

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΗΛΙΑ Χ. ΓΚΙΚΑ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΡΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Αριθμ. Πρωτοκ. 333
Ημερομηνία 22-11-10



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



**«ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΕΠΑΝΑΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΩΝ
ΜΕΤΑΞΥ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ
ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΚΑΙ ΔΙΕΙΔΙΚΩΝ
ΥΒΡΙΔΙΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΚΑΙ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ
ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΤΥΠΟΥ RAPDs»**



Επιβλέπων καθηγητής:

Α. Μαυρομάτης



Βόλος, 2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



**<< Εφαρμογή επαναδιασταυρώσεων μεταξύ εμπορικών ποικιλιών
και διειδικών υβριδίων βαμβακιού και γενετική ανάλυση με χρήση
μοριακών δεικτών τύπου RAPD>>**

ΓΚΙΚΑΣ Χ.ΗΛΙΑΣ

Βόλος 2010



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ.Εισ: 9805/1
Ημερ.Εισ: 14-01-2011
Δωρεά Συγγραφέας
Ταξιθετικός Κωδικός ΠΤ - ΦΠΑΠ
2010
ΓΚΙ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Α.ΜΑΥΡΟΜΑΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Επίκουρος Καθηγητής της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Ν.Δαναλάτος (ΜΕΛΟΣ)

Καθηγητής της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Α.ΧΑ (ΜΕΛΟΣ)

Αναπληρωτής Καθηγητής της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση της πτυχιακής διατριβής αποτελεί την αφετηρία για την μετέπειτα πορεία μου στον πολλά υποσχόμενο χώρο της έρευνας. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας και υπό την επίβλεψη εξαιρετων επιστημόνων τέθηκαν αρκετά ερευνητικά ερωτήματα, στα οποία έπειτα από επίμονη αναζήτηση δόθηκαν οι κατάλληλες απαντήσεις.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Αθανάσιο Μαυρομάτη, επιβλέποντα στην πτυχιακή μου διατριβή, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπο μου καθώς και για τις απαραίτητες υποδείξεις και διορθώσεις του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το κ. Ανδρέα Ντούλη, Ερευνητή Α στο ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε για την πολύ καλή συνεργασία και τη μετάδοση της γνώσης του πάνω στο αντικείμενο των μοριακών τεχνικών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής κ. Αβραάμ Χά, Αναπληρωτή Καθηγητή της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και κ. Νικόλαο Δαναλάτο, Καθηγητή της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθεια τους στην συγγραφή της εργασίας.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον κ. Σπύρο Σουϊπα, Υπεύθυνο του Αγροκτήματος, για την προσοχή που έδειξε στο πείραμα μου στον αγρό και την βοήθεια και τις γνώσεις που μου έδωσε για τις κατάλληλες καλλιεργητικές φροντίδες των φυτών.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα παιδιά του εργαστηρίου, και συγκεκριμένα στις υποψήφιες διδάκτορες του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Σταυρούλα Κωστούλα και κ. Μιχαέλα Σακελλαρίου καθώς και τον προπτυχιακό φοιτητή Ευάγγελο Κουκλά για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε μεταξύ μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της ψυχής μου, την οικογένεια μου για την οικονομική και ψυχολογική υποστήριξη που μου έδωσαν, καθώς και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση τους.

1	Εισαγωγή	6
	2.Ανασκόπηση βιβλιογραφίας	8
	2.1. Ιστορική αναδρομή του βαμβακιού	8
	2.2. Ταξινόμηση και καταγωγή των ειδών βαμβακιού	11
	2.3. Οικονομική σημασία του βαμβακιού	13
	2.4. Συγγενικά είδη του βαμβακιού	16
	2.4.1. Εκμεταλεύσιμα εμπορικά	17
	2.4.2. Μη εκμεταλεύσιμα εμπορικά	20
3	Η βελτίωση του βαμβακιού	24
	3.1. Στόχοι στη βελτίωση του βαμβακιού	25
	3.2. Μέθοδοι και τεχνικές βελτίωσης	26
	3.2.1. Μαζική επιλογή	27
	3.2.2. Επιλογή καθαρής σειράς για βελτίωση εντός των ποικιλιών	27
	3.2.3. Γενεαλογική επιλογή	29
	3.2.4. Αναδιασταύρωση	29
	3.2.5. Επαναλαμβανόμενη επιλογή ή επανερχόμενη	30
	3.3. Υβρίδια βαμβακιού	31
	3.3.1. Ενδοειδικά υβρίδια <i>G.hirsutum</i>	32
	3.3.2. Διεϊδικά υβρίδια (<i>G.hirsutum</i> x <i>G. barbadense</i>)	33
	3.3.3. Μερικώς διεϊδικά υβρίδια βαμβακιού	34
	3.4. Μοριακή βελτίωση	37
	3.4.1. Τύποι μοριακών δεικτών	40
	3.4.1.1. Προσεγγίσεις μη βασιζόμενες στην PCR	41
	3.4.1.2. Τεχνικές βασιζόμενες στην PCR	42
	3.5. Γενετικά τροποποιημένο βαμβάκι	44
	3.6. Σκοπός εργασίας	49
4	Υλικά και μέθοδοι	50
	4.1. Γενετικό υλικό	50
	4.2. Εγκατάσταση πειράματος	52
	4.3. Εκτίμηση ποσοστού φυτρώματος	54
	4.4. Εφαρμογή διασταυρώσεων	55
	4.5. Μετρήσεις και παρατηρήσεις	59
	4.6. Αξιολόγηση γενοτύπων με την βοήθεια μοριακών δεικτών	62
	4.6.1. Δείγμα φύλλων	63

4.6.2. Απομόνωση DNA	64
4.6.3. Πέψη RNA από εκχυλισμένο DNA	63
4.6.4. Ποσοτικός προσδιορισμός DNA	64
4.6.5. Ποσοτικός προσδιορισμός εκκινητών με χρήση του Nanodrop	65
4.6.6. Ανάλυση κατά RAPD	66
4.6.7. Παρασκευή της Metaphor Agarose	67
5 Αποτελέσματα μοριακών αναλύσεων.....	68
6 Συμπεράσματα	84
7 Περίληψη	86
8 Βιβλιογραφία.....	88

1. Εισαγωγή

Αναμφίβολα το βαμβάκι (*Gossypium spp.*), κατέχει περίοπτη θέση στην λίστα ενδιαφέροντος της παγκόσμιας ερευνητικής κοινότητας και αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα καλλιεργούμενα φυτά. Το 95% του βαμβακιού που καλλιεργείται σήμερα ανήκει στο είδος *G.hirsutum* το οποίο χαρακτηρίζεται για την υψηλή παραγωγικότητα και για την πρωιμότητα του. Στο υπόλοιπο 5% συμμετέχει σχεδόν εξολοκλήρου το είδος *G.barbadense* που χαρακτηρίζεται από την υψηλή ποιότητα της ίνας, την οσιμότητα του και την αντοχή σε ασθένειες και έντομα. Εύκολα διαπιστώνει κανείς το πόσο ωφέλιμο θα ήταν για τον παραγωγό και όχι μόνο, η δημιουργία μιας ποικιλίας, η οποία θα συγκέντρωνε τα χαρακτηριστικά των δύο ειδών βαμβακιού.

Οι προσπάθειες προς την συγκεκριμένη κατεύθυνση ξεκίνησαν από νωρίς. Προκειμένου να επιτευχθεί κάτι τέτοιο, τα δύο είδη διασταυρώθηκαν μεταξύ τους, παράγοντας εύρωστα και γόνιμα F_1 υβρίδια που συνδυάζουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Οι γενεές όμως που ακολούθησαν έδιναν καχεκτικά και εκφυλισμένα φυτά, γεγονός που συνδυάζεται και από τη διατήρηση της ατομικότητας του ενός ή του άλλου είδους, κατόπιν επιλογής στις διασπώμενες γενεές. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την αποτυχία της κλασικής μεθοδολογίας να απομονώσει, στις διασπώμενες γενεές, φυτά που φέρουν σύγχρονος τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των *G.hirsutum* και *G.barbadense* (Kohel et al. 1977).

Η αδυναμία αυτή αποτέλεσε την αφετηρία για την αναζήτηση της κατάλληλης μεθοδολογίας. Δεν άργησε να εμφανιστή η έννοια των μερικών διειδικών υβριδίων βαμβακιού. Ως μερικός διειδικά υβρίδια μπορούμε να ορίσουμε τα ομοζύγωτα φυτά που φέρουν στον πυρήνα μερικά από τα μη ομόλογα χρωμοσώματα ή χρωμοσωμικά τμήματα από το *G.hirsutum* και ορισμένα από το *G.barbadense* (Mavromatis and Roupakias, 1994). Το συγκεκριμένο φυτικό μοντέλο θα μπορούσε να επιτευχθεί εφόσον μπορούσαμε να αναγεννήσουμε φυτά από ανώριμους κόκκους γύρης ή μη γονιμοποιημένα ωάρια προερχόμενα από F_1 διειδικά υβρίδια βαμβακιού (Mavromatis and Roupakias, 1994; Roupakias et al. 1998). Η παραγωγή απλοειδών φυτών από τέτοιους γαμέτες και ο διπλασιασμός του αριθμού των χρωμοσωμάτων θα οδηγούσε στην παραγωγή καθαρών σειρών μερικών διειδικών υβριδίων.

Η δημιουργία των μερικών διειδικών υβριδίων θα μπορούσε να θεωρητικά να επιτευχθεί μέσω:

- Μονοσωμικών σειρών αντικατάστασης (Endrizzi & Ramsay 1979)

- Ημιγαμετικών απλοειδών φυτών (Turcotte & Feaster 1967,1969)
- Παραγωγής DH (διαπλοειδών φυτών) με καλλιέργεια ανθήρων, μικροσπορίων ή ωαρίων και εφαρμογή κολχικίνης (Trolinder & Gooding 1987, Umbeck et al. 1987, Μαυρομάτης 1996)

Στην πράξη οι παραπάνω μέθοδοι δεν ήταν αποτελεσματικοί λόγω του μικρού αριθμού φυτών που έδιναν.

Πιο πρόσφατη προσπάθεια προς την συγκεκριμένη κατεύθυνση έκαναν οι Manromatis et al. (2005) όπου μελέτησαν την επίδραση της γονιμοποίησης λουλουδιών υβριδίων βαμβακιού με ξένη γύρη. Αρχικά επικονίασαν τα F₁ διειδικά υβρίδια βαμβακιού με γύρη προερχόμενη από το *Hibiscus cannabinus* με σκοπό να προκαλέσουν in vitro παρθενογένεση. Τα φυτά που παρήχθησαν εμφάνιζαν μορφολογικά γνωρίσματα και από τα δύο είδη βαμβακιού και ήταν μερικώς γόνιμα, χωρίς να διαθέτουν κανένα γνώρισμα του *Hibiscus cannabinus*.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εφαρμογή διασταυρώσεων μεταξύ εμπορικών ποικιλιών και μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού και η γενετική ανάλυση με χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPD. Συγκεκριμένα εκτιμήθηκε η συνδυαστική ικανότητα των εμπορικών ποικιλιών με τα μερικώς διειδικά υβρίδια βαμβακιού. Επίσης, εκτιμήθηκε η γενετική συγγένεια μεταξύ των γονέων και των απογόνων που προήλθαν από τις διασταυρώσεις. Τέλος, μελετήθηκαν διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εξεταζόμενων γενοτύπων με στόχο την αναγνώριση των φαινοτύπων που διέθεταν χαρακτηριστικά του *G. hirsutum*, *G. barbadense* ή συνδυασμό των δυο αυτών ειδών.

2. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

2.1. Ιστορική αναδρομή του βαμβακιού

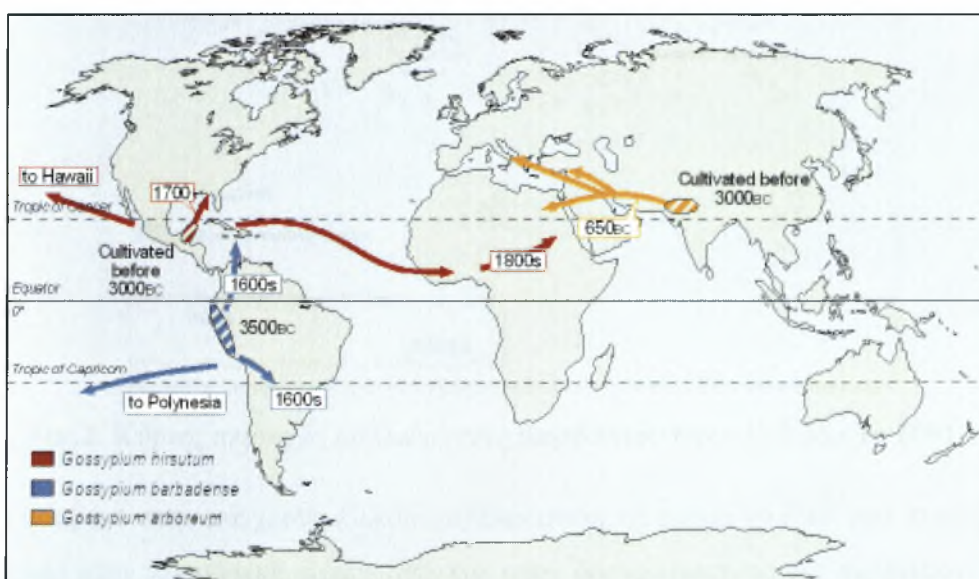
Εύλογα γεννιέται η απορία για την πραγματική προέλευση και την εξέλιξη που είχε στο πέρασμα των αιώνων η καλλιέργεια βαμβακιού. Ακολούθησαν έρευνες και μετά από πολλές ενδείξεις, παλιές και νέες, επικράτησε η άποψη ότι η καλλιέργεια βαμβακιού ξεκίνησε από την Άπω Ανατολή, γύρω στο 7000 π.Χ. (Harlan, 1975). Παράλληλα υπάρχουν στοιχεία που μαρτυρούν την ύπαρξη βαμβακιού στην Νουβία (Chowdhury and Burth, 1971) και σε μια πόλη της Νότιας Ινδίας (Mohenjo-Daro) γύρω στο 2700 π.Χ. (Gulati and Turner, 1928). Η συγκεκριμένη πόλη θεωρείται το κέντρο του αρχαίου Ινδικού πολιτισμού όπου καλλιεργούσαν διπλοειδή είδη, μάλλον *G. arboreum*. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν αποδείξεις για την έκταση και τον τρόπο παραγωγής βαμβακιού αλλά από το γεωγραφικό πλάτος, περίπου 27⁰ N, μπορούμε να υποθέσουμε ότι καλλιεργούνταν σε ετήσια βάση και η ποιότητα της παραγόμενης ίνας θεωρούνταν εξαιρετική.

Συγκεκριμένα το *Gossypium herbaceum* αναπτύχθηκε ως άγριο φυτό στην Νότια Αφρική και πιθανότατα να το συναντούσαμε και στην έρημο Σαχάρα της Βόρειας Αφρικής (Hutchinson et al., 1947). Σύμφωνα με τον Fryxell (1979) αποτελεί την άγρια μορφή από την οποία προέκυψαν και εξελίχθηκαν τα νεότερα είδη βαμβακιού.

Η Νότια Αφρική απέχει αρκετά από την Άπω Ανατολή και αποτελεί ακατάλληλο μέρος για την εξημέρωση του *Gossypium herbaceum*. Παρόλα αυτά υπάρχουν μαρτυρίες ότι το βαμβάκι κατάφερε να εξαπλωθεί στην Άπω Ανατολή, τα αρχαία χρόνια όπου τα φυτά εξημερώνονταν διαδοχικά. Βέβαια οι συναλλαγές μεταξύ Αραβίας και Νότιας Αφρικής πραγματοποιούνταν συχνά αλλά δεν γνωρίζουμε με ποιόν τρόπο (Hutchinson et al., 1947). Εναλλακτικά, εικάζεται ότι η εξημέρωση του *Gossypium herbaceum* πραγματοποιήθηκε στην Βόρεια Αφρική ή μεταφέρθηκε, άγνωστο πώς, στην Αραβία και το Πακιστάν.

Ο Hutchinson et al. (1947) υπέθετε ότι τα είδη εξελίχθηκαν από το *Gossypium herbaceum*. Τα υβρίδια μεταξύ των *Gossypium arboreum* και *Gossypium herbaceum* διαθέτουν προφανώς φυσιολογικά ζευγάρια χρωμοσωμάτων εκτός από τις περιπτώσεις της μεταλλαξογέννησης (Gerstel, 1953). Επίσης υπάρχουν ενδείξεις αναπτυσσόμενης ασυμβατότητας (genetic breakdown) στις επόμενες γενεές

Παράλληλα το *Gossypium barbadense* αναπτύχθηκε ως αυτοφυές φυτό στις ακτές του Περού και του Εκουαδόρ, πιθανόν και στα νησιά Γκαλαπάγκος. Εμπορικές και μη ποικιλίες καλλιεργούνται στην Βόρεια και Νότια Αμερική, την Δυτική Ινδία και την Κεντρική Αμερική. Το *Gossypium hirsutum* ως αυτοφυές είδος εντοπίστηκε στις ξηρές περιοχές της Κεντρικής Αμερικής, της Βόρειας και της Νότιας Αμερικής, την Δυτική Ινδία, το Βόρειο άκρο της Φλόριντα, την Πολυνησία, την Βόρεια Αφρική και την Νότια Ασία. Οι αυτοφυείς πληθυσμοί είναι σπάνιοι και βρίσκονται διασκορπισμένοι σε διάφορες περιοχές. Αρχαιολογικά ευρήματα για το *Gossypium hirsutum* έχουν βρεθεί κυρίως στο Μεξικό (Εικ.1).



Εικ.1. Ιστορική αναδρομή των ειδών *G.hirsutum*, *G. barbadense*, *G. arboretum*.

Στον Ελλαδικό χώρο έκανε την εμφάνιση του το 2^ο μ.Χ. αιώνα σύμφωνα με την αναφορά του Πausανία στο βιβλίο του “Ελλάδος Περιήγησις” (174 μ.Χ). Αρχικά το βαμβάκι αναφέρεται με το όνομα “βύσσος” γι’ αυτό και τα υφάσματα που κατασκεύαζαν τα ονόμαζαν Βυσσινά και επισημαίνεται ότι καλλιεργούνταν μόνο στην Ηλεία. Σκοπός της καλλιέργειας του “βύσσου” ήταν η παραγωγή μαντηλιών για το κεφάλι και φορεμάτων. Επίσης δεν πρέπει να παραλείψουμε το γεγονός ότι τόσο το βαμβάκι όσο και η καλλιέργεια του αναφέρεται πολλές φορές στη νομοθεσία του Ιουστινιανού (552μ.Χ), με την ονομασία “βάμβαξ”. Από την Ελλάδα το φυτό κατάφερε να επεκταθεί στην Νότια Ιταλία. Η εισαγωγή του είδους *G.hirsutum* στην Ελλάδα έγινε από την Αμερική κατά την διάρκεια του εμφυλίου πολέμου (1946-

1949) γεγονός που συνέβαλε στην εξαφάνιση των ειδών *G. herbaceum L* και *G. arboreum L* χάνοντας έτσι το πολύτιμο γενετικό τους.



Εικ.2. Κύριες περιοχές καλλιέργειας βαμβακιού στην Ελλάδα το 2001

Το βαμβάκι στην σύγχρονη Ελλάδα εξακολουθεί να παίζει το δικό του κυρίαρχο ρόλο τόσο στον πρωτογενή τομέα όσο και στον δευτερογενή τομέα συμβάλλοντας σημαντικά στην εθνική οικονομία (Εικ.2). Συγκεκριμένα στην Ελλάδα καλλιεργούνταν περίπου 4.300.000 στρέμματα το 2000 και η ετήσια παραγωγή έφτανε τους 435.000 τόνους. Το 2009 καλλιεργήθηκαν 2.350.000 στρέμματα έναντι ~2.500.000 το 2008 με τάση να καλλιεργηθούν 3.000.000 το 2010. Οι διακυμάνσεις είναι αποτέλεσμα των πολιτικών επιδοτήσεων και των πλαφόν που έχουν αυτές. Το μεγαλύτερο μέρος του Ελληνικού βαμβακιού καταναλώνεται εγχώρια ενώ το υπόλοιπο εξάγεται κυρίως σε μορφή νημάτων. Από το σπόρο του βαμβακιού βγαίνει λάδι που χρησιμοποιείται κυρίως στην βιομηχανία. Επίσης από τα υπολείμματα του βαμβακιού παρασκευάζεται η βαμβακόπιτα που χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή.

2.2. Ταξινόμηση και καταγωγή των ειδών βαμβακιού

Η ταξινόμηση των καλλιεργούμενων ειδών έχει μεγάλη και πολύπλοκη ιστορία καθώς οι προσπάθειες ταξινόμησης του γένους *Gossypium* ανατρέπονται συνεχώς λόγω του εύρους των μορφολογικών χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν. Το 1928 πραγματοποιήθηκε εκτενής μελέτη του γένους *Gossypium* που εμφάνιζαν καλής ποιότητας λινάρι. Ο Todaro αναγνώρισε 39 είδη ενώ ο Watt 29 (Fryxell, 1979). Το σύνολο των πληροφοριών που καταγράφηκαν από τον Fryxell (1979) διαφώτισε περισσότερο και εξυπηρέτησε τους νεότερους ταξινομητές να κατανοήσουν το μέγεθος της μορφολογικής απόκλισης που παρουσιάζουν τα είδη βαμβακιού με το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό (καλύτερης ποιότητας λινάρι). Συνολικά αναγνωρίστηκαν τα είδη : *G.arboreum* (23), *G.herbaceum* (6), *G.barbadense* (15), *G.hirsutum* (27). Λαμβάνοντας υπόψη στην συγκεκριμένη προσπάθεια κατανοούμε την σπουδαιότητα αλλά ταυτόχρονα και την δυσκολία στο να αποδώσουμε έγκαιρα και έγκυρα την καταγωγή και την προέλευση του βαμβακιού. Σε αυτό το πολύπλοκο και μπερδεμένο κεφάλαιο της ταξινόμησης εντάσσονται τα 4 παραπάνω είδη που έχουν εντοπιστεί σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές.

Ο πρώτος ταξινομητής που προσπάθησε να διαλευκάνει την κατάσταση, ήταν ο βοτανολόγος Gavril Semenovitch Zaitzev (Fryxell, 1979). Το 1928 δημοσίευσε το βιβλίο " A contribution to the classification of the genus *Gossypium* L." το οποίο αποτέλεσε την βάση της σύγχρονης κατανόησης του βαμβακιού (Zaitzev, 1928;όπως αναφέρετε από τον Fryxell, 1979). Ο Zaitzev ανακάλυψε ότι αρχικά το βαμβάκι ήταν διπλοειδές, $2n=2x=26$, και με το πέρασμα των χρόνων εξελίχθηκε σε τετραπλοειδές, $2n=2x=52$, αφού μεσολάβησαν τυχαίες διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών(Fryxell, 1979). Συνολικά έχουν καταμετρηθεί 44 διπλοειδή είδη με γενώματα A, B, C, D, E, F, G και 6 αλλοτετραπλοειδή στα οποία συναντάμε 2 διαφορετικά γενώματα A,D. Υπάρχουν 3 κύριες ομάδες των διπλοειδών ειδών , που αντιστοιχούν σε 3 Ηπείρους: την Αυστραλία (C, G, K γενώματα), την Αμερική (D γένωμα) και την Αφρική (A, B, E και F γενώματα) (Πίνακας 1)(Endrizzi et al.,1985).

Το *G. hirsutum* αρχικά ήταν ένας πολυετής θάμνος με προέλευση την Γουατεμάλα και το Μέξικο και μέσω της επιλογής μετατράπηκε σε ετήσιο φυτό το οποίο εγκλιματίστηκε σε εύκρατες περιοχές με γεωγραφικό πλάτος $20-42^{\circ}$ BN (Γαλανοπούλου- Σενδούκα, 2002). Τα κύρια χαρακτηριστικά του *G.hirsutum* είναι η υψηλή απόδοση, η αρκετά καλή ποιότητα ίνας και το μήκος που κυμαίνεται από 25

ως 32 mm . Αντίθετα τα Αιγυπτιακού τύπου (*G. barbadense*) βαμβάκια είναι μακρόνια 28-38mm με πολύ καλή ποιότητας ίνας αλλά χαμηλότερη απόδοση και σημαντική οσιμότητα στην παραγωγή τους.

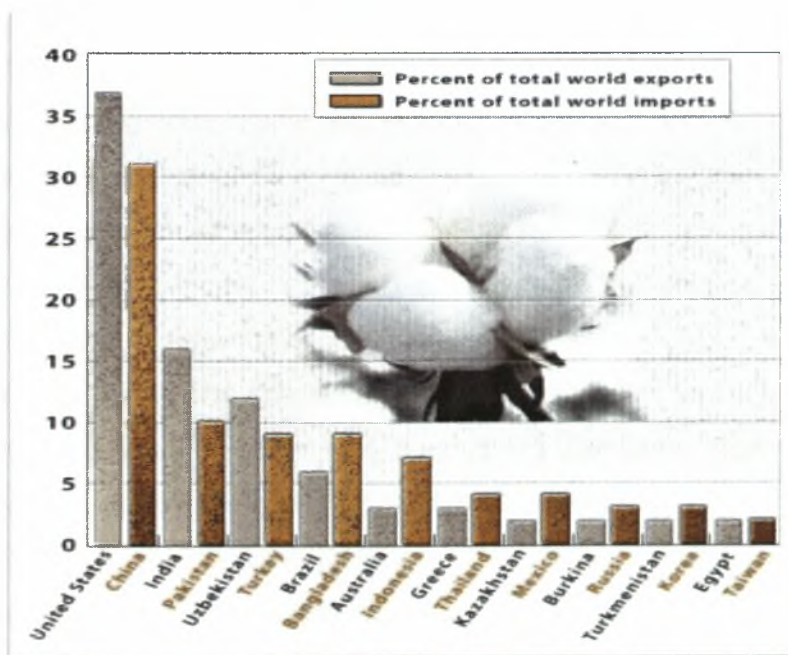
Πίνακας 1 : Γεωγραφική κατανομή των γενωμικών ομάδων βαμβακιού (Wendel and Cronn, 2003)

ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΙΔΩΝ	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ
A	2	ΑΦΡΙΚΗ, ΑΣΙΑ
B	3	ΑΦΡΙΚΗ, ΝΗΣΙΑ CAPE VERDE
C	2	ΑΥΣΤΡΑΛΙΑ
D	13	ΜΕΞΙΚΟ, ΠΕΡΟΥ, ΝΗΣΙΑ ΓΚΑΛΑΠΑΚΟΣ, ΑΡΙΖΟΝΑ
E	7+	ΑΡΑΒΙΚΗ ΧΕΡΟΣΝΗΣΟΣ, ΒΟΡΕΙΑ ΑΦΡΙΚΗ, ΝΟΤΙΑ ΑΣΙΑ
F	1	ΑΝΑΤΟΛΙΚΗ ΑΦΡΙΚΗ
G	3	ΑΥΣΤΑΛΙΑ
K	12	ΝΟΤΙΟ ΔΥΤΙΚΗ ΑΥΣΤΡΑΛΙΑ
AD	5	ΤΡΟΠΙΚΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΚΟΣΜΟΥ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΑΒΑΗΣ

Πηγή: Wendel and Cronn (2003)

2.3. Οικονομική σημασία του Βαμβακιού

Το βαμβάκι κατέχει σπουδαίο ρόλο στην παγκόσμια οικονομία και κατάφερε να είναι ένα από τα πιο ενδιαφέροντα οικονομικώς καλλιεργούμενα φυτά. Οι απαιτήσεις για βαμβάκι παρουσιάζουν σταθερή αύξηση παρόλο τον υφιστάμενο ανταγωνισμό με τα συνθετικά προϊόντα. Το 2000, ετήσια αρχεία σχετικά με την κατανάλωση και την παραγωγή βαμβακιού αναφέρουν αύξηση της παραγωγής συνολικού ύψους 2.6 εκατομμυρίων τόνων βαμβακιού, τα οποία προωθήθηκαν στην υφαντουργική βιομηχανία (Valderrama, 2004). Παρόλα αυτά, η αποδοτικότητα της συγκεκριμένης καλλιέργειας επηρεάστηκε άμεσα από τις διακυμάνσεις των τιμών, την ποιότητα της ίνας και την αύξηση του κόστους παραγωγής, οφειλόμενο στα λιπάσματα, στην απαιτούμενη ενέργεια και στο εργατικό δυναμικό. Παράλληλα, η διεθνής τάση του 1922 για αύξηση των καλλιεργούμενων εκτάσεων πλέον εγκαταλείπεται και τα τελευταία 50 χρόνια στοχεύουμε στην αύξηση της παραγωγής και την μείωση των καλλιεργούμενων εκτάσεων (Culp and Green, 1992; Meredith, 2000) (Εικ.3).



Εικ.3. Χώρες με τις μεγαλύτερες εισαγωγές και εξαγωγές βαμβακιού

Υπολογίζεται ότι το φυτό καλύπτει περίπου το 2.5 % της καλλιεργήσιμης Γής παγκοσμίως, καθιστώντας το ένα από τα πιο σημαντικά φυτά μετά τα σιτηρά και την σόγια (Pan et al. 2008)(Πίνακας 2). Αυτό οφείλεται στις διάφορες εφαρμογές που μπορεί να έχει η παραγόμενη φυτική ίνα καθώς και ο σπόρος που μπορεί να

αποτελέσει πλούσια πηγή λαδιού και πρωτεΐνης τόσο για την διατροφή του ανθρώπου όσο και την κτηνοτροφία.

Στις μέρες μας, αναδεικνύονται ολοένα και περισσότερες εφαρμογές του βαμβακόσπορου, που συλλέγεται από την εκκόκκιση του συγκομισμένου βαμβακιού (Altschul et al. 1958) . Το λάδι που συλλέγουμε από την επεξεργασία του βαμβακόσπορου αποτελεί χρήσιμο συστατικό για μια σειρά τροφίμων καθιστώντας την αξία του προϊόντος σε υψηλά επίπεδα. Ο σπόρος από το βαμβάκι (*Gossypium spp.*) σε γενικές γραμμές, έχει περιεκτικότητα σε λάδι γύρο στο 20% και σε πρωτεΐνες περίπου στο 23%. Το σχεδιάγραμμα λιπαρών οξέων του βαμβακόσπορου περιλαμβάνει γύρο στο 55% πολύ ακόρεστα λιπαρά οξέα, 18% μονό ακόρεστα λιπαρά οξέα και 27% κορεσμένα λιπαρά οξέα (Lukonge et al. 2007; National Cottonseed Products Association 2007). Παρόλα αυτά η χρήση του βαμβακέλαιου περιορίστηκε λόγω της παρουσίας της γκοσσυπόλης (gossypol) το οποίο θεωρείται τοξικό μίγμα. Αν και υπάρχουν μηρυκαστικά ζώα που μπορούν να αφομοιώσουν την γκοσσυπόλη σε περιορισμένες βέβαια ποσότητες, προτιμάτε η απομάκρυνση της κατά την διαδικασία παραγωγής του βαμβακέλαιου. Επίσης το βαμβακέλαιο παρουσιάζει καλή σταθερότητα παρόμοια με το μαγειρικό λάδι και είναι ανθεκτικό στις υψηλές θερμοκρασίες χωρίς να παρατηρείτε κάποια αλλοίωση. Λόγω της σταθερότητας αυτής η μερική υδρογόνωση του βαμβακέλαιου δεν είναι απαραίτητη η οποία επιτρέπει την δημιουργία προϊόντων απουσία των μη φυσικών λιπών. Επιπλέον, ο βαμβακόσπορος είναι πολύ δημοφιλής ως πρώτη ύλη για τα μηρυκαστικά ζώα όπως είναι τα βοοειδή.

Παρόλα αυτά η αξία των ινών είναι πολύ μεγαλύτερη από την αξία του σπόρου και για τον λόγο αυτό, η βελτιωτική προσπάθεια εστιάζεται στην αύξηση της απόδοσης της ίνας και της ποιότητας αυτής (Κατέβα, 2006).

Η παγκόσμια παραγωγή βαμβακιού εστιάζεται κυρίως σε τέσσερις περιοχές. Η περιοχή που εμφανίζει μεγαλύτερη παραγωγικότητα βρίσκεται στην Ασία και περιλαμβάνει την Κίνα, την Ινδία, το Πακιστάν, την κεντρική Ασία και μερικές περιοχές της δυτικής Ασίας. Το βαμβάκι που παράγεται στις συγκεκριμένες περιοχές αποτελεί το 50% της παγκόσμιας παραγωγής. Η Κίνα έχει τη μεγαλύτερη παραγωγή στον κόσμο. Ακολουθούν η Ινδία, οι Η.Π.Α. , η Ρωσία , το Πακιστάν και η Βραζιλία. Σύμφωνα με τις προβλέψεις της Διεθνούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Βαμβακιού (ICAC) η παγκόσμια παραγωγή του προϊόντος αναμένεται να αυξηθεί κατά 10% σε σύγκριση με την εμπορική περίοδο 2009-2010 και η διεθνής κατανάλωση περίπου 2%.

Πίνακας 2 : Καλλιεργήσιμες εκτάσεις και συνολική παραγωγή βάμβακος σε 11 χώρες του κόσμου(2007-2008).

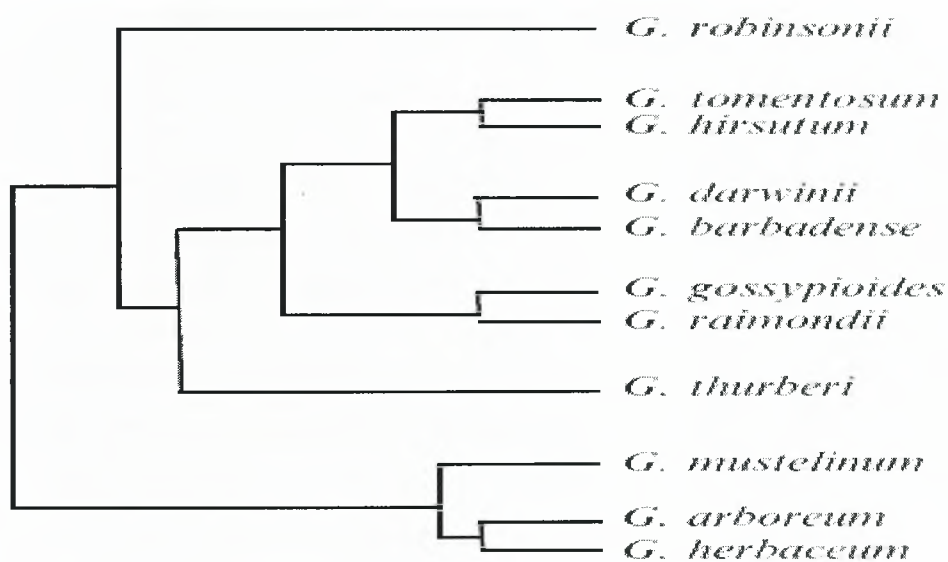
A/A	Χώρα	Έκταση (000 ha)	Παραγωγή σε kg/ha
1	China	6,835	1,265
2	USA	4,245	8,078
3	India	9,555	985
4	Pakistan	3,082	560
5	Uzbekistan	1,45	599
6	Turkey	520	831
7	Australia	63	1,298
8	Brazil	1,077	2
9	Egypt	246	1,487
10	Greece	300	909
11	Argentina	311	950
12	Others	6,129	489
	World average	33,363	787

Πηγή : Cotton: World Statistics, November 2008

Για την Ελλάδα το βαμβάκι αποτελεί το κορυφαίο αγροβιομηχανικό προϊόν και όπως προαναφέρθηκε ο ρόλος του είναι σημαντικός τόσο στον πρωτογενή τομέα όσο και στον δευτερογενή τομέα παίζοντας καθοριστικό ρόλο στην εθνική οικονομία. Η Ελληνική νηματουργία καλύπτεται από την εγχώρια παραγωγή βάμβακος, ενώ σημαντικές ποσότητες κατευθύνονται στο εξωτερικό και κυρίως προς τις Τρίτες χώρες. Το βαμβάκι αποτελεί ένα ιδιαίτερος συναλλαγματοφόρο προϊόν, ενώ η Ελλάδα συγκαταλέγεται ανάμεσα στις 10 μεγαλύτερες βαμβακοπαραγωγικές χώρες του κόσμου και στις πρώτες θέσεις της Ευρώπης. Καλλιεργείται σε μεγάλες εκτάσεις και η βασική γεωγραφική του κατανομή αρχίζει νότια από το νομό Βοιωτίας και φτάνει βόρεια μέχρι τη Θράκη. Πρώτοι νομοί στη χώρα σε επίπεδο καλλιεργούμενων εκτάσεων είναι οι νομοί Λάρισας και Καρδίτσας και ακολουθούν πολλοί άλλοι μεταξύ των οποίων εξέχουσες θέσεις κατέχουν οι νομοί Ροδόπης, Βοιωτίας, Φθιώτιδας, Θεσσαλονίκης και Σερρών. Τέλος, από το βαμβάκι αποκτούν εισόδημα πάνω από 150.000 οικογένειες στην Ελλάδα σε διάφορους τομείς(πηγή: ηλεκτρονική διεύθυνση Ο.Π.Ε.Κ.Ε.Π.Ε).

2.4. Συγγενικά είδη βαμβακιού

Το βαμβάκι είναι αγγειόσπερμο και ανήκει στο γένος *Gossypium* της οικογένειας *Malvaceae* που αποτελείται από 30 διπλοειδή είδη και τέσσερα τετραπλοειδή. Τα αγγειόσπερμα (Angiosperms) εμφανίζουν μεγάλη παραλλακτικότητα όσο αναφορά την μορφή και το μέγεθος (δενδρώδη, θαμνώδη, μονοετή και πολυετή, ποώδη, όρθια, κατακείμενα, αναρριχώμενα) , καθώς και στην μορφή των φύλλων (Σαρλής, 1999). Πιο συγκεκριμένα στην οικογένεια *Malvaceae* συναντάμε ποώδη και ξυλώδη φυτά που διαθέτουν βλενναδένες, και εξαπλώνονται σε όλη την Γή κυρίως στις εύκρατες μέχρι τις θερμές περιοχές και των δύο ημισφαιρίων. Σύμφωνα με τον Σαρλή (1999) τα φύλλα άλλοτε είναι απλά και άλλοτε έλλοβα, με δέσμες τριχών και παράφυλλα τα οποία αποπίπτουν. Τα άνθη μπορεί να είναι μονήρη ή κατά κυματώδεις ταξιανθίες και σε ορισμένα γένη παρατηρείτε επικαλύκιο. Όσο αναφορά τον καρπό είναι κάψα (*Gossypium*) και σχιζοκάρπιο το οποίο διακρίνεται σε μονόσπερμα μερικάρπια, ράγα ή σαμάριο. Τέλος τα σπέρματα εμφανίζουν ευθύ ή κυρτό έμβρυο καθώς και ελάχιστο ή ελλίπες ενδοσπέρμιο.



Εικ.4. Γενεαλογικό δένδρο του γένους *Gossypium*

(Πηγή: Khadi et al., 2010)

Οι γενεαλογικές σχέσεις μεταξύ των ειδών βαμβακιού παρουσιάζονται στην εικόνα 4 ενώ η διάκριση με βάση τη χρήση τους παρουσιάζονται παρακάτω.

2.4.1. Εκμεταλλεύσιμα εμπορικά

Gossypium arboreum L. Είναι δενδρώδες είδος που φτάνει σε ύψος τα 1-2 μέτρα. Τα φύλλα συνδέονται στο κλαδί με έναν μίσχο 1.5-10 cm, είναι ωοειδή σε σχήμα καρδιάς ή τριγωνικό και διαθέτουν 5-7 λοβούς. Επίσης τα φύλλα είναι κάπως λεία που σημαίνει ότι με το πέρασμα των χρόνων έχασαν το χνούδι τους. Τα άνθη μπορεί να έχουν χρώμα κόκκινο, κίτρινο, λεμονί ή άσπρο που άλλοτε εμφανίζουν σκούρα κηλίδα στην βάση των πετάλων και άλλοτε όχι (Εικ.5).



Εικ.5. Απεικόνιση του *Gossypium arboreum L.*

Όσον αναφορά τους σπόρους πρέπει να πούμε ότι φέρουν μικρές ίνες και κοντό χνούδι(εικ 1). Τέλος, αποτελεί αυτοφυές φυτό της Ινδίας και του Πακιστάν αλλά και άλλων τροπικών και υποτροπικών περιοχών.

Gossypium barbadense L. Το βαρβαρικό βαμβάκι είναι τετραπλοειδές είδος, με δημοφιλέστερα καλλιεργούμενα είδη το Αμερικάνικο Pima και το Αιγυπτιακό Sea Island, που καλύπτουν το 5% της παγκόσμιας παραγωγής. Το *Gossypium barbadense* προέρχεται από την περιοχή των Άνδεων, του Περού, του Ισημερινού και της Κολομβίας (Καλτζίκης, 1992). Τροπικό φυτό που αποτελείται από πολυετή ή ετήσια είδη, με μεγάλη απόδοση και καλής ποιότητας ίνα στα οποία συναντάμε κίτρινα άνθη και μαύρους σπόρους . Όσον αναφορά τα πολυετή είδη παρατηρούμε κλάδους με συχνά μονοποδιακή ανάπτυξη και σχηματίζουν δένδρα ύψους 5-6 μέτρων. Επίσης η διάρκεια της φωτοπεριόδου παίζει καθοριστικό ρόλο στην άνθηση, αφού απαιτείται η επίδραση μακράς φωτοπεριόδου για να εισέλθει στο αναπαραγωγικό στάδιο.



Εικ.6. Απεικόνιση του *Gossypium barbadense* L.

Το Αιγυπτιακό και το Sea Island κατατάσσονται στα ετήσια καλλιεργούμενα είδη (Εικ.6). Τα φυτά φτάνουν σε ύψος 1-3 μέτρα και παρατηρούμε συμποδιακή ανάπτυξη με λίγους ή πολλούς μονοποδιακούς κλάδους και φύλλα με 3-5 λοβούς. Επίσης τα βράκτια φύλλα έχουν το ίδιο πλάτος και μήκος, τα άνθη είναι μεγάλα και τα πέταλα έχουν χρώμα κίτρινο. Το μέγεθος των καρυδιών είναι σχετικά μικρό με πολλούς αδένες στην επιφάνεια τους και διαθέτουν 3-4 χώρους όπου ο καθένας περιέχει 5-8 σπόρους. Τέλος οι σπόροι συνήθως καλύπτονται από χνούδι και πυκνό στρώμα ινών. Σε ορισμένες περιπτώσεις συναντάμε σπόρους που διαθέτουν χνούδι μόνο στις δυο άκρες του σπόρου, ενώ υπάρχουν και σπόροι χωρίς χνούδι (Κατέβα, 2006).

Gossypium herbaceum L. Διπλοειδές είδος που καλλιεργήθηκε πιθανότατα για πρώτη φορά στην Αιθιοπία ή την Νότια Αραβία και εξαπλώθηκε γρήγορα στην Περσία, το Αφγανιστάν, την Τουρκία, την Βόρεια Αφρική, την Ισπανία, την Ουκρανία και την Κίνα (Εικ.7). Το φυτό φτάνει σε ύψος 1-1,5 μέτρα και διαθέτει στους βλαστούς και στα νεαρά φύλλα αραιές τρίχες. Τα φύλλα σχηματίζουν 3-5 λοβούς ενώ τα βράκτια φύλλα είναι οδοντωτά, μένουν πάντα ανοιχτά και δεν σκεπάζουν καθόλου το άνθος ή το καρύδι. Το μέγεθος των ανθέων είναι σχετικά μικρό και διαθέτουν κιτρινωπά πέταλα, με μικρή ερυθρή κηλίδα. Τα καρύδια είναι μικρά (2,5-3cm), πιθανότατα με σχήμα σφαιρικό και καταλήγουν σε μύτη, χωρίς να ανοίγουν καλά κατά την ωρίμανση.



Εικ.7. Απεικόνιση του *Gossypium herbaceum* L

Gossypium hirsutum L. Το συγκεκριμένο είδος είναι αλλοπολυπλοειδές (Για την ακρίβεια είναι τετραπλοειδές φυτό το οποίο προκύπτει από τον διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων από υβρίδια μεταξύ διπλοειδών ειδών που τα χρωμοσώματά τους δίστανται σε μεγάλο βαθμό, με αποτέλεσμα την ελάχιστη ή ανύπαρκτη σύναψη τους). Τα βαμβάκια που ανήκουν σε αυτό το είδος είναι γνωστά με το όνομα Upland ή Mexican. Τα φυτά είναι μικροί ετήσιοι θάμνοι, με ύψος 1-1,5 μέτρα, διαθέτουν λίγους φυλλοφόρους βλαστούς, οι οποίοι παρουσιάζουν συνήθως συμποδιακή ανάπτυξη (Εικ.8). Επίσης τα στελέχη έχουν χρώμα πράσινο ή καφετί και τα φύλλα σχίζονται σε 3-5 αβαθείς λοβούς που καταλήγουν σε μύτη. Οι βλαστοί και τα φύλλα άλλοτε καλύπτονται με τρίχες και άλλοτε όχι. Τα βράκτια σχηματίζουν στην άκρη 7-12 μακριά δόντια. Όσο αναφορά τα άνθη πρέπει να επισημάνουμε ότι είναι μεγάλα σε μέγεθος, με πέταλα χρώματος μπεζ χωρίς σκούρα κηλίδα. Επιπλέον τα καρύδια είναι μεγάλα με σχήμα επιμήκη ή σφαιρικό και διαθέτουν 3-5 χώρους με 5-15 σπόρους σε κάθε χώρο. Τέλος, οι σπόροι συναντώνται τόσο με πυκνό στρώμα ινών και καλυμμένοι με χνούδι όσο και σπόροι τελείως γυμνοί (Κατέβα, 2006).



Εικ.8. Απεικόνιση του *Gossypium hirsutum* L.

Σήμερα το *Gossypium hirsutum* καταλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό των καλλιεργούμενων εκτάσεων(95%) αφού κατάφερε να εγκλιματιστεί πολύ καλά σε όλες τις υποτροπικές περιοχές.

2.4.2. Μη εκμεταλλεύσιμα εμπορικά

Gossypium australe. Το συγκεκριμένο φυτό είναι ένας ενδημικός ξυλώδης θάμνος που ανακαλύφθηκε στην Βόρεια Αυστραλία. Προτιμά αμμώδη εδάφη κοντά σε πηγές νερού και το ύψος του κυμαίνεται στα 2-3 μέτρα (Εικ.9) . Τα φύλλα του είναι γκρι και περιβάλλονται από τρίχια, με σχήμα ωσειδές και μήκος 3 cm. Τα άνθη κυμαίνονται από 1-2 cm και τα καρύδια είναι επίσης τριχωτά, με σχήμα σφαιρικό και περιέχουν αγκαθωτό σπόρο.



Εικ.9. Απεικόνιση του *Gossypium australe*

Gossypium darwinii. Είναι ένα τετραπλοειδές είδος βαμβακιού που σχηματίζει θάμνους 2 μέτρων και έχει βρεθεί μόνο στα νησιά Γκαλαπάγκος. Γενετικές μελέτες αποδεικνύουν ότι είναι στενά συνδεδεμένο με το *Gossypium barbadense*. Τα φύλλα έχουν σχήμα καρδίας ή παλαμοειδές είναι λεία και σχίζονται σε 3-5 αβαθείς λοβούς. Επίσης τα άνθη και τα καρύδια αναπτύσσονται πάνω σε σύνθετους άξονες ανθοφορίας, με μίσχους μήκους 20-50 χιλιοστών (Εικ.10).



Εικ.10. Απεικόνιση του *Gossypium darwinii*.

***Gossypium sturtianum*.** Σε αυτό το είδος συναντάμε ξυλώδη θάμνους που εμφανίζουν κάποια συγγένεια με το καλλιεργούμενο βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*) και πιθανότατα κατάγεται από την Αυστραλία. Ο βιολογικός του κύκλος είναι περίπου 10 χρόνια και φτάνει σε ύψος 1-2 μέτρα. Επίσης το χρώμα των πετάλων μπορεί να είναι ροζ ή μωβ και τα πέντε πέταλα κατανέμονται σε μορφή δακτυλίου όπου στο κέντρο διακρίνεται ένα βαθύ κόκκινο χρώμα. Τα φύλλα εμφανίζουν μια μικρή περιστροφή και διαθέτουν ένα χαρακτηριστικό γκρι χρώμα, σε περίπτωση που τα τρίψουμε εκκρίνουν ένα έντομο άρωμα. Τέλος, στο κέντρο του άνθους εντοπίζουμε ένα μικρό σπόρο βαμβακιού (Εικ.11).



Εικ.11. Απεικόνιση του *Gossypium sturtianum*

***Gossypium thurberi*.** Αυτό το είδος περιλαμβάνει θάμνους 2 μέτρων και είναι γνωστό ως άγριο βαμβάκι της Αριζόνας και αποτελεί ένα άγριο είδος βαμβακιού προερχόμενο από το Μεξικό. Τα φύλλα εμφανίζουν ένα ατελές σχήμα καρδιάς και

μια τοπική ανύψωση. Επίσης τα άνθη και τα καρύδια αναπτύσσονται πάνω σε σύνθετους άξονες ανθοφορίας, με μίσχους που δεν ξεπερνούν τα 10-30 χιλιοστά σε μήκος (Εικ.12).



Εικ.12. Απεικόνιση του *Gossypium thurberi*

Gossypium tomentosum. Το συγκεκριμένο βαμβάκι είναι τετραπλοειδές και κατάγεται από τα νησιά της Χαβάης. Αναπτύσσεται σε υψόμετρο 120 μέτρων πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας, με μορφή μικρού θάμνου, ύψους 0,47-1.5 μέτρων (Εικ.13). Επίσης ο σπόρος καλύπτεται από κοντό χνούδι κοκκινωπού χρώματος. Τέλος, γενετικές μελέτες θέλουν το είδος *Gossypium tomentosum* να προέρχεται από το Αμερικάνικο *Gossypium hirsutum*.



Εικ.13. Απεικόνιση του *Gossypium tomentosum*.

Gossypium raimondii. Θεωρείται πρόγονος του *Gossypium arboreum* και κατατάσσεται στα τετραπλοειδή είδη. Συναντάται υπό μορφή θάμνου που δεν ξεπερνά τα 2-3 μέτρα ύψος. Τα φύλλα είναι πλατειά και ωοειδή, σε σχήμα καρδιάς που καλύπτονται από τριχίδια και από τις δυο πλευρές (Εικ.14). Επίσης τα άνθη και

τα καρύδια αναπτύσσονται πάνω σε 1-2 σύνθετους άξονες και το μήκος των μίσχων κυμαίνεται από 5-10 χιλιοστά.



Εικ.14. Απεικόνιση του *Gossypium raimondii*

3. Η βελτίωση στο βαμβάκι

Οι Βελτιωτές έχουν στην διάθεση τους την απαραίτητη τεχνογνωσία και μεθοδολογία για να επιτύχουν τους κατά καιρούς στόχους, επεμβαίνοντας στην φυσική εξέλιξη των φυτικών οργανισμών. Με την πρόοδο της επιστήμης και της τεχνολογίας τα νέα εργαλεία μπορεί να οδηγήσουν ένα βήμα πιο πέρα την γενετική βελτίωση φυτών. Χωρίς να εγκαταλείψουν τις κλασικές μεθόδους βελτίωσης και με την χρήση των νέων τεχνολογικών μέσων, οι βελτιωτές κατάφεραν να μελετήσουν εις βάθος τις γενετικές πληροφορίες και τον τρόπο που αυτές μεταφέρονται από γενιά σε γενιά. Συγκεκριμένα, η εξέλιξη της τεχνολογίας και η εφαρμογή της γενετικής μηχανικής κατάφερε να δημιουργήσει φυτά που συμπεριφέρονται σαν βιο-αντιδραστήρια για την παραγωγή φαρμακευτικών παρασκευασμάτων γνωστά ως βιοφάρμακα (Acquaah, 2007).

Όσο αναφορά το βαμβάκι, οι εξελίξεις είναι ραγδαίες. Τα τελευταία 70 χρόνια η κλασική βελτίωση κατάφερε να αλλάξει καταλυτικά την καλλιέργεια βάμβακος. Της προηγούμενες δεκαετίες, η βελτίωση στο βαμβάκι σε σύγκριση με άλλες καλλιέργειες παρουσίασε αλματώδη εξέλιξη. Η εξέλιξη αυτή οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην εμπειρία που είχαν αποκτήσει οι ερευνητές πάνω στην μοριακή βελτίωση άλλων καλλιεργειών, την οποία χρησιμοποίησαν για να κατανοήσουν το πολύπλοκο και μεγάλο γονιδίωμα του βαμβακιού (Dever, 2004). Επίσης το βαμβάκι υπερτερεί έναντι άλλων φυτών λόγω της καταγωγής του (ανήκει στην οικογένεια *Malvaceae* και αριθμοί πάνω από 40 είδη) και της μεγάλης γενετικής παραλλακτικότητας που εμφανίζει.

Ανεξάρτητα από την κατηγοριοποίηση των προγραμμάτων βελτίωσης σε ιδιωτικά ή δημόσια, η κλασική βελτίωση εξακολουθεί να είναι απαραίτητο εργαλείο των βελτιωτών. Οι μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ ιδιωτικών και δημόσιων προγραμμάτων εστιάζονται στο μέγεθος, στο σκοπό και την χρήση πρωτοπόρων τεχνικών μεταφοράς γονιδίων μεταξύ των ποικιλιών. Παρ'όλα αυτά, οι βασικές τεχνικές δημιουργίας γενετικής παραλλακτικότητας και οι τρόποι επιλογής και αξιολόγησης ποικιλιών είναι κοινί τόσο στα ιδιωτικά όσο και στα δημόσια προγράμματα βελτίωσης.

3.1. Στόχοι στη Βελτίωση του βαμβακιού

Πριν τεθεί σε εφαρμογή ένα πρόγραμμα βελτίωσης λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως οι ανάγκες του παραγωγού, οι προτιμήσεις και οι ανάγκες των καταναλωτών και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Επίσης στοχεύουν στην απλοποίηση της παραγωγικής διαδικασίας και την αποτελεσματική παραγωγή με διάφορους τρόπους. Παράλληλα, επεμβαίνουν στην γενετική δομή των φυτών θέλοντας να βελτιώσουν την ανθεκτικότητα τους, τόσο σε βιοτικούς όσο και αβιοτικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, αναπτύσσουν φυτά τα οποία είναι ανθεκτικά σε διάφορα ζιζάνια αποφεύγοντας ή περιορίζοντας την ποσότητα χρήσης των διαφόρων χημικών σκευασμάτων. Η μειωμένη χρήση φυτοφαρμάκων συνεπάγεται με την διατήρηση της περιβαλλοντικής ισορροπίας μεταξύ των γεωργικών δραστηριοτήτων και του φυσικού περιβάλλοντος.

Επιπλέον οι βελτιωτές στοχεύουν στην βελτίωση χαρακτηριστικών που έχουν βιομηχανική αξία. Για παράδειγμα, την παραγωγή βαμβακιού με βελτιωμένα χαρακτηριστικά ίνας (π.χ., αντοχή). Αν και τα βελτιωτικά προγράμματα που στόχευαν στην ενσωμάτωση των επιθυμητών χαρακτηριστικών της ίνας του *G. barbadense* στο *G. hirsutum* έχουν στην πλειοψηφία τους αποτύχει να δημιουργήσουν εμπορικά χρήσιμους και βιώσιμους γενοτύπους (Wise et al. 2000). Η ανάγκη να βελτιωθεί η ποιότητα της ίνας του βαμβακιού απαιτεί καινοτόμες βελτιωτικές προσεγγίσεις και καλύτερη κατανομή της γενετικής βάσης, της απόδοσης και της ποιότητας (Saha et al. 2004). Οι αλλαγές που γίνονται στα φυτά είναι μόνιμες και κληρονομούνται στις επόμενες γενιές (Acquaah, 2007). Παράλληλα, πρέπει να επισημάνουμε ότι οι στόχοι των βελτιωτών είναι συγκεκριμένοι και σε πολλές περιπτώσεις η επίτευξη τους κρίνεται αναγκαία.

Οι βασικές επιδιώξεις στη βελτίωση βαμβακιού είναι :

- α) η αύξηση της απόδοσης
- β) η βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών της ίνας
- γ) η συγκεντρωμένη καρποφορία σε κοντόσωμα κυρίως φυτά
- δ) η πρωιμότητα της άνθησης και η ταυτόχρονη ωρίμανση, και
- ε) η αύξηση του δυναμικού των φυτών για καλύτερη αξιοποίηση των εδαφικών πόρων.

Ο σύγχρονος τρόπος βελτίωσης εστιάζεται στην εκμετάλλευση των γενετικών αποθεμάτων, την δημιουργία παραλλακτικότητας μέσα από έναν αριθμό ευρέων και στενών διασταυρώσεων (συντά συμμετέχουν περισσότεροι των δυο γονέων) την επιλογή και την σταθεροποίηση νέων ποικιλιών για προσαρμογή στις επιθυμητές

συνθήκες περιβάλλοντος (Dever, 2004). Επομένως κρίνεται αναγκαίο οι νέες ποικιλίες πρέπει να συνδυάζουν ένα σύνολο επιθυμητών χαρακτηριστικών άμεσα συνδεδεμένων με τις απαιτήσεις των καιρών, τα σύγχρονα συστήματα εκμετάλλευσης καθώς και τις μελλοντικές ανάγκες και προοπτικές. Συγκεκριμένα, η σύγχρονη βελτιωτική πρακτική επιδιώκει και απαιτεί (Μαυρομάτης, 1996) :

- α) την ανταπόκριση στη μείωση των εισροών
- β) την ανάπτυξη αντοχής στα έντομα
- γ) την ανάπτυξη αντοχής σε συνθήκες έντονης και διαρκείας καταπόνησης (ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίες, άλατα, βαριά μέταλλα)
- δ) τη βελτίωση της ποιότητας του σπόρου
- ε) την αναβάθμιση της ποιότητας του σπόρου
- στ) την αξιοποίηση των φυσικά χρωματισμένων ινών (έγχρωμο βαμβάκι)
- ζ) την τροποποίηση των βλαστικών τμημάτων του φυτού με σκοπό την αξιοποίηση τους από την βιομηχανία

3.2. Μέθοδοι και τεχνικές βελτίωσης

Για την βελτίωση του βαμβακιού χρησιμοποιούμε διάφορες μεθόδους καθώς και συνδυασμούς μεθόδων βελτίωσης (Fehr, 1991). Η γύρη του είναι βαριά και κολλώδης ενώ η μεταφορά της μέσω του ανέμου είναι σχεδόν μηδενική. Μεταφέρεται όμως με τα έντομα, κυρίως με τις μέλισσες και τους βομβίνους (Niles and Feastrer, 1984).

Οι βελτιωτές νεότερης γενιάς έδωσαν έμφαση στην παραγόμενη ποσότητα μεταξύ των ετερογενών πληθυσμών. Με την συγκεκριμένη τεχνική στοχεύουν στην επιλογή ατομικών φυτών από τον επιθυμητό φαινότυπο, την διατήρηση του σπόρου και την σπορά στις επόμενες γενιές. Στην συνέχεια οι βελτιωτές επιλέγουν ατομικά φυτά με τον επιθυμητό φαινότυπο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου επιτύχουμε αύξηση του ποσοστού των θεμιτών γενοτύπων για τη διαμόρφωση ενός ομοζύγωτου πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα οι μέθοδοι βελτίωσης που εφαρμόζονται, έχουν ως σκοπό αφενός την εκμετάλλευση της γενετικής παραλλακτικότητας που υπάρχει σε ετερογενείς ποικιλίες και αφετέρου τη δημιουργία, με τον υβριδισμό, πληθυσμών με παραλλακτικότητα από τους οποίους μπορεί να δημιουργηθούν νέοι γενετικοί συνδυασμοί.

Στην κλασική βελτίωση συναντάμε μεθόδους που έχουν δοκιμαστεί για αρκετές δεκαετίες και έχουν δώσει πλήθος νέων ποικιλιών που κάλυπταν τις εκάστοτε ανάγκες της βιομηχανίας βάμβακος.

3.2.1. Μαζική επιλογή

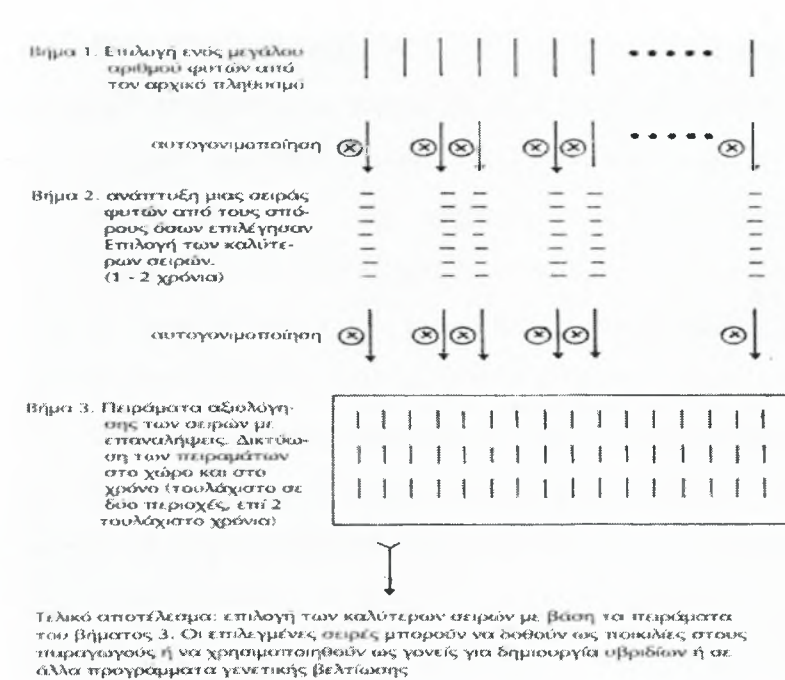
Πρόκειται για μια μέθοδο βελτίωσης που έχει μελετηθεί αρκετά στα μερικώς αυτογονιμοποιούμενα φυτά. Παράλληλα, η μαζική επιλογή έχει μακρινή παράδοση εφαρμογής και στα σταυρογονιμοποιούμενα είδη, αφού έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για βελτίωση πληθυσμών στο καλαμπόκι, στα τεύτλα, κτηνοτροφικά φυτά κ.λ.π. (Φανουράκης, 2005). Το κύριο χαρακτηριστικό της είναι ότι δεν αλλάζει ριζικά την αρχική ποικιλία που αντικαθιστά, απλώς καθαρίζει κάπως την ποικιλία απορρίπτοντας τα φυτά που έχουν ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά. Στη πράξη, η μαζική επιλογή γίνεται ανακατεύοντας τους σπόρους από καλά φυτά που επιλέγονται με βάση τον φαινότυπο τους. Συνδέεται άμεσα με τον συντελεστή κληρονομικότητας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν μεγάλο συντελεστή κληρονομικότητας (Καλτσίκης, 1992). Τέλος, η μαζική επιλογή αυξάνει γρήγορα και φτηνά την αναλογία των επιθυμητών γονότυπων κατά την διάρκεια της ομομιξίας.

3.2.2. Επιλογή καθαρής σειράς για βελτίωση εντός των ποικιλιών

Η γενετική παραλλακτικότητα στην οποία βασίζεται η επιλογή καθαρής σειράς για βελτίωση εντός των ποικιλιών (pure line selection) προέρχεται από τυχαίες μεταλλαγές που εμφανίζονται σε πολύ μικρή αναλογία. Στα αυτογονιμοποιούμενα φυτά έπειτα από μακρόχρονη φυσική αυτογονιμοποίηση κάθε φυτού, επιτυγχάνεται η δημιουργία ομοζύγων γονιδίων και μπορεί να αποτελέσει μια καθαρή σειρά η οποία αναπαράγεται με σταθερά χαρακτηριστικά (Φανουράκης, 2005).

Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο αυτή επιλέγονται τα φυτά τα οποία έχουν τα χαρακτηριστικά της ποικιλίας που επιθυμούμε. Αρχικά, ο σπόρος από τα φυτά αυτά, που μπορεί να προέρχεται είτε από αυτογονιμοποίηση είτε από σταυρογονιμοποίηση, σπέρνεται σε μία σειρά. Έπειτα, οι σειρές αξιολογούνται και επιλέγονται τα φυτά που υπερέχουν. Ο σπόρος από το κάθε φυτό σπέρνεται πάλι σε μια ξεχωριστή σειρά για να γίνει πάλι επιλογή (εικ.1) (Καλτσίκης, 1992). Συμπερασματικά, η ενδοποικιλιακή επιλογή είναι αναμφίβολα μια μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή και τον εγκλιματισμό επιθυμητών ποικιλιών από άλλες περιοχές (Niles and Feaster, 1984). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι δύο πρώτες ποικιλίες Pima που

αναπτύχθηκαν στις ΗΠΑ, οι οποίες προέκυψαν έπειτα από επιλογές εντός των
υπαρχόντων ποικιλιών.



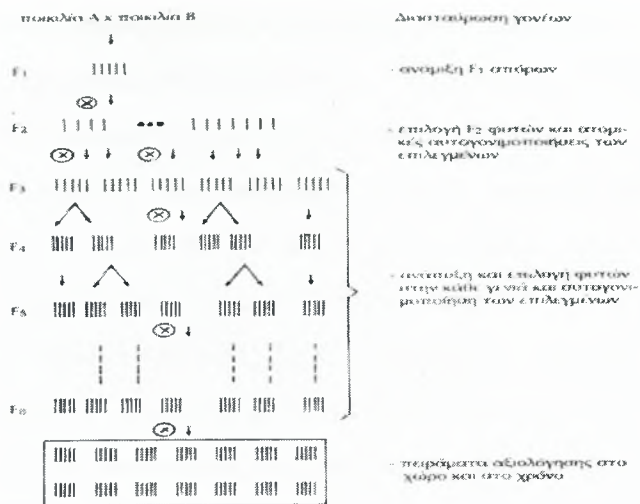
Εικ.15. Απεικόνιση μεθόδου επιλογή καθαρής σειράς

Στα uplands βαμβάκια ένα εξαιρετικό παράδειγμα της αποτελεσματικότητας της ενδοποικιλιακής επιλογής είναι η ανάπτυξη των καθαρών σειρών Stoneville από τον πρόγονο Lone Star, με την πρωταρχική επιλογή να λαμβάνει χώρο το 1916. Στα πρώτα 50 χρόνια οι βελτιωτές κατάφεραν να δημιουργήσουν με επιτυχία ένα μεγάλο αριθμό ποικιλιών από τις οποίες προήρθαν σημαντικές εμπορικές ποικιλίες (Niles and Feaster, 1984). Σήμερα με τη γενετική ομοιομορφία που διακρίνει τις καλλιεργούμενες ποικιλίες, ιδιαίτερα στις προηγμένες γεωργικά χώρες, οι δυνατότητες για αποτελεσματική εφαρμογή της βελτίωσης καθαρής σειράς είναι περιορισμένες. Οι περισσότερες από τις παραδοσιακές ποικιλίες έδωσαν ότι είχαν να δώσουν και σήμερα τείνουν να εξαφανιστούν(Φανουράκης, 2005).

3.2.3. Γενεαλογική επιλογή

Οι περισσότεροι βελτιωτές σήμερα χρησιμοποιούν την γενεαλογική επιλογή (Pedigree selection) ως μέθοδο βελτίωσης, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Newman το 1912. Στα προγράμματα γενεαλογικής επιλογής φροντίζουμε να καταγράφουμε ακριβή στοιχεία για τα χαρακτηριστικά των φυτών και την προέλευση τους έτσι ώστε για κάθε επιλογή να μπορεί να βρεθεί ολόκληρη η γενεαλογική καταγωγή του ατόμου μέχρι και τους αρχικούς γονείς (Φανουράκης, 2005). Συγκεκριμένα, στη μέθοδο αυτή γίνεται επιλογή στην F_2 , των 800-1000 καλύτερων φυτών με οπτικά κριτήρια. Οι σπόροι των φυτών αυτών, σπέρνονται σε γραμμές την επόμενη χρονιά και γίνεται επιλογή των καλύτερων γραμμών με αναλογία επιλογής 25% (Καλτσίκης, 1992). Σε ορισμένες περιπτώσεις, μετά την δημιουργία των πρώτων υβριδίων βαμβακιού γίνεται χρήση φυτάρων, ειδικά για να αυξηθεί ο αριθμός των πρώτων γενεών και να έχουμε ταχύτερη ανάπτυξη των φυτών. Επίσης εστιάζουμε στην επιλογή ατομικών φυτών των μετέπειτα γενεών που διέθεταν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Ο πρώτος έλεγχος των επιλεγμένων σειρών ολοκληρώνεται σε ελεγχόμενο και υψηλής δυναμικής απόδοσης περιβάλλον όπου μπορεί να επιτευχθεί η μέγιστη έκφραση των αλληλόμορφων που συνδέονται για παράδειγμα με την απόδοση και την ποιότητα της ίνας. Καθώς ο έλεγχος συνεχίζεται στις βελτιωμένες σειρές, γίνονται δοκιμές και στη χρήση διαφόρων συνθηκών περιβάλλοντος για να καθοριστεί η σταθερότητα των αποδόσεων. Η όλη διαδικασία διαρκεί κατά κανόνα, τουλάχιστον δέκα έτη, από την αρχική διασταύρωση έως την δημιουργία της τελικής ποικιλίας βαμβακιού (εικ.2). Το κυριότερο μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι η διατήρηση των γενεαλογικών στοιχείων είναι χρονοβόρα διαδικασία και περιορίζει το υλικό που μπορεί να αναπτύσσει ο Βελτιωτής (Φανουράκης, 2005).

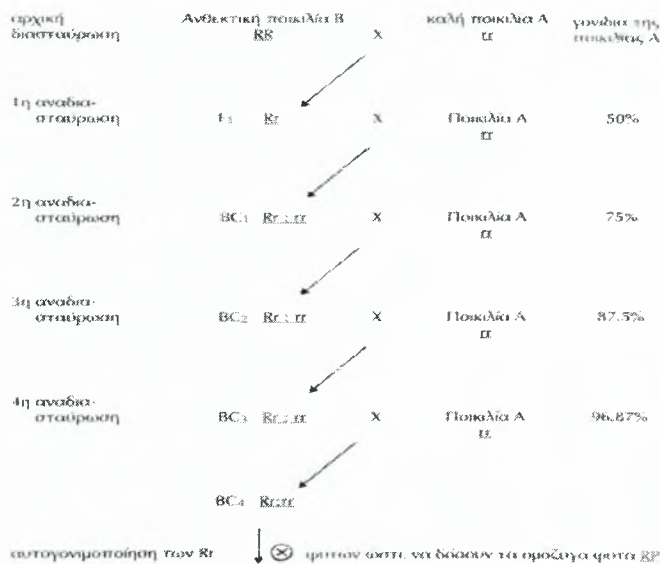
Υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων, παρατηρούμε ένα πλατό στην απόδοση του βαμβακιού, στα τέλη της δεκαετίας του 1990. Ένας από τους κορυφαίους παράγοντες ήταν η έλλειψη γενετικής παραλλακτικότητας που προέκυψε από τους μονόπλευρους σκοπούς και στόχους της βελτίωσης (Meredith, 2002). Η γενετική παραλλακτικότητα αποτελεί την βάση και την κύρια συνιστώσα για την πρόοδο της βελτίωσης των πληθυσμών βαμβακιού.



Εικ.16. Απεικόνιση μεθόδου Γενεαλογικής επιλογής

3.2.4. Αναδιασταύρωση

Η αναδιασταύρωση (backcross) είναι μία μέθοδος επιλογής στην οποία γίνονται διαδοχικές διασταυρώσεις με τον ένα γονέα και αποβλέπει στην ενσωμάτωση ενός πολύ καλού χαρακτηριστικού σε μια επιθυμητή κατά τα άλλα ποικιλία (Φανουράκης, 2005). Επίσης αποτελεί την πιο γνωστή διαδικασία βελτίωσης που στοχεύει στην δημιουργία μεταλλαγμένων ποικιλιών. Χρησιμοποιείται για να προσθέσουμε σε μια καλή ποικιλία ένα γνώρισμα συνήθως ποιοτικό, που υπάρχει σε μια άλλη ποικιλία και η οποία κατά τα άλλα δεν έχει τα επιθυμητά γνώρισμα (εικ.3)(Κατέβα, 2006).



Εικ.17. Ακολουθούμενη πορεία σε μια αναδιασταύρωση στην οποία ο επικρατής αλληλόμορφος R για ανθεκτικότητα μιας ασθένειας μεταφέρεται σε μια καλή προσαρμοσμένη ποικιλία A, που είναι ευπαθείς στην ασθένεια.

3.2.5. Επαναλαμβανόμενη επιλογή ή Επανερχόμενη επιλογή

Η επαναλαμβανόμενη επιλογή αποτελεί την κυριότερη μέθοδο για την βελτίωση πληθυσμών. Χρησιμοποιείται κυρίως στα αυτογονιμοποιούμενα φυτά με σκοπό να συγκεντρώσει επιθυμητά αλληλόμορφα για ένα ποσοτικό χαρακτηριστικό του πληθυσμού χωρίς απώλεια της γενετικής παραλλακτικότητας του (Φανουράκης, 2005). Η επαναλαμβανόμενη επιλογή δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη έκταση στη βελτίωση του βαμβακιού (Κατέβα, 2006). Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογής της μεθόδου είναι η μεταβολή του μέσου όρου του πληθυσμού (Bilbro, 1961 ; Lewis, 1956) και η αύξηση του ανασυνδυασμού γονιδίων (Miller and Rawlings, 1967a; Meredith and Bridge, 1971). Η επαναλαμβανόμενη επιλογή χρησιμοποιήθηκε από τους Miller και Rawlings, 1971) για αύξηση της απόδοσης, ενώ οι Meredith και Bridge (1973) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο αυτή για να βελτιώσουν την αναλογία ίνας.

3.3. Υβρίδια βαμβακιού

Το φαινόμενο της ετέρωσης και ζωηρότητας των υβριδίων βαμβακιού είναι γνωστά από το 1894 όταν ο Mell παρατήρησε μια αύξηση στα αγρονομικά χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες της ίνας στα υβρίδια βαμβακιού. Ακολούθησε ο Ball, ο οποίος παρατήρησε ζωηρότητα των υβριδίων στις διειδικές διασταυρώσεις μεταξύ του upland και του Αιγυπτιακού βαμβακιού. Στην πορεία ένας μεγάλος αριθμός ερευνών στην Ινδία, στην Αμερική αλλά και σε διάφορα άλλα μέρη, αναφέρουν την εμφάνιση της ετέρωσης σε αρκετά χαρακτηριστικά μεταξύ ενδοειδικών και διειδικών υβριδίων (*Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*; *Gossypium herbaceum* x *Gossypium arboreum*). Επίσης παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά ετέρωσης στα διειδικά υβρίδια (*G.hirsutum* x *G.barbadense*) από ότι στα ενδοειδικά υβρίδια (*G.hirsutum* x *G.hirsutum*) (Basu and Paroda, 1995). Παρόλα αυτά τα υβρίδια δεν μπορούν να αξιοποιηθούν εμπορικά λόγω του υψηλού κόστους των διασταυρώσεων που πραγματοποιούνται με το χέρι. Για τον λόγο αυτό δεν είναι πολύ διαδεδομένα εμπορικά, εκτός βέβαια των χωρών που διαθέτουν πολλά και φτηνά εργατικά χέρια, όπως είναι η Ινδία (Chaudhry, 1997b). Όλες οι χώρες που παράγουν βαμβάκι στοχεύουν στην αύξηση της παραγωγής τους μέσω της εμπορικής καλλιέργειας υβριδίων αλλά μέχρι σήμερα μόνο η Ινδία και η Κίνα το έχουν επιτύχει (Khan, 2004). Στην Κίνα εκτός από τα υβρίδια F₁, καλλιεργούνται επίσης και F₂, για τα οποία βρέθηκε ότι η χρήσιμη ετέρωση ως προς την απόδοση είναι αρκετά σημαντική, αλλά η ποιότητα της ίνας είναι ασταθής (Wu et al. 2004).

Σε γενικές γραμμές η παραγωγή των υβριδίων περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Επιλογή των επιθυμητών φυτών, γονέων, από ετεροζύγωτο πληθυσμό.
2. Αυτογονιμοποίηση των φυτών αυτών και επιλογή επί σειρά γενιών για την δημιουργία καθαρών σειρών που θα χρησιμοποιηθούν ως γονείς των υβριδίων.
3. Διασταύρωση των καθαρών σειρών και αξιολόγηση των παραγόμενων υβριδίων

(Φανουράκης, 2005).

Η ανακάλυψη της κυτταροπλασματικής αρρενοστεριότητας στο είδος *G.harknessii* (Olvey, 1986) σε συνδυασμό με την ανακάλυψη σειρών με γονίδια επαναφοράς της γονιμότητας της γύρης (Weaver, 1997), αναζωπύρωσε το ενδιαφέρον για τη δημιουργία εμπορικών υβριδίων. Εξάλλου, η βιοτεχνολογία υπόσχεται να προσεγγίσει το πρόβλημα παραγωγής υβριδισμένου σπόρου με διάφορους τρόπους, όπως με την ενσωμάτωση υποτελούς γονιδίου που ελέγχει το αυτοασυμβίβαστο σε γονείς με καλή συνδυαστική ικανότητα (Stewart, 1991).

3.3.1 Ενδοειδικά υβρίδια βαμβακιού *G.hirsutum*

Οι βελτιωτές στην προσπάθειά τους να δημιουργήσουν ενδοειδικά υβρίδια που θα διέθεταν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του *G.hirsutum* εκπόνησαν μια πληθώρα από μελέτες. Οι Lewis και McFarland (1951) ασχολήθηκαν με τη μεταφορά των γονιδίων σήμανσης στις επαναδιασταυρώσεις μεταξύ του *G.hirsutum*. Παρατήρησαν ότι στις ενδοειδικές επαναδιασταυρώσεις περιλαμβάνονται κάποιοι απομεινάντες μορφολογικοί δείκτες του *G.hirsutum* οι οποίοι ανακτήθηκαν όπως αναμένονταν βάσει του τυχαίου ανασυνδυασμού. Κάθε αλληλόμορφο και κάθε συνδυασμός αλληλόμορφων αποδείχθηκαν εξίσου βιώσιμοι και τα δύο στους γαμέτες και στους ζυγώτες. Σε μια άλλη μελέτη για τα υβρίδια στο βαμβάκι παρατηρήθηκε αύξηση της απόδοσης σε ενδοειδικά υβρίδια *G.hirsutum* (Davis, 1978). Στην συνέχεια ο Meredith (1990) κατέγραψε στον μέσο γονέα ετέρωση από 8 έως 24% στην απόδοση των ενδοειδικών υβριδίων. Οι Sambamurthy et al. (1995) παρατήρησαν στα τετραπλοειδή βαμβάκια, ότι το βάρος των καρυδίων και ο αριθμός τους στα ενδοειδικά υβρίδια αποτελεί το κύριο συστατικό της ετέρωσης για απόδοση. Επίσης οι Panhwar et al. (2002) παρατήρησαν 64,2 % ετέρωση στην απόδοση του σύσπορου βαμβακιού σε σχέση με το μέσο όρο των γονέων (εμπορικές ποικιλίες Qalandri, K-68/9, Shaheen και Rehmani).

Τέλος, σε μια προσπάθεια να ανιχνεύσουν 700 μικροδορυφορούς γενετικούς τόπους (loci) στο *G.hirsutum*, οι Hoffman et al. (2007) παρατήρησαν ότι στις ενδοειδικές διασταυρώσεις μεταξύ του είδους *G.hirsutum* το εύρος των πολυμορφισμών από τους SSRs κυμαίνεται $\pm 11\%$.

3.3.2. Διεδικά υβρίδια βαμβακιού (*G.hirsutum* x *G.barbadense*)

Πάντα με σκοπό την βελτίωση, πραγματοποιούνται μελέτες για τη δημιουργία μιας ποικιλίας που θα συνδυάζει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά τόσο από το *G.hirsutum* όσο και από το *G.barbadense*. Ο συνδυασμός βασικών χαρακτηριστικών των δύο ειδών (πίνακας 5) είναι επιθυμητός και αποσκοπεί στη δημιουργία απογόνων με υψηλή απόδοση, εξαιρετική ποιότητα ίνας και αντοχή σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (Μαυρομάτης, 1996).

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των ειδών *Gossypium hirsutum* και *Gossypium barbadense*

Χαρακτηριστικά	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Gossypium barbadense</i>
	Μονοετές	Μονοετές & Πολυετές
Ύψος	1 - 1,5 m	1 - 3 m 5 - 6 m
Μήκος ίνας	13 - 33 mm	μέχρι 60 mm
Κοντές ίνες (χνούδι)	Ναι	Ναι
Πρωιμότητα	Πρώιμες	Όψιμες
	Ελληνικές : 28 mm	Αιγυπτιακές : 32 mm

Επίσης θα πρέπει να πούμε ότι τα Αιγυπτιακά βαμβάκια (*Gossypium barbadense*) ξεχωρίζουν για την καλύτερη ποιότητα ίνας και για την μεγαλύτερη αντοχή σε ορισμένες ασθένειες, όπως η βερτιτσιλλίωση, σε σχέση με το παγκοσμίως καλλιεργούμενο είδος *Gossypium hirsutum*, το οποίο όμως είναι πρώιμο και υψηλοαποδοτικό.

Η ανάγκη να βελτιωθεί η ποιότητα του *Gossypium hirsutum* βαμβακιού, οδήγησε τους βελτιωτές να στραφούν στην δημιουργία των διεδικών υβριδίων *G.hirsutum* x *G.barbadense*.

Πρώτος ο Cook (1909) αναφέρει ευρωστία σε διεδικές διασταυρώσεις στο βαμβάκι, ενώ τις επόμενες δεκαετίες ακολούθησαν διάφοροι βελτιωτές. Οι Kowsalya και Raveendram (1996) μελέτησαν την έκφραση της ετέρωσης πέρα από τον μέσο

όρο και την απόδοση του καλύτερου γονέα για 11 χαρακτήρες και παρατήρησαν ότι ο αριθμός των καρυδιών ανά φυτό, το ποσοστό από το χνούδι, η λεπτότητα της ίνας και η αντοχή της ίνας παρουσίαζαν σημαντική ετέρωση. Επίσης οι Γαλανοπούλου – Σενδουκά και Ρουπακιάς (1995) σε μελέτη πέντε διειδικών υβριδίων, παρατήρησαν θετική ωφέλιμη ετέρωση για την απόδοση σε ίνα (4%), αλλά στη μία μόνο από τις δυο περιοχές που διεξήχθη το πείραμα.

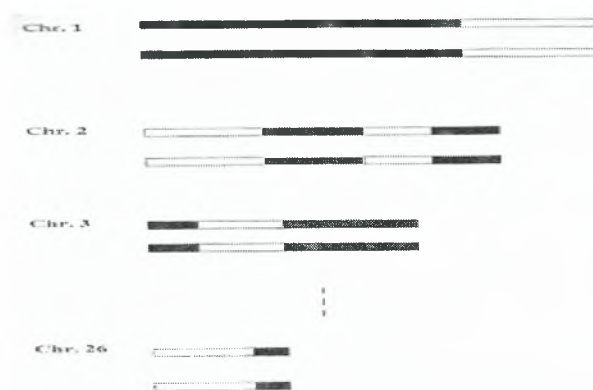
Όπως προκύπτει και από τις έρευνες των βελτιωτών, έγιναν πολλές προσπάθειες και χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές για να περάσουν γονίδια από το *Gossypium hirsutum* στο *Gossypium barbadense* και αντίστροφα. Αρχικά εργαζόταν στο επίπεδο του συνολικού γενόματος, το οποίο οδηγούσε στην μεταφορά μεγάλων ποσοτήτων μη επιθυμητού DNA που συνόδευε τα γονίδια στόχους. Από τη στιγμή που η βελτίωση ενός χαρακτηριστικού είναι δυνατό να μειώσει την επίδοση ενός άλλου, η συσχέτιση μεταξύ των οικονομικά επιθυμητών γνωρισμάτων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη καθώς μπορεί να θέσει δυσκολίες στις βελτιωτικές προσπάθειες (Κανταρτζή, 2006). Για παράδειγμα, η απόδοση σε ίνα σχετίζεται θετικά με τη λεπτότητα και ωριμότητα αυτής, αλλά αρνητικά με την αντοχή και το μήκος της (Saha et al. 2004). Είναι γεγονός ότι οι διειδικές διασταυρώσεις συχνά οδηγούν, μετά από κάποιες γενιές, στην παραγωγή φυτών μειωμένης γονιμότητας, τυπικό φαινόμενο της υβριδικής κατάρρευσης (Kohel et al. 1977).

Χαρακτηριστική είναι και η δυσκολία που αντιμετωπίζουν οι βελτιωτές να επιλέξουν τα φυτά που φέρουν το θεμιτό γονίδιο από τις πρώτες γενιές. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το φαινοτυπικό αποτέλεσμα του γονιδίου επικαλύπτεται από την γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των φυτών, τις γονιδιακές αλληλεπιδράσεις και την γενετική αστάθεια ανάμεσα στις γενεές που προκύπτει, λόγω των υψηλών επιπέδων ετεροζυγωτίας (Κανταρτζή, 2006). Σύμφωνα με τους Reinisch et al. (1994) και Mei et al. (2004) σε διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών είναι επίπονο να εντοπιστούν φυτά με τα επιθυμητά γονίδια λόγω των επιστατικών φαινομένων.

3.3.3. Μερικώς διειδικά υβρίδια βαμβακιού

Η ετέρωση σε σχέση με τον καλύτερο γονέα που παρατηρείται στα διειδικά υβρίδια βαμβακιού (*G. hirsutum* x *G. barbadense*), χάνεται σταδιακά και οι γενιές που ακολουθούν περιλαμβάνουν εξασθενημένα και αδύνατα φυτά, που τελικά τείνουν προς τα χαρακτηριστικά του ενός ή του άλλου είδους (Μαυρομάτης, 1996). Αυτή η αποτυχία της κλασικής μεθοδολογίας να απομονώσει ομόζυγα φυτά βαμβακιού, που να συνδυάζουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, οδήγησε τους ερευνητές στην

αναζήτηση εναλλακτικών λύσεων. Συγκεκριμένα, προτάθηκε η δημιουργία των μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού με κυτταρογενετικές μεθόδους (White et al. 1967, Endrizzi & Ramsay, 1979). Ως μερικώς διειδικά υβρίδια μπορούμε να ορίσουμε τα ομοζύγωτα φυτά που φέρουν στον πυρήνα μερικά από τα μη ομόλογα χρωμοσώματα ή χρωμοσωμικά τμήματα από το *G.hirsutum* και ορισμένα από το *G.barbadense* (Mavromatis and Roupakias, 1994). Το συγκεκριμένο φυτικό μοντέλο θα μπορούσε να επιτευχθεί εφόσον μπορούσαμε να αναγεννήσουμε φυτά από ανώριμους κόκκους γύρης ή μη γονιμοποιημένα ωάρια προερχόμενα από F₁ διειδικά υβρίδια βαμβακιού (Mavromatis and Roupakias, 1994; Roupakias et al. 1998). Η παραγωγή απλοειδών φυτών από τέτοιους γαμέτες και ο διπλασιασμός του αριθμού των χρωμοσωμάτων θα οδηγούσε στην παραγωγή καθαρών σειρών μερικώς διειδικών υβριδίων (εικ.18).



Εικ.18. Καθαρή σειρά μερικώς διειδικού υβριδίου.(Διαπλοειδές φυτό)

Οι ερευνητές έχοντας πλέον στόχο την παραγωγή μερικώς διειδικών υβριδίων στο βαμβάκι αρχίζουν να εφαρμόζουν πλήθος εναλλακτικών μεθόδων προς αυτή την κατεύθυνση. Αρχικά η απομόνωση των μονοσωμικών του βαμβακιού (Endrizzi and Ramsay, 1979) και η δυνατότητα παραγωγής σειρών αντικατάστασης δημιούργησε τις προϋποθέσεις για την αναγνώριση των χρωμοσωμάτων τα οποία φέρουν τα γονίδια που ελέγχουν τους επιθυμητούς χαρακτήρες των δύο ειδών (Κανταρτζή, 2006). Οι Ρουπακιάς και Γαλανοπούλου-Σενδουκά (1988) επιχείρησαν να χωρίς επιτυχία, να αναπτύξουν σειρές αντικατάστασης σε δύο ποικιλίες βαμβακιού (Σίνδος 80 και Pima S4). Η αποτυχία οφείλεται στο γεγονός ότι οι μονοσωμικοί φαινότυποι δεν ήταν εμφανείς, όταν οι διαφορετικές σειρές επαναδιασταυρώθηκαν για αρκετές γενεές με τις αρχικές ποικιλίες.

Επίσης οι Turcotte και Feaster (1963) παρατήρησαν ότι ένα διαπλοειδές άτομο παράγει σε μεγάλη συχνότητα απλοειδή από διεμβρυακούς σπόρους βαμβακιού Pima. Τα ημιγαμετικά αυτά φυτά είναι το αποτέλεσμα της μη ομαλής διαδικασίας γονιμοποίησης, κατά την οποία ο αρσενικός και ο θηλυκός γαμέτης αποτυγχάνουν να ενωθούν. Τελικά το ωάριο και ο σπερματικός πυρήνας διαιρούνται ανεξάρτητα και καταλήγουν να δώσουν ένα απλοειδή χιμαιρικό ιστό (Turcotte and Feaster, 1967, 1969). Με τον συγκεκριμένο τρόπο εργάστηκαν και άλλοι ερευνητές που κατάφεραν να αναπτύξουν διαπλοειδή μέσω της ημιγαμίας (Barrow and Chaudhari 1976; Mahill et al. 1984). Στην πράξη δεν κατάφερα να επικρατήσει λόγω του μικρού αριθμού απλοειδών που παράγονταν και εγκαταλείφθηκε ως αναποτελεσματική και μη συμφέρουσα.

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η εφαρμογή βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων όπως η *in vitro* καλλιέργεια ανθέρων και αγονιμοποίητων σπερματοβλαστών. Η καλλιέργεια ανθέρων εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στο βαμβάκι από τους Barrow et al. (1978). Σύμφωνα με τους Turaev και Samina (1986), Goodin και Trolinder (1990), Μαυρομάτης και Ρουπακιάς (1994), Van Overbeke et al. (1995) η παραγωγή απλοειδών μέσω *in vitro* καλλιέργειας ανθέρων και μικροσπορίων δεν ήταν επιτυχής τόσο στα διπλοειδή όσο και στα τετραπλοειδή είδη, που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό υλικό. Παράλληλα οι Μαυρομάτης και Ρουπακιάς (1995) παρατήρησαν μη επιτυχή αναγέννηση φυτών με την *in vitro* καλλιέργεια αγονιμοποίητων ωαρίων. Τελικά η μόνη εναλλακτική λύση που προτάθηκε για την παραγωγή διαπλοειδών στο βαμβάκι είναι η γονιμοποίηση με ξένη γύρη (Μαυρομάτης, 1996).

Πιο πρόσφατη προσπάθεια προς την συγκεκριμένη κατεύθυνση έκαναν οι Mavromatis et al. (2005) όπου μελέτησαν την επίδραση της γονιμοποίησης λουλουδιών υβριδίων βαμβακιού με ξένη γύρη. Αρχικά επικονίασαν τα F₁ διειδικά υβρίδια βαμβακιού με γύρη προερχόμενη από το *Hibiscus cannabinus* με σκοπό να προκαλέσουν *in vitro* παρθενογένεση. Τα φυτά που παρήχθησαν εμφάνιζαν μορφολογικά γνωρίσματα και από τα δύο είδη βαμβακιού και ήταν μερικώς γόνιμα, χωρίς να διαθέτουν κανένα γνώρισμα του *Hibiscus cannabinus*. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων της πρώτης γενιάς (P₀) κυμαινόταν από 27 έως 42. Από γενεά σε γενεά όμως παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων και στην τέταρτη (P₃) γενεά, έφτασαν από 46-52 (Κανταρτζή, 2006).

Συμπερασματικά, η όλη διαδικασία προάγει παρθενογενετική ανάπτυξη ωαρίων, τα οποία έπειτα από προοδευτική αύξηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων,

παράγουν πλήρως γόνιμα φυτά με τα περισσότερα κύτταρα τους να είναι τετραπλοειδή ή περίπου τετραπλοειδή (Mavromatis et al. 2005).

3.4. Μοριακή Βελτίωση

Τα τελευταία χρόνια οι μοριακές τεχνικές καθιερώθηκαν στον χώρο της βελτίωσης. Οι δείκτες DNA είναι ένα υποσχόμενο γενετικό εργαλείο που παρέχει τη δυνατότητα να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της επιλογής στο βαμβάκι (Meredith, 1995). Οι μοριακοί δείκτες μπορεί να αποτελούνται από ένα γονίδιο ή αλληλουχίες DNA, με γνωστό γενετικό τόπο πάνω στο χρωμόσωμα τα οποία συνδέονται με ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή χαρακτηριστικό. Από τις πρώτες δεκαετίες του 20ου αιώνα είχε αρχίσει η μελέτη τέτοιων δεικτών με εύκολη εκδήλωση φαινοτύπου, κύρια σε μορφολογικά χαρακτηριστικά. Μέχρι σήμερα έχει γίνει σε πολλά φυτά η γενετική ανάλυση για διάφορα γονίδια-δείκτες που καθορίζουν χαρακτηριστικά όπως το χρώμα ή το σχήμα του άνθους ή του καρπού ή και των φύλλων, η αρρενοστεριότητα, η ανθεκτικότητα σε ορισμένες ασθένειες κ.λπ. Αποτέλεσμα της συσσώρευσης της γνώσης αυτής είναι ο εντοπισμός του χρωμοσώματος ή και της θέσης (locus) του γονιδίου πάνω στο χρωμόσωμα και η σταδιακή κατασκευή του γενετικού χάρτη του είδους (Φανουράκης, 2005).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γεγονός ότι για πολλές δεκαετίες η γενετική χαρτογράφηση περιορίστηκε στους περισσότερους οργανισμούς λόγω της εφαρμογής παραδοσιακών γενετικών δεικτών που περιλαμβάνουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν κύρια χαρακτηριστικά όπως είναι το η ομάδα αίματος ή το σχήμα του σπόρου. Η συγκεκριμένη ανεπάρκεια παρατήρησης και συλλογής ειδικών χαρακτηριστικών σε διάφορους οργανισμούς οδήγησε στην δημιουργία φτωχών χαρτών και επηρέασε την λήψη, την διασταύρωση και την αξιοποίηση των δεδομένων που παρέχει στον ερευνητή η γενετική χαρτογράφηση. Σήμερα, με την αξιοποίηση στο έπακρον του συνόλου των δυνατοτήτων που μας προσφέρουν οι μοριακοί δείκτες, η ποιότητα των γενετικών χαρτών έχει βελτιωθεί σημαντικά.

Γενικά με τον όρο μοριακοί δείκτες ή γενετικοί δείκτες εννοούμε τα τμήματα του DNA που προκύπτουν μετά από την κατεργασία του φυτικού γενετικού υλικού με διάφορες μεθόδους. Τα τμήματα αυτά εμφανίζονται τελικά σαν διακριτές ζώνες σε ηλεκτροφορητικό προφίλ. Οι μοριακοί δείκτες, που είναι φαινοτυπικά ουδέτεροι και περιβαλλοντικά ανεξάρτητοι, ανιχνεύουν πολυμορφισμούς, δηλαδή διαφορές στις γενετικές πληροφορίες μεταξύ ατομικών φυτών (Κατέβα, 2006). Με την ιδιότητα τους αυτή, υπόκεινται σε γενετική ανάλυση, χαρτογραφούνται και χρησιμοποιούνται

για την σήμανση γενετικών θέσεων, ποιοτικών και ποσοτικών γνωρισμάτων (Σκαράκης, 2005). Επιπλέον είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη τόσο απλών όσο και πολύπλοκων χαρακτήρων, όπως και για την ταυτόχρονη βελτίωση της απόδοσης και της ποιότητας της ίνας, βασικό πρόβλημα της βελτίωσης του βαμβακιού, μιας και υπάρχει αρνητική συσχέτιση της απόδοσης με την αντοχή της ίνας (Guo et al.2003).

Οι μοριακές τεχνικές που εφαρμόστηκαν κατά καιρούς στην βελτίωση του βαμβακιού δεν περιορίζονται στους μοριακούς δείκτες. Ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο θεωρείται και η εφαρμογή των QTLs (quantitative trait loci). Συχνά συναντάμε σε βελτιωτικά προγράμματα ποσοτικά χαρακτηριστικά (traits) τα οποία ελέγχονται από ένα γονίδιο ή από ένα σύνολο γονιδίων. Για παράδειγμα τα χαρακτηριστικά της ίνας όπως είναι η ποιότητα, η αντοχή και η λεπτότητα είναι ποσοτικός κληρονομούμενα. Έτσι τα αποτελέσματα του προγεννητικού διαχωρισμού από συγκεκριμένες διασταυρώσεις δεν απομονώνονται μέσα σε ξεχωριστές ομάδες όπως συμβαίνει με τα απλά κληρονομούμενα χαρακτηριστικά. Αντιθέτως, αυτά τα χαρακτηριστικά παρουσιάζουν ένα συνεχόμενο εύρος φαινοτύπων μέσα σε ένα γενετικό διαχωρισμό πληθυσμών ως αποτέλεσμα των διαφορετικών αριθμών ευνοϊκών αλληλόμορφων που συνθέτουν ένα ποσοτικό χαρακτηριστικό, το οποίο λειτουργεί ανεξάρτητα και με πλήθος επιδράσεων. Οι ανεξάρτητοι παράγοντες που συνθέτουν ένα ποσοτικό χαρακτηριστικό ονομάζονται QTLs (quantitative trait loci).

Τα QTLs είναι δύσκολο να μελετηθούν ανεξάρτητα και να εφαρμοστούν στην κλασική βελτίωση όπου βασίζονται αποκλειστικά στην φαινοτυπική επιλογή επειδή :

- (i) τα χαρακτηριστικά επηρεάζονται από το σύνολο των επιδράσεων άλλων φαινοτύπων, ο καθένας από τους οποίους επηρεάζονται από ένα ή περισσότερους γενετικούς τόπους, (ii) ο βαθμός της φαινοτυπικής έκφρασης που αποδίδεται από κάθε γενετικό τόπο μεταβάλλεται ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, (iii) και οι ανεξάρτητοι γενετικοί τόποι που συνδέονται με τον φαινότυπο συχνά επηρεάζουν το γενετικό υπόβαθρο λόγω των αλληλεπιδράσεων που υπάρχουν μεταξύ των γενετικών τόπων. Η κατανόηση της ποσοτικής παραλλακτικότητας σε μοριακό επίπεδο θα μπορούσε δώσει σημαντικές πληροφορίες για την μελέτη των γονιδίων και κάτι τέτοιο γίνεται εφικτό με την δημιουργία QTLs χαρτών. Υπάρχουν δύο γενικές προϋποθέσεις για να δημιουργήσουμε χάρτες QTLs αφενός απαιτείται ένας γενετικός χάρτης με αρκετές πολυμορφικές γενετικές περιοχές οι οποίες καλύπτουν το σύνολο του γενετικού υλικού του πυρήνα και αφετέρου ένας ξεχωριστός γενετικός πληθυσμός. Βασικά η αναλυτική εφαρμογή περιλαμβάνει τον εντοπισμό συνδέσεων

που εμφανίζουν μειωμένη ισορροπία μέσω στατιστικών συνδέσμων μεταξύ αλληλόμορφων σε γενετικές περιοχές δεικτών και συνδεδεμένων QTLs (Chee et al., 2009).

Η παρουσία ενός QTL εκφράζεται όταν σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των μέσων όρων των φαινοτυπικών αξιών όλων των ανεξάρτητων πληθυσμών. Επειδή η αναζήτηση των QTLs αποτελεί βασικά μια στατιστική διαδικασία, πρέπει να αναφέρουμε ότι ένα QTL δεν περιγράφεται με την ίδια ακρίβεια όπως ένας γενετικός τόπος. Αντιθέτως, ένα QTL σχεδιάστηκε σαν ένα τμήμα του χρωμοσώματος από γενετικούς δείκτες επεμβαίνοντας στα ποσοτικά χαρακτηριστικά που επιθυμούμε να βελτιώσουμε. Παράλληλα τα QTLs μας επιτρέπουν να μελετήσουμε ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων, την θέση τους στο γονιδίωμα και κύρια τον φαινότυπο και τις γενετικές επιδράσεις συγκεκριμένων QTLs. Η αναγνώριση ενός συγκεκριμένου QTL θα μπορούσε να οδηγήσει στην βελτίωση του δυναμικού επιλογής στα βελτιωτικά προγράμματα, ειδικά σε χαρακτηριστικά με χαμηλή ή μέτρια κληρονομικότητα.

Επομένως, παρά το γεγονός ότι οι μοριακοί δείκτες χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό από τους βελτιωτές την τελευταία δεκαετία, η εφαρμογή τους χαρακτηρίζεται ακόμη περιορισμένη. Αρκετές από τις δυσκολίες που συναντάμε στην εκτέλεση των MAS για την βελτίωση της ποιότητας της ίνας οφείλονται στην αδυναμία μας να κατανοήσουμε τον φαινότυπο συγκεκριμένων QTLs. Επίσης, με την ραγδαία πρόοδο των τεχνικών μοριακής ανάλυσης, όπως για παράδειγμα η εφαρμογή 4.000 SSRs δεικτών διαθέσιμων για το βαμβάκι, θεωρείται βέβαια η δημιουργία QTLs χαρτών για τα χαρακτηριστικά της ίνας (Chee et al., 2009).

Τέλος, η ομάδα του Zhang TianZhen κατάφερε να αποτυπώσει μοριακούς δείκτες που συνδέονται με σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά ή QTLs και μελέτησε τον τρόπο που κληρονομούνται τα χαρακτηριστικά της ίνας με διαχωρισμό των γονιδίων σε υψηλής ποιότητας ίνας ισογονικών ή σχεδόν ισογονικών σειρών βαμβακιού. Επίσης ανακάλυψαν ότι τα χαρακτηριστικά της ίνας επηρεάζονται από το QTL qLP-A10-1 το οποίο μπορεί να είναι χρήσιμο για τους MAS και ανέπτυξαν για το *G. raimondii* EST-SRRs (expressed sequence tags-simple sequence repeats or microsatellite DNA) δείκτες απαραίτητους για την μελέτη του γονιδιώματος και την βελτίωση του βαμβακιού.

3.4.1. Τύποι μοριακών δεικτών

Οι δείκτες κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με την εφαρμογή τους. Σε γενικές γραμμές διακρίνονται σε **μορφολογικούς δείκτες** οι οποίοι προσδιορίζουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, σε **βιοχημικούς δείκτες** οι οποίοι ειδικεύονται στα παράγωγα των γονιδίων και σε **μοριακούς δείκτες** οι οποίοι βασίζονται στην αλληλούχηση του DNA. Οι τελευταίοι διακρίνονται σε τρεις υποκατηγορίες : α) προσεγγίσεις που δεν βασίζονται στην PCR, β) μέθοδοι βασιζόμενοι στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) γ) συνδιασμός RT-PCR συγκεκριμένου στόχου και αλληλούχηση).

3.4.1.1. Προσεγγίσεις μη βασιζόμενες στην PCR

► RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) : Πολυμορφισμός Μήκους Θραυσμάτων εκ Περιορισμού

Στην κατηγορία αυτή ανήκει η RFLP ανάλυση (Restriction Fragment Length Polymorphism) που αποτελεί και την πρώτη τεχνολογία που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση των πολυμορφισμών σε επίπεδο αλληλουχίας DNA. Με την τεχνική RFLP προσδιορίζονται οι διαφορές που παρουσιάζουν διαφορετικά φυτά ως προς το μήκος και τον αριθμό τμημάτων DNA τα οποία προέρχονται από πέψη με περιοριστικά ένζυμα (Φανουράκης, 2005). Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική RFLP ακολουθεί την εξής διαδικασία :

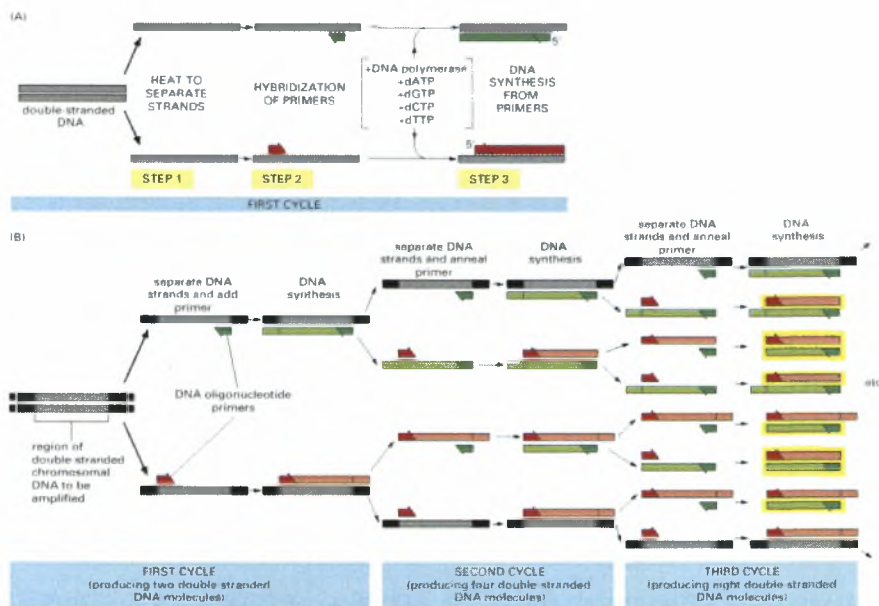
- α) Απομόνωση του DNA από τα φυτά που εξετάζουμε.
- β) Κοπή του DNA σε τμήματα με πέψη από περιοριστικά ένζυμα.
- γ) Διαχωρισμός των τμημάτων του DNA με ηλεκτροφόρηση συνήθως σε πήκτωμα αγαρόζης.
- δ) Υβριδοποίηση με ραδιενεργά σημασμένο ιχνηλάτη (probe) σε μεμβράνη υποστήριξης.

Τα πλεονεκτήματα των δεικτών RFLP, είναι η υψηλή επαναληψιμότητα τους και το ότι είναι συγκυρίαρχοι δείκτες. Από την άλλη απαιτείται υψηλό κόστος για τις αναλύσεις, είναι χρονοβόρος διαδικασία, απαιτείται μεγάλη ποσότητα DNA και συνήθως χρησιμοποιείται ραδιενέργεια (Σκαράκης, 2005).

3.4.1.2. Τεχνικές βασισμένες στη PCR

Η τεχνική της PCR στηρίζεται στη δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται οποιαδήποτε περιοχή του DNA εάν γνωστές οι αλληλουχίες των άκρων της. Για τον πολλαπλασιασμό μιας περιοχής χρησιμοποιούνται εκκινητές (Primers) και στα δύο

άκρα της περιοχής αυτής. Οι εκκινητές είναι μικρά τμήματα μονόκλωνου DNA συνήθως μεγέθους 15-20 νουκλεοτιδίων (ολιγονουκλεοτίδια) τα οποία είναι συμπληρωματικά του τμήματος αυτού του DNA στο 5' άκρο και είναι απαραίτητα για να αρχίσει την αντιγραφή της αλυσίδας η DNA πολυμεράση. Για τον πολλαπλασιασμό ενός δίκλωνου τμήματος DNA είναι απαραίτητη δυο εκκινητές, ένας για το 5' άκρο της κάθε αλυσίδας (εικ.19).



Εικ.19. Απεικόνιση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

► **AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms)** : Πολλαπλασιασμός Πολυμορφικών Τμημάτων DNA εκ Περιρισμού.

Ο πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA είναι μια νέα τεχνική μοριακή ταυτοποίησης που μπορεί να εφαρμοστεί σε DNA οποιασδήποτε πηγής ή πολυπλοκότητας. Το συνολικό γενωμικό DNA κόβεται χρησιμοποιώντας δύο ένζυμα περιορισμού. Δίκλωνοι προσαρμοστές από ολιγονουκλεοτίδια επιδέονται στα τμήματα DNA για να χρησιμεύσουν ως οι περιοχές συνδέσεων των εκκινητών για την ενίσχυση PCR. Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί στην ακολουθία των επιδεμένων τμημάτων στο 3'άκρο, και χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν ένα υποσύνολο των επιδεμένων τμημάτων. Οι πολυμορφισμοί προσδιορίζονται από την παρουσία ή την απουσία τμημάτων DNA μετά από ανάλυση σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης. Αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε φυτικό DNA για την ανάπτυξη των (υψηλής ευκρίνειας) γενετικών χαρτών και για τη θεσιακή κλωνοποίηση των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν. Επίσης, η εφαρμογή της επεκτείνεται γρήγορα στα βακτηρίδια και στους ανώτερους

ευκαριωτικούς οργανισμούς για τον καθορισμό των γενετικών σχέσεων και για την επιδημιολογική ταυτοποίηση.

► RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA) : Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά Τμήματα DNA

Στην περίπτωση των RAPDs ο εκκινητής προσδένεται σε διάφορες θέσεις πάνω στο δείγμα DNA δίνοντας ως αποτέλεσμα πλήθος προϊόντων. Τα προϊόντα αυτά διαχωρίζονται με βάση το μήκος τους, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και εμβάπτιση σε βρωμιούχο αιθίδιο ενώ από τις διαφορές στο ηλεκτροφορητικό πρότυπο διαπιστώνεται η ύπαρξη πολυμορφισμού στο γενωμικό DNA που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στην αντίδραση PCR (Βακαλουνάκης και Φραγκιαδάκης, 2003). Οι πολυμορφισμοί του DNA που προκύπτουν, οφείλονται σε διαφορές στην αλληλουχία των περιοχών DNA που έχουν ενωθεί με τον εκκινητή ή σε χρωμοσωμικές διαφορές που επηρεάζουν τις πολλαπλασιαζόμενες περιοχές (Arum and Moreno-Gonzalez, 1993).

► SCAR (sequence characterized amplified regions) : Χαρακτηριστικές αλληλουχίες ενισχυμένων περιοχών

Τα προβλήματα στη ποιότητα τους και η γενική ευαισθησία στις αλλαγές των συνθηκών αντιδράσεων καθιστούν τη μέθοδο προβληματική, στην σταθερότητα της μεταξύ των εργαστηρίων. Αυτές οι δυσκολίες υπερνικήθηκαν μετατρέποντας τα RAPDs σε SCARs (Paron και Micheltore, 1993). Επομένως οι συγκεκριμένοι δείκτες αποτελούν μια προέκταση των RAPDs και δημιουργήθηκαν από ένα ζεύγος μεγαλύτερων εκκινητών το οποίο διαθέτει μια ειδική ακολουθία περίπου 20 βάσεων. Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους εκκινητές, θεωρούνται μοναδική για εφαρμογή σε ειδικές περιοχές του γενετικού υλικού. Επίσης τα αποτελέσματα τους επηρεάζονται ελάχιστα από τις συνθήκες αντίδρασης και θεωρούνται αρκετά αξιόπιστα (Hernández et al., 1999). Σήμερα έχουν εφαρμοστή με επιτυχία σε διάφορα φυτικά είδη όπως είναι τα ακτινίδια, η φράουλα, το σιτάρι και το μαρούλι.

► SSRs (Simple Sequence Repeats) : Μικροδορυφόροι ή Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες

Ο όρος μικροδορυφορικό DNA δόθηκε από τους Litt & Luty (1989) αλλά σήμερα αναφέρονται και ως απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA. Πρόκειται για τμήματα DNA τα οποία αποτελούνται επαναλαμβανόμενα και διαδοχικά μονο-,

δι-, τρι-, τετρα-, και πεντανουκλεοτίδια τα οποία είναι διατεταγμένα σε όλο το γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών (Powell et al. 1996). Παράλληλα οι μικροδορυφόροι που αναπτύχθηκαν από γονιδιωματικές βιβλιοθήκες μπορεί να προέρχονται από λειτουργικά ή μη τμήματα του γενετικού υλικού και σχετικά δύσκολα γνωρίζουμε την χρησιμότητα-λειτουργικότητα τους.

Οι SSRs αναλύονται μετά από πολλαπλασιασμό με PCR μιας μικρής γενωμικής περιοχής που περιέχει την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία και διαχωρισμό των επαναλήψεων με βάση το μήκος τους σε πηκτή. Μόνο μια μικρή ποσότητα DNA απαιτείται ενώ ο εργαστηριακός εξοπλισμός μπορεί να είναι ο ίδιος που χρησιμοποιείται και στους RAPDs. Για τον διαχωρισμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί πηκτή αγαρόζης, αλλά για την ανάλυση όλων των αλληλομόρφων προτείνεται η χρήση πηκτής ακριλαμιδίου (Rafalski and Tingey, 1993). Η επαναληψιμότητα των δεικτών αυτών είναι πολύ υψηλή, λόγω του ότι χρησιμοποιούν μεγάλους μήκους εκκινητές στην PCR και το DNA δεν χρειάζεται να είναι υψηλής ποιότητας.

Πίνακας 6 : Σύγκριση χαρακτηριστικών μεταξύ των πιο κοινών δεικτών

A/A	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	RFLP	RAPD	AFLP	SSRs	SNPs
1	Απαιτούμενη ποσότητα DNA (μg)	10	.02	.5-1.0	.05	.05
2	Ποιότητα DNA	Υψηλή	Υψηλή	Μέτρια	Μέτρια	Υψηλή
3	Βασιζόμενοι στην PCR	ΌΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
4	Αριθμός πολυμορφικών γενετικών τόπων	1 έως 3	1,5 έως 50	20 έως 100	1 έως 3	1
5	Εφαρμογή	Όχι εύκολη	Εύκολη	Εύκολη	Εύκολη	Εύκολη
6	Αυτοματοποίηση	Χαμηλή	Μέτρια	Μέτρια	Υψηλή	Υψηλή
7	Επαναληψιμότητα	Υψηλή	Ανακριβή	Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή
8	Κόστος ανάπτυξης	Χαμηλό	Χαμηλό	Μέτρια	Χαμηλό	Χαμηλό
9	Κόστος ανά ανάλυση	Υψηλό	Χαμηλό	Μέτριο	Χαμηλό	χαμηλό

3.5. Γενετικά τροποποιημένο βαμβάκι

Η εφαρμογή της βιοτεχνολογίας, της γενετικής μηχανικής, της μοριακής βιολογίας και της υψηλής γονιδιακής ανάλυσης, αναμφίβολα προβληματίζει τόσο την ερευνητική κοινότητα όσο και μια μεγάλη μερίδα ανθρώπων. Πρόκειται για τεχνολογικά επιτεύγματα, τεχνολογικά εργαλεία με σημαντική προσφορά στον τομέα της έρευνας. Οι ερευνητές άρχισαν να κατανοούν το γονιδίωμα των φυτών από την δεκαετία του 1920 όπου η εφαρμογή των ακτινών X και της κολχικίνης αποτελούσε μοναδικό εργαλείο για να μελετήσουν τα χρωμοσώματα. Λίγο αργότερα, το 1940-1950, γίνεται πλέον αποδεκτό ότι το DNA αποτελεί την βάση της κληρονομικότητας. Μεταξύ 1960 και 1970 εφαρμόστηκαν οι ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών για την καλλιέργεια φυτικών κυττάρων και την *in vitro* ιστοκαλλιέργεια. Τα φυτικά κύτταρα στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης τους, στερούνται κάποιων βασικών δομών (ατελή μορφή) όπως είναι ο σχηματισμός των μεριστωματικών ιστών, των παρέγχυματικών ιστών και του καμβίου γεγονός το οποίο μας επιτρέπει να παρέμβουμε και δημιουργήσουμε μια μάζα κυττάρων (κάλλος) ή ακόμα και ένα ολόκληρο φυτό με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Κατά την περίοδο 1970-1980 εντοπίστηκαν για πρώτη φορά ένζυμα τα οποία έχουν την ικανότητα να "κόβουν" και να συνδέουν το DNA επιλεκτικά, σε συγκεκριμένες θέσεις, επιτρέποντας έτσι για πρώτη φορά τον ανασυνδυασμό του DNA. Για παράδειγμα, η ασθένεια των φυτών, κορονωτός κάλλος (crown gall) η οποία οφείλεται στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*, προκαλεί γρήγορη διάδοση των αδιαφοροποίητων ιστών από τον κάλλο στο φυτό (Trolinder, 2009). Οι επιστήμονες μελέτησαν το φαινόμενο σε μοριακό επίπεδο και κατέληξαν στο ότι το γενετικό υλικό του βακτηρίου εισέρχεται στο γενετικό υλικό του φυτού και προκαλεί κάποιας μορφής λοίμωξη, χωρίς όμως να το θανατώνει.

Για τα περισσότερα φυτά επιδιώκουμε να αλλάξουμε την γονιδιακή έκφραση με ανασυνδυασμό του DNA με την βοήθεια της γενετικής μηχανικής. Στην πράξη όμως κάτι τέτοιο είναι αρκετά δύσκολο να επιτευχθεί. Για το βαμβάκι η ίνα και ο σπόρος λειτουργούν αθροιστικά στον υπολογισμό της συνολικής παραγωγής. Εύκολα προκύπτει το συμπέρασμα ότι η απόδοση εξαρτάται άμεσα από την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών. Επίσης ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση είναι το περιβαλλοντικό στρες και σε γονιδιακό επίπεδο γνωρίζουμε ότι πρόκειται για ένα πολύπλοκο και πολυγονιδιακό χαρακτηριστικό.

Σήμερα η καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένου βαμβακιού αποκτά ολοένα και περισσότερους οπαδούς. Η γενετική τροποποίηση του βαμβακιού, για αντοχή στα έντομα βασίζεται σε γονίδια του βακτηρίου *Bacillus Thuringiensis* (Bt) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες τοξικές στα λεπιδόπτερα και σε ορισμένα κολεόπτερα. Ο πιο κοντινός τύπος γονιδίου είναι αυτό που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Cry1Ac, ενώ τελευταία εντοπίστηκε και ένα δεύτερο γονίδιο που ευθύνεται για μια ανάλογη πρωτεΐνη Cry2Ab (Gonzalez-Carbera, 2003). Ο εντοπισμός νέων γονιδίων κοινού χαρακτήρα και ο συνδυασμός τους στο ίδιο φυτό είναι πολύ σημαντικός μιας και τα έντομα είναι δυνατό να υπερκεράσουν την αντοχή που προβάλλεται από μονογονιδιακά ελεγχόμενες πρωτεΐνες (Riebe, 1999). Το Bt βαμβάκι έχει απελευθερωθεί εμπορικά σε πολλές χώρες της Νότιας Αφρικής, στην Αργεντινή, στο Μέξικο, την Ινδονησία, την Κίνα και την Ινδία όπου έχουν συνταχθεί και οι πρώτες μελέτες (Morse et al. 2004). Γεγονός είναι πως οι αναφορές στην καλλιέργειας του Bt βαμβακιού σχετικά με το κέρδος, την απόδοση, την περιβαλλοντική κατάσταση και την ανθρώπινη υγεία είναι θετικές (James, 2002). Εντυπωσιακά είναι και τα συγκριτικά πλεονεκτήματα του Bt βαμβακιού έναντι των ανάλογων συμβατικών ποικιλιών στην Ινδία μιας και σε αυτό οι ποσότητες των χρησιμοποιημένων εντομοκτόνων μειώνεται στο ένα τρίτο και το κέρδος στην απόδοση κυμαίνεται 30-40% και μπορεί να φτάσει ως το 80% σε περιόδους που οι πληθυσμοί των λεπιδόπτερον παρουσιάζουν έξαρση (Quaim, 2003).

Πίνακας 7: Αριθμός παγκόσμιων καλλιεργούμενων εκτάσεων (εκατομμύρια εκτάρια) με γενετικά τροποποιημένο βαμβάκι (Bt και Bt /ανθεκτικά σε ζιζανιοκτόνα)

Year	Bt	Bt and herbicide	Total
1996	0.8	0.0	0.8
1997	1.1	<0.1	1.1
1998	1.4	0.1	1.5
1999	1.3	0.8	2.1
2000	1.5	1.7	3.2
2001	1.9	2.4	4.3
2002	2.4	2.2	4.6
2003	3.1	2.6	5.7
2004	4.5	3.0	7.5
2005	4.9	3.6	8.5
2006	8.0	4.1	12.1

Πηγή: Διεθνής υπηρεσία για την απόκτηση εφαρμογών Agri-Biotech. (ISAAA 2006). <http://www.isaaa.org/RESOURCES/PUBLICATIONS/BRIEFS/35/pptslides/default.html>

Οι βελτιωτές έχουν στην διάθεση τους εργαλεία όπως είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και η μέθοδος Southern blot τόσο για τον εντοπισμό όσο και την ανάλυση των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών.

Επίσης με την διαδικασία της PCR επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός των ομόζυγων φυτών. Σε γενικές γραμμές, 2 με 3 επαναδιασταυρώσεις πραγματοποιούνται μεταξύ των μη μεταλλαγμένων σειρών σύμφωνα με το ανώτερο δυναμικό παραγωγής. Υπάρχουν και περιπτώσεις όπου οι μεταλλαγμένες αδερφικές σειρές ελέγχονται και οι καλύτερες σειρές απομονώνονται και συγκεντρώνονται για να δημιουργήσουμε μια καινούργια ποικιλία. Επιπλέον, συναντάμε περιπτώσεις στις οποίες όλα τα φυτά που προέκυψαν από τις επαναδιασταυρώσεις συγκεντρώνονται με σκοπό την δημιουργία μιας καινούργιας ποικιλίας. Παράλληλα από την αρχική υβριδοποίηση με το μεταλλαγμένο φυτό δότη μέχρις ότου να φτάσουμε στις εμπορικές πωλήσεις, μεσολαβεί ένα διάστημα 6 ετών(πίν.7).

Η επιτυχία ή αποτυχία της γενετικής βελτίωσης εξαρτάται από τον αριθμό των φυτών που διασταυρώθηκαν και από τον αριθμό των αδερφών σειρών που μπορούν να ελεγχθούν στην αρχή και στην ολοκλήρωση της όλης διαδικασίας. Το κόστος βελτίωσης αυξάνεται συνεχώς, αφού οι ανάγκες για βελτίωση της ποιότητας και αύξηση της απόδοσης γίνονται ολοένα και πιο επιτακτικές. Καθοριστικό ρόλο στην όλη διαδικασία έχουν τα γενετικά τροποποιημένα βαμβάκια, τα οποία αυξάνουν το κόστος παραγωγής και μειώνουν το γενετικό όφελος σε σχέση με την εφαρμογή των κλασικών μεθόδων βελτίωσης.

Πίνακας 8: Χρονοδιάγραμμα για την ανάπτυξη των εμπορικών μεταλλαγμένων ποικιλιών χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία των επαναδιασταυρώσεων.

Year	Activity
1	Backcrossing three generations per year if greenhouses or counter-season nurseries are used.
2	Final backcross and isolation of homozygous transgenic plants.
3	Seed increase and preliminary yield trials.
4	Seed increase and advanced yield trials.
5	Seed increase and preliminary commercial level testing.
6	Seed sales.

Επίσης οι ιδιώτες βελτιωτές πιέζονται να δημιουργήσουν ποικιλίες με μεγαλύτερες αποδόσεις ενώ χρησιμοποιούν μόνο στενές γενετικές βάσεις σε σχέση με τους βελτιωτές του δημοσίου (Bowman 2000). Εμπορικά προγράμματα βελτίωσης

βαμβακιού έχουν αποκτήσει παγκόσμια εφαρμογή με χαρακτηριστικά παραδείγματα τις εταιρίες Monsanto, Bayer και Dow η οποία πρόσφατα απέκτησε παγκόσμια εφαρμογή στον χώρο της παραγωγής βαμβακόσπορου. Αυτές οι ενέργειες αποτελούν την διαφοροποίηση στην βελτίωση βαμβακιού, η οποία θα ενισχύσει την παρουσία πολυμορφισμών και θα αυξήσει τις ευκαιρίες για ποσοτική γενετική βελτίωση. Επιπλέον, παρέχουν ευρύτερα δίκτυα ελέγχου που επιτρέπουν μεγαλύτερη επίγνωση των επιδόσεων των ελίτ σειρών.

Το κόστος της εμπορικής βελτίωσης έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια λόγω της εφαρμογής των γενετικά τροποποιημένων φυτών. Ταυτόχρονα, παρατηρείται αύξηση των επενδύσεων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το ποσόν που καταβάλουν οι καλλιεργητές βάμβακος στις ΗΠΑ για να προμηθευτούν γενετικά τροποποιημένο σπόρο είναι 2000% περισσότερο από ότι θα πλήρωναν για να προμηθευτούν τον συμβατικό βαμβακόσπορο στις αρχές του 1990. Κάτι τέτοιο έχει σοβαρές επιπτώσεις στην βιομηχανία βάμβακος. Πλέον οι βιομηχανίες βαμβακόσπορου συνεργάζονται με μεγάλες χημικές εταιρίες που είναι πρόθυμες να επενδύσουν στο τομέα της βιοτεχνολογίας με σκοπό να μειώσουν τις απώλειες από τις πωλήσεις χημικών. Καθώς το 90% του βαμβακόσπορου που πωλείτε στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι μεταλλαγμένο (USDA 2006) και ένα μεγάλο μέρος του παγκόσμιου γεωργικού πληθυσμού υιοθέτησε γρήγορα τον μεταλλαγμένο σπόρο βαμβακιού(πίνακας). Επίσης βιομηχανίες παραγωγής βαμβακόσπορου επικεντρώνονται σε μεγάλο βαθμό στην ενσωμάτωση των χαρακτηριστικών στις ελίτ σειρές.



Πίνακας 9: Απόδοση ποικιλιών GMO βαμβακιού στην Κολομβία.

Ποικιλίες (συμβατικές)	Γενετική τροποποίηση	Απόδοση / στρέμμα
Delta Opal	-	2,027kg
Nu Opal	Bt gene	1,905 kg
Nu Opal ¹ BG RR	Herbicide resistance Bt gene ('Bollgard')	1,883 kg
DP 164 BG2 RR FLEX	Herbicide resistance Bt gene ('Bollgard2')	1,762 kg
DP 455 BG RR	Herbicide resistance Bt gene ('Bollgard')	956 kg

Πηγή: Fonseca Prada 2009

Πίνακας 10: Καλλιεργούμενες εκτάσεις Γ.Τ βαμβακιού

Καλλιεργούμενες εκτάσεις (εκατομμύρια στρέμματα)				
	Χρονολογία	Συνολική παραγωγή	GM Cotton	GMO Ratio
Σε παγκόσμιο επίπεδο	1997	52,3	1,4	11%
	2008	33	15	47%
	2009	33	16	49%
Αμερική	1997	5,21	1,3	25%
	2008	3,7	3,2	86%
	2008	3,6	3,2	88%
Κίνα	1998	4,72	0,034	0,70%
	2007	6	3,8	68%
	2009	5,6	>3,7	60%
Ινδία	2002	7,85	0,04	0,50%
	2008	9,1	6,95	76%
Αργεντινή	1998	0,8	0,08	10%
	2007	0,4	0,38	95%
Αυστραλία	1997	0,4	0,06	15%
	2007	0,05	0,047	95%
Ινδονησία	2001		0,004	
	2003	0,012		
Κολομβία	2002		2	
	2007	0,072	0,022	30,60%
Μεξικό	2003	0,07	0,025	36%
	2007	0,012	0,065	56,50%
Νότια Αφρική	1998		12	
	2007	0,01	0,009	90%
	2009	0,009	0,009	98%
Burkina Faso	2008	0,4	0,0085	2%
	2009	0,4	0,115	29%
Βραζιλία	2009	0,84	0,145	18%

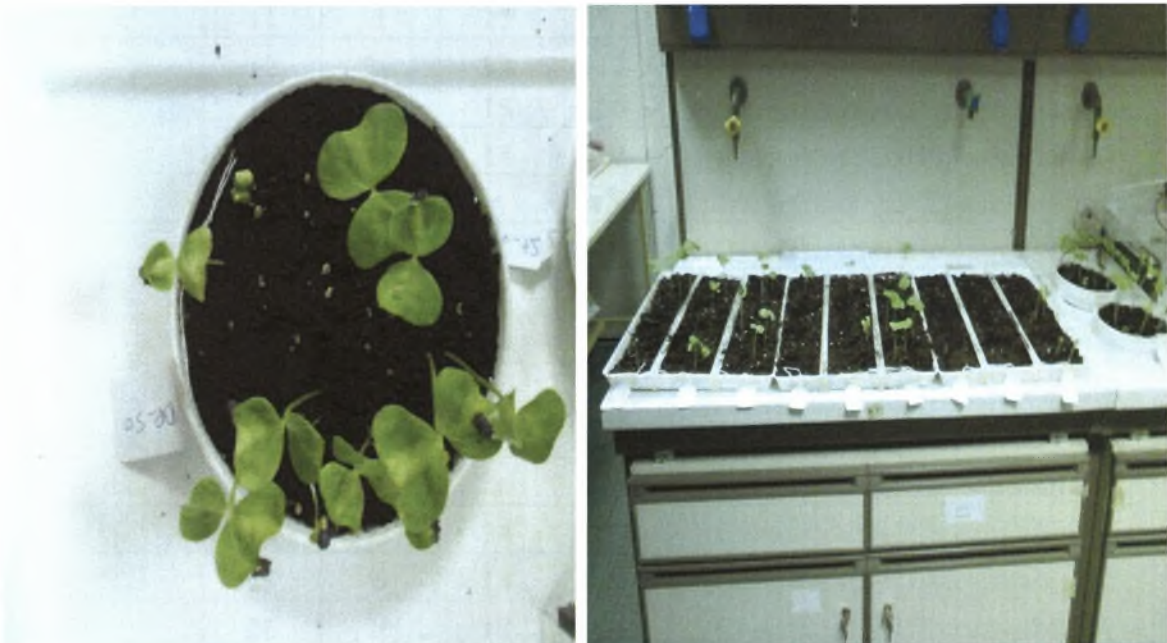
3.6. Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εφαρμογή διασταυρώσεων μεταξύ εμπορικών ποικιλιών και μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού και η γενετική ανάλυση με χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPD. Συγκεκριμένα εκτιμήθηκε η συνδυαστική ικανότητα των εμπορικών ποικιλιών με τα μερικώς διειδικά υβρίδια βαμβακιού. Επίσης, εκτιμήθηκε η γενετική συγγένεια μεταξύ των γονέων και των απογόνων που προήλθαν από τις διασταυρώσεις. Τέλος, μελετήθηκαν διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εξεταζόμενων γενοτύπων με στόχο την αναγνώριση των φαινοτύπων που διέθεταν χαρακτηριστικά του *G. hirsutum*, *G. barbadense* ή συνδυασμό των δυο αυτών ειδών.

4. Υλικά και μέθοδοι

4.1. Γενετικό υλικό

Το γενετικό υλικό αποτέλεσαν δύο εμπορικές ποικιλίες Dp-50, St-474, τέσσερα μερικώς διειδικά υβρίδια βαμβακιού P6 γενεάς (Επικονιαστές) που προήλθαν από αμοιβαίες διασταυρώσεις μεταξύ ποικιλιών του *G.hirsutum* (4S, Acala, Coker) και του *G.barbadense* (B403, Carnak) καθώς και οι γενότυποι P1, P2, P3, P4, P5, Pima και TM1. Συγκεκριμένα, τα μερικώς διειδικά υβρίδια προήλθαν από διασταύρωση F1 διειδικών υβριδίων τα οποία επικονιάστηκαν με γύρη του *Hibiscus cannabinus*. Τα μερικώς διειδικά υβρίδια (P₀) διατηρήθηκαν στις επόμενες γενεές (P₀-P₅) με ελεγχόμενες αυτογονιμοποιήσεις και ελεύθερη επικονίαση. Επιπλέον σε κάθε μία μητρική ποικιλία πραγματοποιήθηκαν 30 διασταυρώσεις με κάθε επικονιαστή, και έγιναν 60 διασταυρώσεις ανά μητρικό φυτό (εικ.20).



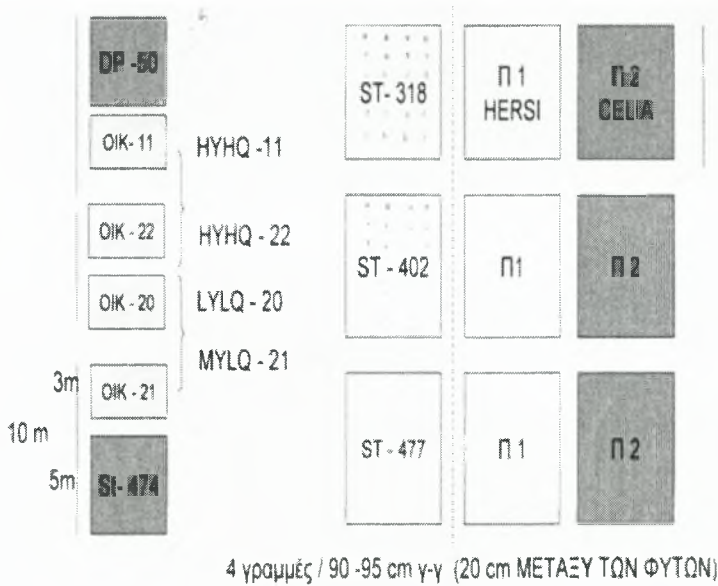
Εικ.20. Σπορά μητρικών ποικιλιών και απογόνων στον χώρο του εργαστηρίου.

Πίνακας 11 : Γενεαλογία του φυτικού υλικού των ατομικών φυτών βαμβακιού και κωδικοποίηση κατά τα έτη 2002-2010

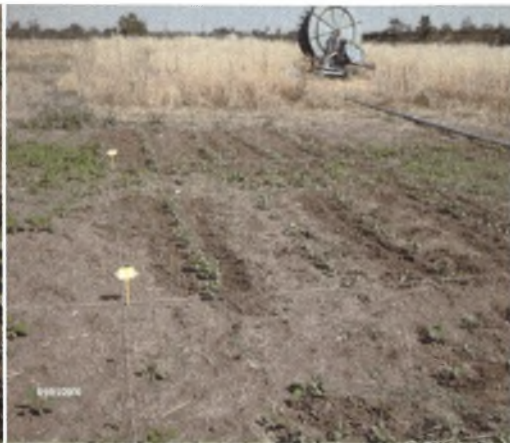
2010	2005	2004	2003	2002	
	1	6	14	A12-2	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	2	21	24	B5-3	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	3	24	2	A1-3	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	4	27	9	A3-10	[(B403cCoker)xHib.cannabinus]
	5	26	9	A3-10	[(B403cCoker)xHib.cannabinus]
	6	6	14	A12-2	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	7	21	24	B5-3	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	8	16	28	B9-4	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	9	13	4	A3-1	[(B403cCoker)xHib.cannabinus]
	10	9	8	A3-9	[(B403cCoker)xHib.cannabinus]
	11	1	27	B7-12	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	12	20	14	A12-2	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
HYHQ-22	13	22	15	A20-6	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	15	6	14	A12-2	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	16	13	4	A3-1	[(B403cCoker)xHib.cannabinus]
	17	25	2	A1-3	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	18	14	25	B5-5	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	19	6	14	A12-2	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
LYLQ-20	20	25	2	A1-3	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
MYLQ-21	21	22	15	A20-6	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	23	12	8	A3-9	[(B403cCoker)xHib.cannabinus]
	24	21	24	B5-3	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	25	6	14	A12-2	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	26	29	12	A5-8	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	27	21	24	B5-3	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	28	6	14	A12-2	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	29	7	8	A3-9	[(B403cCoker)xHib.cannabinus]
	30	22	15	A20-6	[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]
	31	17	17	A25-1	[(B403xAcala)xHib.cannabinus]

4.2 Εγκατάσταση του πειράματος

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στην περιοχή του Βελεστίνου στο αγρόκτημα του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά την διάρκεια του έτους 2008-9. Οι σπορά έγινε 17 Μαΐου 2008 και τηρήθηκαν όλες οι απαραίτητες καλλιεργητικές φροντίδες καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος. Τα μητρικά φυτά σπάρθηκαν σε αγροτεμάχια (plots) διαστάσεων 5x3m και οι επικονιαστές σε αγροτεμάχια (plots) διαστάσεων 3x3m. Κάθε αγροτεμάχιο αποτελούνταν από τέσσερις γραμμές φυτών που οι μεταξύ τους αποστάσεις ήταν 95 cm και οι αποστάσεις φύτευσης μεταξύ των φυτών ήταν 20 cm (εικ.21). Έγινε αραίωμα με το χέρι στις 12/7/2008 ώστε να παραμείνει ένα φυτό σε κάθε θέση, το οποίο ήταν το πιο εύρωστο (εικ.22).



Εικ.21. Σχεδιάγραμμα πειραματικού αγρού.



Εικ.21. Απεικόνιση αγροτεμάχιου σποράς στο Βελεστίνο.

4.3. Εκτίμηση ποσοστού φυτρώματος

Το ποσοστό φυτρώματος μεταξύ των εμπορικών ποικιλιών DP-50 και St-474 κυμαινόταν από 76% έως 93% ενώ τα μερικώς διειδικά υβρίδια εμφάνισαν πιο χαμηλό ποσοστό φυτρώματος, μεταξύ 30% και 40%. Συγκεκριμένα ο γενότυπος ΗΥΗQ-22 εμφάνισε φυτρωτική ικανότητα 33%, ο γενότυπος LYLQ-20 εμφάνισε 40% και ο γενότυπος MYLQ-21 εμφάνισε 30%. Επίσης πρέπει να αναφέρουμε ότι ο γενότυπος ΗΥΗQ-11 εμφάνισε φυτρωτική ικανότητα 0% γεγονός που το καθιστά αδύνατο να εξεταστεί στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Παράλληλα οι ποικιλίες Pima, TM1, P1, P2, P3, P4, και P5 εμφάνισαν σχετικά υψηλή φυτρωτική ικανότητα μεταξύ 80% και 100% (πίνακας 11).

Πίνακας 12: Εκτίμηση της φυτρωτικής ικανότητας γενότυπων βαμβακιού με βάση την πυκνότητα του πληθυσμού των φυτών

Γενότυπος	Πυκνότητα Πληθυσμού (φυτά ανά γραμμή)	
DP-50	1η γραμμή	24
	2η γραμμή	23
	3η γραμμή	25
	4η γραμμή	23
ST-474	1η γραμμή	20
	2η γραμμή	21
	3η γραμμή	22
	4η γραμμή	20
HYHQ-22	1η γραμμή	13
	2η γραμμή	15
	3η γραμμή	14
	4η γραμμή	13
LYLQ-20	1η γραμμή	18
	2η γραμμή	20
	3η γραμμή	19
	4η γραμμή	19
MYLQ-21	1η γραμμή	14
	2η γραμμή	16
	3η γραμμή	14
	4η γραμμή	15

4.4. Εφαρμογή διασταυρώσεων

Η τεχνική της διασταύρωσης διαφέρει από είδος σε είδος και σχετίζεται με τους εκάστοτε στόχους του βελτιωτή. Στο συγκεκριμένο πείραμα προσαρμόσαμε την ημερομηνία σποράς έτσι ώστε να επιτύχουμε την ταυτόχρονη άνθιση τόσο των μητρικών ποικιλιών όσο και των επικονιαστών.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- ▶ Επιλέγουμε τα άνθη που πρόκειται να ευνουχιστούν.
- ▶ Απομακρύνουμε τους ανθήρες με την βοήθεια λαβίδων.

(Το συγκεκριμένο στάδιο πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή για να αποφύγουμε τυχόν τραυματισμούς στο άνθος).

▶ Αφού ολοκληρώσαμε τον ευνουχισμό, πρέπει να επιλέξουμε και τον κατάλληλο επικονιαστή (γυρεοδότρια ποικιλία).

▶ Ακλουθεί η μεταφορά της γύρης στο ευνουχισμένο άνθος(ψεκάσμός) και τέλος σκεπάζουμε το άνθος με ένα ειδικό φάκελο έτσι ώστε να επιτύχουμε την πλήρη απομόνωση του.(πάντα σημειώνουμε στην ειδική καρτελίτσα τους γονείς και την ημερομηνία πραγματοποίησης της επικονίασης) (εικ.22)



Εικ.22. Μαρκαρισμένα άνθη.

Πίνακας 13: Αριθμός επιτυχημένων διασταυρώσεων ανά μητρική ποικιλία

Μητρική ποικιλία		Επικονιαστές	<u>Αριθμός επιτυχημένων διασταυρώσεων</u>	<u>Αριθμός αποτυχημένων διασταυρώσεων</u>
ΠΡ-50	X	ΗΥΗQ- 22	16 / 30	14 / 30
ΠΡ-50	X	LYLQ-20	11 / 30	19 / 30
ΠΡ-50	X	MYLQ-21	15 / 30	15 / 30
Ν-474	X	ΗΥΗQ- 22	9/ 30	21 / 30
Ν-474	X	LYLQ-20	10/ 30	20 / 30
Ν-474	X	MYLQ-21	16 / 30	14 / 30

Πρέπει να αναφέρουμε ότι η όλη διαδικασία γίνεται μόνο κατά τις πρώτες πρωινές ώρες έτσι ώστε να αποφύγουμε τυχόν φυσικές επικονιάσεις (έντομα). Επίσης η επιλογή των ανθών γίνεται όταν αυτά βρίσκονται στο στάδιο της κορώνας. Τέλος οι διασταυρώσεις ξεκίνησαν 22/07/2008 και ολοκληρώθηκαν 10/08/2008.

Μετά την ολοκλήρωση των διασταυρώσεων περιμέναμε έως ότου τα άνθη μας εξελιχθούν σε καρύδια (εικ). Ο έλεγχος των διασταυρώσεων και η αφαίρεση των ειδικών φακέλων πραγματοποιήθηκε τον Οκτώβριο καθώς και η λήψη των παρατηρήσεων (πίνακας 9). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στα παρακάτω σχήματα.



Εικ.23. Καρύδια που προέκυψαν έπειτα από επιτυχημένες διασταυρώσεις.

Πίνακας 14 : Αριθμός καρυδιών της μητρικής ποικιλίας DP-50 ανά επικονιαστή.

Αριθμός καρυδιών				
Αριθμός φυτών	DP-50(Μητρική ποικιλία)	ΗΥΗQ-22(Επικονιαστής)	LYLQ-20(Επικονιαστής)	MYLQ-21(Επικονιαστής)
	1	X	X	2
	2	1	2	X
	3	X	1	X
	4	X	2	X
	5	X	1	X
	6	X	X	1
	7	1	X	X
	8	2	X	1
	9	1	X	X
	10	1	X	X
	11	X	X	1
	12	1	X	X
	13	X	X	1
	14	X	1	X
	15	1	X	X
	16	1	X	X
	17	X	X	1
	18	X	X	2
	19	X	X	1
	20	X	X	1
	21	2	X	X
	22	X	X	1
	23	2	X	X
	24	X	2	X
	25	X	X	1
	26	X	1	X
27	1	X	X	
ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΥΔΙΩΝ	12	10	12	

Πίνακας 15: Αριθμός καρυδιών της μητρικής ποικιλίας ST-474 ανά επικονιαστή.

Αριθμός καρυδιών				
	ST- 474(Μητρική ποικιλία)	ΗΥΗQ- 22(Επικονιαστής)	LYLQ- 20(Επικονιαστής)	MYLQ- 21(Επικονιαστής)
Αριθμός φυτών	1	X	1	1
	2	1	1	X
	3	X	X	2
	4	1	X	1
	5	3	X	X
	6	X	1	1
	7	X	1	1
	8	X	X	2
	9	1	1	X
	10	2	X	X
	11	X	1	1
	12	X	X	2
	13	1	X	X
	14	X	1	X
	15	X	X	1
	16	X	X	2
	17	X	2	X
	18	X	1	X
	19	1	X	X
	20	X	X	2
	21	X	X	1
	ΣΥΝΟΛΟ ΚΑΡΥΔΙΩΝ	10	10	16

4.4. Μετρήσεις και παρατηρήσεις

Οι χειρισμοί που έγιναν στα φυτά, κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, είχαν σαν αντικειμενικό σκοπό τη συλλογή πληροφοριών για την αναγνώριση των φαινοτύπων που διέθεταν χαρακτηριστικά του *G. hirsutum*, *G. barbadense* ή συνδυασμό των δυο αυτών ειδών. Γι' αυτό το λόγο, διενεργήθηκαν παρατηρήσεις και καταγράφηκαν στοιχεία των φυτών που αφορούσαν:

- ❖ στο χρώμα του ανθούς
- ❖ στην ύπαρξη ή όχι της κηλίδας
- ❖ στον τύπο των φύλλων
- ❖ στο ύψος του φυτού
- ❖ φυτά με τυπικά χαρακτηριστικά *G. barbadense*
- ❖ φυτά με τυπικά χαρακτηριστικά *G. hirsutum*
- ❖ φυτά με μεικτά χαρακτηριστικά ("γέφυρες") των δυο ειδών.

Πίνακας 16: Κατάταξη των οικογενειών με βάση τα μορφολογικά τους γνωρίσματα ως προς την ομοιότητα τους με τα είδη *G. barbadense* και *G. hirsutum*.

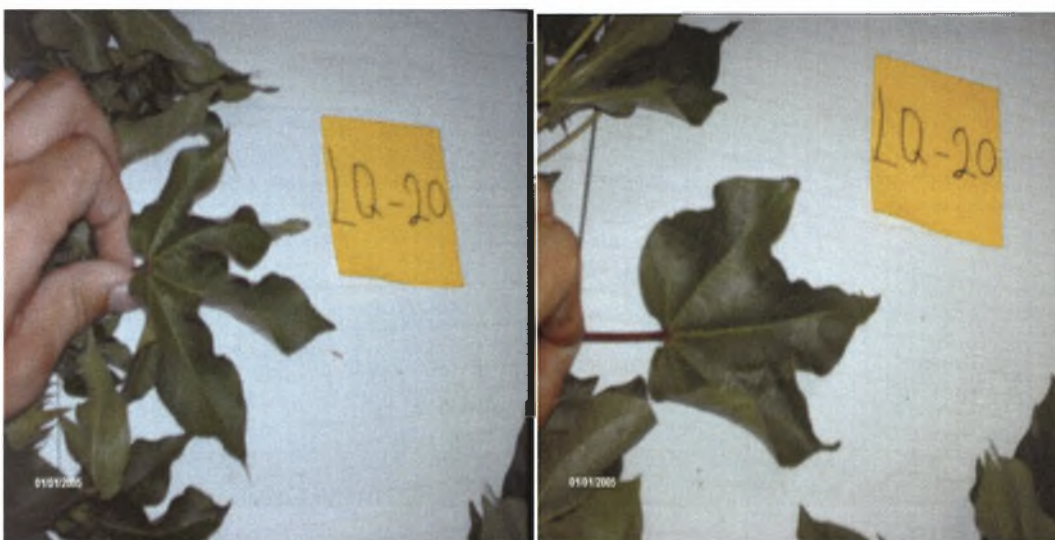
Γενότυπος	<i>G. barbadense</i>	<i>G. hirsutum</i>	Ενδιάμεσος τύπος
St-474	0%	100%	0%
DP-50	0%	100%	0%
DP-50 X LQ-20	33%	4%	63%
DP-50 X HQ-22	25%	42%	33%
DP-50 X LQ-21	16%	53%	31%
St-474 X LQ-20	64%	11%	25%
St-474 X HQ-22	77%	19%	14%
St-474 X LQ-21	48%	33%	18%
LQ-21	3%	91%	6%
HQ-22	4%	93%	3%
P1			
P2			
P3			
P4			
P5			
Pima	100%	0%	
TMI	0%	100%	



A



B



Γ

Εικ.24. Α. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους *G.hirsutum* (φύλλα χωρίς εγκοιλώσεις).Β. Ο γενότυπος LQ-21 παρουσιάζει μορφολογικά χαρακτηριστικά και από τα δύο είδη *G.barnadense* και *G.hirsutum*. Γ. **Αριστερά** παρατηρούμε μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους *G.barbadense* (φύλλα με εγκοιλώσεις) και **δεξιά** παρόλο που είναι ο ίδιος γενότυπος εμφανίζονται μορφολογικά χαρακτηριστικά από το είδος *G.hirsutum*(φύλλα με μικρές εγκοιλώσεις).

A



B



Γ



Εικ.25. Α. Μεταφορά φυτών στο εργαστήριο με σκοπό την περαιτέρω μελέτη τους. Β. Απεικόνιση καρυδίων που προέκυψαν έπειτα από διασταυρώσεις μεταξύ των εμπορικών ποικιλιών και των μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού. Γ. Παρακολούθηση της ανάπτυξης των φυτών στο αγρό.

4.4. Αξιολόγηση γενοτύπων με την βοήθεια μοριακών δεικτών

Στα πλαίσια της γενετικής ανάλυσης του γενετικού υλικού εφαρμόστηκαν οι μοριακοί δείκτες RAPDs. Το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι εμπορικές ποικιλίες DP-50 και ST-474, τρία μερικώς διειδικά υβρίδια βαμβακιού, τα ΗΥΗQ-22, LYLQ-20 και LYLQ-21 καθώς και οι απόγονοι που προέκυψαν από τις μεταξύ τους διασταυρώσεις. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και οι ποικιλίες Pima, TM1, P1, P2, P3, P4, P5.

4.4.1. Δείγματα φύλλων

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού από φύλλα χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα φύλλων (bulks) 3-4 φυτών από κάθε γενότυπο. Πρέπει να αναφέρουμε ότι πραγματοποιήθηκαν αρκετές σπορές για την παραλαβή των φύλλων ανά γενότυπο λόγω της χαμηλής βλαστικότητας που παρουσίαζαν οι σπόροι (εικ.26).



Εικ.26. Σπορά βαμβακιού σε τύρφη στον χώρο του εργαστηρίου.

4.4.2. Απομόνωση DNA

Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από ιστό νεαρών υγιών φύλλων βάρους 0,3 gr για κάθε δείγμα, σύμφωνα με την CTAB μέθοδο για απομόνωση ολικού DNA, όπως προτάθηκε από τους Edwards et al. (1991). Πρέπει να αναφέρουμε ότι για την διάσπαση των φυτικών κυττάρων έγινε χρήση υγρού Αζώτου. Το διάλυμα CTAB που χρησιμοποιήθηκε ήταν περιεκτικότητας 2% w/v και περιείχε στα 100 mL, 2 gr CTAB (hexadltrimethylammonium bromide – βρωμίδιο του εξατριμεθυλαμμώνιου), 10 mL 1M Tris-HCl (pH8,0), 4 mL 0,5M Na₂-EDTA και 35 mL 4M NaCl_s συμπληρωμένο έως τα 100 mL. Επίσης περιείχε 1% PVP για την απομάκρυνση του

υψηλού βαθμού των πολυφαινολών που περιέχουν τα φύλλα του βαμβακιού. Το απομονωμένο DNA διαλύθηκε σε 200 μl TE διαλύματος (10mM TRIS-HCl, 1mM Na₂ EDTA, pH 8,0).

4.4.3. Πέψη RNA από εκχυλισμένο DNA

Σε κάποιες περιπτώσεις κρίνεται αναγκαίο μετά την απομόνωση του DNA να ακολουθήσει η πέψη RNA (remove RNA) για να βελτιώσουμε την ποιότητα του γενετικού μας υλικού. Πρόκειται για μια σύντομη διαδικασία που επηρεάζει σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα του πειράματος. Αρχικά προσθέτουμε 2 μl RNase (10mg/mL stock solution) και το αφήνουμε για 12 ώρες στους 37 °C. Μεταφέρουμε το DNA που βρίσκεται αιωρούμενο μέσα στα tube με την βοήθεια κομμένων tips. Στην συνέχεια προσθέτουμε 2 mL TE, 1mL 10M Ammonium acetate, 8 mL chilled absolute EtOH, τα αναδεύουμε προσεκτικά και τα φυγοκεντρούμε στις 6000 g για 5 λεπτά στους 0 °C. Αφαιρούμε το DNA που βρίσκεται στο πάτο του tube με την βοήθεια ενός κομμένου tip, ξεπλένουμε με absolute EtOH και το αφήνουμε να στεγνώσει στους 37 °C για 5-10 λεπτά. Τέλος προσθέτουμε 200 μl H₂O ή TE και το μεταφέρουμε στο ψυγείο.

4.4.4. Ποσοτικός προσδιορισμός DNA

Η συγκέντρωση του DNA των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του Nano Drop στο εργαστήριο βιοτεχνολογίας φυτών του τμήματος Βιολογίας στο Πανεπιστήμιο Κρήτης (εικ.27). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- Χρησιμοποιώντας απιονισμένο νερό ρυθμίζουμε το μηχάνημα (blank) και καθαρίζουμε την βάση με χαρτί.
- Προσθέτουμε 2 μl από το κάθε δείγμα, κατεβάζουμε το στόμιο και περιμένουμε να μας βγάλει την συγκέντρωση στην οθόνη του υπολογιστή μας.
- Το ίδιο κάνουμε για το σύνολο των δειγμάτων μας και το μηχάνημα αποθηκεύει τις συγκεντρώσεις.
- Τέλος τα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε ένα φύλλο excel και είναι έτοιμα για επεξεργασία.



Εικ.27. Μηχάνημα Nano Drop

Πίνακας 17: Ποσοτικοποίηση δειγμάτων με χρήση του Nano Drop (στον παρακάτω πίνακα παρατηρούμε και μια προσαρμογή του όγκου έτσι ώστε να διευκολύνουμε την παραλαβή των 25 ng / 6 μl, που είναι και η άριστη συγκέντρωση DNA για την μοριακή ανάλυση με RAPDs)

A/A	Γενότυπος Sample name	Συγκέντρωση DNA (ng/μl) DNAConcentration	Απαιτούμενος όγκος για τα 25 ng Volume to get 25 ng	Προσαρμογή του αρχικού όγκου (200μl) έτσι ώστε να λαμβάνουμε 25 ng / 6 μl	Προστιθέμενος όγκος για να λαμβάνουμε 25 ng/ 6 μl
1	St-474	4,37	5,72	209,76	9,76
2	DP-50	9,78	2,56	469,44	269,44
3	DP-50 X LQ- 20	7,38	3,39	354,24	154,24
4	DP-50 X HQ-22	5,71	4,38	274,08	74,08
5	DP-50 X LQ- 21	7,38	3,39	354,24	154,24
6	St-474 X LQ-20	5,82	4,30	279,36	79,36
7	St-474 X HG-22	4,98	5,02	239,04	39,04
8	St-474 X LQ-21	5,41	4,62	259,68	59,68
9	LQ-21	9,15	2,73	439,2	239,2
10	HQ-22	10,29	2,43	493,92	293,92
11	P1	13,91	1,80	667,68	467,68
12	P2	9,36	2,67	449,28	249,28
13	P3	6,26	3,99	300,48	100,48
14	P4	7,44	3,36	357,12	157,12
15	P5	22,48	1,11	1079,04	879,04
16	Pima	18,39	1,36	882,72	682,72
17	TMI	8,58	2,91	411,84	211,84

4.4.5. Ποσοτικός προσδιορισμός των εκκινητών με χρήση του Nano Drop

Για την σωστή διεξαγωγή των μοριακών αναλύσεων κρίνεται αναγκαία και η ποσοτικοποίηση των εκκινητών. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με αυτήν της ποσοτικοποίησης του DNA και περιγράφεται αναλυτικά στην προηγούμενη ενότητα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Πίνακας 18 : Ποσοτικός προσδιορισμός των εκκινητών με χρήση του Nano Drop

A/A	Εκκινητές	Ημερομηνία	Ώρα	Συγκέντρωση σε ng/ul	A260
1	OPJ-06	7/30/2010	2:51 μμ	18.87	0.572
2	OPJ-04	7/30/2010	2:52 μμ	18.99	0.575
3	OPE-17	7/30/2010	2:58 μμ	16.49	0.500
4	OPE-02	7/30/2010	2:59 μμ	16.39	0.497
5	OPI-07	7/30/2010	3:14 μμ	15.41	0.467
6	OPI-04	7/30/2010	3:15 μμ	15.25	0.462
7	OPB-17	7/30/2010	3:22 μμ	18.34	0.556
8	OPA-08	7/30/2010	3:23 μμ	18.14	0.447
9	OPC-13	7/30/2010	3:24 μμ	15.50	0.470
10	OPC-11	7/30/2010	3:25 μμ	18.73	0.568
11	OPC-19	7/30/2010	3:33 μμ	15.09	0.457
12	OPB-16	7/30/2010	3:35 μμ	18.80	0.570
13	OPB-13	7/30/2010	3:36 μμ	14.86	0.450

4.4.5. Ανάλυση κατά RAPD

Σε κάθε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκαν 25 ng γενωμικού DNA σαν μήτρα, 2 μl PCR buffer, 2μM από 13 νουκλεοτιδικούς RAPD εκκινητές (Operon Tech), 3,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs και 2 U/μl red TAq HyTest DNA polymerase. Η αντίδραση ρυθμίστηκε σε 20 μl τελικό όγκο με αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται αναλυτικότερα οι συνθήκες της αντίδρασης ανά εκκινητή.

Αφού έγιναν αρκετές δοκιμές καταλήξαμε στις εξής άριστες συνθήκες αντίδρασης της PCR:

1. Προ-αποδιάταξη στους 95 °C για 7 λεπτά.
2. 35 κύκλοι που αποτελούνταν από : Αποδιάταξη στους 94 °C για 1 λεπτό, επικόλληση των εκκινητών στους 36 °C για 1 λεπτό και επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72 °C για 1: 30 λεπτά.
3. Τελική επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72 °C για 7 λεπτά

Τα προϊόντα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης για κάθε γενότυπο φορτώθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν για 3 ώρες σε πήκτη Metaphor Agarose 3% στην οποία είχε προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πήκτη εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφήθηκε. Ακολούθησε ο εντοπισμός και η καταγραφή των πολυμορφισμών των δειγμάτων. Τέλος, για την ανίχνευση του μοριακού βάρους των ζωνών χρησιμοποιήσαμε ένα Ladder 100 bp DNA της εταιρίας invitroge. Παράλληλα, με βάση τις μήτρες γενετικής ομοιότητας, κατασκευάστηκαν δένδρογράμματα φυλογενετικής ανάλυσης με την μέθοδο UPGMA.

4.4.6. Παρασκευή της Metaphor Agarose

Πριν περιγράψουμε την διαδικασία παραγωγής της Metaphor πρέπει να αναφέρουμε ότι αποτελεί μια υψηλής συγκέντρωσης αγαρόζη που ανταγωνίζεται την πολυακρυλαμιδη. Επίσης μας δίνει την δυνατότητα να διακρίνουμε ζώνες με μοριακό βάρος 200 bp έως 800 bp. Πιο συγκεκριμένα, ένα θραύσμα DNA 200 bp είναι δυνατό να διαχωριστεί από ένα άλλο θραύσμα 204 bp μετά από ηλεκτροφόρηση διάρκειας 1:30 λεπτά. Η διαδικασία παρασκευής είναι:

1. Ζυγίζουμε 3 g Metaphor για να παρασκευάσουμε 150 mL.
2. Παράλληλα προσθέτουμε σε μία φιάλη 150 mL 1x TAE και τα αναδεύουμε με μαγνητάκι για 10 λεπτά.
3. Αφού διαλυθεί καλά μεταφέρουμε την φιάλη στον φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου το διάλυμα γίνει διαυγές.
4. Περιμένουμε να πέσει λίγο η θερμοκρασία του διαλύματος και έπειτα προσθέτουμε 4 μl βρωμιούχο αιθίδιο.
5. Τέλος όταν έρθει σε θερμοκρασία σώματος το αδειάζουμε στο πιάτο της ηλεκτροφόρησης.

Πίνακας 19: Κατάλληλες συγκεντρώσεις για την ανίχνευση διαφόρων ζευγών βάσεων

Προτεινόμενη συγκέντρωση		
Ζεύγη Βάσεων	1X TAE buffer(%)	1X TBE Buffer(%)
150-800	2.0	1.8
100-600	3.0	2.0
50-250	4.0	3.0
20-130	5.0	4.0
<80	-	5.0

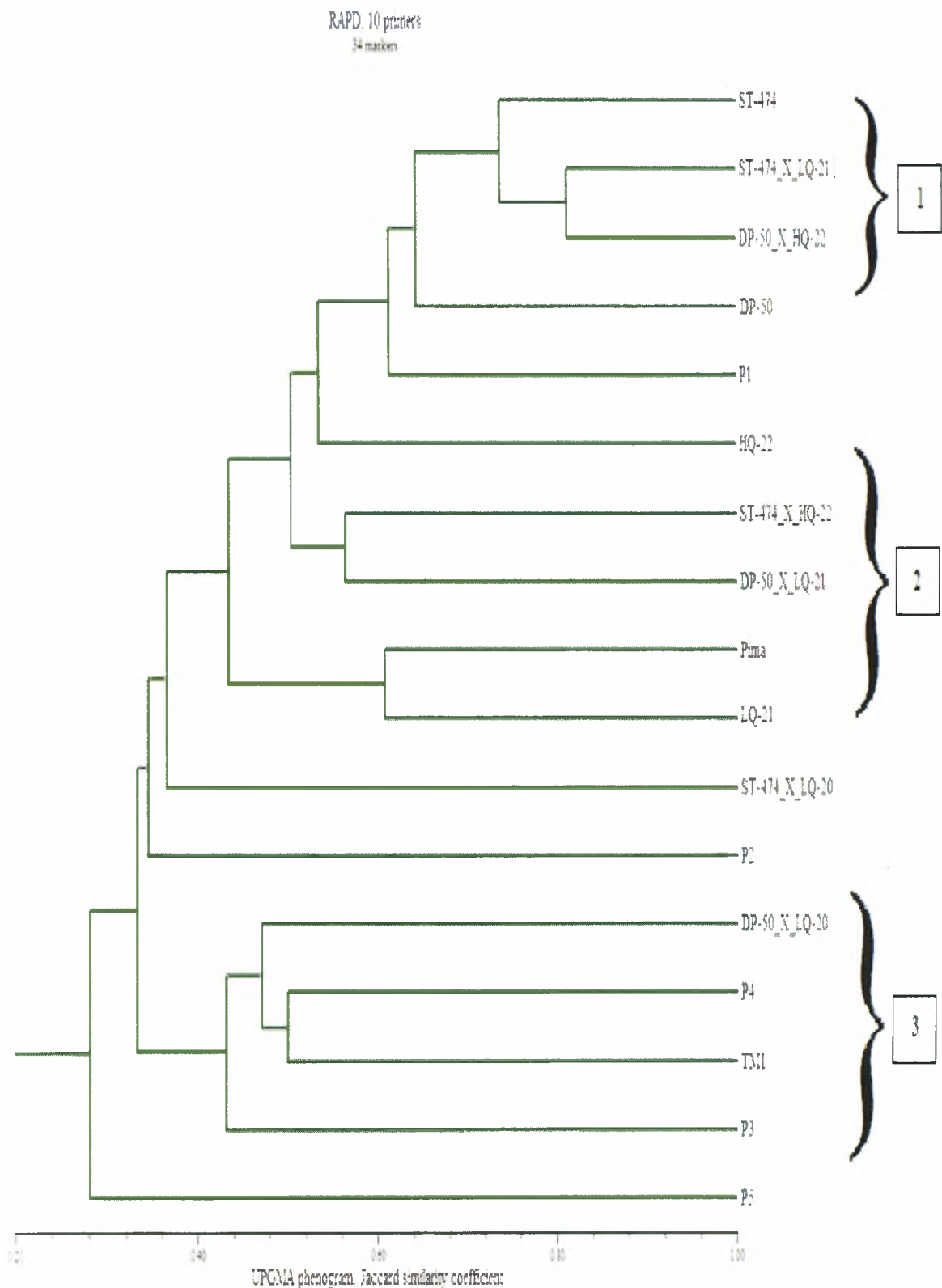
5. Αποτελέσματα μοριακών αναλύσεων

Στα πλαίσια των μοριακών αναλύσεων εφαρμόστηκαν συνολικά 17 μονόκλωνες αλληλουχίες τύπου RAPD ως εκκινητές. Πολυμορφισμοί ανιχνεύτηκαν μόνο σε 10 εκκινητές. Η μοριακή γενετική ανάλυση των 17 γενοτύπων βαμβακιού με βάση το μοριακό πρότυπο των 17 εκκινητών δεν ήταν το ίδιο αποτελεσματική στο σύνολο των εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε. Συγκεκριμένα μόνο 10 εκκινητές ενίσχυσαν ζώνες και παρουσίασαν πολυμορφισμούς και στους 17 γενότυπους βαμβακιού. Συνολικά παρατηρήθηκαν 307 ζώνες και οι πολυμορφισμοί που κατεγράφησαν φτάνουν τους 34. Κατά μέσο όρο κατεγράφησαν 3,4 πολυμορφικές ζώνες ανά εκκινητή ενώ ο μέγιστος αριθμός πολυμορφικών ζωνών ανά εκκινητή ήταν 7 και ο ελάχιστος 1.

Πίνακας 20: Σύνοψη μοριακού προτύπου των 10 εκκινητών

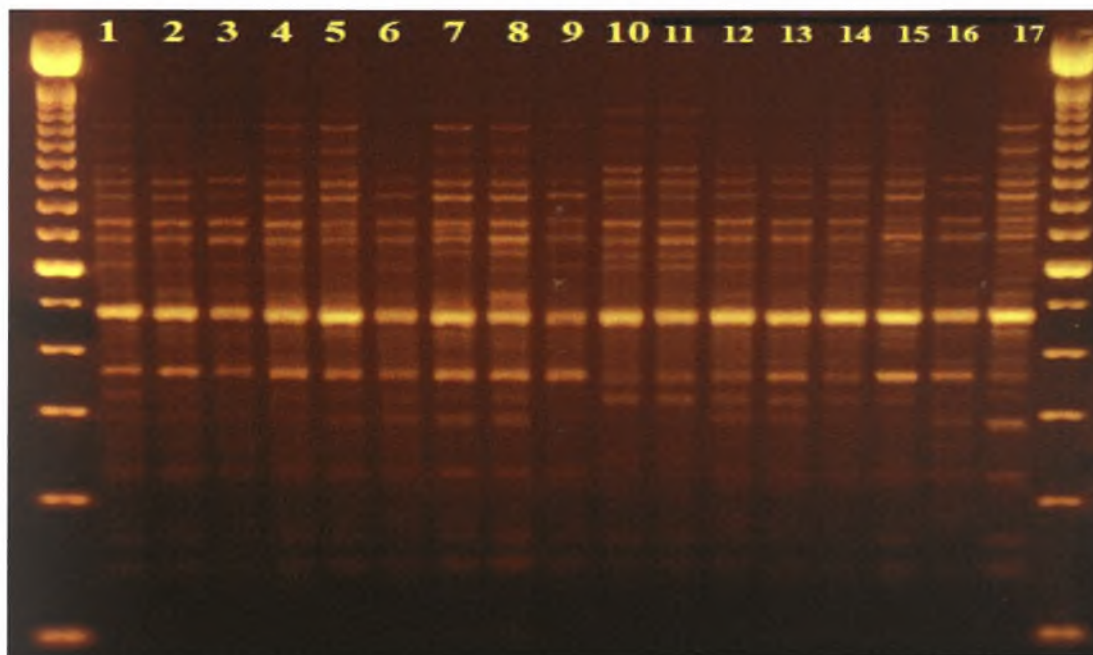
A/A	RAPD εκκινητής	Αριθμός πολυμορφικών ζωνών	Σύνολο ζωνών που ενίσχυση κάθε εκκινητής
1	OPB-17	3	27
2	OPC-11	5	44
3	OPC-13	1	10
4	OPC-19	2	11
5	OPE-02	2	23
6	OPE-17	4	38
7	OPI-04	3	34
8	OPI-07	7	51
9	OPJ-04	3	31
10	OPJ-06	4	38
	Σύνολο	34	307
	M.O	3,4	30,7

Το μοριακό πρότυπο κάθε εκκινητή καταγράφηκε και στην συνέχεια κωδικοποιήθηκε για το σύνολο των γενοτύπων. Κατά την κωδικοποίηση, η παρουσία ή απουσία των ζωνών αντιπροσωπεύτηκε από την μονάδα << 1 >> ή από το μηδέν << 0 >>, αντίστοιχα, σύμφωνα με το δυαδικό σύστημα. Το σύνολο των παραπάνω κωδικοποιημένων παρατηρήσεων αποτέλεσε τη βάση για τον υπολογισμό μητρώων γενετικής συγγένειας. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με την βοήθεια του προγράμματος NTSYS pc και η παρουσίαση πραγματοποιήθηκε με την δημιουργία δενδρογράμματος φυλογενετικών σχέσεων. Η εκτίμηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των 17 γενοτύπων βαμβακιού του πειράματος έγινε σύμφωνα με τον αλγόριθμο JACCARD/UPGMA (Εικ.28).



Εικόνα 28 : Δενδρόγραμμα φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των 17 εξεταζόμενων γενοτύπων βαμβακιού και διάκριση σε ομοειδή υποσύνολα όπως προέκυψαν από την ανάλυση με μοριακούς δείκτες τύπου RAPD.

Από το παραπάνω δενδρόγραμμα προκύπτουν διάφορα συμπεράσματα όσο αναφορά την γενετική συγγένεια των εξεταζόμενων γενοτύπων (Εικ.28). Γενικά μπορεί να διακριθεί η ομαδοποίηση των γενοτύπων σε 3 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα παρατηρούμε ότι οι απόγονοι που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις μεταξύ St-474 x LQ-21 εντοπίζονται στο ίδιο υποσύνολο δηλαδή συνδέονται στενά μεταξύ τους γεγονός το οποίο επαληθεύει την επιτυχή διασταύρωση μεταξύ της εμπορικής ποικιλίας St-474 και του μερικώς διειδικού υβριδίου LQ-21. Παράλληλα, στην δεύτερη ομάδα διακρίνουμε μια απομακρυσμένη γενετική σχέση μεταξύ των απογόνων St-474 x HQ-22 και DP-50 x LQ-21 με τους αντίστοιχους γονείς. Τέλος, στην τρίτη ομάδα παρατηρούμε ότι οι γενότυποι P3, P4 και P5 ομαδοποιούνται μαζί αφού έχουν κοινή γενεαλογική προέλευση [(Carnak x 4S)xHib.cannabinus].



Εικ.29. Προφίλ ζωνών που προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό των ομαδοποιημένων δειγμάτων του συνόλου των γενοτύπων με τον εκκινητή ORI-07.

Παρακάτω δίνονται αναλυτικότερα οι συνθήκες των αντιδράσεων για το σύνολο των εκκινητών που εφαρμοστήκαν στα πλαίσια του πειράματος καθώς και τα αποτελέσματα με την μορφή ζωνών όπως αυτές εμφανίστηκαν και φωτογραφήθηκαν έπειτα από την έκθεση στους υπεριώδεις.

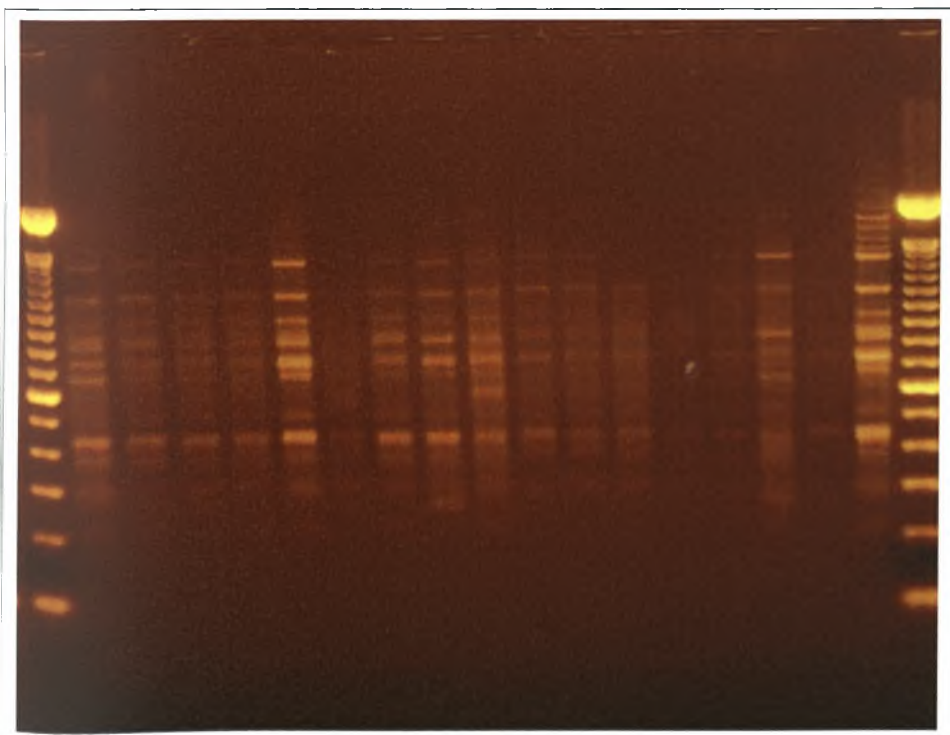
RAPD 31/07/2010		MASTER MIX 1			
PCR Cotton					
				sample size=	19
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	Vol in μ l for 1 rxn	(19) rxn
ds water H2O	μ l			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPC-11	μ M	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6 μ l	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/ μ l	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	μ l	20		20,00	292,60

PCR Conditions	C	min	
Predenaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extansion	72	7	

Σειρά φόρτωσης δειγμάτων στα πηγαδάκια από αριστερά στα δεξιά	Γενότυπος Sample name
1	St-474
2	St-474 X HG-22
3	St-474 X LQ-20
4	St-474 X LQ-21
5	DP-50 X HQ-22
6	DP-50 X LQ-20
7	DP-50 X LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TMI
17	DP-50

RAPD 31/07/2010		MASTER MIX 2			
PCR Cotton					
				sample size=	19
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	Vol in µl for 1 rxn	(19) rxn
ds water H2O	µl			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPC-13	µM	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6µl	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/µl	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	µl	20		20,00	292,60

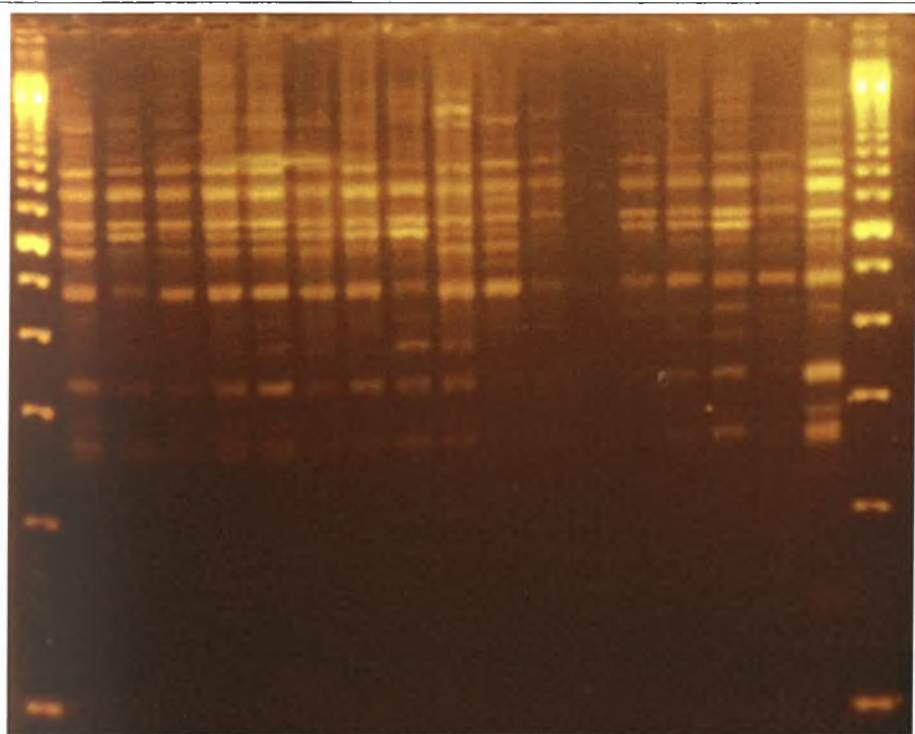
PCR Conditions	C	min	
Pre denaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extension	72	7	



Σειρά φόρτωσης δειγμάτων στα πηγαδάκια από αριστερά στα δεξιά	Γενότυπος Sample name
1	St-474
2	St-474 X HG-22
3	St-474 X LQ-20
4	St-474 X LQ-21
5	DP-50 X HQ-22
6	DP-50 X LQ-20
7	DP-50 X LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TMI
17	DP-50

RAPD 31/07/2010		MASTER MIX 3			
PCR Cotton					
				sample size=	19
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	Vol in µl for 1 rxn	(19) rxn
ds water H2O	µl			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPC-19	µM	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6µl	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/µl	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	µl	20		20,00	292,60

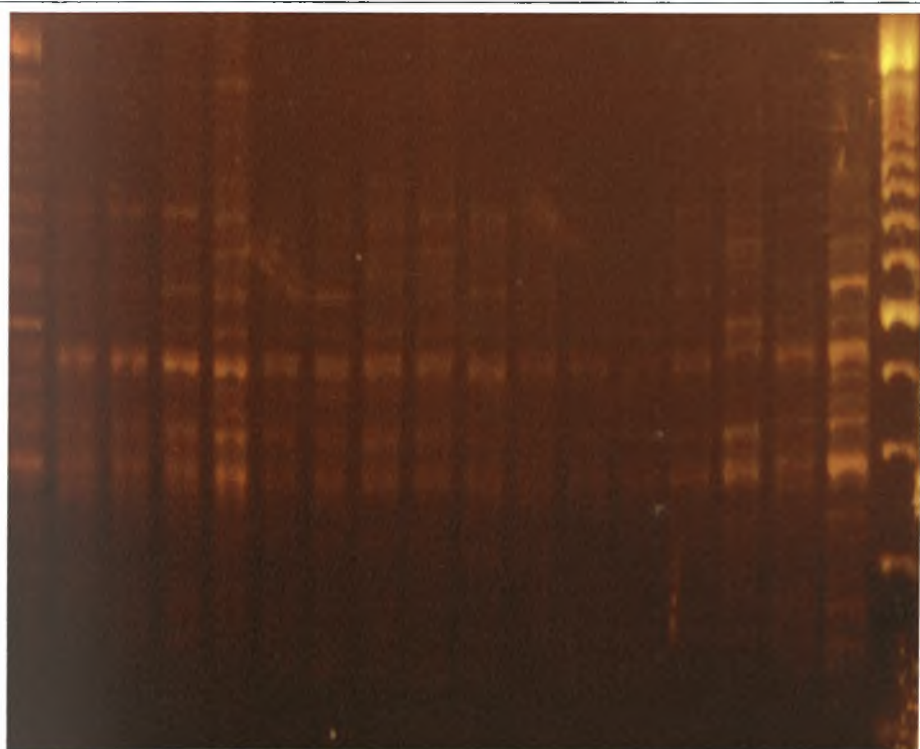
PCR Conditions	C	min	Cycles
Pre denaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extansion	72	7	



Σειρά φόρτωσης δειγμάτων στα πηγαδάκια από αριστερά στα δεξιά	Γενότυπος Sample name
1	St-474
2	St-474 X HG-22
3	St-474 X LQ-20
4	St-474 X LQ-21
5	DP-50 X HQ-22
6	DP-50 X LQ-20
7	DP-50 X LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TMI
17	DP-50

RAPD 31/07/2010		MASTER MIX 4			
PCR Cotton					
				sample size=	19
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	Vol in µl for 1 rxn	(19) rxn
ds water H2O	µl			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPB-17	µM	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6µl	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/µl	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	µl	20		20,00	292,60

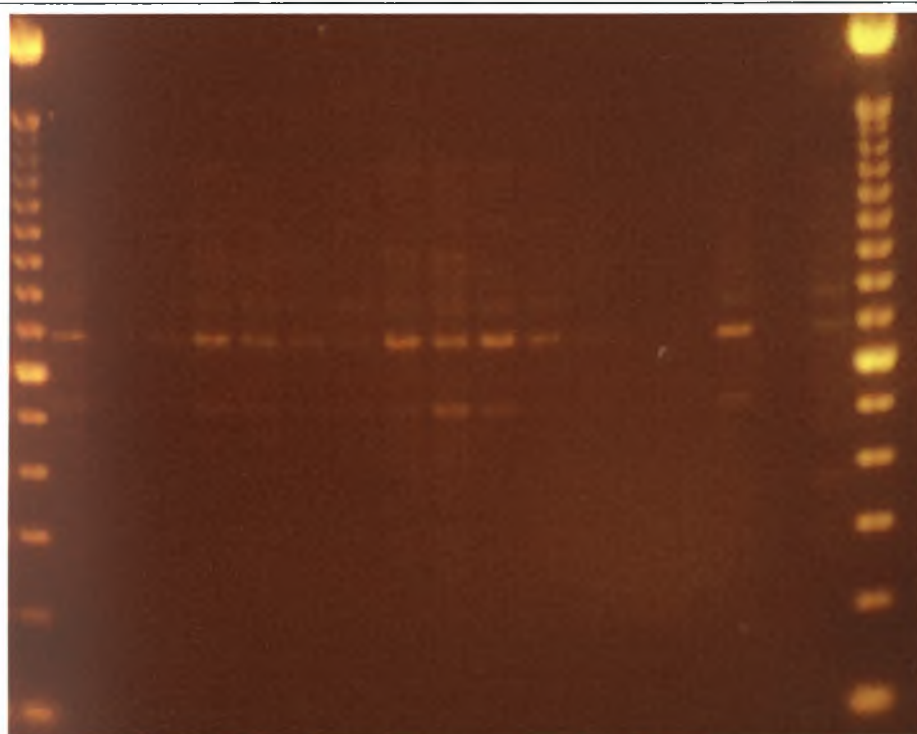
PCR Conditions	C	min	Cycles
Pre denaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extansion	72	7	



Σειρά φόρτωσης δειγμάτων στα πηγαδάκια από αριστερά στα δεξιά	Γενότυπος Sample name
1	St-474
	St-474 X
2	HQ-22
	St-474 X
3	LQ-20
	St-474 X
4	LQ-21
	DP-50 X
5	HQ-22
	DP-50 X
6	LQ-20
	LQ-21
7	DP-50 X
	LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TMI
17	DP-50

RAPD 12/08/2010		MASTER MIX 1			
PCR Cotton					
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	sample size= Vol in µl for 1 rxn	19 (19) rxn
ds water H2O	µl			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPB-13	µM	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6µl	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/µl	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	µl	20		20,00	292,60

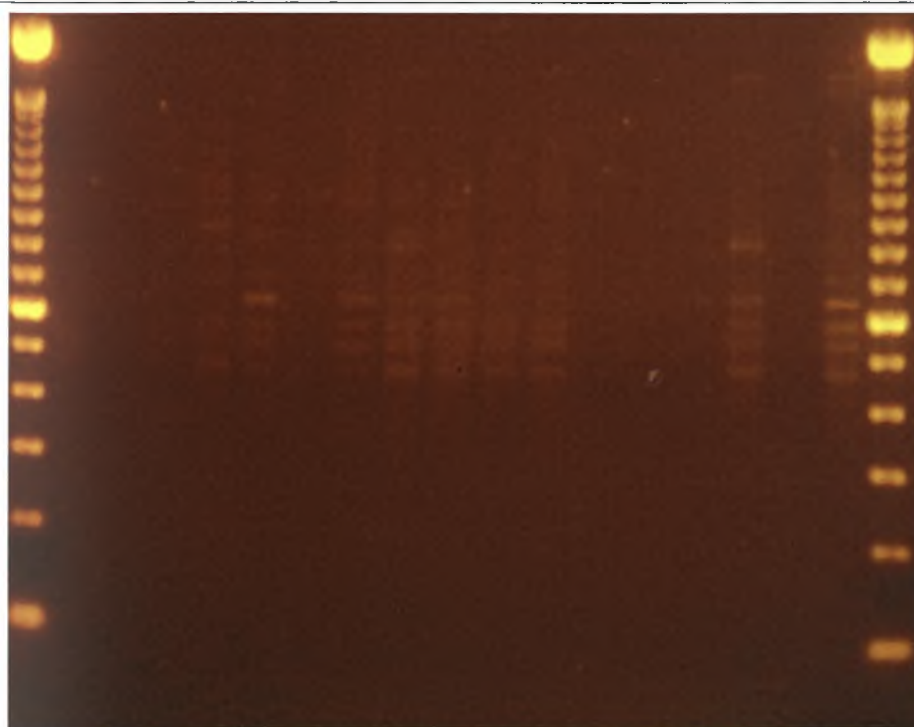
PCR Conditions	C	min	Cycles
Pre-denaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extension	72	7	



Σειρά φόρτωσης δειγμάτων στα πηγάδια από αριστερά στα δεξιά	Γενότυπος Sample name
1	St-474
2	St-474 X HG-22
3	St-474 X LQ-20
4	St-474 X LQ-21
5	DP-50 X HQ-22
6	DP-50 X LQ-20
7	DP-50 X LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TMI
17	DP-50

RAPD 12/08/2010		MASTER MIX 2			
PCR Cotton					
				sample size=	19
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	Vol in μ l for 1 rxn	(19) rxn
ds water H2O	μ l			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPB-16	μ M	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6 μ l	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/ μ l	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	μ l	20		20,00	292,60

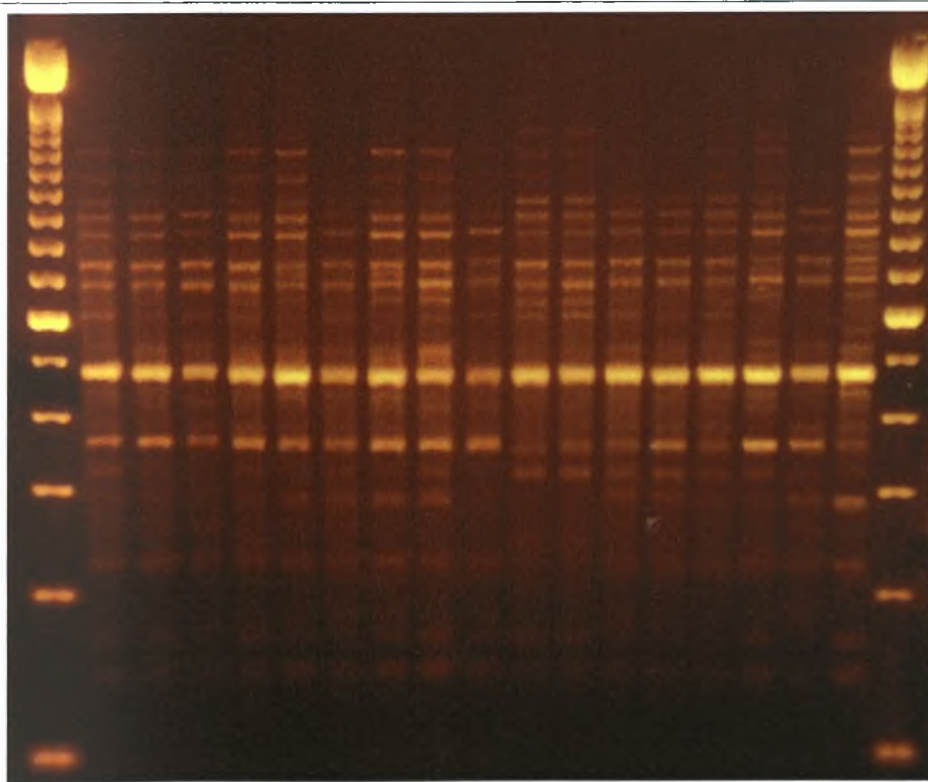
PCR Conditions	C	min	Cycles
Pre-denaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extension	72	7	



Σειρά φόρτωσης δειγμάτων στα πηγαδάκια από αριστερά στα δεξιά	Γενότοπος Sample name
1	St-474
2	St-474 X HG-22
3	St-474 X LQ-20
4	St-474 X LQ-21
5	DP-50 X HQ-22
6	DP-50 X LQ-20
7	DP-50 X LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TMI
17	DP-50

RAPD 12/08/2010		MASTER MIX 3			
PCR Cotton					
				sample size=	19
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	Vol in µl for 1 rxn	(19) rxn
ds water H2O	µl			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPI-07	µM	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6µl	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/µl	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	µl	20		20,00	292,60

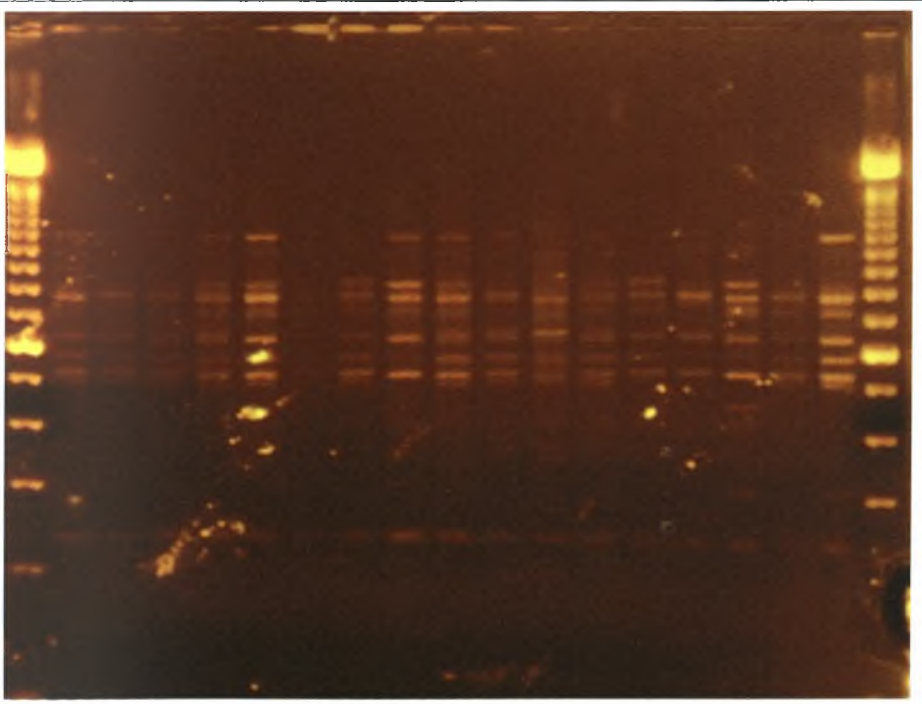
PCR Conditions	C	min	Cycles
Pre-denaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extension	72	7	



Σειρά φόρτωσης δειγμάτων στα πηγαδάκια από αριστερά στα δεξιά	Γενότοπος Sample name
1	St-474
2	St-474 X HG-22
3	St-474 X LQ-20
4	St-474 X LQ-21
5	DP-50 X HQ-22
6	DP-50 X LQ-20
7	DP-50 X LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TMI
17	DP-50

RAPD 12/08/2010		MASTER MIX 4			
PCR Cotton					
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	sample size= Vol in µl for 1 rxn	19 (19) rxn
ds water H2O	µl			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPI-04	µM	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6µl	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/µl	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	µl	20		20,00	292,60

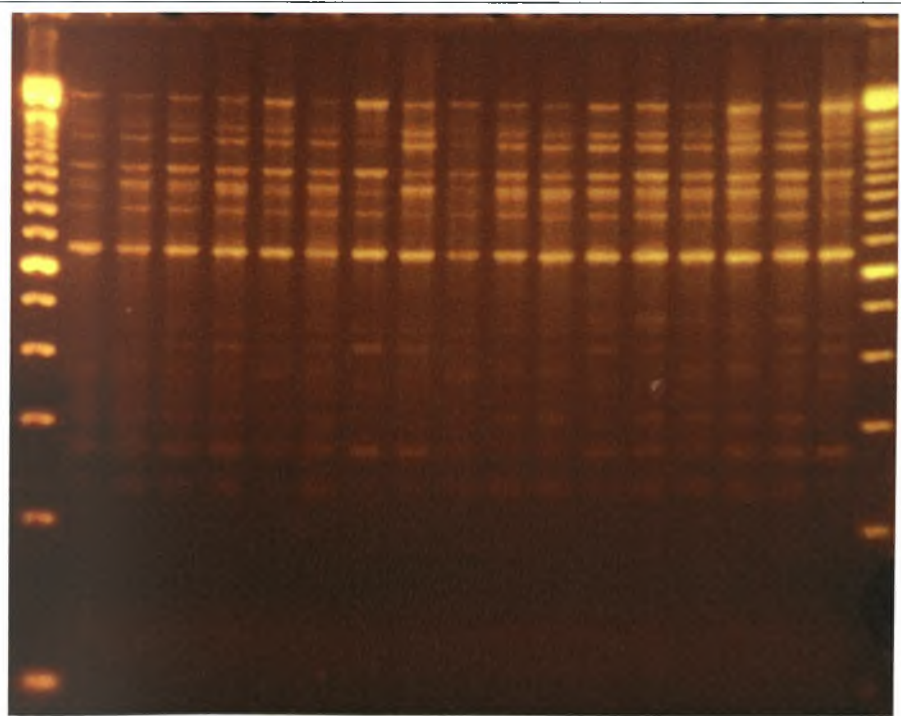
PCR Conditions	C	min	Cycles
Predenaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extansion	72	7	



Σειρά φόρτωσης δειγμάτων στα πηγαδάκια από αριστερά στα δεξιά	Γενότυπος Sample name
1	St-474
2	St-474 X HG-22
3	St-474 X LQ-20
4	St-474 X LQ-21
5	DP-50 X HQ-22
6	DP-50 X LQ-20
7	DP-50 X LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TMI
17	DP-50

RAPD 31/07/2010		MASTER MIX 1			
PCR Cotton					
				sample size=	19
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	Vol in µl for 1 rxn	(19) rxn
ds water H2O	µl			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPE-02	µM	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6µl	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/µl	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	µl	20		20,00	292,60

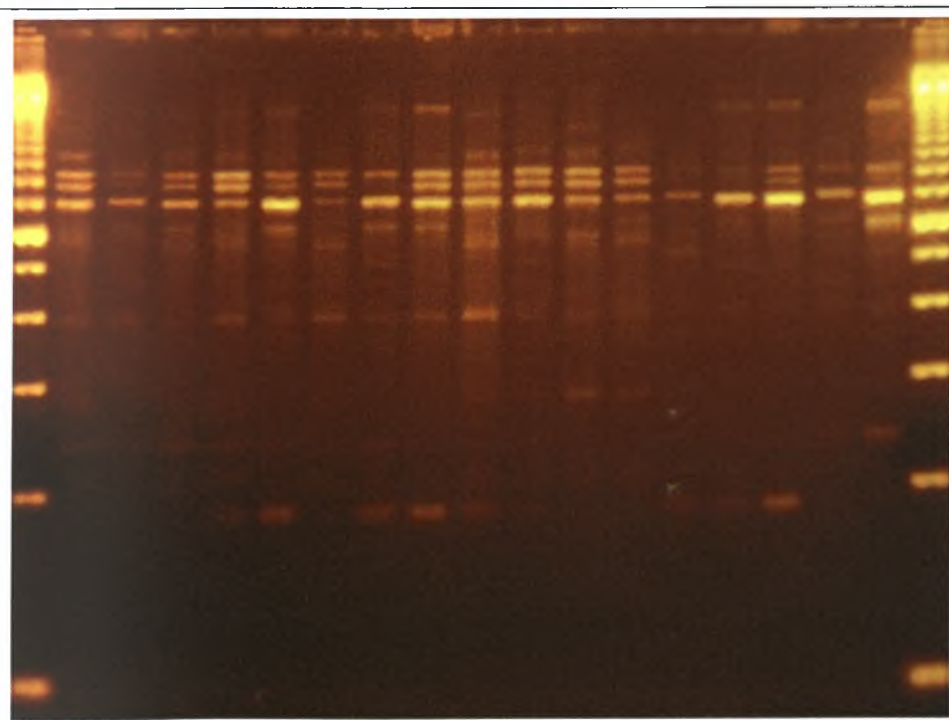
PCR Conditions	C	min	Cycles
Pre denaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extension	72	7	



Σειρά φόρτωσης δειγμάτων στα πηγαδάκια από αριστερά στα δεξιά	Γενότυπος Sample name
1	St-474
2	St-474 X HG-22
3	St-474 X LQ-20
4	St-474 X LQ-21
5	DP-50 X HQ-22
6	DP-50 X LQ-20
7	DP-50 X LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TM1
17	DP-50

RAPD 31/07/2010		MASTER MIX 2			
PCR Cotton					sample size= 19
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	Vol in µl for 1 rxn	(19) rxn
ds water H2O	µl			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPE-17	µM	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6µl	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/µl	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	µl	20		20,00	292,60

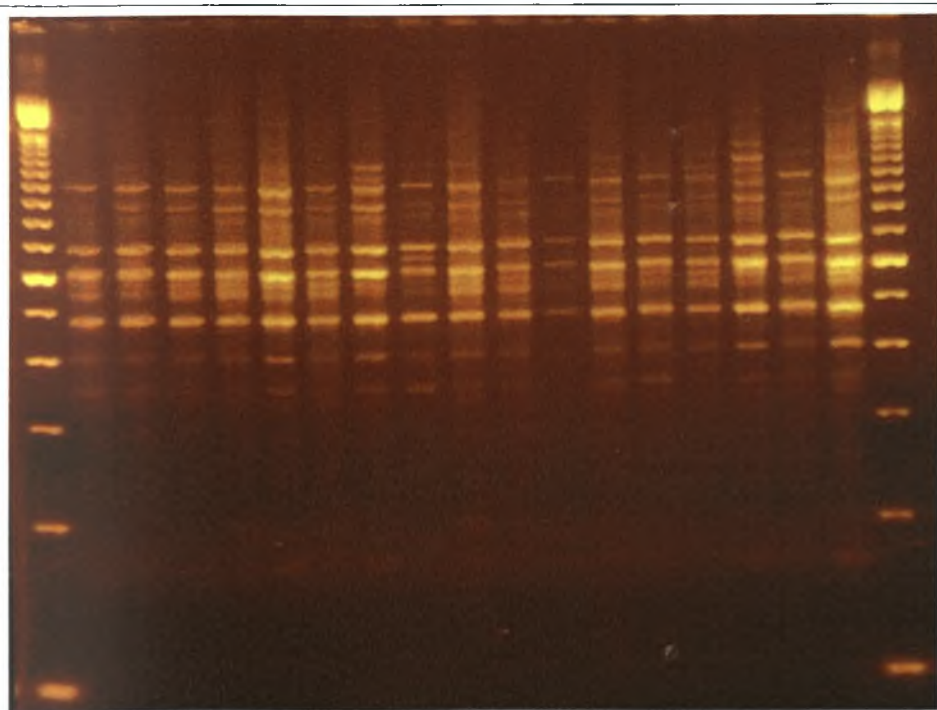
PCR Conditions	C	min	Cycles
Pre-denaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extension	72	7	



Σειρά φόρτωσης δειγμάτων στα πηγάκια από αριστερά στα δεξιά	Γενότυπος Sample name
1	St-474
2	St-474 X HG-22
3	St-474 X LQ-20
4	St-474 X LQ-21
5	DP-50 X HQ-22
6	DP-50 X LQ-20
7	DP-50 X LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TMI
17	DP-50

RAPD 31/07/2010		MASTER MIX 3			
PCR Cotton					
				sample size=	19
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	Vol in µl for 1 rxn	(19) rxn
ds water H2O	µl			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPJ-04	µM	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6µl	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/µl	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	µl	20		20,00	292,60

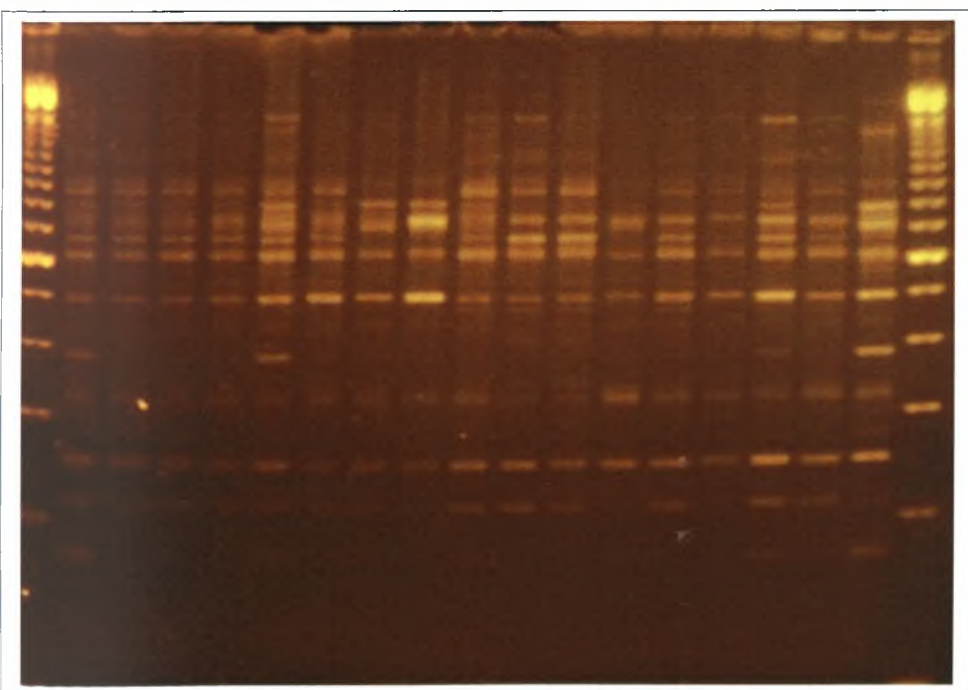
PCR Conditions	C	min	Cycles
Pre denaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extension	72	7	



Σειρά φόρτωσης δειγμάτων στα πηγαδάκια από αριστερά στα δεξιά	Γενότυπος Sample name
1	St-474
2	St-474 X HG-22
3	St-474 X LQ-20
4	St-474 X LQ-21
5	DP-50 X HQ-22
6	DP-50 X LQ-20
7	DP-50 X LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TMI
17	DP-50

RAPD 31/07/2010		MASTER MIX 4			
PCR Cotton					
				sample size=	19
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	Vol in µl for 1 rxn	(19) rxn
ds water H2O	µl			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPJ-06	µM	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6µl	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/µl	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	µl	20		20,00	292,60

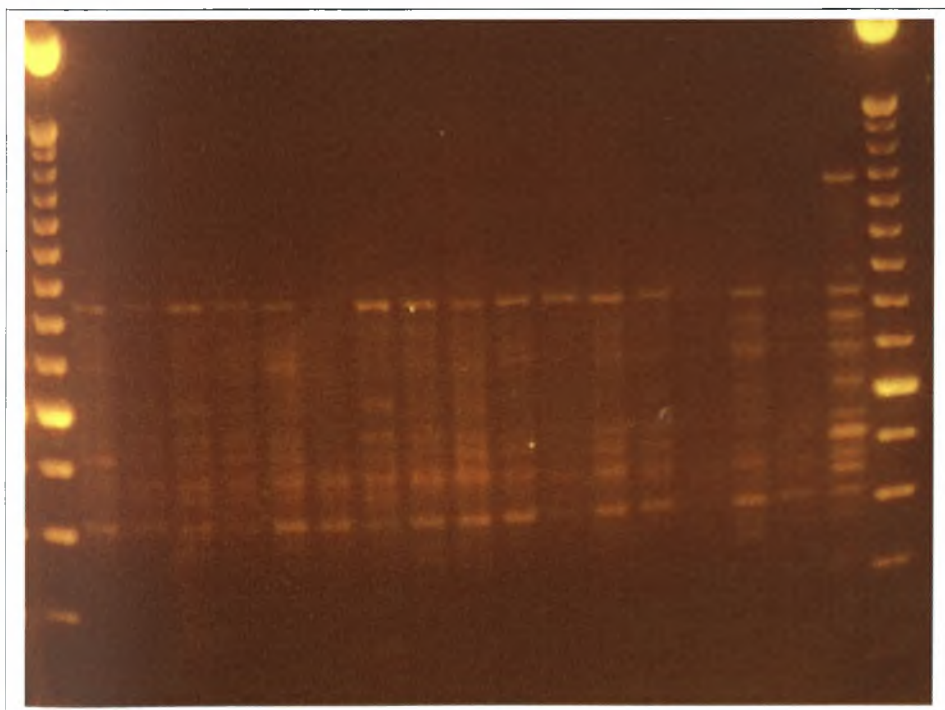
PCR Conditions	C	min	Cycles
Pre-denaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extension	72	7	



Σειρά φόρτωσης δεγμάτων στα πηγαδάκια από αριστερά στα δεξιά	Γενότυπος Sample name
1	St-474
2	St-474 X HG-22
3	St-474 X LQ-20
4	St-474 X LQ-21
5	DP-50 X HQ-22
6	DP-50 X LQ-20
7	DP-50 X LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TMI
17	DP-50

RAPD 31/07/2010		MASTER MIX 1			
PCR Cotton					sample size=
					19
Master Mix (MM)	UNIT	Original []	Final []	Vol in µl for 1 rxn	(19) rxn
ds water H2O	µl			1,80	37,62
PCR Buffer	X	10	1	2	41,80
dNTPs	mM	10	0,2	0,4	8,36
PRIMER OPA-08	µM	5,00	2	8,00	167,20
DNA	ng/6µl	25	25	6	
TAG RED HyTest DNA polymerase (catalogue No: 7TR1)	U/µl	5	2	0,4	8,36
MgCl2	mM	50	3,5	1,4	29,26
Total Volume	µl	20		20,00	292,60

PCR Conditions	C	min	Cycles
Pre-denaturation	95	7	35
Denaturation	94	1	
Annealing	36	1	
Extension	72	1:30	
Final extension	72	7	



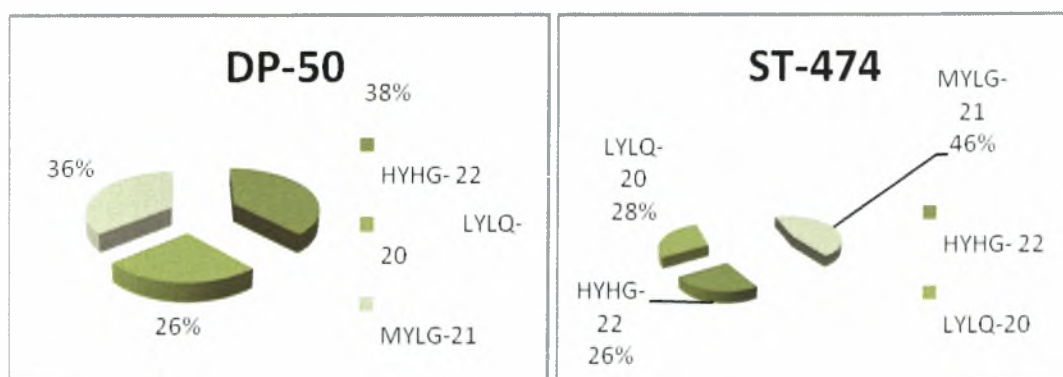
Σειρά φόρτωσης δειγμάτων στα πηγαδάκια από αριστερά στα δεξιά	Γενότυπος Sample name
1	St-474
2	St-474 X HG-22
3	St-474 X LQ-20
4	St-474 X LQ-21
5	DP-50 X HQ-22
6	DP-50 X LQ-20
7	DP-50 X LQ-21
8	HQ-22
9	LQ-21
10	P1
11	P2
12	P3
13	P4
14	P5
15	Pima
16	TMI
17	DP-50

6. Συμπεράσματα

Από την εκτίμηση της φυτρωτικής ικανότητας των 17 γενοτύπων, προέκυψε ότι το ποσοστό φυτρώματος βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Συγκεκριμένα, το ποσοστό φυτρώματος στο σύνολο, δεν ξεπερνούσε το 50%, ενώ το ποσοστό φυτρώματος μιας αξιόλογης εμπορικής ποικιλίας κυμαίνεται στο 90-95% .

Όσο αναφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, οι περισσότεροι γενότυποι παρουσίασαν υψηλή παραλλακτικότητα. Από το σύνολο των φυτών που εξετάστηκαν η εμπορική ποικιλία DP-50 και τα μερικώς διειδικά υβρίδια εμφάνισαν κυρίως τα τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του *G.hirsutum*. Αντιθέτως, η εμπορική ποικιλία St-474 εμφάνισε κυρίως τα τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του είδους *G.barbadense*. Επίσης, οι απόγονοι που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις μεταξύ των εμπορικών ποικιλιών και των διειδικών υβριδίων συνδύασαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και των δύο ειδών.

Από την εφαρμογή των διασταυρώσεων μεταξύ των εμπορικών ποικιλιών και των διειδικών υβριδίων προέκυψε ότι η συνδυαστική τους ικανότητα είναι ικανοποιητική. Συγκεκριμένα, ο επικονιαστής HQ-22 έδωσε 16/30 επιτυχείς διασταυρώσεις με την DP-50 ως μάνα, ενώ με την St-474 οι επιτυχείς διασταυρώσεις δεν ξεπέρασαν τις 9. Όσο αναφορά τον επικονιαστή LQ-20 έδωσε 11/30 επιτυχείς διασταυρώσεις με την DP-50 και 10/30 με την St-474. Σε γενικές γραμμές η συνδυαστική ικανότητα στο σύνολο των γονέων κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα.



Εικ.22. Απεικόνιση ποσοστών των επιτυχημένων διασταυρώσεων ανά μητρική ποικιλία .

Τέλος, οι δείκτες τύπου RAPD αν και παρουσίασαν μια σχετική ευαισθησία στις συνθήκες αντίδρασης, μπορούμε να πούμε ότι αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αξιόπιστοι για την περάτωση του πειράματος και εμφάνισαν υψηλή διακριτική ικανότητα. Στο σύνολο των εκκινητών που δοκιμάστηκαν, εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί. Έπειτα από αρκετές δοκιμές και αφού βελτιστοποιήσαμε τις συνθήκες αντίδρασης καταλήξαμε στους πιο πολυμορφικούς δείκτες, οι οποίοι είναι οι **OPE-02, OPE-17, OPI-04, OPI-07, OPJ-04, OPJ-06, OPC-19, OPC-11, OPC-13, OPB-16, OPB-17 και OPA-08**. Παρόλο που εντοπίστηκαν αρκετοί πολυμορφισμοί και ακολούθησε η δημιουργία του δενδρογράμματος φυλογενετικών σχέσεων, τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα. Μόνο λίγοι γενότυποι εμφάνισαν την αναμενόμενη γενετική συγγένεια η οποία βασίζεται στην γενεαλογία του φυτικού υλικού. Η πλειοψηφία των γενότυποι εμφάνισαν μεταξύ τους και σε αρκετά σημεία, ανεξήγητη γενετική συγγένεια. Η στενή γενετική σχέση μερικών γενοτύπων δεν επιβεβαιώνεται από τα μορφολογικά τους γνωρίσματα ή την αγρονομική τους συμπεριφορά. Η περίπτωση αυτών των γενοτύπων προτείνεται να εξεταστεί εκ νέου.

7.Περίληψη

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας αξιολογήθηκε η συνδυαστική ικανότητα μεταξύ εμπορικών ποικιλιών και διειδικών υβριδίων βαμβακιού και εφαρμόστηκαν μοριακοί δείκτες τύπου RAPD για την γενετική ανάλυση τόσο των μητρικών ποικιλιών όσο και των απογόνων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η εγκατάσταση του πειράματος στον αγρό τηρώντας όλες τις απαραίτητες καλλιεργητικές φροντίδες κατά την διάρκεια του έτους 2008-2009. Στα διάφορα στάδια ανάπτυξης των φυτών λαμβάνονταν μετρήσεις και παρατηρήσεις όσο αναφορά την φυτρωτική ικανότητα και κυρίως είχαν σαν αντικειμενικό σκοπό τη συλλογή πληροφοριών για την αναγνώριση των φαινοτύπων που διέθεταν χαρακτηριστικά του *G. hirsutum*, *G. barbadense* ή συνδυασμό των δυο αυτών ειδών. Ακολούθησε η εφαρμογή των διασταυρώσεων (ξεκίνησαν 22/07/2008 και ολοκληρώθηκαν 10/08/2008) και πρέπει να αναφέρουμε ότι η όλη διαδικασία γίνεται μόνο κατά τις πρώτες πρωινές ώρες έτσι ώστε να αποφύγουμε τυχόν φυσικές επικονιάσεις (έντομα). Επίσης η επιλογή των ανθών γίνεται όταν αυτά βρίσκονται στο στάδιο της κορώνας. Στην συνέχεια, περιλάβαμε τους καρπούς-σπόρους που πρόεκυψαν από τις επιτυχείς διασταυρώσεις (απογόνους) και πραγματοποιήσαμε νέα σπορά στον χώρο του εργαστηρίου και μέσα σε Jiffy pellets.

Έχοντας στην διάθεση μας φυτικό υλικό τόσο από τους γονείς όσο και από τους απογόνους των διασταυρώσεων ξεκίνησε η γενετική ανάλυση με χρήση μοριακών δεικτών. Αρχικά απομονώθηκε το γενετικό υλικό των 17 γενοτύπων σύμφωνα με την CTAB μέθοδο για απομόνωση ολικού DNA και ακολούθησε η πέψη RNA (remove RNA) για να βελτιώσουμε την ποιότητα του γενετικού μας υλικού. Για την βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης κρίθηκε αναγκαίος ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA των δειγμάτων και των εκκινητών με χρήση του Nanodrop.

Η ανάλυση κατά RAPDs αποδείχτηκε ιδιαίτερα αξιόπιστη για το γενετικό υλικό του πειράματος και εμφάνισαν υψηλή διακριτική ικανότητα. Έπειτα από αρκετές δοκιμές και αφού βελτιστοποιήσαμε τις συνθήκες αντίδρασης καταλήξαμε στους πιο πολυμορφικούς δείκτες, οι οποίοι είναι οι **OPE-02, OPE-17, OPI-04, OPI-07, OPJ-04, OPJ-06, OPC-19, OPC-11, OPC-13, OPB-16, OPB-17 και OPA-08**. Πολυμορφισμοί ανιχνεύτηκαν μόνο σε 12 εκκινητές. Συγκεκριμένα μόνο 10 εκκινητές ενίσχυσαν ζώνες και παρουσίασαν πολυμορφισμούς και στους 17

γενότυπους βαμβακιού. Επίσης, παρατηρήθηκαν 307 ζώνες και οι πολυμορφισμοί που κατεγράφησαν φτάνουν τους 34.

Τέλος, ακολούθησε η δημιουργία του δενδρογράμματος φυλογενετικών σχέσεων. Μόνο λίγοι γενότυποι εμφάνισαν την αναμενόμενη γενετική συγγένεια η οποία βασίζεται στην γενεαλογία του φυτικού υλικού. Η πλειοψηφία των γενότυποι εμφάνισαν μεταξύ τους και σε αρκετά σημεία, ανεξήγητη γενετική συγγένεια. Η στενή γενετική σχέση μερικών γενοτύπων δεν επιβεβαιώνεται από τα μορφολογικά τους γνωρίσματα ή την αγρονομική τους συμπεριφορά. Η περίπτωση αυτών των γενοτύπων προτείνεται να εξεταστεί εκ νέου.

8. Βιβλιογραφία

♣ Ξένη βιβλιογραφία

- Arús P, Moreno-González J (1993) Marker-assisted selection. In: Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa I (eds) Plant breeding. Principles and prospects. Chapman & Hall, London, pp 314–331.
- Acquaaah, G. (2007) Principles of Plant Genetics And Breeding.
- Barrow, J. R. and Chaudhari, H. K. A homozygous interspecific F2 hybrid of *Gossypium barbadense* X *Gossypium hirsutum* via the semigametic haploid method. Crop Sci. 16:441-442. 1976.
- Barrow, J. R., Katterman, F. and Williams, D. Haploid and diploid callus from cotton anthers. Crop Sci. 18:619-622. 1978.
- Basu, A.K and R.S. Paroda (1995) 'Hybrid Cotton in India: A Success Story', Asia-Pacific Association of Agricultural Research Institutions, Bangkok.
- Bowman DT (2000) Attributes of public and private cotton breeding programs. J Cotton Sci 4:130–136.
- Bilbro, J.D. (1961). Comparative effectiveness of three breeding methods in modifying coarseness of cotton fiber. Crop Sci. 1:313-316.
- Chaudhry, M.R. 1997b. Commercial cotton hybrids. The Int. Cotton Advisory Committee Recorder XV(2):3–14.
- Chee, P. W and B. Todd Campbell. 2009. Bridging Classical and Molecular Genetics of Cotton Fiber Quality and Development. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 3.
- Cook, O.F. 1909. Supressed and Intensified Characters in Cotton Hybrids. U.S. Dept. Agr. Bur. Pl. Ind. Bull. 147, 27 pp.

- Culp, T.W., and C.C. Green. 1992. Performance of obsolete and current cultivars and Pee Dee germplasm lines of cotton. *Crop Sci.* 32:35–41.
- Dever, J., (2004). *Cotton Breeding: Approaches to Germplasm Improvement*.
- Davis, D. D. 1978. Hybrid cotton: Specific problems and potentials. *Adv. Agron.* 30: 129-157.
- Edwards K, Johnstone C, and Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acid Res* 19: 1349.
- Endrizzii, J. E., E. L. Turcotte and R. J. KOHEL, 1985 Genetics, cytology, and evolution of *Gossypium*. *Adv. Genet.* 23: 271–375.
- Endrizzii, J.E., Ramsay G. (1979). Monosomes and telosomes for 18 of 26 chromosomes of *Gossypium hirsutum*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 21:531-536.
- Fonseca Prada LA (2009a). Balance y perspectivas del cultivo, Evaluación Valledupar (CONALGODON harvest evaluation conference presentation), 5 June 2009.
- Fehr WR (1991) *Principles of cultivar development. Volume 1: Theory and technique*. Macmillian Publishing Company, New York.
- Fryxell PA. 1979. The natural history of the cotton tribe. *College Station, Texas, USA: Texas A & M University Press*.
- Galanopoulou-Sendouca, S., Roupakias, D., 1999. Performance of cotton F1 hybrids and its relation to the mean yield of advanced bulk generations. *Eur. J. Agron.* 11, 53–62.
- Gerstel, D. U. (1953) . Chromosomal translocations in interspecific hybrids of the genus *Gossypium*. *Evolution* 7, 234-244.

- Gulati, A. N.; A. J. Turner (1928). *A Note on the Early History of Cotton*. Bombay: Indian Central Cotton Committee, Technological Laboratory. OCLC: 32976759.
- Guo W, Sun J, Zhang T. Gene cloning and molecular breeding to improve fiber qualities in cotton. *Chin Sci Bull*, 2003, 48: 709—717.
- Harlan, J.R. 1975. Geographic patterns of variation in some cultivated plants. *J. Heredity* 66:182-191.
- Hernández P, Martín A, Dorado G. Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. *Mol Breed*. 1999;5(3):245–253. doi: 10.1023/A:1009637928471.
- Hutchinson, J.B., Silow, R.A., and Stephens, S.G. 1947. *In* "The evolution of *Gossypium* and the differentiation of the cultivated cottons". Oxford University Press, London.
- Hoffman, Volker, Kirstan Probst, and Anja Christinck. 2007. Farmers and researchers: How can collaborative advantages be created in participatory research and technology development. *Agriculture and Human Values* 24:355-368.
- James, C. 2002. Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 2001 Feature: Bt cotton. *ISAAA Brief* 26: 1-184.
- Kantartzi, S.K., M. Ulloa, E. Sacks and J.M. Stewart, 2009. Assessing genetic diversity in *Gossypium arboreum* L. cultivars using genomic and EST-derived microsatellites. *Genetica*, 136: 141-147.

- Khadi, B.M., V. Santhy, and M.S. Yadav. 2010. Cotton : An introduction. Biotechnology in Agriculture and Forestry 65. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Khan, I.A., F.S. Awan, A. Ahmad and A.A Khan. 2004. A modified mini-prep method for economical and rapid extraction of genomic DNA in plants. *Plant Mol. Bio. Reporter*, 22: 89a-89c.
- Kohel, R.J., Endrizzi J.E., White T.G (1977). An evolution of *Gossypium barbadense* L. chromosomes 6 and 17in the *G.hirsutum* L. genome. *Crop Sci.* 17:404-406.
- Kowsalya, R. and T.S. Raveendran, 1996. Heterosis in intra-specific *Gossypium* Hybrids Possessing *harknessii* and *hirsutum* plasmones. *Anl. Pl. Physiol.*, 10: 114-117.
- Lewis, C.F. (1956).Cotton Breeding Methods. In : Proc.cotton improvement Conf., Atlanta, Ga.
- Lewis, C. F. and E. F. McFarland (1951). The Transmission of Marker Genes in Intraspecific Backcrosses of *Gossypium Hirsutum* L. *Genetics.* July; 37(4): 353–358.
- Lukonge, E., M.T. Labuschagne, and A. Hugo. 2007. The evaluation of oil and fatty acid composition in seed of cotton accessions from various countries. *J. Sci. Food Agric.* 87:340–347. Nergiz, C., H. Yalçın, and H. Yildiz.
- Litt, M. and Luty, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of nucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Amer.J. Hum. Genet.*, 44: 397-401.
- Mahill, J.F. 1983. Registration of eight germplasm lines of cotton (Reg. Nos. GP 210 to GP 217). *Crop Sci.* 23:653-660.

- Mavromatis AG, Kantartzi SK, Vlachostergios DN, Xynias IN, Skarakis GN, Roupakias (2005) Induction of embryo development and fixation of partial Interspecific lines after pollination of F1 cotton interspecific hybrids (*Gossypium barbadense* · *Gossypium hirsutum*) with pollen from *Hibiscus cannabinus*. Aust J Agric Res (accepted Volume 10, October 2005).
- Mavromatis AG, Roupakias DG (1995) Haploid production via intergenetic pollination and inovule culture in cotton (*Gossypium* spp.). Proceedings 2nd meeting of the WG Cotton biotechnology of the FAO-Int. cooperative res network on cotton, 31st March and 1st April 1995, Thessaloniki, Greece, pp.179–184.
- Mavromatis AG, Roupakias DG (1994) Biotechnology: A hope for a partial interspecific hybrid in cotton (*Gossypium* spp.). In: Peeters MC (ed) Cotton biotechnology. Proceedings of a meeting of the working group on cotton biotechnology. Leuven, Belgium, 22–23 October 1993. FAO, Rome, 1994. FAO-Technical Series 32:29–36.
- Meredith, W.R., Jr. 2000. Cotton yield progress-why has it reached a plateau? (U.S. Cotton Belt). Better Crops 84:6–9.
- Meredith, W.R., Jr. 2002. Factors that contribute to lack of genetic progress. *In Proc. Beltwide Cotton Conf., Atlanta, GA. 8-12 Jan. 2002. Natl. Cotton Counc. Am., Memphis, TN. Available online at <http://www.cotton.org/beltwide/proceedings/getPDF.cfm?year=2002&paper=C002.pdf> Accessed Jan. 19, 2004.*
- Miller, P. A. and J. O. Rawlings. 1967. Selection for increased lint yield and correlated responses in upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. Crop Sci. 7: 637-640.

- Meredith Jr., W.R. and Bridge, R.R. (1971). Break up of linkage blocks in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Crop Science* 11, 695-698.
- Meredith Jr., W.R. and Bridge, R.R. (1973). Yield, yield components and fibre property variation of cotton within and among environments. *Crop Science* 13 (3), 307-312.
- Mei M., Syed N.H., Gao W., Thaxton P.M., Smith C.W., Stelly D.M., and Chen Z.J., 2004, Genetic mapping and QTL analysis of fibre-related traits in cotton (*Gossypium*), *Theor. Appl. Genet.*, 108: 280-291.
- Mell P. H. 1894. Experiments in crossing for the purpose of improving the cotton fiber. *Ala. Agr. Expt. Sta. Bul.* 56, 47 pp.
- Meredith, W. R., Jr. 1990. Yield and fiber-quality potential for second generation cotton hybrids. *Crop Sci.* 30:1045-1048.
- Morse, S., Bennett, R., Ismael, Y. 2004. Why Bt Cotton Pays for Small-Scale Producers in South Africa. *Nature Biotechnology.* 22(4): 379-380.
- Newman, L.H. (1912) *Plant Breeding in Scandinavia.* Canadian Seed Growers Association, Ottawa.
- Niles G.A. and Feaster C.V. (1984). Breeding. In R.J. Kohel and C.F. Lewis (Ed.) *cotton.* Agron 24. USA, CSSA, Madison, WI.
- Olvery, J.M., 1986. Performance and potential of F2 hybrids. *In:* Nelson, T.C. (ed.), *Beltwide Cotton Proc. Research Conference Las Vegas*, pp: 101–2. N.V. 4-9 January 1986. National Cotton council of America, Memphis, T.N.
- Pan, S., D., Hudson, D., Enthridge, M. Mutuc and M. Fadiga (2008). TEXTILE ECONOMIC ADJUSTMENT ASSISTANCE: WILL IT AFFECT COTTON MARKETS?

- Panhwar, G.N., A.R. Soomro, R. Anjum, S.B. Babar, A.M. Memon and A.W. Soomro. 2002. Predicting Earliness in Cotton during Crop Development Stage-11. *Asian J. Plant Sci.*, 1: 37-38.
- Paran, I. and R. W. Michelmore, 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993.
- Powell, W., Thomas, W.T.B., Baird, E., Lawrence, P., Booth, A., Harrower, B., McNicol, J.W., and Waugh, R. 1996b. Analysis of quantitative traits in barley by the use of amplified fragment length polymorphisms. *Heredity*, 79: 48–59.
- Peng W. Chee and B. Todd Campbell. (2009). Bridging Classical and Molecular Genetics of Cotton Fiber Quality and Development.
- Rafalski, J.A., and Tingley, S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9: 275–280.
- Reinisch, A., J.-M. Dong, C. Brubaker, D. Stelly, J. Wendel *et al.*, 1994 A detailed RFLP map of cotton (*Gossypium hirsutum* x *G. barbadense*): Chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. *Genetics* 138: 829-847.
- Riebe, J. F. 1999. The development and implementation of strategies to prevent resistance to Bt-expressing crops: an industry perspective. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21 (2), 101-105.
- Roupakias DG, Gouli-Vavdinoudi E, Koutsika-Sotiriou M, Galanopoulou S, Mavromatis AG (1998) “Heterosis in Cotton” In: Bajaj YSP (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 42. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 140–172.

- Saha S., Wu J., Jenkins J.N., McCarty J.C., Stelly D.M., Percy R.G., Raska D.A., and Gutierrez A. O. 2004. Effect of chromosome substitutions from *Gossypium barbadense* L. 3-79 into *G. hirsutum* L. TM-1 on agronomic and fiber traits. *J. Cotton Sci.* 8:162-169 [Online]. Available at <http://www.cotton.org/journal/2004-08/3/162.cfm>.
- Sambamurthy JSV, Reddy DM, Reddy KHG (1995) Genetic variability, association and path analysis in cotton. *J Indian Soc Cotton Improv* 20(2):133–137.
- Stewart, J.M. 1991. *Biotechnology of Cotton: Achievements and Perspectives*. ICAC Review Articles on Cotton Production Research No: 3, 56 pages, USA.
- Trolinder, N. L.; Goodin, J. R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Plant Cell Rep.*6:231±234; 1987.
- Trolinder, N.L., and J.R. Goodin. 1988b. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). II. Requirements for embryo development and plant regeneration. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 12:43–53.
- Turcotte, E.L., Feaster C.V (1967). Semigamy in Pima cotton. *J. Hered.* 58:55-57.
- Turcotte, E.L., Feaster C.V (1969). Semigametic production of haploids in Pima cotton. *Crop Sci.* 9:653-655.
- Umbeck P, Johnson G, Barton K, and Swain W (1987) Genetically transformed cotton plants. *Biotechnology* 5: 263-266.
- Valderrama, C. 2004. Fifth year of record consumption. Cotton: review of the world situation. *International Cotton Advisory Committee.* 58:10-12. CD ROM available at <http://www.icac.org/members/login.lasso>.

- Wendel JF, Cronn RC. 2003. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Advances in Agronomy* 78: 139–186.
- White TG, Richmond TR, Lewis CF (1967) Use of cotton monosomes in developing interspecific substitution lines. *Crops Research, ARS* 34–91. pp 3–15.
- Wu , K. , Feng , H. & Guo , Y . (2004) Evaluation of maize as a refuge for management of resistance to Bt cotton by *Helicoverpa armigera* (Hübner) in the Yellow River cotton-farming region of China . *Crop Protection* , 23 , 523-530 .
- Zhang, J.,W.-Z. Guo&T.-Z. Zhang, 2002. Molecular linkage map of allotetraploid (*Gossypium hirsutum* L. × *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population. *Theor Appl Genet* 105: 1166–1174.

♣ Ελληνική βιβλιογραφία

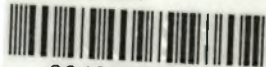
- Γανόπουλος, Ι. (2005). Από την πτυχιακή διατριβή: Ανασκόπηση μεθόδων δημιουργίας γενετικών χαρτών στο βαμβάκι (*Gossypium spp*) και εφαρμογή μοριακής γενετικής ανάλυσης με χρήση δεικτών τύπου RAPD's.
- Δαμιανίδου, Γ. (2006). Από την μεταπτυχιακή διατριβή: Εκτίμηση της γενοτυπικής σταθερότητας και αξιολόγηση της παραγωγικής συμπεριφοράς και των χαρακτηριστικών ποιότητας σε διπλοειδές σειρές βαμβακιού.
- Κατέβα, Γ. (2006). Από την μεταπτυχιακή διατριβή : Αξιολόγηση ανευπλοειδών και διαπλειδών σειρών βαμβακιού στον αγρό και γενετική ανάλυση με χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPD.
- Καλτσίκης, Π.Ι. (1970). Ειδική βελτίωση φυτών. Εκδόσεις Σταμούλης, Πειραιάς.
- Μαυρομάτης, Α.Γ (1996). Από την πτυχιακή διατριβή : Αναγέννηση in vitro και σωμακλωνική παραλλακτικότητα στο βαμβάκι (*Gossypium spp*).
- Σκαράκης, Γ. Ν. (2005). Κλασική και μοριακή βελτίωση φυτών. Σημειώσεις στα πλαίσια μεταπτυχιακών σπουδών.
- Φανουράκης, Ν. (2005). Γενετική βελτίωση φυτών. Εκδόσεις "ΙΩΝ".

♣ Ηλεκτρονικές διευθύνσεις

1. http://www.fas.usda.gov/pecad2/highlights/2002/04/greece_apr02/index.htm
2. http://www.spinningtheweb.org.uk/images/industry/c_map1.gif
3. http://www.stratfor.com/memberships/117775/analysis/brazil_cotton_sanctions_s_could_create_larger_aftershocks_u_s
4. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/genus.pl?5113>
5. <http://blass.com.au/definitions/gossypium>
6. <http://www.tropicaflore.com/boutique/contents/fr/d882.html>
7. <http://florabase.calm.wa.gov.au/browse/profile/4910>
8. <http://www.growsonyou.com/bernieh/blog/11723-it-s-the-first-day-of-spring-downunder-and-it-s-our-national-wattle-day>
9. <http://www.swsbm.com/homepage/NameIndexAC.html>
10. http://www.gmocompass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/343.genetically_modified_cotton_global_area_under_cultivation.html
11. <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/malv.htm>
12. <http://www.calhortsociety.org/seed-exchange/seed-exchange-2007/seeds2007.html>
13. <http://www.malvaceae.info/Genera/Gossypium/gallery.html>
14. http://www.science20.com/humboldt_fellow_and_science/molecular_marks
15. <http://www.bcm.edu/mcfweb/index.cfm?pmid=3097>



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000106746