σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας, η εμφάνιση των οποίων είναι πολύ συχνή στην περίπτωση της μπανάνας. Το ποσοστό εμφάνισης τέτοιων φαινομένων στη μπανάνα ποικίλει ανάλογα με το γενότυπο και

κυμαίνεται από 0-70% για φυτά που προέρχονται από *in vitro* καλλιέργεια ακραίων, βλαστικών μεριστωμάτων (Crouch *et al.*, 1998). Η γενετική αυτή αστάθεια αποτελεί σοβαρό πρόβλημα στην περίπτωση που στοχεύουμε στην διατήρηση ορισμένου γενετικού υλικού μέσω του *in vitro* πολλαπλασιασμού. Ωστόσο η σωματοκλωνική παραλλακτικότητα μπορεί να αποτελέσει, όπως προαναφέρθηκε, μια νέα και χρήσιμη πηγή γενετικής παραλλακτικότητας. Συγκεκριμένα με αυτό τον τρόπο δημιουργήθηκαν κλώνοι μπανάνας με ανθεκτικότητα στο μύκητα *Fusarium oxysporum* (Khayat *et al.*, 2004).

Σε κάθε άλλη περίπτωση, η εμφάνιση σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας στην μπανάνα είναι ανεπιθύμητη, καθότι οδηγεί στην δημιουργία φυτών με φαινοτυπικές εκτροπές από το μητρικό γενότυπο. Οι εκτροπές αυτές δεν γίνονται αντιληπτές, παρά μόνο σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης (όταν τα φυτά έχουν εγκατασταθεί στον αγρό) και αφορούν τόσο σε νανισμό όσο και γιγαντισμό των φυτών αυτών. Επιπλέον, στις περισσότερες των περιπτώσεων, τα φυτά αυτά υπολείπονται κατά πολύ της αρχικής ποικιλίας από την οποία προήλθαν (για παράδειγμα, οι καρποί και η παραγωγή γενικότερα είναι πολύ μικρότερη). Η συχνή λοιπόν εμφάνιση “off-type” φυτών σε μια καλλιέργεια έχει σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο στους παραγωγούς. Για το λόγο αυτό υπάρχει αυξημένη ανάγκη για ανάπτυξη μεθόδων έγκαιρου εντοπισμού των παραγώγων της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας. Ειδικότερα για τους σκοπούς της βελτίωσης θα ενδιέφερε και η εύρεση μεθόδων εντοπισμού των σπάνιων αλλά χρήσιμων παραγώγων σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας μεταξύ των υπολοίπων που δεν παρουσιάζουν κανένα ενδιαφέρον (Vuylsteke *et al.*, 1998).

Η σταθερότητα εμφάνισης των “off-type” φυτών μετά από σειρά κύκλων αναπολλαπλασιασμού υποδηλώνει ότι η σωματοκλωνική

παραλλακτικότητα στην μπανάνα έχει γενετική βάση. Οι μοριακοί δείκτες τύπου RAPD's έχουν χρησιμοποιηθεί για την μοριακή ανάλυση κανονικών και "off-type", νάνων φυτών μπανάνας, ποικιλίας *Cavendish*. Το ποσοστό πολυμορφισμού που προέκυψε (28.8%), υποδηλώνει την ύπαρξη γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των δύο αυτών τύπων (Ramage *et al.*, 2004).

Η ανευπλοειδία, δηλ. η ύπαρξη ατόμων με ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα επιπλέον ή λιγότερα του βασικού χρωμοσωμικού αριθμού, αποτελεί ένα εξίσου συχνό φαινόμενο για τα φυτά μπανάνας που προέρχονται από *in vitro* πολλαπλασιασμό. Ανευπλοειδή άτομα ωστόσο δύναται να προκύψουν και από εγγενείς διασταυρώσεις 3x/2x ατόμων. Ο εντοπισμός τέτοιων φαινομένων γίνονταν παραδοσιακά με καταμέτρηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων, μια εργασία που απαιτούσε πολύ εργασία και χρόνο. Ως εναλλακτική μέθοδος προτείνεται η μέτρηση της ποσότητας DNA στον πυρήνα των κυττάρων με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται ευρέως στην περίπτωση της μπανάνας καθότι έχει βρεθεί ότι αποτελεί κατάλληλη μέθοδο για τον έγκαιρο εντοπισμό φαινομένων ανευπλοειδίας (Roux *et al.*, 2002).

## II. Υλικά & Μέθοδοι

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Γενετικό Υλικό

Το γενετικό υλικό αποτέλεσαν φυτά μπανάνας της ποικιλίας Grande Naine, που καλλιεργούνται στην περιοχή της Κρήτης. Όλα τα φυτά προέρχονταν από *in vitro* πολλαπλασιασμό. Ειδικότερα εξετάστηκαν 20 μπανανόφυτα Grande Naine, τα οποία ταξινομούνται σε δύο διαφορετικές ομάδες ανάλογα με τον αριθμό των επανακαλλιεργειών που έχουν υποστεί. Συγκεκριμένα 10 φυτά ανήκαν στην ομάδα GRNn-1 με 12 κύκλους υποκαλλιέργειας και τα άλλα 10 στην ομάδα GRNn-2 με 22 κύκλους. Τα φυτά αυτά προήλθαν από το εργαστήριο γεωργίας και πολλαπλασιαστικού υλικού, σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Επιπλέον εξετάστηκαν 16 φυτά της ποικιλίας Grande naine, περίπου ηλικίας 3 μηνών, που προήλθαν από θερμοκηπιακές καλλιέργειες στην περιοχή Ιεράπετρας, Κρήτης. Τα φυτά αυτά, αν και προερχόμενα από *in vitro* πολλαπλασιασμό, παρουσίασαν εκτροπές από το μητρικό φαινότυπο και σοβαρά προβλήματα στην ανάπτυξη τους, με αποτέλεσμα να εκριζώνονται και να απομακρύνονται από τη καλλιέργεια.

Στον έλεγχο συμπεριλήφθηκαν και 4 φυτά των παρακάτω ποικιλιών για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων με την ποικιλία Grande naine, καθώς και για τη μελέτη της σταθερότητας αναπαραγωγής τους.

Κωδικός	Ποικιλία	Κλώνος
GN	Cavendish nana	-
GRNn	Grand Naine	
GRNn-L		Grand Nain-L
FH-01	-	PHIA-01



Ειδικότερα για τα παραπάνω αναφέρονται:

- ❖ Η ποικιλία Cavendish nana καλλιεργείται για πολλά χρόνια στη Κρήτη, όμως τελευταία εμφανίζει αρκετά προβλήματα εκφυλισμού.
- ❖ Η ποικιλία Grand Nain καταλαμβάνει συνεχώς μεγαλύτερες εκτάσεις και αντικαθιστά σταδιακά την Cavendish nana.
- ❖ Ο κλώνος Grand Nain-L της ποικιλίας Grand Nain βρίσκεται στη διαδικασία αξιολόγησης.
- ❖ Ο κλώνος ΡΗΙΑ-01 της ποικιλίας Goldfinger προέρχεται από τη Ν. Αφρική, είναι ανθεκτικός στο κρύο, στους νηματώδεις και βρίσκεται στη διαδικασία αξιολόγησης, προκειμένου να προωθηθεί στους παραγωγούς.

## 2.2 Διαδικασία παραγωγής Πολλαπλασιαστικού Υλικού μπανάνας με *in vitro* τεχνική

### α) Επιλογή των φυτών "δωρητών"

Αρχικά επιλέγησαν φυτά "δωρητές" με άριστα φυτοτεχνικά χαρακτηριστικά (ώστε να μην απέχουν από τα βασικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας), και τα οποία στη συνέχεια ελέγχθηκαν για συμπτώματα οφειλόμενα στον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς (Cucumber Mosaic Virus-CMV) με τη ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA.

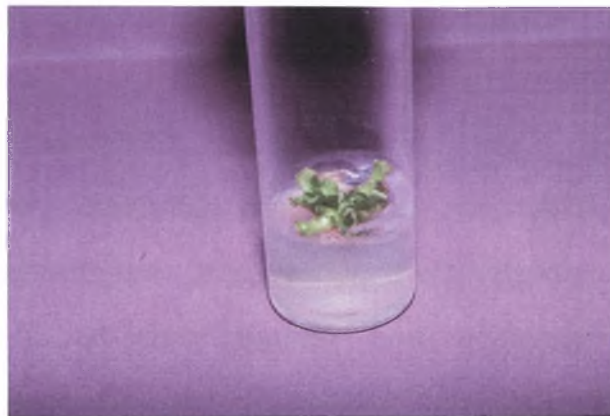
### β) Προετοιμασία των παραφυάδων

Από τα επιλεγμένα φυτά "δωρητές" απομονώθηκαν παραφυάδες από τις οποίες αφαιρέθηκαν τα εξωτερικά φύλλα και το μεγαλύτερο μέρος του ριζωματικού ιστού, με αποτέλεσμα να παραμένει ένα κομμάτι ιστού (έκφυτο) με μήκος περίπου 10-15cm και διάμετρο 6-8cm.

### γ) Καλλιέργεια των εκφύτων σε *in vitro* συνθήκες

Ακολούθως κάτω από ασηπτικές συνθήκες έγινε η απολύμανση των εκφύτων σε διαλύματα αλκοόλης (75%) για 1 περίπου λεπτό και

υποχλωριώδους ασβεστίου (10%) για 20-30 λεπτά και ακολούθησαν τρία διαδοχικά πλυσίματα με αποστειρωμένο νερό. Από τα απολυμασμένα έκφυτα απομακρύνθηκαν τα υπολείμματα των φύλλων, προκειμένου να εμφανιστεί η βλαστική κορυφή, η οποία αποσπάσθηκε, δημιουργώντας ένα μικρότερο έκφυτο (διαστάσεων περίπου 1,5 x 1,5 x 1,0 cm), στη συνέχεια με τη σειρά του καλλιεργήθηκε σε ειδικό υπόστρωμα



**Εικ.13 Έκπτυξη τυχαίων οφθαλμών-βλαστών μετά από 15 ημέρες στο θρεπτικό υπόστρωμα.**

πολλαπλασιασμού. Συγκεκριμένα, αξιοποιήθηκε το προτεινόμενο από τους Murashige and Skoog (1962) θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με Thiamine HCL (2mg/l), myo-inositol (100mg/l), BAP (3mg/l), σακχαρόζη (30gr/l) και άγαρ (8gr/l), ενώ το pH ρυθμίστηκε στο 5,8. Τα υπό καλλιέργεια έκφυτα μεταφέρονται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών ανάπτυξης (θερμοκρασία 25°C, 16 ώρες φωτοπερίοδο και ένταση φωτισμού 10.000 Lux.) και μετά από 4-5 εβδομάδες, σε κάθε καλλιεργούμενο έκφυτο σχηματίζονται περίπου 12-15 τυχαίοι οφθαλμοί-βλαστοί (Εικ. 13).

#### **δ) Αναγέννηση *in vitro*-φυταρίων**

Ακολούθησε η υποκαλλιέργεια των τυχαίων οφθαλμών σε γυάλινα βάζα, τα οποία περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962), συμπληρωμένο με σακχαρόζη (20 gr/l), ενεργό άνθρακα (1,6 gr/l) και IBA (2 mg/l), ενώ το pH ρυθμίστηκε στο 5,8. Η επώαση έγινε σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών ανάπτυξης (θερμοκρασία 25°C, 16 ώρες φωτοπερίοδο και ένταση φωτισμού 10.000 Lux.) για 2-3 περίπου εβδομάδες με αποτέλεσμα οι τυχαίοι οφθαλμοί να εξελιχθούν σε πλήρη φυτάρια. Η

διαδικασία παραγωγής των *vitro*-φυταρίων έγινε στο εργαστήριο γεωργίας και πολλαπλασιαστικού υλικού, σχολή τεχνολογίας γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Κρήτης, τα οποία κατόπιν μας στάλθηκαν μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες, για να ακολουθήσει ο εγκλιματισμός του σε *in vitro* συνθήκες.

#### ε) Εγκλιματισμός των *vitro*-φυταρίων - Π.Υ.

Οι συστάδες των *vitro*-φυταρίων απομακρύνθηκαν από τα δοχεία πολλαπλασιασμού (Εικ. 14) και ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό βρύσης, προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του θρεπτικού υποστρώματος. Ακολούθησε η

μεταφύτευσή τους σε γλαστράκια που περιείχαν άμμο, χώμα, τύρφη και περλίτη, τα οποία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ειδικούς κλωβούς εγκλιματισμού, όπου η υγρασία διατηρούνταν σε



Εικ.14. *Vitro*-φυτάρια σε πλήρη ανάπτυξη, έτοιμα για τη διαδικασία εγκλιματισμού.

υψηλά επίπεδα. Ο εγκλιματισμός των *vitro*-φυταρίων έγινε στο εργαστήριο γενετικής βελτίωσης, σχολή γεωπονίας φυτικής παραγωγής και αγροτικού περιβάλλοντος, πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## 2.3 Καταγραφή Μορφολογικών χαρακτηριστικών

### 2.3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Καταγράφηκε το ύψος κάθε φυτού σε cm, με μετρήσεις που έγιναν από τη βάση του βλαστού έως την άκρη του τελευταίου νεοσχηματιζόμενου φύλλου. Επιπλέον κατεγράφησαν οι διαστάσεις μήκος και πλάτος (cm)

των δύο ακραίων, πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων κάθε φυτού καθώς και ο συνολικός αριθμός φύλλων/φυτό. Οι μετρήσεις έγιναν σε 2 στάδια.

## 2.4 SPAD

Το χλωροφυλλόμετρο (SPAD), εκτιμά έμμεσα την περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη, μετά από εκτίμηση της έντασης του πράσινου χρώματος των φύλλων. Η ένταση του πράσινου χρώματος των φύλλων εκφράζεται σε αδιάστατες μονάδες SPAD με θεωρητικό εύρος 0-70 και σχετίζεται θετικά με την περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη. Είναι μη καταστροφική μέθοδος και μπορεί να βοηθήσει στην βελτίωση φυτών ως έμμεσο κριτήριο (Κορκόβελος, 2003). Για το λόγο αυτό, προτάθηκε η χρησιμοποίηση της ως έμμεσο κριτήριο για την εκτίμηση της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας σε φυτά μπανάνας. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν το χλωροφυλλόμετρο SPAD-502 (Minolta Corp., Ramsey, N.Y.). Οι εκτιμήσεις που λαμβάνονταν, βασίστηκαν στην εκπομπή φωτεινής δέσμης σε δύο μήκη κύματος 650 και 940 nm και στην μέτρηση της απορροφούμενης ποσότητας ακτινοβολίας μέσω ενός φωτοευαίσθητου αισθητήρα. Συνολικά διεξήχθησαν 3 μετρήσεις, ανά διαστήματα 3 μηνών περίπου. Οι μετρήσεις λαμβάνονταν από τα 2 ακραία (νεότερα) φύλλα κάθε φυτού, σε 6 σημεία κάθε φύλλου. Ο μέσος όρος των τιμών αυτών αποτέλεσε τη τελική τιμή SPAD για κάθε φύλλο.

## 2.5 Απομόνωση Γενωμικού DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε από τα φύλλα των αναγεννημένων φυτών (0.3gr φυτικού ιστού) με τη τροποποιημένη CTAB μέθοδο. Αναλυτικά η μέθοδος περιλαμβάνει ομογενοποίηση των ιστών του φύλλου με αποστειρωμένο γουδί, παρουσία υγρού αζώτου. Ακολουθούσε τοποθέτηση του εκχυλίσματος σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα μαζί με 1ml

ρυθμιστικού διαλύματος CTAB και 10μL β-μερκαπτοαιθανόλης (1%v/v). Το παραπάνω διάλυμα διατηρούνταν σε υδατόλουτρο στους (65°C) για 10 έως 15min. Στη συνέχεια προσθέτονταν φρέσκο διάλυμα χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1 v/v) έως πληρώσεως του όγκου και ανακινούνταν ελαφρά με το χέρι. Κατόπιν τα δείγματα φυγοκεντρώνταν στις 7000 rpm για 20min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης η υπερκείμενη υγρή φάση μεταφέρονταν προσεχτικά σε νέο, αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και προσθέτονταν 2/3 του όγκου 2-ισοπροπανόλη και 1/10 Na-acetate. Τα δείγματα τοποθετούνταν στο ψυγείο σε θερμοκρασία -20°C για 30min. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 10.000rpm για 15min. Σε αυτό το σημείο ήταν εμφανής η δημιουργία λευκού ιζήματος. Η υγρή φάση αφαιρούνταν με προσοχή και προστίθονταν 900μL EtOH (70%) και 100μL 0.1M K-acetate και κατόπιν ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 14.000rpm για 15min. Στη συνέχεια γίνονταν ακόμη μία πλύση με καθαρή αιθανόλη (95%) και κατόπιν φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Τέλος τα δείγματα ξηραίνονταν σε κενό αέρος και θερμοκρασία 60°C για 5min. Το τελικό προϊόν διαλύονταν σε 200μL διαλύματος TE (10mM Tris-HCl, 1mM Na<sub>2</sub> EDTA, pH 8.0). Τα δείγματα υπέστησαν επιπλέον καθαρισμό με RNA-άση. Η απομόνωση του γενωμικού DNA έγινε στο εργαστήριο γενετικής βελτίωσης φυτών, σχολή γεωπονίας, πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## **2.6 Ποιοτικός και Ποσοτικός προσδιορισμός DNA**

Η εκτίμηση της ποσότητας του dsDNA σε ng/μl των δειγμάτων έγινε με φωτομέτρηση στα 260nm ενώ ο ποιοτικός προσδιορισμός τους έγινε με απορρόφηση στα 280nm για να εκτιμηθεί η παρουσία πρωτεϊνών στα δείγματα με βάση το λόγο 260/280nm. Οι παραπάνω εκτιμήσεις



επιβεβαιώθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 0,8% με πρότυπο δείγμα DNA ως μάρτυρα.

## 2.7 Ανάλυση με μοριακούς δείκτες τύπου RAPD's

Στα πλαίσια της μοριακής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 24 εκκινητές (primers) με τυχαία νουκλεοτιδική ακολουθία, των σειρών OPC, OPD και OPF της εταιρίας OPERON.

Πίνακας 1. Τύπος και αλληλουχία των RAPD εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

OPC 2	5'-GTGAGGCGTC-3'	OPD 5	5'-TGAGCGGACA-3'
OPC 5	5'-GATGACCGCC-3'	OPD 6	5'-ACCTGAACGG-3'
OPC 7	5'-GTCCCGACGA-3'	OPD 8	5'-GTGTGCCCCA-3'
OPC 8	5'-TGGACCGGTG-3'	OPD 14	5'-CTTCCCCAAG-3'
OPC 9	5'-CTCACCGTCC-3'	OPD 19	5'-CTGGGGACTT-3'
OPC 10	5'-TGTCTGGGTG-3'	OPD 20	5'-ACCCGGTCAC-3'
OPC 13	5'-AAGCCTCGTC-3'	OPF 3	5'-CCTGATCACC-3'
OPC 14	5'-TGCCTGCTTG-3'	OPF 8	5'-GGGATATCGG-3'
OPC 15	5'-GACGGATCAG-3'	OPF 9	5'-CCAAGCTTCC-3'
OPC 16	5'-CACACTCCAG-3'	OPF 11	5'-TTGGTACCCC-3'
OPC 17	5'-TTCCCCCAG-3'	OPF 17	5'-TTGGTACCCC-3'
OPD 4	5'-TCTGGTGAGG-3'	OPF 18	5'-TTCCC GGTT-3'

Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ορίστηκε στα 25μL, τα οποία περιείχαν τα εξής αντιδραστήρια:

- 150ng γενωμικού DNA
- 2.5μL διαλύματος PCR buffer 10x
- 10 pmoles RAPD εκκινητή (Operon Tech.)
- 2μL διαλύματος MgCl συγκέντρωσης 25 mM
- 2μL διαλύματος dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) με τελική συγκέντρωση 2.5 mM
- 1 unit Taq πολυμεράση

Η προσαρμογή στο τελικό όγκο των 25μL έγινε με ddH<sub>2</sub>O.

Οι συνθήκες του προγράμματος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης που εφαρμόστηκε, αναφέρονται αναλυτικά στο πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 2. Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Προ-αποδιάταξη των αλυσίδων	94°C	6 min	} 35
Αποδιάταξη των αλυσίδων	94°C	1 min	
Επικόλληση των εκκινητών	37°C	1 min	
Σύνθεση και επιμήκυνση νέων αλυσίδων	72°C	1,30 min	
Τελική επιμήκυνση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων	72°C	7 min	

Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR εν συνεχεία ηλεκτροφορούσαν σε πηκτή αγαρόζης, πυκνότητας 1%, η οποία περιείχε 0.004% (w/v) βρωμιούχο αιθίδιο. Τα αποτελέσματα εμφανίζονταν ύστερα από έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίζονταν. Παράλληλα γινόταν καταγραφή των πολυμορφικών ζωνών των δειγμάτων και εκτίμηση του μοριακού τους βάρους με τη βοήθεια πρότυπου δείγματος DNA (100 bp PCR ladder).

## 2.8 Εκτίμηση του επιπέδου πλοειδίας των αναγεννημένων φυτών – Κυτταρομετρία Ροής

Η εκτίμηση του επιπέδου πλοειδίας των αναγεννημένων φυτών έγινε με κυτταρομετρητή ροής (Flow cytometer – PARTEC II, Germany). Η μέθοδος βασίζεται στην εκτίμηση της ποσότητας του περιεχόμενου DNA σε διάλυμα φυτικού ιστού μετά από χρώση του πυρήνα των κυττάρων. Για την παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν μικρά τμήματα νεαρών φύλλων, τα οποία μετά την προσθήκη 2 ml διαλύματος απομόνωσης των πυρήνων (*isolation buffer* – PA I), τεμαχίζονταν σε πολύ μικρά τμήματα ώστε να επιτευχθεί ο κατακερματισμός των κυττάρων και

η απομόνωση των πυρήνων. Ακολουθούσε φιλτράρισμα του διαλύματος με μικροφίλτρα διαμέτρου 50 mesh για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων τμημάτων ενώ στο εναπομείναν διάλυμα, προσθέτονταν τριπλάσιος έως τετραπλάσιος όγκος από το διάλυμα χρώσης (DAPI staining solution - PA II). Τα δείγματα διατηρούνταν σε πάγο για 12-15 λεπτά και ακολουθούσε μέτρηση της ποσότητας DNA του πυρήνα των κυττάρων με την τοποθέτησή τους στον υποδοχέα δειγμάτων. Με τον τρόπο αυτό, καταγράφονταν ο μιτωτικός κύκλος των κυττάρων, γινόταν διαχωρισμός των φάσεων G1 και G2 και εκτίμηση του επιπέδου πλοειδίας των φυτών. Για την ακρίβεια των αναλύσεων και την εκτίμηση σχέσεων και διαφορών στην ποσότητα DNA μεταξύ των εξεταζόμενων ειδών ακτινιδίου, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αναφοράς (RCBD) και DNA από ιστούς μπιζελιού.

## 2.9 Στατιστική Ανάλυση

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της μοριακής ανάλυσης έγινε με τη χρήση του προγράμματος *NTSYS pc v2.02i* σε Windows XP, μετά από κωδικοποίηση των μοριακών δεδομένων. Ειδικότερα η παρουσία πολυμορφικών ζωνών στα δείγματα αντιπροσωπεύτηκε με (1) και η απουσία με (0) για κάθε εκκινητή. Με βάση τα δεδομένα αυτά υπολογίστηκε η γενετική ομοιότητα των δειγμάτων με τη βοήθεια των συντελεστών γενετικής ομοιότητας Jaccard  $S_{ij} = a/(a+b-c)$  (κατά Sneath και Sokal, 1973) και Dice  $S_{ij} = 2a/(2a+b+c)$  (κατά Nei και Li, 1979), όπου:

- $S_{ij}$  : η γενετική ομοιότητα των δειγμάτων  $i$  και  $j$
- $a$  : το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα  $i$  και στο δείγμα  $j$ .
- $b$  : το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα  $i$  αλλά απουσιάζουν στο δείγμα  $j$ .

- $c$  : το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα  $j$  αλλά απουσιάζουν στο δείγμα  $i$ .

Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα δενδρογράμματα φυλογενετικών σχέσεων με τις μεθόδους Neighbourjoining και UPGMA. Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που παρουσίασε το μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης με τον αρχικό πίνακα των δεδομένων και των δύο αλγόριθμων. Ο συνδυασμός Jaccard-UPGMA παρουσίασε το μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης ( $r = 0.87$ ).

Στα δεδομένα των μορφολογικών χαρακτηριστικών καθώς και στις τιμές SPAD έγινε ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA), με τη βοήθεια του προγράμματος SPSS 10.0 για Windows SE.

# III. Αποτελέσματα και Συζήτηση



### **3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά**

Από την καταγραφή και την επεξεργασία των μορφολογικών χαρακτηριστικών για τα φυτά των δύο διαφορετικών κύκλων αναπαραγωγής, προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές τόσο για το μήκος όσο και για το πλάτος των φύλλων των φυτών των δύο διαφορετικών κύκλων αναπαραγωγής (12<sup>ου</sup> και 22<sup>ου</sup>), γεγονός που πιθανόν υποδηλώνει την ύπαρξη σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας στα φυτά (Πίν. 1). Το ύψος των φυτών και ο αριθμός φύλλων ανά φυτό, δεν αποτελούν επαρκή στοιχεία, καθώς κατά την ανάλυση τους δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές. Οι παραπάνω μετρήσεις δεν λήφθηκαν για τα 16 φυτά της τρίτης ομάδας, που προέρχονταν από θερμοκηπιακές καλλιέργειες, καθώς η ηλικία τους δεν ήταν κοινή και επομένως τα στοιχεία αυτά δεν θα ήταν συγκρίσιμα.

Πίνακας 1. Τιμές μορφολογικών χαρακτηριστικών σε 20 φυτά μπανάνας των ομάδων GRNn1 και GRNn2.

Γενότυποι	Ύψος	Μήκος	Πλάτος	Φύλλα
				ανά φυτό
		cm		αρ
GRNn1 1	9.5	12.5	6.25	9
GRNn1 2	11.5	14	7	9
GRNn1 3	10	9.5	3.9	9
GRNn1 4	8	10	4.5	8
GRNn1 5	7.5	8.75	3.65	8
GRNn1 6	8	11.75	5.75	9
GRNn1 7	10	11	5.25	8
GRNn1 8	9	11.1	5.15	8
GRNn1 9	9.5	11.9	5.6	9
GRNn1 10	11.5	14	6.65	10
GRNn2 1	14.5	15.25	7.5	10
GRNn2 2	12.5	13	6.25	9
GRNn2 3	11.5	12.75	6.1	11
GRNn2 4	9.5	11	4.6	7
GRNn2 5	7.5	9	3.65	7
GRNn2 6	15	16.5	7.75	11
GRNn2 7	6	8.5	3.6	7
GRNn2 8	11	12.5	6.25	9
GRNn2 9	9	11	5.3	9
GRNn2 10	8	7.75	3.25	6
M.O±Sx	9.6±2.1	11.6±0.7	5.4±0.3	8.65±1.3
F test		**	**	
E.Σ.Δ.		1.92	0.89	
CV %	22.4	19.9	25	15.1

### 3.2 Μετρήσεις SPAD

Οι μετρήσεις SPAD διεξήχθησαν 3 φορές, σε διαστήματα 3 μηνών περίπου, στα φυτά και των τριών ομάδων (Πίν 2-4).

Πίνακας 2. Μετρήσεις SPAD για τα φυτά της ομάδας GRNn1.

Φυτό	Μετρήσεις SPAD		
	SPAD (8//8)	SPAD (2/11)	SPAD (25/02)
GRNn1 1	37.2	34.7	30.8
	33.1	30.4	25.5
GRNn1 2	33.9	35.6	28
	38.1	39.5	26.2
GRNn1 3	40.7	34.1	37.1
	44.6	35.9	33.5
GRNn1 4	40.5	35	26.3
	33.3	34.2	32.7
GRNn1 5	44.1	36.1	28.7
	35.5	33.3	32.8
GRNn1 6	29.9	29.2	33.6
	41.9	37.4	29.5
GRNn1 7	42.2	36.9	35.9
	38.6	29.6	32
GRNn1 8	34.4	36.6	29.1
	26.7	34.1	34.4
GRNn1 9	24.3	39.2	35.9
	40.6	34.5	37.4
GRNn1 10	34.9	31.8	32.1
	40.5	38.7	30.2

Πίνακας 3. Μετρήσεις SPAD για τα φυτά της ομάδας GRNn2.

Φυτό	Μετρήσεις SPAD		
	SPAD (8//8)	SPAD (2/11)	SPAD (25/02)
GRNn2 1	34.2	36.3	29.8
	41.5	31.6	30
GRNn2 2	34.4	40	38.5
	44.3	32.9	35.3
GRNn2 3	41	30.5	25.5
	32.8	37.4	29.6
GRNn2 4	41.1	34.9	25.7
	31.1	29.1	21.3
GRNn2 5	36.5	35.3	27
	33.1	26.7	33.3
GRNn2 6	34.5	36.4	25.7
	41.8	40.3	26.5
GRNn2 7	36.6	37.7	28.9
	29.8	35.8	27.5
GRNn2 8	41.2	30.4	34.4
	33.6	38.4	30.4
GRNn2 9	31.9	34.4	26.4
	38.3	28.4	30.4
GRNn2 10	37	38	29.2
	36.6	29.1	24.3

Πίνακας 4. Μετρήσεις SPAD για τα φυτά της ομάδας 3 (προερχόμενα από θερμοκηπιακής καλλιέργειας).

Φυτό	Μετρήσεις SPAD		
	SPAD (8/8)	SPAD (2/11)	SPAD (25/02)
1	20,05	25,1	-
	25	16,5	-
2	38,3	31,8	29,2
	28,3	35,4	34,2
3	20,5	39,1	-
	36,4	38,2	-
4	41,6	36,6	36,1
	42,9	37,3	33,5
5	46,1	38,9	33
	35,8	40,8	35,1
6	51,9	39,1	37,8
	41,2	44,6	28,9
7	49,8	44,7	31,5
	48	33	25,6
8	40,2	35,4	25,7
	46,7	40,3	39,9
9	48,3	36,8	37,7
	33,7	41,6	36,3
10	38,8	35,2	28,4
	40	39,7	35,3
11	41,9	43,1	42,6
	49,1	40,2	34,2
12	44,7	45,5	-
	50,4	34,8	-
13	48,2	41,4	34,7
	45,9	39,9	44,2
14	48,6	42	39,5
	48,3	41	32,5
15	44,8	41,3	34,9
	40,5	41,7	38,8
16	49,8	44,6	30,6
	45,8	43,7	34
Μάρτυρας	50,8	42,8	43,6
	48,9	41	42,5
GRN-L	38,8	38,5	41,3
	40,3	40,4	38,9
FH-01	44,3	39,4	34,7
	40	31,1	39
GRNn	34,2	35,3	35,5
	43	31,1	31,1
GRN*	38,9	23,4	28,3
	39,1	28,4	24,7

\* Οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν το μέσο όρο των τιμών κάθε φύλλου.

Τα παραπάνω δεδομένα ομαδοποιήθηκαν σε δύο ομάδες: α) στην ομάδα 1 που απαρτιζόνταν από τα φυτά των δύο διαφορετικών κύκλων αναπολλαπλασιασμού της *in vitro* καλλιέργειας και β) στην ομάδα 2 που αποτελούνταν από τα φυτά που προέρχονταν από θερμοκηπιακές καλλιέργειες. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) αυτών και προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:

**Πίνακας 4. Ανάλυση Παραλλακτικότητας Ομάδας 1 για 1<sup>η</sup> μέτρηση SPAD**

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	πημ-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	297,78275	19	15,672776	0,515014	0,922974747	2,137007016
Μέσα στις ομάδες	608,635	20	30,43175			
Σύνολο	906,41775	39				

**Πίνακας 5. Ανάλυση Παραλλακτικότητας Ομάδας 1 για 2<sup>η</sup> μέτρηση SPAD**

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	πημ-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	153,056	19	8,0555789	0,4826301	0,9408641	2,137007
Μέσα στις ομάδες	333,82	20	16,691			
Σύνολο	486,876	39				

**Πίνακας 6. Ανάλυση Παραλλακτικότητας Ομάδας 1 για 3<sup>η</sup> μέτρηση SPAD**

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	πημ-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	477,901	19	25,15268421	3,21666145	0,006299242	2,137007016
Μέσα στις ομάδες	156,39	20	7,8195			
Σύνολο	634,291	39				



**Πίνακας 7. Ανάλυση Παραλλακτικότητας Ομάδας 2 για 1<sup>η</sup> μέτρηση SPAD**

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	πμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	1895,904048	20	94,79520238	3,667117373	0,002327137	2,096033569
Μέσα στις ομάδες	542,85125	21	25,85005952			
Σύνολο	2438,755298	41				
Ε.Σ.Δ.	7,477890663					

**Πίνακας 8. Ανάλυση Παραλλακτικότητας Ομάδας 2 για 2<sup>η</sup> μέτρηση SPAD**

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	πμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	1228,2	20	61,41	5,123904881	0,000231142	2,096033569
Μέσα στις ομάδες	251,685	21	11,985			
Σύνολο	1479,885	41				
Ε.Σ.Δ.	5,091753333					

**Πίνακας 9. Ανάλυση Παραλλακτικότητας Ομάδας 2 για 3<sup>η</sup> μέτρηση SPAD**

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	πμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	601,4388889	17	35,37875817	1,951154014	0,084688369	2,232546592
Μέσα στις ομάδες	326,38	18	18,13222222			
Σύνολο	927,8188889	35				
Ε.Σ.Δ.	6,32610755					

Από τη μελέτη των παραπάνω πινάκων προκύπτει ότι για τα φυτά της ομάδας 1, που προέρχονταν από *in vitro* καλλιέργεια, η τιμή SPAD δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές, τουλάχιστον για τις δύο πρώτες μετρήσεις (πίνακας 4 και 5). Ωστόσο σημαντικές διαφορές προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων της τρίτης μέτρησης (πίνακας 6), που διεξήχθη όταν τα φυτά βρίσκονταν σε καλά ανεπτυγμένο στάδιο. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι τυχόν διαφορές που σχετίζονται με την ένταση του χρώματος των φύλλων, δεν είναι ανιχνεύσιμες στα αρχικά στάδια των φυτών.

Αντίθετα για τα φυτά της ομάδας 2, που προέρχονταν από θερμοκηπιακής καλλιέργειας και βρίσκονταν ήδη σε αρκετά ανεπτυγμένο στάδιο, προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές για τις δύο πρώτες μετρήσεις. Η ανάλυση των δεδομένων της τρίτης μέτρησης δεν έδωσε σημαντικά αποτελέσματα για τα φυτά αυτά και για το λόγο αυτό θα μπορούσε να υποθεθεί ότι πέραν ενός ορισμένου σταδίου ανάπτυξης των φυτών, οι διαφορές στην ένταση χρώματος των φύλλων καθίστανται και πάλι μη ανιχνεύσιμες.

Στη συνέχεια παρατίθενται φωτογραφίες φυτών που παρουσίαζαν εμφανείς εκτροπές από το μητρικό φαινότυπο, όσο αφορά το σχήμα και το μέγεθος των φύλλων, καθώς και χρωματικές αποκλίσεις αυτών. Στα πλαίσια της μοριακής ανάλυσης εξετάστηκε το αν και κατά πόσο συνδέονται οι φαινοτυπικές αυτές αλλαγές με αλλαγές στο γένωμα των φυτών.



**Εικ.15** Μητρικό φυτό GRNn



**Εικ.16** Γενότυπος 1



**Εικ.17** Γενότυπος 4



**Εικ.18** Γενότυπος 2

### **3.3 Μοριακή Ανάλυση**

#### **3.3.1 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός**

Μετά την εξαγωγή του γενωμικού DNA από τους 41 συνολικά γενοτύπους μπανάνας που εξετάστηκαν, ακολούθησε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους με σκοπό να εκτιμηθεί η συγκέντρωση του DNA στα δείγματα αλλά και η ποιότητα του (βαθμός αποικοδόμησης, ύπαρξη προσμίξεων κλπ.). Όλα τα δείγματα φωτομετρήθηκαν σε

φασματοφωτόμετρο σε απορρόφηση 260nm με σκοπό την εκτίμηση της συγκέντρωσης του DNA και στα 280nm για την εκτίμηση της παρουσίας πρωτεϊνών στα δείγματα από τον λόγο 260/280nm. Τιμή μεταξύ 1.8 – 2.0 μονάδων του παραπάνω λόγου βεβαιώνει την απουσία πρωτεϊνικών προσμίξεων στο δείγμα. Ωστόσο ο ποιοτικός αυτός έλεγχος δείγματος DNA με φωτομέτρηση δεν μπορεί να υποδείξει την κατάσταση του DNA αναφορικά με το βαθμό αποικοδόμησης του. Σε αυτή την περίπτωση ο ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων ολοκληρώνεται με ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή αγαρόζης. Όλα τα δείγματα που υποβλήθηκαν στις ανωτέρω αναλύσεις, βρέθηκαν να είναι σε ικανοποιητική κατάσταση.

### **3.3.2 Μοριακή ανάλυση με δείκτες τύπου RAPD's**

Όπως ήδη έχει αναφερθεί (Υλικά και μέθοδοι, 2.6), στα πλαίσια της μοριακής γενετικής ανάλυσης, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 24 εκκινητές με τυχαία νουκλεοτιδική ακολουθία (τύπου RAPD's), των σειρών OPC, OPD και OPF της εταιρίας OPERON (Πίν. 1, Υλικά & Μέθοδοι).

Εκ του συνόλου των 24 RAPD εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, οι 19 βρέθηκαν πολυμορφικοί, καθώς το μοριακό πρότυπο των υπολοίπων 5 εκκινητών βρέθηκε μονομορφικό για το σύνολο των γενοτύπων που εξετάστηκαν. Όπως φανέρωσε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και κατόπιν εκθέσεως της σε υπεριώδη ακτινοβολία, η μοριακή ανάλυση των 41 γενοτύπων μπανάνας που εξετάστηκαν με βάση το μοριακό πρότυπο των 19 εκκινητών που επιλέχθηκαν, αποτελείται συνολικά από 105 ζώνες που αντιστοιχούν σε ίσο αριθμό περιοχών του γενώματος που πολλαπλασιάστηκαν κατά το σύνολο των αντιδράσεων PCR.

Από το σύνολο των πολυμορφικών περιοχών που ανιχνεύθηκαν, η πλειονότητα αυτών αφορούσε το σύνολο των φυτών που προέρχονταν

από θερμοκηπιακές καλλιέργειες. Τα φυτά που προέρχονταν απευθείας από ιστοκαλλιέργεια δεν διαφοροποιούνταν ιδιαίτερα κατά το μοριακό τους πρότυπο και τούτο ίσχυε τόσο για τα φυτά του 12<sup>ου</sup> όσο και για τα φυτά του 22<sup>ου</sup> κύκλου αναπαραγωγής. Αναφορικά με τις φαινοτυπικές εκτροπές που παρατηρήθηκαν σε φυτά της πρώτης ομάδας, δεν κατέστη δυνατό να συνδυαστούν με γενοτυπικές αποκλίσεις, καθώς τα φυτά αυτά δεν διαφοροποιούνταν σημαντικά συγκριτικά με το μητρικό γενότυπο.

Το ποσοστό των πολυμορφισμών για τη δεδομένη μοριακή ανάλυση, ανήλθε στο 39% καθώς 41 από τις 105 περιοχές του γενώματος που πολλαπλασιάστηκαν βρέθηκαν πολυμορφικές. Κατά μέσο όρο κατεγράφησαν 2 πολυμορφικές ζώνες ανά εκκινητή, ενώ ο μέγιστος αριθμός πολυμορφικών ζωνών ανά εκκινητή ήταν 4 και ο ελάχιστος 1.

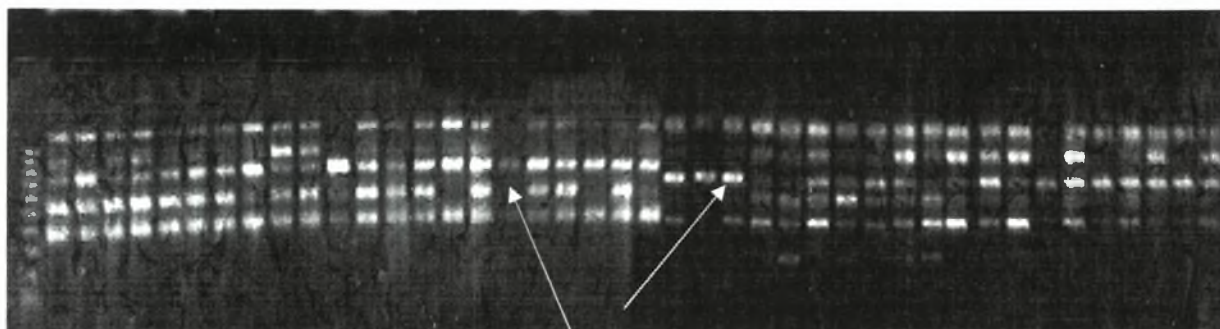
Το μοριακό πρότυπο κάθε εκκινητή καταγράφηκε και στη συνέχεια κωδικοποιήθηκε για το σύνολο των γενοτύπων. Κατά την κωδικοποίηση, η παρουσία ή η απουσία των ζωνών αντιπροσωπεύτηκε από τη μονάδα «1» ή το μηδέν «0» αντίστοιχα, για την ηλεκτρονική επεξεργασία των δεδομένων σύμφωνα με το δυαδικό σύστημα (Εικ. 16). Το σύνολο των παραπάνω κωδικοποιημένων παρατηρήσεων αποτέλεσε τη βάση για τον υπολογισμό των μητρών γενετικής συγγένειας κατά τους αλγόριθμους JACCARD και DICE, ενώ οι φυλογενετικές σχέσεις υπολογίστηκαν από τις μήτρες που προέκυψαν, σύμφωνα με τις NEIGHBORJOIN και UPGMA μεθόδους.

Πίνακας 12. Σύνοψη μοριακού προτύπου των 24 εκκινητών.

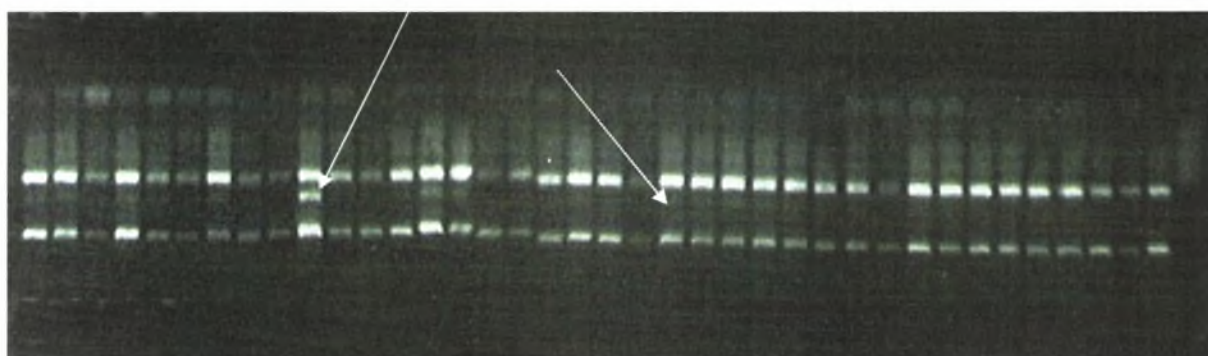
RAPD εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή	Αριθμός πολυμορφικών ζωνών	Σύνολο ζωνών που πολ/σιασε ο εκκινητής
OPC 2	5'-GTGAGGCGTC-3'	3	7
OPC 5	5'-GATGACCGCC-3'	1	6
OPC 8	5'-TGGACCGGTG-3'	2	5
OPC 9	5'-CTCACCGTCC-3'	1	6
OPC 13	5'-AAGCCTCGTC-3'	2	6
OPC 15	5'-TGCGTGCTTG-3'	4	8
OPC 16	5'-GACGGATCAG-3'	1	4
OPC 17	5'-CACACTCCAG-3'	4	5
OPD 4	5'-TTCCCCCAG-3'	4	4
OPD 5	5'-TGAGCGGACA-3'	3	5
OPD 6	5'-ACCTGAACGG-3'	2	3
OPD 8	5'-GTGTGCCCCA-3'	1	5
OPD 14	5'-CTTCCCCAAG-3'	2	2
OPD 20	5'-ACCCGGTCAC-3'	4	10
OPF 3	5'-CCTGATCACC-3'	2	10
OPF 8	5'-GGGATATCGG-3'	1	4
OPF 9	5'-CCAAGCTTCC-3'	1	6
OPF 11	5'-TTGGTACCCC-3'	1	4
OPF 18	5'-TTCCC GGTT-3'	2	5
OPC 7	5'-GTCCCGACGA-3'	Μονομορφικός	3
OPC 10	5'-TGTCTGGGTG-3'	Μονομορφικός	4
OPC 14	5'-TGCGTGCTTG-3'	Μονομορφικός	6
OPD 19	5'-CTGGGGACTT-3'	Μονομορφικός	3
OPF 17	5'-TTGGTACCCC-3'	Μονομορφικός	4



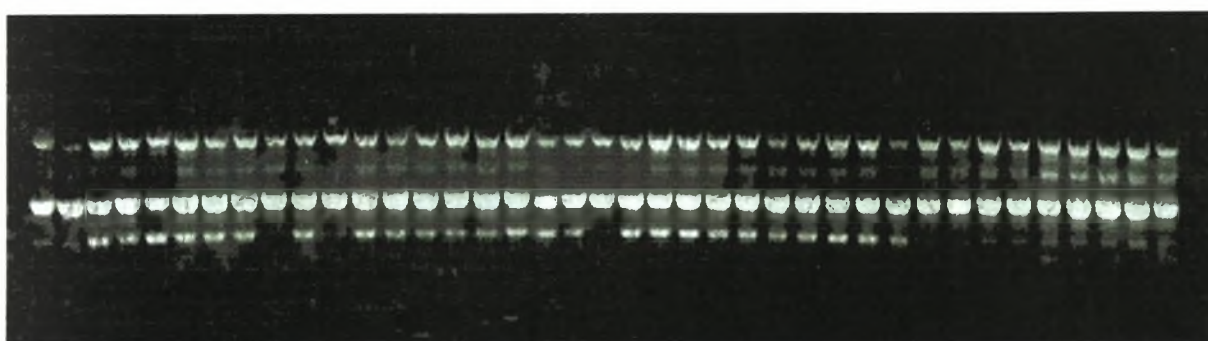
**OPC 17 με 5 ζώνες εκ των οποίων οι 4 πολυμορφικές**



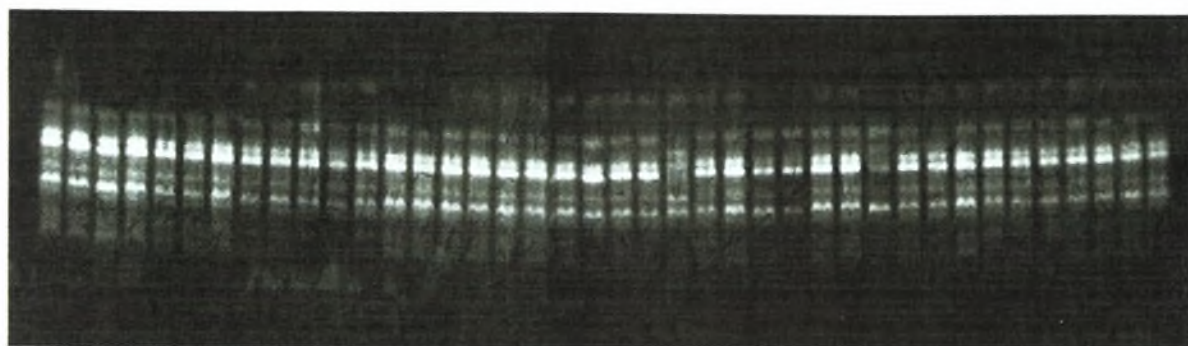
**Πολυμορφισμοί δηλώνονται ως παρουσία ή απουσία ζωνών**



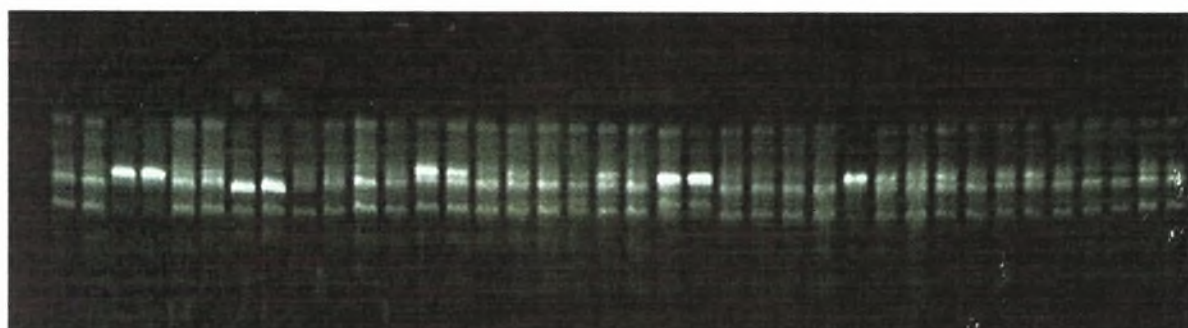
**OPF 11 με 4 ζώνες εκ των οποίων η 1 πολυμορφική**



**Εκκινητής OPC 5**



**Εκκινητής OPD 20**



**Εκκινητής OPF 18**

**Εικ.19** Απεικόνιση πολυμορφισμών

Η τελική επιλογή έγινε με βάση τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων κάθε φυλογενετικής ανάλυσης με την αρχική μήτρα. Για την εκτίμηση του παραπάνω βαθμού συσχέτισης υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης MxComp. Με βάση τις τιμές αυτού του συντελεστή που έδωσαν όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί των μεθόδων υπολογισμού των φυλογενετικών σχέσεων, επιλέχθηκε τελικά ο συνδυασμός JACCARD/UPGMA, καθότι παρουσίαζε το μεγαλύτερο βαθμό συσχέτισης ( Πίν. 13).

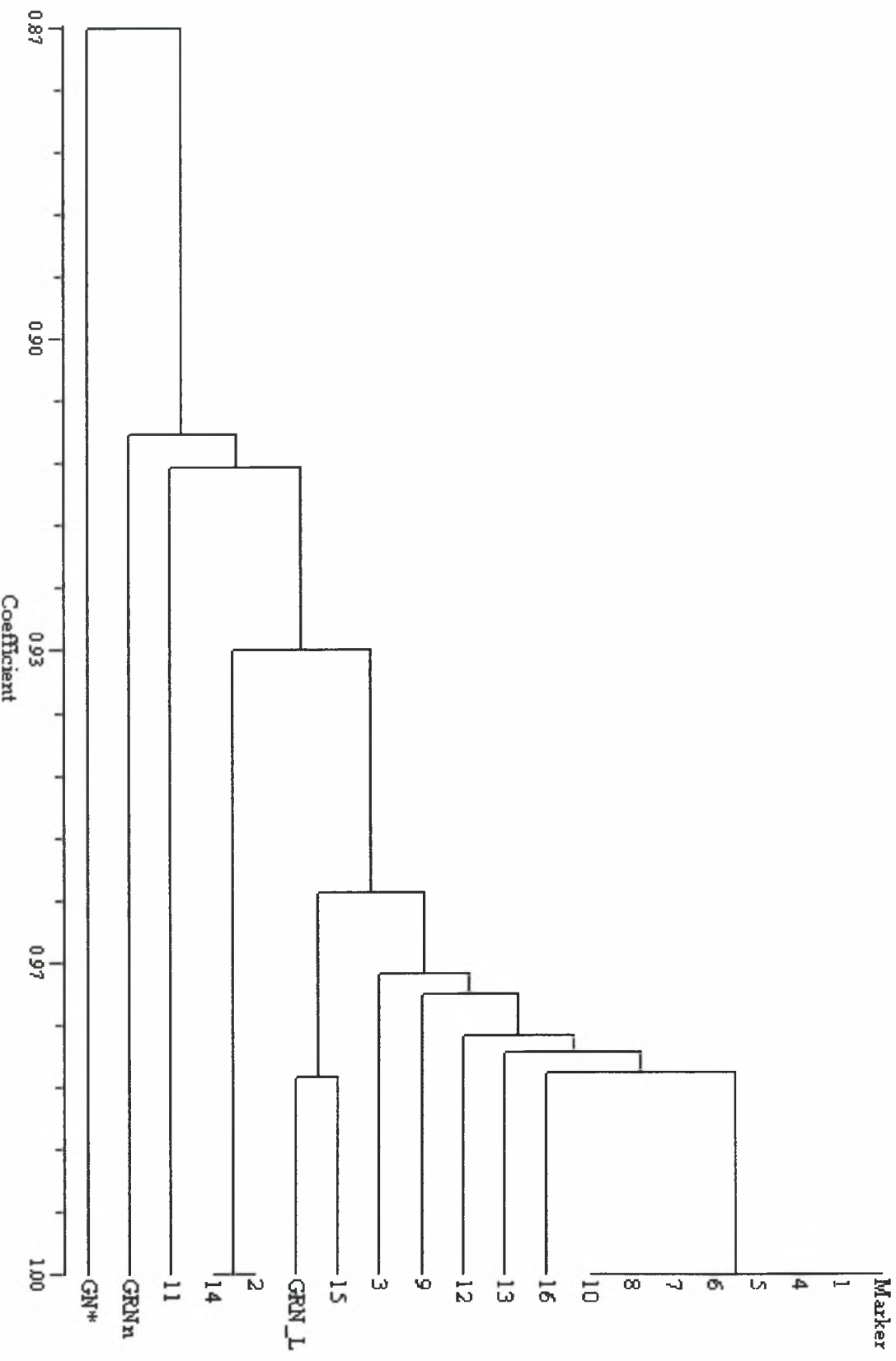
**Πίνακας 13.** Βαθμός συσχέτισης των φυλογενετικών σχέσεων με τα μοριακά δεδομένα

Μέθοδος υπολογισμού των φυλογενετικών σχέσεων	Τιμή MxComp.
DICE - NEIGHBORJOIN	0,60
JACCARD - NEIGHBORJOIN	0,65
DICE - UPGMA	0,87
JACCARD - UPGMA	0,92

Στα δένδρογράμματα που ακολουθούν αναπαριστώνται γραφικά οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των φυτών που προήλθαν από θερμοκηπιακές καλλιέργειες σε σχέση με τα μητρικά φυτά (Σχήμα 1), καθώς και των φυτών που προήλθαν κατευθείαν από *in vitro* καλλιέργεια, σε σχέση πάντα με τα μητρικά φυτά (Σχήμα 2). Οι γενετικές αποστάσεις και για τα δύο δένδρογράμματα ωστόσο δεν είναι πολύ μεγάλες, (έως 0,85), γεγονός αναμενόμενο καθότι όλα τα φυτά προήλθαν από *in vitro* πολλαπλασιασμό. Ειδικότερα όσο αφορά το δένδρογράμμα 1 (Σχήμα 1), παρατηρούμε ότι ο γενότυπος 2 βρίσκεται σε απόσταση με τους υπόλοιπους γενότυπους, και αν συμπεριλάβει κανείς και την εικόνα του φυτού που παρουσιάζει σημαντικές φαινοτυπικές εκτροπές συγκριτικά με τα υπόλοιπα φυτά (βλ. Εικ. 15), θα μπορούσε να υποθέσει την ύπαρξη σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας. Επιπλέον οι άλλοι 2 γενότυποι που παρουσίασαν εξίσου σημαντικές φαινοτυπικές αποκλίσεις, φαίνεται από το δένδρογράμμα, πως ομαδοποιούνται μαζί με κάποιους άλλους γενότυπους σε μια ομάδα με μηδενική απόσταση μεταξύ τους και με αρκετή απόσταση από τους υπόλοιπους. Ο μητρικός γενότυπος GRNη τοποθετείται σε μεγαλύτερη απόσταση από κάθε γενότυπο, γεγονός που επιβεβαιώνει την ύπαρξη σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας. Τέλος ο γενότυπος GN\*, που εξετάστηκε για συγκριτικό έλεγχο της ποικιλίας, βρίσκεται να είναι ο πιο απομακρυσμένος, γεγονός αναμενόμενο καθότι προέρχεται από τελείως διαφορετική ποικιλία (Cavendish nana).

Αναφορικά με το δένδρογράμμα 2 (Σχήμα 2), παρατηρούνται και πάλι γενετικές αποστάσεις μεταξύ τόσο των φυτών του 12<sup>ου</sup> όσο και των φυτών του 22<sup>ου</sup> κύκλου αναπολλαπλασιασμού και καθότι τα φυτά αυτά αποτελούν ουσιαστικά κλώνους του ιδίου αρχικού φυτού, η ύπαρξη αυτής της γενετικής παραλλακτικότητας δεν θα έπρεπε να υφίσταται και όλα οι γενότυποι θα έπρεπε να ομαδοποιούνται σε μία μεγάλη ομάδα. Κάτι τέτοιο ωστόσο δεν προκύπτει από το παρόν δένδρογράμμα και επομένως

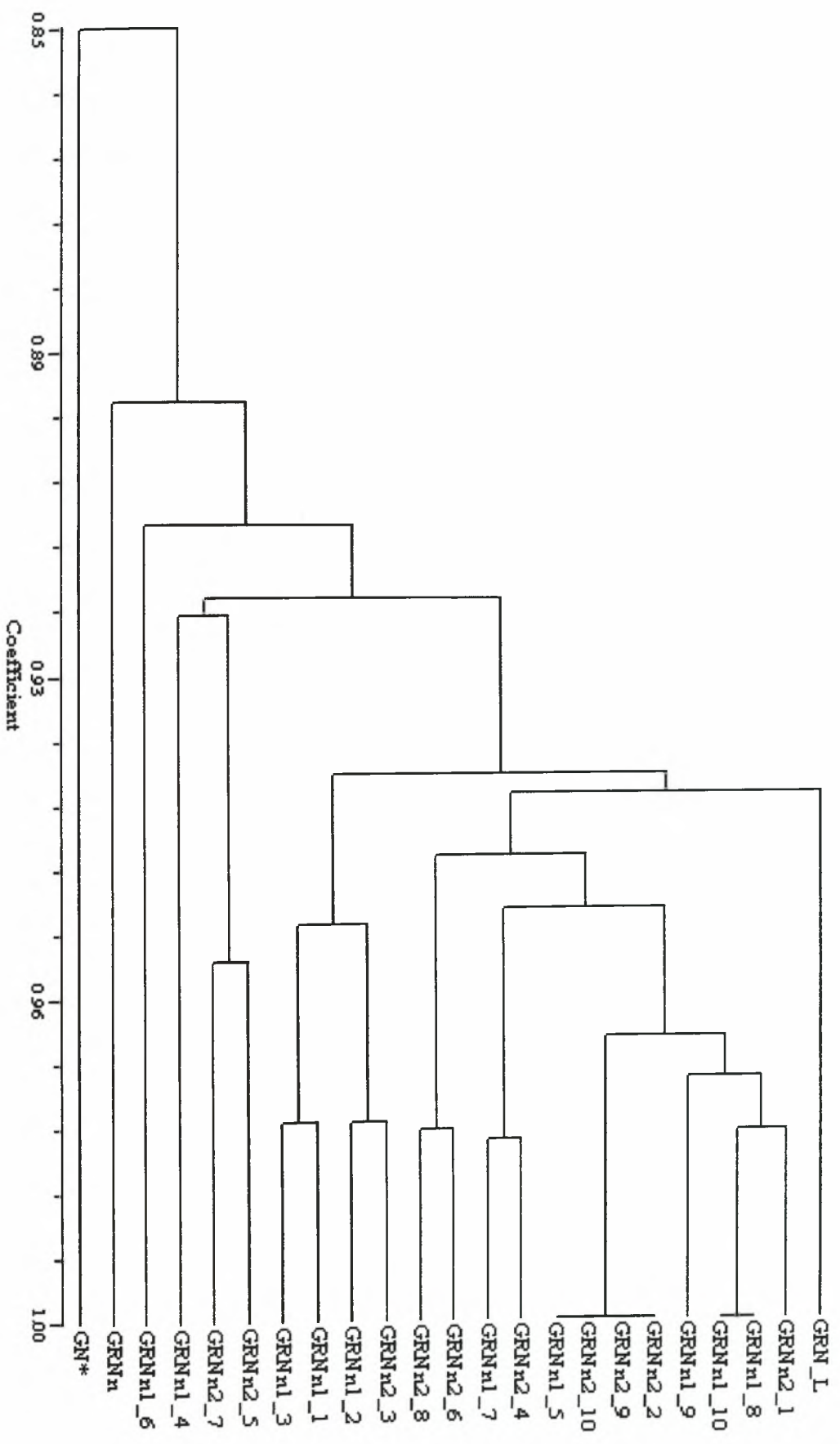
επιβεβαιώνεται η ύπαρξη σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας και σε αυτήν την περίπτωση. Η κατάταξη τόσο για το μητρικό γενότυπο GRNη, όσο και για τον γενότυπο GN\*, είναι η ίδια και στην περίπτωση αυτή ισχύουν τα όσα προαναφέρθηκαν.



Σχήμα 1. Δενδρόγραμμα Φυλογενετικής ανάλυσης των φυτών που προήλθαν από θερμοκηπιακή καλλιέργεια με βάση τον JACCARD-UPGMA



Σχήμα 2. Δενδρογράμμα Φυλογενετικής ανάλυσης των φυτών του 12<sup>ο</sup> & 22<sup>ο</sup> κύκλου αναπολλαπλασιασμού με βάση τον JACCARD-ΥΡΓΜΑ αλγόριθμο. ( $r = 0.92$ )

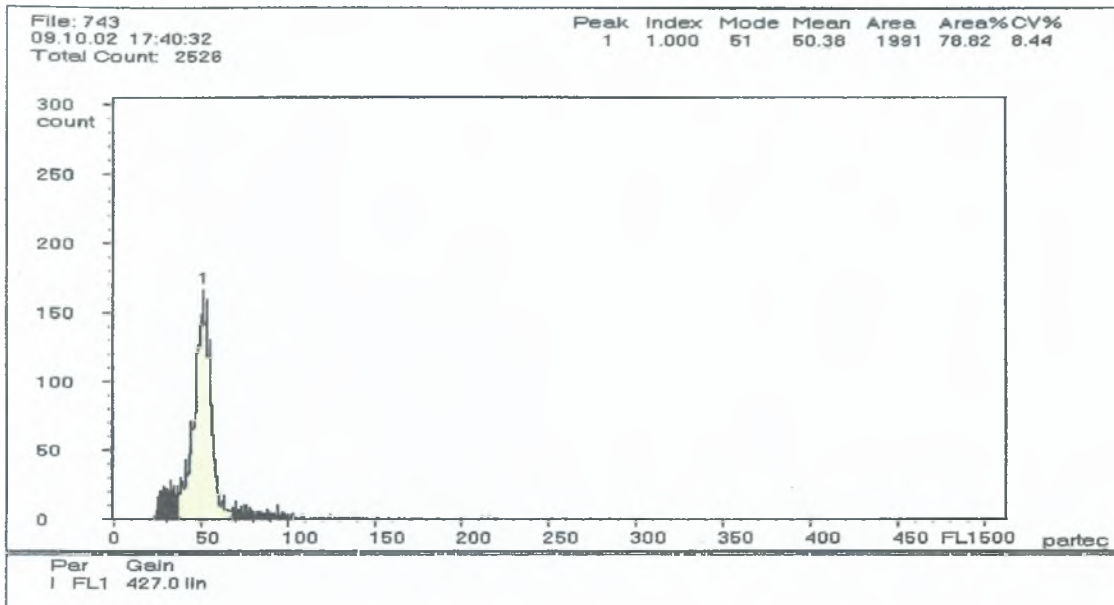




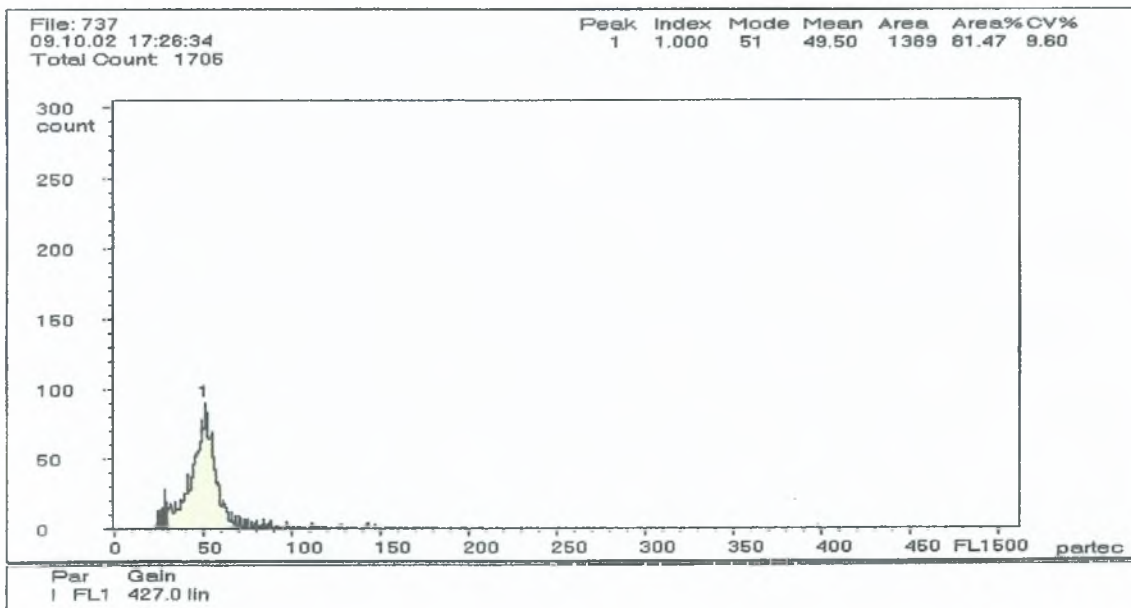
### **3.4 Κυτταρομετρία Ροής**

Από την ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής προέκυψαν τα παρακάτω γραφήματα (ενδεικτικά παρατίθενται τέσσερα από αυτά). Η ανάλυση με κυτταρομετρητή ροής έγινε μόνο για τα φυτά της ομάδας 1 (των θερμοκηπιακών καλλιεργειών), καθώς και για το μητρικό φυτό.

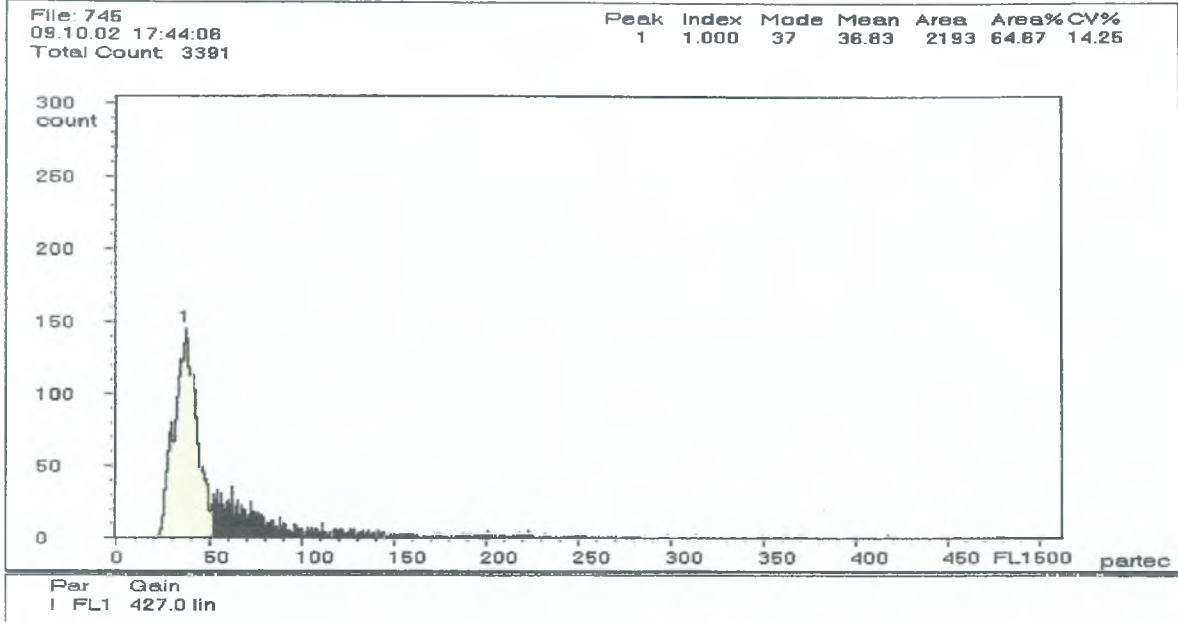
Η απορρόφηση της τριπλοειδούς μπανάνας ορίστηκε στην τιμή 50 και όπως φαίνεται από το αντίστοιχο γράφημα, ο μητρικός γενότυπος απορροφά στην τιμή αυτή. Η πλειοψηφία των γενοτύπων που εξετάστηκαν επέδειξαν απορρόφηση στην ίδια τιμή, μεταξύ των οποίων και ο γενότυπος 4, για τον οποίο τα μορφολογικά και μοριακά δεδομένα επιβεβαίωσαν την ύπαρξη σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας. Εξαίρεση αποτέλεσαν οι γενότυποι 11 και 13, των οποίων τα γραφήματα παρουσιάζονται ανωτέρω. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του γενοτύπου 13, είναι εμφανές το φαινόμενο της ανευπλοειδίας, καθώς η απορρόφηση του φυτού αυτού βρέθηκε στην τιμή 36.8, τιμή που αποκλίνει σημαντικά από την προκαθορισμένη τιμή (50). Ο γενότυπος 11 παρουσίασε 2 κορυφές στις τιμές 29.7 και 51.3 αντίστοιχα. Το μέγεθος των τιμών (η μία σχεδόν διπλάσια της άλλης), θα μπορούσε να υποδηλώνει την παρουσία φαινομένου ενδομίτωσης. Ωστόσο το ύψος των κορυφών, για να ισχύει κάτι τέτοιο, θα έπρεπε να είναι αντίστροφο. Κάτι τέτοιο δεν υφίσταται και για το λόγο αυτό θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι πρόκειται για την G1 και G2 φάση ενδομίτωσης ανευπλοειδούς κυττάρου.



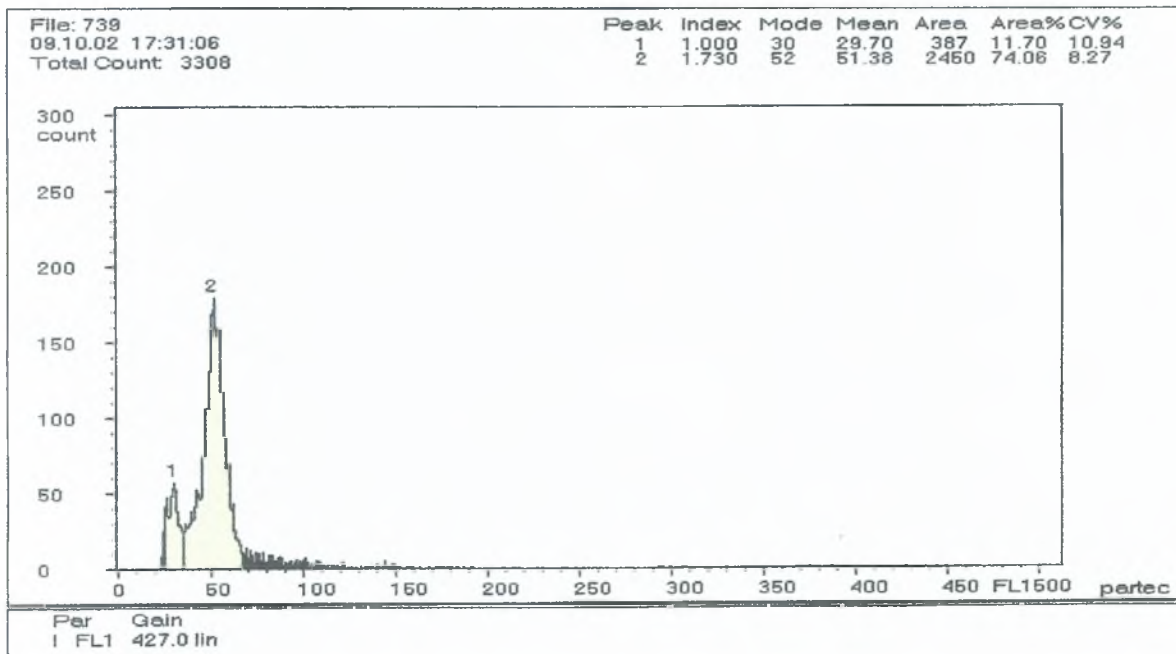
### Μητρικός γενότυπος GRNη



### Γενότυπος 4



**Γενότυπος 13**



**Γενότυπος 11**

# IV. Συμπεράσματα

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα εργασία προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- 1) Στα φυτά μπανάνας, της ποικιλίας *Grand naine*, που εξετάστηκαν επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας, η οποία και κατέστη δυνατό να ανιχνευθεί. Η ανίχνευση της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας επετεύχθη με τη μέθοδο της μοριακής ανάλυσης με δείκτες τύπου RAPD's και με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.
- 2) Από τους 24 εκκινητές τύπου RAPD's που χρησιμοποιήθηκαν, οι 19 βρέθηκαν πολυμορφικοί και το ποσοστό των πολυμορφισμών ανήλθε στο 39%. Η μοριακή ανάλυση με δείκτες RAPD's επιβεβαίωσε την ύπαρξη σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας ανάμεσα στους γενοτύπους μπανάνας που εξετάστηκαν και γενικότερα αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο για την ανίχνευση τέτοιων φαινομένων.
- 3) Η τιμή SPAD δεν κατέστη δυνατό να εντοπίσει φαινόμενα σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας. Ωστόσο θεωρείται αξιόλογη μέθοδος για την εκτίμηση της έντασης του πράσινου χρώματος των φύλλων.
- 4) Η Κυτταρομετρία ροής αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο για τον εντοπισμό αλλαγών που οφείλονται σε σωματοκλωνική παραλλακτικότητα και εκφράζονται ως φαινόμενα ανευπλοειδίας ή/και ενδομίτωσης.
- 5) Συνοψίζοντας καταλήγουμε ότι κατάλληλες μέθοδοι για την ανίχνευση φαινομένων σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας στην μπανάνα, θεωρούνται η μοριακή ανάλυση με δείκτες RAPD's και η Κυτταρομετρία ροής. Προτείνεται η εφαρμογή των μοριακών δεικτών στα μητρικά φυτά κάθε κύκλου αναπολλαπλασιασμού, για την έγκαιρη αναγνώριση γενοτύπων μπανάνας που εμφανίζουν σωματοκλωνική παραλλακτικότητα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baurens, F.C., Noyer, J.L., Lanaud, C., & Lagoda, P.J.L., 1996. *Use of competitive PCR to assay copy number of repetitive elements in banana*. Mol Ge Genet 253 : 57-64.
- Bhagwat, B., & Duncan, E.J., 1998. *Mutation breeding of Highgate (Musa acuminata, AAA) for tolerance to Fusarium oxysporum f. sp. cubense using gamma irradiation*. Euphytica 101: 143-150.
- Creste, S., Neto, A., Vencovsky, R., Silva, S., & Figueira, A., 2004. *Genetic diversity of Musa diploid and triploid accessions from the Brazilian banana breeding program estimated by microsatellite markers*. Genetic Resources and Crop Evolution 51: 723-733.
- Crouch, H.K., Crouch, J.H., Madsen, S., Vuylsteke, D.R., & Ortiz, R., 2000. *Comparative analysis of phenotypic and genotypic diversity among plantain landraces (Musa spp., ABB group)*. Theor. Appl. Genet 101: 1056-1065.
- Crouch, J.H., Crouch, H.K., Constandt, H., Van Gysel, A., Breyne, P., Van Montagu, M., Jarret, R.L., & Ortiz, R., 1999. *Comparison of PCR-based molecular marker analyses of Musa breeding populations*. Molecular Breeding 5: 233-244.
- Crouch, J.H., Crouch, H.K., Tenkouano, A., & Ortiz, R., 1999. *VNTR- based diversity analysis of 2x and 4x full-sib Musa hybrids*. Plant Biotechnology Vol.2 No.3
- Crouch, J.H., Vuylsteke, D., & Ortiz, R., 1998. *Perspectives no the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (Musa spp.)*. Plant Biotechnology Vol.1 No.1
- Escalant, J.V., Sharrock, S., & Frison, E., 2002. *The genetic improvement of Musa using conventional breeding and modern tools of molecular and cellular biology*. INIBAP, December 2002.
- Gubbuk, H., & Pekmezci, M., 2004. *In vitro propagation of some new banana types (Musa spp.)*. Turk. J. Agric. For. 28: 355-361.
- Kaemmer, D., Fischer, D., Jarret, R.L., Baurens, F.C., Grapin, A., Dambier, D., Noyer, J.L., Lanaud, C., Kahl, G., & Lagoda, P.J.L., 1997. *Molecular breeding in the genus Musa: a strong case for STMS marker technology*. Euphytica 96: 49-63.

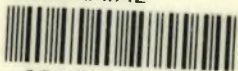


- Khayat, E., Duvdevani, A., Lahav, E., & Ballesteros, B.A., 2004. *Somaclonal variation in banana (Musa acuminata cv. Grande naine). Genetic mechanism, frequency and application as a tool for clonal selection*. FAO Corporate Document Repository.
- Κορκόβελος, Α., 2003. *Η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη ως κριτήριο επιλογής στην βελτίωση πληθυσμών καλαμποκιού (Zea mays L.). Διδακτορική διατριβή.*
- Madhulatha, P., Anbalagan, M., Jayachandran, S., & Sakthivel, N., 2004. *Influence of liquid pulse treatment with growth regulators on in vitro propagation of banana (Musa spp. AAA)*. Plant Cell 76: 189-191.
- Kazumitsu, M., Vilarinhos, A.D., & Oka, S., 2002. *Somatic hybridization by electrofusion of banana protoplasts*. Euphytica 125: 317-324.
- Μαυρομάτης, Α., 1996. *Αναγέννηση in vitro και σωματοκλωνική παραλλακτικότητα στο βαμβάκι (Gossypium spp.). Διδακτορική διατριβή.*
- Nwakanna, D.C., Pillay, M., Okoli, B.E., & Tenkouano, A., 2003. *Selectional relationships in the genus Musa L. inferred from the PCR-RFLP of organelle DNA sequences*. Theor. Appl. Genetics 107: 850-856.
- Onguso, J.M., Kahangi, E.M., Ndiritu, D.W., & Mizutani, F., 2004. *Genetic characterization of cultivated bananas and plantains in Kenya by RAPD markers*. Scientia Horticulturae 99: 9-20.
- Ortiz, R., 1997. *Morphological variation in Musa germplasm*. Genetic Resources and Crop Evolution 44: 393-404.
- Ortiz, R., & Vuylsteke, D., 1998. *Segregation of bunch orientation in plantain and banana hybrids*. Euphytica 101: 79-82.
- Pillay, M., Ogundiwin, E., Nwakanna, D.C., Ude, G., & Tenkouano, A., 2001. *Analysis of genetic diversity and relationships in East African banana germplasm*. Theor. Appl. Genetics 102: 965-970.
- Ramage, C.M., Borda, A.M., Hamill, S.D., & Smith, M.K., 2004. *A simplified PCR test for early detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas (Musa spp. AAA)*. Scientia Horticulturae 103: 145-151.
- Roux, N., Dolezel, J., Swennen, R., & Zapata-Arias, F.J., 2001. *Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimera in Musa spp.* Plant Cell 66: 189-197.

- Roux, N., Toloza, A., Radecki, Z., Zapata-Arias, F.J., & Dolezel, J., 2003. *Rapid detection of aneuploidy in Musa using flow cytometry*. Plant Cell 21: 483-490.
- Ταμπούκου, Α., 1991. *Καλλιέργεια Τροπικών στην Ελλάδα- Παραγωγή μπανάνας*. Γεωργική Τεχνολογία 6: 24-38.
- Tenkouano, A., Crouch, J.H., Crouch, H.K., & Ortiz, R., 1998. *Genetic diversity, hybrid performance and combining ability for yield in Musa germplasm*. Euphytica 102: 281-288.
- Tenkouano, A., Crouch, J.H., Crouch, H.K., Vuylsteke, D., & Ortiz, R., 1999. *Comparison of DNA marker and pedigree-based methods of genetic analysis of plantain and banana (Musa spp.) clones. I. Estimation of genetic relationships*. Theor. Appl. Genetics 98: 62-68.
- Tenkouano, A., Crouch, J.H., Crouch, H.K., Vuylsteke, D., & Ortiz, R., 1999. *Comparison of DNA marker and pedigree-based methods of genetic analysis of plantain and banana (Musa spp.) clones. II. Predicting hybrid performance*. Theor. Appl. Genetics 98: 69-75.
- Tenkouano, A., Vuylsteke, D., & Ortiz, R., 1998. *Combining ability for yield and plant phenology in plantain derived populations*. Euphytica 104: 151-158.
- Tripathi, I., 2003. *Genetic engineering for improvement of Musa production in Africa*. African Journal of Biotechnology 12: 503-508.
- Ude, G., Pillay, M., Nwakanna, D., & Tenkouano, A., 2002. *Analysis of genetic diversity and Selectional relationships in Musa using AFLP markers*. Theor. Appl. Genetics 104: 1239-1245.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000074942