



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διειδικός υβριδισμός στο βαμβάκι μέσω βιοτεχνολογικών μεθόδων



Μονογιός Γρηγόρης

ΒΟΛΟΣ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διειδικός υβριδισμός στο βαμβάκι μέσω βιοτεχνολογικών μεθόδων

ΜΟΝΟΓΙΟΣ ΓΡΗΓΟΡΗΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων
Ιμπραχίμ Αβραάμ Χα (Καθηγητής)
Μέλος
Μαυρομάτης Αθανάσιος (Επίκουρος Καθηγητής)
Μέλος
Γούναρης Ιωάννης (Καθηγητής)

ΒΟΛΟΣ 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να απευθίνω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ για την ανάθεση του θέματος της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ευχαριστίες ακόμη απευθύνω στον κ. Μαυρομάτη Αθανάσιο Καθηγητή της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στον κ. Γούναρη Ιωάννη Καθηγητή της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την συνεργασία και την καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής.

Η υλοποίηση αυτής της πτυχιακής διατριβής θα ήταν αδύνατη χωρίς στην ηθική υποστήριξη των γονιών μου στους οποίους εκφράζω μέγιστες ευχαριστίες.

Θα ήταν παράλειψη μου να αν δεν ευχαριστούσα όσους μου συμπαραστάθηκαν αλλά και όσους δεν μου συμπαραστάθηκαν γιατί έγιναν αφορμή για να προσπαθήσω περισσότερο.

Περίληψη

Η καλλιέργεια πρωτοπλαστών είναι μια εναλλακτική μέθοδος για βελτίωση του γενώματος του βαμβακιού. Σε αυτή την εργασία αξιολογούνται οι πρωτοπλάστες προερχόμενων από διαφορετικές ποικιλίες βαμβακιού του γένους *Gossypium* καθώς και συγγενών ειδών που ανήκουν στην οικογένεια *Malvaceae* (*Abelmoschus esculentum*, *Hibiscus cannabinus*) ως προς την απομόνωση και την καλλιέργεια, με την χρήση τριών των πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων πρωτοκόλλων σήμερα πάνω στην απομόνωση πρωτοπλαστών στο βαμβάκι. Επίσης για ακαδημαϊκούς λόγους έγινε και σύντηξη πρωτοπλαστών ανάμεσα σε 2 διαφορετικές ποικιλίες βαμβακιού.

Από τα δεδομένα του πειράματος, μεγαλύτερο ρυθμό εδραίωσης του κάλλου φαίνεται να είχαν οι ποικιλίες με την εμπορική επωνυμία Fibermax® και να ακολουθούν οι ποικιλίες Deltapine® και Stoneville®. Ενώ παράλληλα παρουσιάζεται μια αρνητική συσχέτιση της συγκέντρωσης γκοσσυπόλης στα έκφυτα ως προς τον ρυθμό εδραίωσης του κάλλου. Συγκεντρώσεις ορμονών στο υπόστρωμα των 1 mg 2.4D και 2 mg KIN έδειξαν τον μεγαλύτερο ρυθμό αντίδρασης του εκφύτου ως προς το υπόστρωμα. Ενώ αν τα έκφυτα παραμείνουν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα στην ιστοκαλλιέργεια παρουσιάζονται εκκρίσεις φαινολικών ουσιών από τα έκφυτα στο καλλιεργητικό μέσο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	9
2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	9
2.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	15
2.3. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	15
2.3.1. Ρίζα	16
2.3.2. Βλαστοί	16
2.3.3. Φύλλα	17
2.3.4. Άνθη	17
2.3.5. Επικονίαση	18
2.3.6. Αυτεπικονίαση ή σταυροεπικονίαση	19
2.3.7. Γονιμοποίηση	19
2.3.8. Ανθόρροια και καρπόρροια	19
2.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΑ ΕΙΔΗ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	20
2.5. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	22
2.5.1. Εξέλιξη Βαμβακιών του Παλαιού Κόσμου	23
2.5.2. Εξέλιξη Βαμβακιών του Νέου Κόσμου	24
2.6. ΆΛΛΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ MALVACEAE	25
2.6.1 Μπάμια (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	25
2.6.2 Κενάφ (<i>Hibiscus cannabinus</i>)	26
2.7. ΟΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΙ ΦΡΑΓΜΟΙ	27
2.7.1. Μέτρα για να ξεπεραστούν οι αναπαραγωγικοί φραγμοί	32
2.8.ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΣΤΟ ΒΑΜΒΑΚΙ	36
2.8.1. Γενικά	36
2.8.2. Μέθοδοι βελτίωσης του βαμβακιού	36

2.9. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	39
2.9.1. Γενικά	39
2.9.2. Ταξινόμηση με βάσει των ειδών που συμμετέχουν στη διασταύρωση	40
2.9.2.1. Ενδοειδικά υβρίδια βαμβακιού	41
2.9.2.2. Διεϊδικά υβρίδια βαμβακιού	41
2.9.3. Ταξινόμηση με βάση το επίπεδο πλοειδίας	42
2.9.3.1. Τετραπλοειδή υβρίδια βαμβακιού	42
2.9.3.2. Διπλοειδή υβρίδια βαμβακιού	42
2.9.4. Ταξινόμηση με βάση τη μέθοδο παραγωγής σπόρου των υβριδίων	43
2.9.4.1. Συμβατικά υβρίδια βαμβακιού	43
2.9.4.2. Αρρενόστειρα υβρίδια βαμβακιού	43
2.9.5. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των υβριδίων	44
2.10. <i>IN VITRO</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	45
2.10.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ιστοκαλλιέργεια	45
2.10.2 Εφαρμογές της <i>in vitro</i> καλλιέργειας	46
Α. Μικροπολλαπλασιασμός	
Β. Διατήρηση του γενετικού υλικού	
Γ. Κρυοδιατήρηση	
Δ. Δημιουργία σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας	
Ε. Καλλιέργεια εμβρύων	
ΣΤ. Παραγωγή Απλοειδών και διαπλοειδών φυτών	
Ζ. <i>In vitro</i> υβριδοποίηση	
Η. Παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών	
2.11. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ	52
2.11.1 Θρεπτικοί παράγοντες	53
2.11.2 Ωσμωτικό μέσο (Osmoticum)	54
2.11.3 Συγκέντρωση πρωτοπλαστών στο καλλιεργητικό μέσο	55
2.11.4 Αναγέννηση πρωτοπλαστών	55
2.12. Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ ΣΤΟ ΒΑΜΒΑΚΙ	57
2.12.1 Στόχοι της καλλιέργειας πρωτοπλαστών	57
2.12.2 Πρόσφατα επιτεύγματα	58
2.13. ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	60

2.14. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΞΗ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ ΣΤΟ ΚΕΝΑΦ	62
2.15. Η ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΛΛΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΜΠΑΜΙΑ	63
2.16. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	65
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	66
3.1. Γενετικό υλικό	66
3.2. Πείραμα 1 (Πρωτόκολλο WO/2001/000785)	66
3.3. Πείραμα 2: Πρωτόκολλο Xi Ynag et al. (2007) [Production and characterization of asymmetric hybrids between upland cotton Coker 201 (<i>Gossypium hirsutum</i>) and wild cotton (G. klotzschianum Anderss)]	70
3.4. Πείραμα 3: Πρωτόκολλο Kumria et al. (2003) [High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (<i>Gossypium hirsutum</i>) through metabolic stress]	78
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	80
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	99
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το βαμβάκι (*Gossypium* sp.) αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή σε υφαντική ίνα παγκοσμίως, αλλά επίσης και μια σημαντική πηγή λαδιού. Από τα τέσσερα εξημερωμένα είδη δυο από αυτά χρησιμοποιούνται στη βαμβακοκαλλιέργεια, το *G.hirsutum* το οποίο αποτελεί περίπου το 90% της παγκόσμιας παραγωγής σε ίνες βαμβακιού και το *G. barbadense*, που αναφέρεται συνήθως ως μακρόνιο βαμβάκι, το οποίο παρέχει περίπου το 8% της ίνας παγκοσμίως.

Μια συνεχόμενη έρευνα ήταν απαραίτητη για να βελτιωθεί η ποιότητα των ινών του βαμβακιού, για να διατηρηθεί το βαμβάκι σε ανταγωνιστικά επίπεδα. Οι εντατικές προσπάθειες της κλασσικής βελτίωσης, είχαν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υψηλοαποδοτικών και εξαιρετικής ποιότητας ποικιλιών βαμβακιού. Παρόλο αυτά, υπάρχει ακόμη ένα τεράστιο γενετικό απόθεμα που περιμένει να εκμεταλλευθεί στην φύση, όμως η περεταίρω βελτίωση στο βαμβάκι μέσω του υβριδισμού είναι ιδιαίτερα δύσκολη, λόγω της ασυμβατότητας μεταξύ των ειδών.

Εναλλακτικές μέθοδοι για την μεταφορά γονιδίων, όπως το γονιδιακό πιστόλι και η καλλιέργεια πρωτοπλάστων έχουν υψηλές προσδοκίες. Οι πρωτοπλάστες θεωρούνται ιδανικό μέσο για την μεταφορά γονιδίων λόγω του ότι το κυτταρικό τοίχωμα αφαιρείται, άρα δεν είναι πλέον φυσικός φραγμός, έτσι το πλασμαλύμμα είναι πιο επιδεκτικό σε επιδράσεις. Από τους πρωτοπλάστες έχουμε την ικανότητα της παραγωγής μη χιμαιρικών φυτών από μόνο ένα κύτταρο και στην επιλογή κλώνων με νέα χαρακτηριστικά μέσω της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας.

2.ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

2.1 Ιστορική αναδρομή του βαμβακιού

Υπάρχουν άμεσες και σίγουρες ενδείξεις που φαίνεται ότι το βαμβάκι ήταν γνωστό και καλλιεργούνταν από αρχαιοτάτων χρόνων, αλλά ο τόπος καταγωγής του παραμένει μέχρι σήμερα άγνωστος. Όμως σχετικές έρευνες αποκαλύπτουν, ότι το βαμβάκι πρωτοαναπτύχθηκε σε δυο ανεξάρτητες απομακρυσμένες περιοχές, η μια στο παλαιό κόσμο στην Ινδία και η άλλη στο νέο κόσμο στην Αμερική.

Τα πρώτα στοιχεία ότι ο άνθρωπος καλλιεργούσε βαμβάκι στο παλαιό κόσμο, προέρχονται από τα αρχαιολογικά ευρήματα του Mohenjo-Daro στη κοιλάδα του Ινδού ποταμού στο Πακιστάν (από λείψανα υφάσματος και σκονιών από βαμβάκι), τα οποία χρονολογούνται από το 3000 π.Χ. και αναφέρονται στην καλλιέργεια του είδους *Gossypium arboreum*. Στο νέο κόσμο, το *Gossypium hirsutum* φαίνεται ότι ήταν ήδη γνωστό από το 3500 π.Χ. στην κοιλάδα Tehuacan του Μεξικού, ενώ το *Gossypium barbadense* από το 2500 π.Χ. στις ακτογραμμές του Περού.

Πλείστες γραπτές αναφορές έχουν βρεθεί που αναφέρουν το βαμβάκι. Πρώτη αναφορά μεταξύ αυτών, γίνεται στο θρησκευτικό Ινδικό βιβλίο Rig Veda που χρονολογείται γύρω στο 1500 π.Χ. όπως και στο ιερό βιβλίο «Νόμοι του Manu» που γράφτηκε το 800 π.Χ. όμως αναφορές γίνονται και από Έλληνες συγγραφείς με πρώτο τον Ηρόδοτο και αργότερα τον Θεόφραστο, οι οποίοι περιγράφουν το φυτό και την καλλιέργεια του στην Ινδία. Ενώ ο Αρριανός (95-180 μ.Χ.) αναφέρει το εμπόριο βαμβακερών υφασμάτων από τους Άραβες στην Ινδία και την Αίγυπτο.

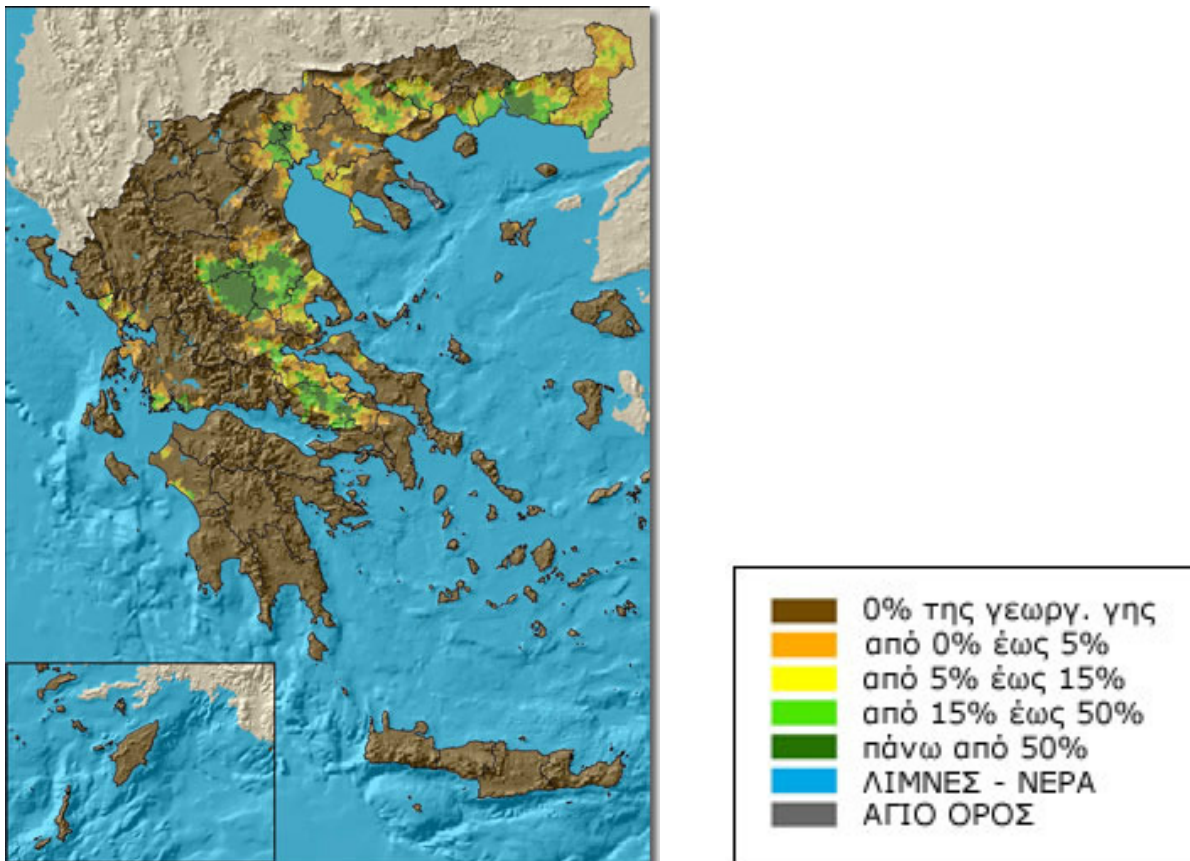
Στην Ελλάδα, όπως αναφέρεται από τον Πausανία, το βαμβάκι καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά τον 2^ο μ.Χ. αιώνα στην περιοχή της Ηλείας, το οποίο το έφεραν οι στρατιώτες του Μεγάλου Αλεξάνδρου από την Ινδία, αλλά γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη μετά το 1500 μ.Χ. Το αποτέλεσμα ήταν η ευρέως διάδοση του και το 1592, κατά τον Prosper Alpinus, να εξάγεται σε Αίγυπτο και Αγγλία. Η ακμή του βαμβακιού ήρθε στην Ελλάδα με την ανάπτυξη της

βαμβακοβιομηχανίας στη Θεσσαλία το 18^ο αιώνα και κυρίως στην περιοχή του Τυρνάβου.

Μετά από απογραφή του 1911, η καλλιεργούμενη έκταση είχε ανέλθει στα 90.500 στρέμματα με στρεμματική απόδοση 52 κιλά, ενώ το 1931 αυξήθηκε στα 201.980 στρέμματα. Η καλλιεργούμενη έκταση με βαμβάκι ανεβαίνει σταδιακά και φθάνει τα 800.000 στρέμματα το 1940. Όμως κατά την περίοδο του πολέμου και της κατοχής (1940-1950) έχουμε μια δραστική μείωση της καλλιέργειας του βαμβακιού λόγω παραγωγής ειδών διατροφής του πληθυσμού. Το μεγάλο άλμα στην ανάπτυξη της βαμβακοκαλλιέργειας, ήταν η ίδρυση του Οργανισμού και του Ινστιτούτου Βάμβακος το 1932, με απόφαση Ελευθέριου Βενιζέλου και την καθοδήγηση του καθηγητή Χριστίδη, με αποτέλεσμα την αλματώδη αύξηση της καλλιεργούμενης έκτασης σε 2.310.000 στρέμματα το 1963 και η στρεμματική απόδοση από 2500 χιλιάδες τόνους τετραπλασιάστηκε και πλησίασε τους 100.000 τόνους. Μετά το 1950 η αύξηση της παραγωγής είχε σαν αποτέλεσμα την κάλυψη της εγχώριας αγοράς αλλά και να δημιουργηθούν περιθώρια για εξαγωγές.

Για μια 15ετία (1965-1980) η καλλιεργούμενη έκταση βαμβακιού διατηρείται περίπου στα 1.300.000-1.400.000 στρέμματα με χαμηλή στρεμματική απόδοση, τα 150-180 κιλά το στρέμμα. Την περίοδο 1981-1985 η καλλιεργούμενη έκταση πλησιάζει τα 2 εκατομμύρια στρέμματα με ελάχιστη αύξηση στην απόδοση. Από το 1986 και μετά η βαμβακοκαλλιέργεια διατηρεί σταθερή ανοδική πορεία και το 1999 έφτασε τα 4.300.000 στρέμματα εκ των οποίων το 95% είναι σε αρδευόμενη έκταση, ενώ η παραγωγή φθάνει τα 101kg το στρέμμα εκκοκκισμένο βαμβάκι. (Κουρέντας, 2005)

Σήμερα στο βαμβάκι παρατηρείται μια συνεχόμενη μείωση της καλλιεργούμενης έκτασης. Καλλιεργούμενο σε μια έκταση που ξεπερνά 3,5 εκατομμύρια στρέμματα και με μια στρεμματική απόδοση του 1 εκατομμυρίων τόνων, συνεχίζει να είναι η δυναμικότερη εκτατική καλλιέργεια στην Ελλάδα με τη μεγαλύτερη οικονομική σημασία.



Εικόνα 1: Χάρτης κλιμάκωσης της καλλιέργειας βαμβακιού

Οικονομική σημασία

Το βαμβάκι (*Gossypium* sp.) είναι η σημαντικότερη υφαντική ίνα παγκοσμίως. Υπάρχουν τέσσερα εξημερωμένα είδη βαμβακιού. Το *G. arboreum* και το *G. herbaceum* είναι διπλοειδή ($2n=26$) βαμβάκια, και γνωστά στον παλαιό κόσμο, και καλλιεργούνταν αρχικά στην Ινδία. Το *G. barbadense* και το *G. hirsutum* είναι βαμβάκια του νέου κόσμου, και είναι αλλοτετραπλοειδή ($2n = 4x = 52$). Το *G. barbadense*, αναφέρεται συνήθως σαν μακρόινο βαμβάκι και παρέχει περίπου το 8% της ίνας παγκοσμίως. Η μακριά ίνα του χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή νημάτων που χρησιμοποιούνται στο ράψιμο υφασμάτων πολυτέλειας. Το *G. hirsutum*, γνωστό ευρύτατα ως βαμβάκι υψιπέδων (upland), αποτελεί περίπου το 90% της παγκόσμιας παραγωγής ινών βαμβακιού. Η ίνα του χρησιμοποιείται κυρίως στα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα. Το λάδι που προέρχεται από το βαμβακόσπορο χρησιμοποιείται κυρίως για βιομηχανική χρήση, και η πίτα

που προέρχεται μετά την εξαγωγή του λαδιού, χρησιμοποιείται ως λίπασμα και ως πηγή λευκώματος για το ζωικό κεφάλαιο.

Αν και το βαμβακόφυτο είναι αυτόχθονο φυτό στις τροπικές χώρες, η παραγωγή βαμβακιού δεν περιορίζεται μόνο στους τροπικούς κύκλους. Η εμφάνιση των νέων ποικιλιών, καθώς επίσης και της προόδου στις τεχνικές καλλιέργειας, οδήγησε στην εξάπλωση της καλλιέργειας μέσα σε μια περιοχή που φτάνει από περίπου 47 βαθμούς βόρειου γεωγραφικού πλάτους (Ουκρανία) έως και 32 βαθμούς νότια (Αυστραλία). Το βαμβάκι είναι από τις πιο σημαντικές καλλιέργειες στις αναπτυσσόμενες χώρες. Από τις 85 βαμβακοπαραγωγικές χώρες το 2005, οι 80 ήταν αναπτυσσόμενες χώρες, εκ των οποίων 28 συντάχθηκαν από τα Ηνωμένα Έθνη μεταξύ των λιγότερων αναπτυγμένων χωρών (LDC).

Το βαμβάκι είναι εξαιρετικά σημαντικό για τις αναπτυσσόμενες χώρες, ιδιαίτερα στην κεντρική και δυτική Αφρική, όπου περίπου 10 εκατομμύρια άνθρωποι εξαρτώνται από τον τομέα αυτό για τα εισοδήματά τους. Εκτός από την συγκομιδή των ινών, το βαμβάκι παρέχει επίσης και υποπροϊόντα, το λάδι και τον σπόρο. Το λάδι προερχόμενο από το βαμβακόσπορο είναι ένα φυτικό έλαιο που ταξινομείται πέμπτο σε παγκόσμια χρήση μεταξύ των λαδιών (υπολογίζεται ότι είναι περίπου το 5% της παγκόσμιας κατανάλωσης φυτικών ελαίων). Ο βαμβακόσπορος χρησιμοποιείται συνήθως ως ζωοτροφή στη διατροφή των βοοειδών.

Τα συνηθέστερα καλλιεργούμενα είδη βαμβακιού στον κόσμο περιλαμβάνουν τα *Gossypium hirsutum* και το *Gossypium barbadense*. Το *Gossypium hirsutum* κατάγεται από Μεξικό και είναι το σημαντικότερο γεωργικό βαμβάκι και αποτελεί περισσότερο από 97% της παγκόσμιας παραγωγής ινών. Το *Gossypium barbadense*, είναι περουβιανής προέλευσης

Πίνακας 1: Χώρες που καλλιεργούν βαμβάκι ανά γεωγραφική περιοχή, 2005

Πηγή: UNCTAD secretariat

	Αναπτυγμένες χώρες	Αναπτυσσόμενες χώρες		Σύνολο
		LDCs	Άλλες	
Αφρική	1	21	15	37
Νότιος και κεντρική Αμερική		2	14	16
Νότιος Αμερική			7	7
Ασία	1	5	16	22
Ευρώπη	2			2
Ωκεανία	1			1
Σύνολο	5	28	52	85

και αποτελεί περίπου 3% της παγκόσμιας παραγωγής ίνας. Στο δεύτερο περιλαμβάνονται οι ίνες βαμβακιού της υψηλότερης ποιότητας, όπως η ποικιλία Jumel (από τα Μπαρμπάντος), μεταξύ των καλύτερων ιών βαμβακιού από άποψη ποιότητας και μήκους ιών. Δύο επιπρόσθετα καλλιεργημένα είδη είναι το *Gossypium arboretum* (που κατάγεται από την υπο-ήπειρο του Ινδο-Πακιστάν) και *Gossypium herbaceum* (που κατάγεται από τη νότια Αφρική. Αυτές οι δύο ποικιλίες του βαμβακιού έχουν κοντή σε μήκος ίνα και βασικά δεν έχουν καμία εμπορική αξία. Εντούτοις, διάφορες ποικιλίες που παράγονται σε εμπορική κλίμακα είναι προερχόμενες από αυτές.

Σήμερα, το βαμβάκι καλλιεργείται σε μια έκταση πάνω από 280.000.000 στρέμματα σε όλο τον κόσμο, ενώ η παραγωγή με την κατανάλωση φθάνει περίπου 15.000-17.000 τόνους. Οι κυριότερες βαμβακοπαραγωγικές χώρες είναι: Η.Π.Α, Κίνα, Ινδία, Πακιστάν, που είναι και οι πιο σημαντικές χώρες της κατανάλωσης και παράγουν σήμερα τα 2/3 της παγκόσμιας παραγωγής.

Πίνακας 2. Στατιστικά στοιχεία των μεγαλύτερων βαμβακοπαραγωγών χωρών του κόσμου τα έτη 2004-06. Έκταση, (1000 εκτάρια), Παραγωγή (1000 bales), Παραγωγή σε ίνα (kg/ha)

Χώρα	2004-05			2005-06		
	Έκταση	Παραγωγή	Παραγ. Σε ίνα	Έκταση	Παραγωγή	Παραγ. Σε ίνα
Παγκόσμια	35,976	120,232	728	35,194	111,529	690
Ινδία	9,000	18,900	457	9,125	18,400	439
Κίνα	5,690	29,000	1,110	5,100	25,500	1,089
ΗΠΑ	5,284	23,251	958	5,533	22,282	877
Βραζιλία	5,284	23,251	958	5,533	22,282	877
Πακιστάν	3,190	11,300	771	3,150	10,000	691
Ουζμπεκιστάν	1,456	5,200	778	1,450	4,800	721
Τουρκία	700	4,150	1,291	630	3,700	1,279
ΕU	466	2,301	1,075	456	2,201	1,051
Αυστραλία	314	3,000	2,080	285	2,400	1,833
Αίγυπτος	307	1,300	922	270	1,150	927
Συρία	234	1,600	1,489	220	1,375	1,361
Καμερούν	220	500	495	200	465	506
Καζακιστάν	216	680	685	200	625	680
Ισραήλ	14	119	1851	10	100	2,177

2.2 Ταξινόμηση και καταγωγή του βαμβάκιού

Η πρώτη ταξινομική μελέτη για το βαμβάκι έγινε το μέσο του 18^{ου} αιώνα όταν ο Λιναίος περιέγραψε το γένος και οι μελέτες συνεχίστηκαν σχετικά εντατικά έως τα μέσα του 19^{ου} αιώνα. Το γένος παλαιότερα είχε ταξινομηθεί και στην οικογένεια Malvaceae ή mallow και στις οικογένειες Bombacaceae και στις φυλές Hibisceae και Gossypieae. Σήμερα, το γένος φαίνεται σταθερά τοποθετημένο στη τάξη Malvales, στην οικογένεια Malvaceae, και στη φυλή Gossypieae, λόγω της μοναδικότητας των λυσιγόνων αδένων που βρίσκονται σε όλα τα είδη μέσα στο γένος. Αυτοί οι αδένες περιέχουν διάφορα τερπένια, που αποκαλούνται συλλογικά γκοσσυπόλη (gossypol). Μόνο εκείνα τα είδη *Gossypium* που παράγουν τις τρίχες στο σπόρο μπορούν ακριβώς να κληθούν βαμβάκι (Smith, 1995).

Σήμερα ακόμη ανακαλύπτονται καινούργια είδη αφού ανακαλύπτονται αποτελεσματικότερες τεχνικές που προσφέρουν επιπρόσθετα στοιχεία για την αξιολόγηση των μεταξύ τους σχέσεων. Το γένος *Gossypium* αποτελείται από 50 είδη (Fryxell, 1992) περιλαμβάνοντας 4 καλλιεργούμενα είδη από τα οποία, δύο διπλοειδή είδη του παλιού κόσμου ($2n=26$) *G. arboreum* και *G. herbaceum* και δύο Νέου Κόσμου τετραπλοειδή είδη ($2n=52$), *G. hirsutum* και *G. barbadense* και είναι συγκεντρωμένα στην Αφρική, κεντρική και νότια Αμερική και Αυστραλία (Fryxell, 1980).

2.3 Μορφολογία και ανάπτυξη του βαμβάκιού

Το καλλιεργούμενο βαμβάκι είναι φυτό ετήσιο, εκτός σε από ορισμένες χώρες στη Νότιο Αμερική όπου το καλλιεργούν σαν πολυετές και το διατηρούν έως 7 έτη. Παρουσιάζει μεγάλη πολυμορφία ως προς τη μορφολογία του γιατί καλλιεργείται σε πληθώρα περιοχών στο κόσμο με διαφορετικές κλιματικές συνθήκες. Σοβαρός μορφολογικός διαχωρισμός παρατηρείται όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων ειδών και των διαφόρων ποικιλιών του ίδιου είδους αλλά και μεταξύ φυτών της ίδιας ποικιλίας, λόγω των διαφορετικών συνθηκών αναπτύξεως του.

2.3.1 Ρίζα

Το ριζικό σύστημα των καλλιεργούμενων βαμβακιών αποτελείται από μια πασσαλώδη ρίζα που μπορεί να φτάσει σε βάθος μέχρι και 2 μέτρα, με το κύριο ριζόστρωμα να βρίσκεται στα 40-60 cm. Οι πλάγιες ρίζες μπορεί να φτάσουν έως 120 cm μακριά από την κύρια ρίζα.

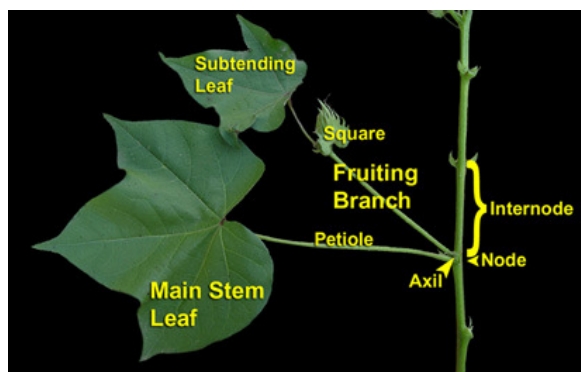
Η κύρια ρίζα του βαμβακόφυτου προχωρεί κατακόρυφα προς τα κάτω και για αρκετές ημέρες δεν σχηματίζει καμία διακλάδωση. Η ανάπτυξη της γίνεται πολύ γρήγορα. Με θερμοκρασία εδάφους στους 18°C μεγαλώνει 0,9mm την ώρα ενώ στους 22°C μπορεί να αυξηθεί στα 1,25mm (Χρηστίδης,1965). Οι δευτερεύουσες ρίζες αρχίζουν συνήθως να σχηματίζονται όταν η κύρια ρίζα αποκτήσει μήκος 12 cm περίπου και αυτό συμπίπτει με την εμφάνιση των κοτυληδόνων στην επιφάνεια του χωραφιού.

2.3.2 Βλαστοί

Όταν τα βαμβάκια αναπτύσσονται στο φυσικό τους τροπικό περιβάλλον δύναται μερικά από τα πολυετή βαμβάκια να αποκτήσουν ύψος από 4,5 – 6 μέτρα. Όμως τα μονοετή καλλιεργούμενα βαμβάκια σπάνια ξεπερνούν τα 2 μέτρα και αποκτούν ύψος που κυμαίνεται από 60 – 180 εκατοστά εξαρτώμενου πάντα της ποικιλίας και τις συνθήκες περιβάλλοντος. Τα φύλλα σχηματίζονται σε κανονική σπειροειδή διάταξη, κατά μήκος του κύριου βλαστού. Στη μασχάλη κάθε φύλλου υπάρχουν οι καταβολές δύο οφθαλμών ενός κεντρικού και ενός πλευρικού. Οι κατώτεροι μασχαλιαίοι οφθαλμοί δίνουν φυλλοφόρους βλαστούς που ονομάζονται μονοπόδια και δεν κάνουν λουλούδια αν δεν κάνουν νέα διακλάδωση. Μεγαλώνουν σχεδόν κατακόρυφα και τα φύλλα έχουν την ίδια διάταξη με τον κύριο άξονα. Οι πλευρικοί οφθαλμοί και οι μασχαλιαίοι που βρίσκονται προς την κορυφή του φυτού που ονομάζονται συμπόδια, παράγουν συνήθως ανθοφόρους βλαστούς. Οι ανθοφόροι αυτοί κλάδοι αυξάνονται σχεδόν οριζόντια και στην άκρη του κλάδου σχηματίζεται ανθοφόρος οφθαλμός και κάτω από αυτόν ένα φύλλο. Στο τέλος ένα κλαδί μπορεί να έχει από 6 μέχρι 8 λουλούδια ή και περισσότερα.

2.3.3 Φύλλα

Τα φύλλα ανάλογα με τα είδη και τις ποικιλίες παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές ως προς τη μορφολογία (μέγεθος, σχήμα, υφή κλπ). Αποτελούνται από το μίσχο, το έλασμα και στο σημείο που ενώνεται ο μίσχος με το στέλεχος βρίσκονται δύο μικρά παράφυλλα. Το έλασμα, στα αμερικάνικα βαμβάκια (*G. hirsutum*) είναι λεπτό σαν χαρτί, ενώ στα αιγυπτιακά βαμβάκια



(*G. barbadense*), είναι παχύ σαν περγαμηνή. Το έλασμα παρουσιάζει συνήθως πέντε λοβούς. Στην άνω επιφάνεια, κατά τον Balls, φέρει 44-97 στομάτια ενώ στην κάτω επιφάνεια 116-176 στομάτια ανά τετραγωνικό χιλιοστό.

Στο κάτω μέρος του φύλλου διακρίνονται άφθονες μικρές διακλαδώσεις νεύρων που καλύπτουν όλη την επιφάνεια του φύλλου.

Το έλασμα των φύλλων μπορεί να είναι όπως στο αιγυπτιακό βαμβάκι, λείο, ή τριχωτό όπως είναι στο αμερικάνικο.

2.3.4 Άνθη

Τα άνθη, σχηματίζονται στους ανθοφόρους κλάδους και στην αρχή μοιάζουν με μικρά πυραμιδοειδή κατασκευάσματα που περικλείονται από τρία χαρακτηριστικά βράκτια φύλλα. Από την ημέρα που η καταβολή του άνθους διακρίνεται πάνω στο φυτό, χρειάζονται 21 περίπου ημέρες ώσπου ν' ανοίξει το αντίστοιχο άνθος.

Το άνθος του βαμβακιού αποτελείται από τα παρακάτω μέρη:

α) Τα βράκτια φύλλα, είναι συνήθως τρία, μεγάλα και καταλήγουν σε 10 περίπου μυτερά δόντια το καθένα.

β) Τον κάλυκα, που αποτελείται από πέντε μικρά ακανόνιστα σέπαλα, ενωμένα στη βάση του λουλουδιού. Στη βάση του κάλυκα και των βρακτίων φύλλων πολλές φορές βρίσκονται και τα νεκτάρια.

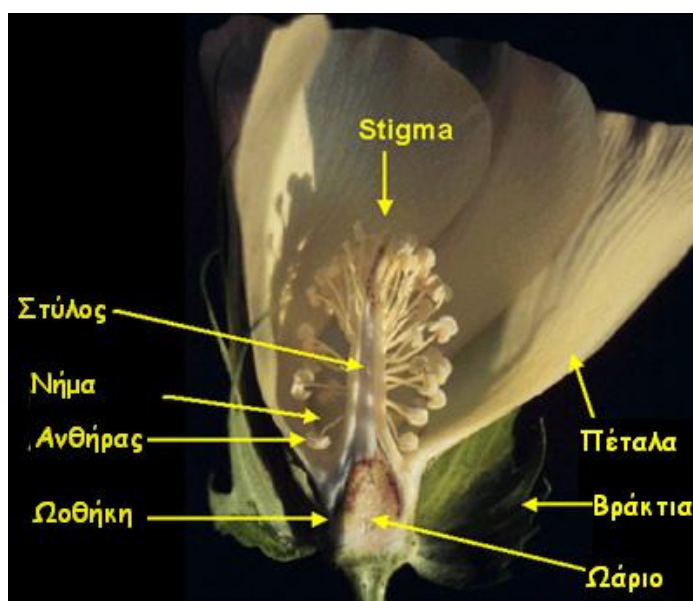
γ) Τη στεφάνη, που αποτελείται από πέντε πέταλα ενωμένα στη βάση τους με το χρώμα της να ποικίλει ανάλογα με το είδος. Στα αμερικάνικα έχει

χρώμα λευκό ή κρεμ ενώ στο αιγυπτιακό είναι χαρακτηριστικό κίτρινο, ενώ σε άλλα είδη μπορεί να είναι κόκκινο.

Το χρώμα αυτό κρατά μόνο την πρώτη ημέρα μετά το άνοιγμα του άνθους και το βράδυ της ίδια ημέρας μεταχρωματίζεται σε ροζ, και το άνθος κλείνει. Την δεύτερη ημέρα ακολουθεί η στεφάνη η οποία γίνεται κόκκινη και την τρίτη ημέρα το άνθος μαραίνεται και πέφτει.

δ) Τους στήμονες, που αριθμούνται σε 90-100 και βρίσκονται σε 10 κατακόρυφες σειρές. Οι ανθήρες είναι δίχωροι, ανοίγουν κατά μήκος μιας γραμμής στο πάνω τους μέρος και ελευθερώνουν μεγάλους γυρεόκοκκους με αγκάθια στην επιφάνεια.

ε) Τον ύπερο, που αποτελείται από μια μικρή κωνική, πολύχρωρη ωοθήκη, το στύλο και το στίγμα. Ο ύπερος αποτελείται από τόσα καρπόφυλλα όσοι είναι οι χώροι της ωοθήκης. Το *G. hirsutum* έχει 4-5 καρπόφυλλα ενώ του *G. barbadense* συνήθως τρία.



Εικόνα 2 : Μορφολογία του άνθους

2.3.5 Επικονίαση

Η αύξηση του λουλουδιού γίνεται με ταυτόχρονο σχηματισμό και ωρίμανση των γαμετών. Κάθε ωοθήκη περιέχει γύρω στα 40 ωοκύτταρα σε ισάριθμες, εντελώς ανάτροπες, σπερμοβλάστες. Ενώ μπορεί να παραχθούν

έως και 10000 γυρεόκοκκοι από ένα λουλούδι. Την ημέρα που πρόκειται να ανοίξει το λουλούδι, με την ανατολή του ηλίου, και μέχρι τις 9 – 10 το πρωί, τα πέταλα έχουν ανοίξει εντελώς και οι ανθήρες έχουν σπάσει με αποτέλεσμα να ξεχυθούν οι γυρεόκοκκοι.

2.3.6 Αυτεπικονίαση ή σταυροεπικονίαση

Το βαμβάκι θεωρείται φυτό αυτόγονιμοποιούμενο, ωστόσο παρατηρείται και ένα μικρό ποσοστό σταυροεπικονίασης όπου είναι δυνατό το φυτό να γονιμοποιηθεί με ξένη γύρη. Το ποσοστό αυτό δεν υπερβαίνει το 5-10% (Webber ;1903) Παρόλο το σχετικά μικρό ποσοστό αυτό δημιουργεί τεράστια προβλήματα στη διατήρηση της καθαρότητας μιας ποικιλίας. Όταν τα βαμβάκια ανήκουν σε ομάδες με διαφορετικό αριθμό χρωματοσωμάτων μπορεί να παρατηρηθεί ένα μικρό ποσοστό διασταύρωσης όπου όμως αυτό δεν υπερβαίνει το 0,003% (Vycotski,1930).

2.3.7 Γονιμοποίηση

Μόλις οι γυρεόκοκκοι βρεθούν πάνω στο στίγμα και με ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας αρχίζουν να βλαστάνουν με τη μορφή σωληνοειδής προβολής. Είναι δυνατό να βλαστήσουν ταυτόχρονα πολλοί γυρεόκοκκοι, όπως και ένας να σχηματίσει πολλές προβολές (Iyengar, 1938). Οι ξένοι γυρεόκοκκοι βλαστάνουν και αναπτύσσονται πιο αργά όσο πιο πολύ διαφέρουν μεταξύ τους οι δύο γονείς. Οι προβολές προχωρούν στο στύλο και φτάνουν στην ωοθήκη, όταν συναντήσουν μια σπερματική βλάστη, προχωρούν προς τη μικροπύλη, αλλά μόνο μια προβολή μπαίνει μέσα για τη γονιμοποίηση. Η γονιμοποίηση διαρκεί από 10 ώρες έως και 30 ώρες σε Αιγυπτιακά βαμβάκια.

2.3.8 Ανθόρροια και καρπόρροια

Ανθόρροια και καρπόρροια είναι το φαινόμενο κατά το οποίο το βαμβάκι παράγει πολύ περισσότερα άνθη και καρύδια από όσα τελικά ωριμάζουν, όποτε ένα ποσοστό ανθέων και καρυδιών πέφτει. Το ποσοστό

της καρπόδεσης επηρεάζεται από συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως η υγρασία, η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, την άνοδο της θερμοκρασίας, τη προσβολή από έντομα και ασθένειες, τους ισχυρούς άνεμους ή από μηχανικό τραυματισμό. Η φωτοπερίοδος φαίνεται επίσης να παίζει σπουδαίο ρόλο. Επίσης, επηρεάζεται από τον γενότυπο του φυτού. Καρύδια συνήθως 3-10 ημερών είναι αυτά που πέφτουν, ενώ καρύδια μεγαλύτερα από 10 ημέρες σπάνια πέφτουν, εκτός εάν το φυτό υποστεί την επίδραση ισχυρών παραγόντων όπως χημικών ουσιών, παγωνιάς, κλπ.



Εικόνα 3: Κοινό φαινόμενο καρπόπτωσης βαμβακιού

2.4 Καλλιεργούμενα είδη βαμβακιού

1) *Gossypium herbaceum*

Το *Gossypium herbaceum* (Βάμβαξ ο ποώδης) προέρχεται από τις Ινδίες και έχει απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων $n=13$. Είναι μικρός μονοετής θάμνος, με ύψος 1-1,5 μέτρα. Ο βλαστός είναι ερυθρωπός ή ερυθρόφαιος, τα φύλλα είναι μικρά ωοειδή με τρεις ως πέντε λοβούς. Τα άνθη είναι μικρά και έχουν κίτρινο χρώμα ενώ οι κάψες του είναι μικρές, σφαιρικές και οξύληκτες, συνήθως τετράχωρες, με 5 ως 8 μεγάλους σπόρους σε κάθε χώρο. Οι ίνες του έχουν χρώμα τεφρόλευκο, με υφή τραχεία και μήκος μεταξύ 17-28 mm. Το είδος αυτό παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στην αδρομύκωση, είναι όψιμο και δίνει μικρή παραγωγή και σήμερα καλλιεργείται κυρίως στις ξηρότερες περιοχές της Αφρικής και της Ασίας.

2) *Gossypium arboreum*

Το *Gossypium arboreum* (Βάμβαξ ο δενδρώδης) κατάγεται μάλλον από την Κεντρική Αφρική, καλλιεργήθηκε όμως σε μεγάλη έκταση και στην Ινδία. Έχει απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων $n=13$ και περιλαμβάνει μονοετείς και πολυετείς τύπους. Τα πολυετή μπορεί να φθάσουν σε ύψος 2 μέτρων ενώ τα μονοετή δεν ξεπερνούν το 1,5 μέτρο. Ο βλαστός του είναι ξυλώδης, τα φύλλα είναι σχεδόν λεία, με 5 ως 7 λογχοειδείς λοβούς. Τα άνθη του είναι μικρά συνήθως ερυθρού χρώματος. Οι κάψες είναι συνήθως τρίχωρες με 6-8 σπόρους σε κάθε χώρο. Το χρώμα των ινών είναι λευκό ή σε χρώμα σκουριάς ενώ το μήκος τους φθάνει τα 25mm. Δεν παρουσιάζει μεγάλο γεωργικό ενδιαφέρον λόγω του μεγάλου ύψους του το οποίο δυσκολεύει τη συγκομιδή.

3) *Gossypium hirsutum*

Το *Gossypium hirsutum* (Βάμβαξ ο χνοώδης) κατάγεται από την Κεντρική Αμερική (Μεξικό) και έχει απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων $n=26$. Είναι πολύ διαδεδομένο και καλλιεργείται και στην Ελλάδα. Τα καλλιεργούμενα φυτά του είδους αυτού ανήκουν στη βοτανική ποικιλία *Latifolium*. Το *G.hirsutum* είναι μονοετής θάμνος και τα φύλλα του σχηματίζουν 3 ως 5 λοβούς. Τα άνθη έχουν διάφορα μεγέθη και χρώμα συνήθως λευκό αμέσως μετά την έκπτυξη, μετά ρόδινο και τέλος ιώδες. Οι κάψες έχουν 3 ως 5 χώρους και σχήμα σφαιρικό ή ωοειδές.

4) *Gossypium barbadense*

Το *Gossypium barbadense* (Βάμβαξ ο βαρβαδινός) κατάγεται από τη Νότια Αμερική και έχει απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων $n=26$. Τα Αιγυπτιακά βαμβάκια ανήκουν στο *G.barbadense*, διακρίνονται για το μεγάλο μήκος, τη λεπτότητα και τη στιλπνότητα των ινών τους και καλλιεργούνται στην Αίγυπτο, στο Σουδάν, στις Η.Π.Α. και αλλού, αλλά η καλλιέργεια του τείνει να μειωθεί λόγω της οψιμότητάς του. Περιλαμβάνει μονοετή φυτά



αλλά και πολυετής θάμνους που φθάνουν σε μεγάλο ύψος. Ο βλαστός είναι ευυτενής και λείος και τα φύλλα έχουν 3-5 αιχμηρούς λοβούς. Τα άνθη του είναι μεγάλα συνήθως ωχροκίτρινου χρώματος. Οι κάψες είναι ογκώδεις, ωοειδείς με αιχμηρό άκρο συνήθως τρίχωρες, με 6-10 σπόρους σε κάθε χώρο. Οι ίνες του είναι λευκού χρώματος, έχουν συνήθως μήκος στα 38mm, αλλά μπορούν να φθάσουν και στα 64mm.

Σήμερα καλλιεργούνται παγκοσμίως εκατοντάδες διαφορετικές ποικιλίες βαμβακιού. Από τα Αμερικάνικα βαμβάκια Upland (*Gossypium hirsutum*) κυρίως είναι διαδεδομένες οι ποικιλίες Deltapine, Cocer, Acala, Stoneville κ.α. Από τα Αιγυπτιακά βαμβάκια οι σπουδαιότερες ποικιλίες είναι η Ashmouni, Giza, Menoufi, Karman κ.α. Στην Ελλάδα δημιουργήθηκαν οι εγχώριες ποικιλίες : 4S, Σίνδος 8, Άκαλα Σίνδου, Σάμος και τέλος οι ποικιλίες της σειράς Ζέτα.

2.5 Γονιδίωμα Βαμβακιού

Όταν το γένος *Gossypium* διαφοροποιήθηκε και αποίκισε τις ξηρές και ημιάγονες περιοχές σε όλη την υδρόγειο τότε υποβλήθηκε σε εκτενή χρωμοσωμική εξέλιξη. Από τα 50 διαφορετικά είδη του γένους *Gossypium* (Fryxell, 1992) μόνο τα τέσσερα καλλιεργούνται (*G. arboreum*, *G. herbaceum*, *G. hirsutum*, *G. barbadense*) και με τα υπόλοιπα να είναι άγρια είδη. Το γένος *Gossypium* είναι χωρισμένο σε επτά κυτολογικές γενωτυπικές ομάδες οι οποίες είναι διπλοειδής ($2n=2x=26$) και συμβολίζονται με γράμματα A,B,C,D,E,F,G (Endrizzi, 1984) και μια όγδοη ομάδα, η οποία είναι τετραπλοειδής ($2n=4x=52$) και είναι ο συνδυασμός των δυο γενωμάτων A και D και συμβολίζεται με τα γράμματα AD. Το γένωμα A βρίσκεται αποκλειστικά στα διπλοειδή στα είδη *G. arboreum* και *G. herbaceum* του Παλαιού Κόσμου ενώ το D σε μερικά διπλοειδή είδη του Νέου Κόσμου όπως το *G. thurberi*.

Το μέγεθος του γονιδιώματος του γένους *Gossypium* κυμαίνεται περίπου από 885 Mbp ως 2570Mbp ανά 1C πυρήνα.

Σύμφωνα με τους Stephens (1947) και Katterman και Ergle (1970) η σχέση στα μεγέθη ανάμεσα στις γενωτυπικές ομάδες είναι η ακόλουθη:

- α. Το C γένωμα έχει πολύ μεγάλα χρωμοσώματα
- β. Τα E και F έχει μεγάλα χρωμοσώματα που είναι ελαφρώς μεγαλύτερα από εκείνα του A και B
- γ. Το B έχει μεγάλα χρωμοσώματα τα οποία είναι ελαφρώς μεγαλύτερα από εκείνα του A
- δ. Το A έχει μέτριου μεγέθους χρωμοσώματα
- ε. Το G γένωμα έχει μετρίου μεγέθους χρωμοσώματα τα οποία είναι μικρότερα από αυτού του A
- στ. Το D έχει μικρού μεγέθους χρωμοσώματα

Κατά τον Saunders (1961a) το κέντρο καταγωγής του γένους *Gossypium* είναι η κεντρική Αφρική για το λόγο ότι τέσσερα από τα επτά διπλοειδή είδη βρίσκονται στην Αφρικανική ήπειρο και υποθέτετε ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών έγινε με τον διαχωρισμό των ηπείρων κατά την Κρητιδική (Μεσοζωική) περίοδο.

2.5.1 Εξέλιξη Βαμβακιών του Παλαιού Κόσμου

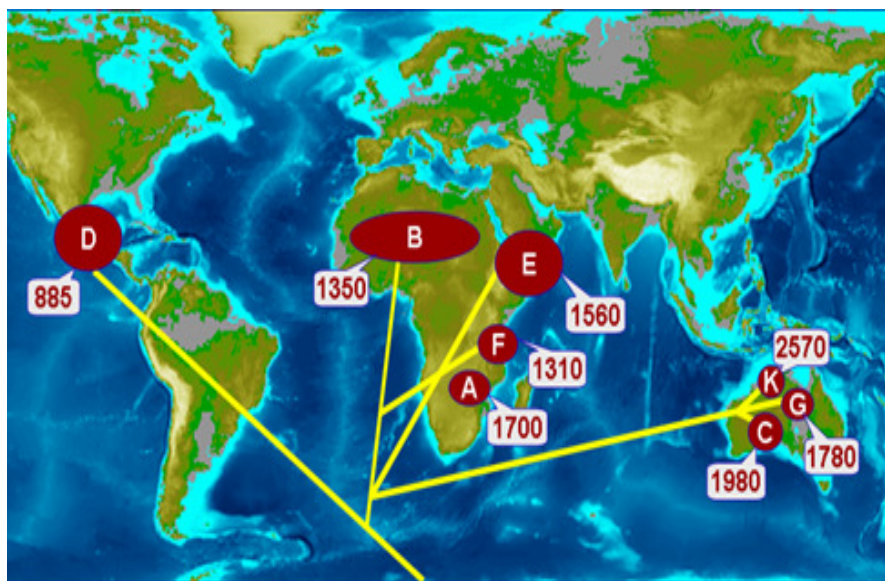
Το Α-γονιδίωμα των διπλοειδών βαμβακιών του Παλαιού Κόσμου τοποθετείται στους πρώτους αιώνες στη καταγωγή του γένους *Gossypium* και περιλαμβάνει τα είδη 14 Αφρικάνικα και Αραβικά είδη (τα γονιδιώματα A, B, E, F). Μέσα σ' αυτό το γκρουπ κάθε ένα από τα γενώματα αντιπροσωπεύεται από μια μονοφυλετική ομάδα ειδών (Wendel and Albert 1992, Seelanan et al 1997). Επειδή άγριοι πληθυσμοί του *G.arboreum* δεν έχουν προσδιοριστεί ποτέ, έχει προταθεί ότι το *G.arboreum* είναι απλά ένας πρόσφατος διαχωρισμός του καλλιεργούμενου *G.herbaceum*. (Hutchinson et Al 1947 Hutchinson, 1959). Εντούτοις πιο πρόσφατες, κυτταρογενετικές, γενετικές, φυλογενετικές μελέτες, δείχνουν σαφώς δύο είδη α-γονιδιώματος απόκλιση πριν από τη εξημέρωση του κάθε είδους (Wendel et al. 1989 Liu et al 2001).

2.5.2 Εξέλιξη Βαμβακιών του Νέου Κόσμου

Τα τετραπλοειδή Βαμβάκια του Νέου Κόσμου είναι αλλοτετραπλοειδή που συνδυάζουν ένα γονιδίωμα που αντλείται από ένα πρόγονο του Α-γονιιώματος και ένα δεύτερο γονιδίωμα από έναν πρόγονο του D-γονιδιώματος (Endrizzi *et al* 1985; Galau και Wilkins 1989; Brubaker *et al* 1999; Liu *et al* 2001; Wendel and Cronn 2003). Και οι δυο καταγωγές απέκλισαν περίπου 6,0-7,3 εκατομμύρια έτη πριν (Senchina *et al* 2003). Παραμένει μυστήριο το πώς αυτό εμφανίστηκε. Όλα τα γνωστά AD τετραπλοειδή είδη είναι αυτόχθονα στο νέο κόσμο, αλλά δεν υπάρχει καμία ένδειξη ειδών του Α-γονιδιώματος μέσα στο Νέο Κόσμο και κανένα είδους του D-γονιδιώματος έξω από το Νέο Κόσμο Παρ' όλα αυτά, 1,3-7 εκατομμύρια έτη πριν ένα φυτό του Α-γονιδιώματος επικοινωνήθηκε από ένα φυτό του D-γονιδιώματος και τότε παρήχθη ένα AD-διπλοειδές υβρίδιο, το οποίο σε ένα πολυπλοειδές γεγονός, δημιουργήθηκε ένα AD αλλοτετραπλοειδές με κυτταρόπλασμα του α-γονιδιώματος (Wendel 1989; Cronn *et al.* 1996; Small *et al* 1998, Senchina *et al* 2003; Wendel, Cronn 2003). Μετά από την αρχική δημιουργία του AD τετραπλοειδούς, αυτό, απέκλισε στη συνέχεια σε τρεις γενεαλογίες (Seelanan *et al* 1997; Small *et al* 2002). Μια αντιπροσωπεύεται με το *G. mustelinum*, το οποίο βρίσκεται μόνο σε ένα μικρή περιοχή Βορειοανατολικά της Βραζιλίας. Οι δύο εναπομείναντες αντιπροσωπεύονται από ένα εξημερωμένο και ένα άγριο ενδημικό είδος σε ένα νησί το *G. barbadense*/*G. darwinii* (Νησιά Galapagos) και το *G. hirsutum*/*G. tomentosum* (Hawaii).

Από τα υπάρχον Α- και D-γονιδιώματα, το *G. arboreum* και το *G. herbaceum* είναι τα καλύτερα διπλοειδές πρότυπα του τετραπλοειδές Αt υπογονώματος και το *G. raimondii* του Dt υπογονώματος (Wendel *et al*, 2003). Η ακαθάριστη δομική ρύθμιση του γονιδιώματος του *G. arboreum* διαφέρει από αυτό του Αt υπογονώματος από μόνο δυο translocation, ενώ το γονιδίωμα του *G. herbaceum* διαφέρει σε τρεις (Brown and Menzel 1950; Menzel and Brown 1954, Endrizzi *et al.* 1985; Brubaker *et al.* 1999), αλλά τα φυλογενετικά στοιχεία, εντούτοις, δείχνουν ότι τα δυο είδη διαχωρίστηκαν μετά το γεγονός της πολυπλοειδοποίησης τους και επομένως και τα δυο υπάρχοντα είδη του Α-γονιδιώματος είναι φυλογενετικά απέχουσα από το Αt

υπογένωμα. Υπήρχε μια υπόθεση κατά τη διάρκεια των ετών για το ποιο από τα υπάρχον D-γονιδιώματα είναι το καλύτερο πρότυπο για το Dt υπογένωμα (Endrizzi *et al.* 1985; Wendel 1989), αλλά τα πιο πρόσφατα και πειστικά στοιχεία δείχνουν ότι το *G.raimondii* είναι ο πλησιέστερος συγγενής του προγόνου του Dt υπογενώματος και γι' αυτό είναι το καλύτερο πρότυπο (Wendel & Cronn 2003).



Εικόνα 4: Προέλευση κυτολογικών ομάδων στο βαμβάκι

2.6 Άλλα μέλη της οικογένειας Malvaceae

2.6.1. Μπάμια (*Abelmoschus esculentus*)

Η μπάμια (*Abelmoschus esculentus*) ανήκει στην ίδια οικογένεια με το βαμβάκι (Malvaceae) και καλλιεργείται σαν ετήσιο φυτό με ετήσια ανάπτυξη 1m.

Το γένος *Abelmoschus* κατάγεται από την Νοτιοανατολική Ασία. Η μπάμια (*Abelmoschus esculentus*), εντούτοις, είναι αβέβαιης προέλευσης. Είναι πιθανόν να διαδόθηκε στη Μεσόγειο και στην Αφρική μέσω του Νείλου.



Είναι διαδεδομένο στις τροπικές, υποτροπικές και θερμές συγκρατημένες περιοχές, αλλά είναι ιδιαίτερα δημοφιλές στη δυτική Αφρική, την Ινδία, τις Φιλιππίνες, την Ταϊλάνδη και τη Βραζιλία. Η μπάμια (*Abelmoschus esculentus*) έχει αναφερθεί σε όλη την τροπική Αφρική, ενώ η μπάμια της δυτικής Αφρικής (*Abelmoschus caillei* (A.Chev.) Stevels) είναι περιορισμένη μόνο στα υγρά κλίματα της Αφρικής.

Η μπάμια είναι μεταξύ των πιο ανεκτικών φυτών σε θερμότητα και ξηρασία. Το φυτό προτιμά τα μέσα (πηλώδη) και βαριά (αργιλώδη) εδάφη, και απαιτεί καλά-αποστραγγισμένα εδάφη. Επίσης προτιμά τα ουδέτερα και βασικά (αλκαλικά) εδάφη και μπορεί να αυξηθεί επίσης και στο πολύ αλκαλικό έδαφος. Αλλά δεν μπορεί να αυξηθεί στη σκιά.

Το φυτό έχει λουλούδια από τον Ιούλιο μέχρι τον Σεπτέμβριο. Τα λουλούδια του είναι ερμαφρόδιτα (έχει και τα αρσενικά και θηλυκά όργανα) και επικονιάζονται από τις μέλισσες.

Ο σπόρος σπέρνεται πρώιμα την άνοιξη και βλαστάνει σε 27 ημέρες στους 15°C ή σε 6 ημέρες στους 35°C. Οι περισσότερες ποικιλίες απαιτούν περίπου 4 μήνες από τη σπορά προτού να παραχθεί η πρώτη συγκομιδή, αν και μερικές πρώιμες ποικιλίες μπορούν να παράγουν συγκομιδή σε 50 ημέρες όταν βρίσκονται σε τροπικό κλίμα.

2.6.2 Κενάφ (*Hibiscus cannabinus*)

Το κενάφ (*Hibiscus cannabinus*) ανήκει στην οικογένεια Malvaceae. Η καταγωγή του είναι από την νότιο Ασία, αλλά η ακριβής τοποθεσία είναι άγνωστη.

Είναι ετήσιο ή διετή φυλλώδες φυτό που αυξάνει σε ύψος μέχρι 1,5-3,5 m με ξυλώδες βάση. Οι μίσχοι του αυξάνουν 1-2 cm σε διάμετρο και συχνά αλλά όχι πάντα διακλαδίζονται. Τα φύλλα του είναι 10-15 cm σε μήκος και ποικίλουν σε σχήμα, με αυτά της βάσης να είναι αρκετά λοβοειδή, με 3-7 λοβούς, ενώ αυτά της κορυφής



να είναι λιγότερο λοβωτά έως καθόλου. Τα άνθη του είναι 8-15 cm σε διάμετρο, λευκά, κίτρινα ή μωβ. Ο καρπός του είναι περικάρπιο με πολλαπλούς σπόρους διαμέτρου 2 cm.

Αν και τα φυτά είναι αυτογονιμοποιούμενα και γενικά θεωρητικά αυτοεπικονιαζόμενα μπορούν επίσης να σταυρογονιμοποιηθούν. Οι Jones et al (1955) ανέφεραν ότι η φύση της γύρης του κενάφ αποτρέπει τη διασπορά της μέσω του αέρα και ότι οποιαδήποτε σταυρογονιμοποίηση είναι μια συνέπεια της δραστηριότητας εντόμων. Τα λουλούδια ανοίγουν και κλείνουν για μία ημέρα και είτε σταυροεπικονιάζονται πρώτιστα από τις μέλισσες, (Tamargo και Jones 1954), ή αυτεπικονιάζονται από τη μετακίνηση λόγω στριψίματος των πετάλων όταν κλείνει το άνθος.

Το κενάφ καλλιεργείται κυρίως σήμερα για την ίνα του για παραγωγή σχοινοϋ και χαρτιού. Μελλοντικά όμως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν οικολογικό φυτό, λόγω της μικρής ποσότητας εισροών που απαιτεί σαν καλλιέργεια σε λιπάσματα, εντομοκτόνα και νερό συγκρινόμενο με άλλες καλλιέργειες

2.7 Οι αναπαραγωγικοί φραγμοί

Ο υβριδισμός είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την βελτίωση φυτών. Μέχρι πρόσφατα για την βελτίωση των φυτών χρησιμοποιούνταν η γενετική παραλλακτικότητα μέσα στο ίδιο το είδος, όπου οι αναπαραγωγικοί φραγμοί δεν ήταν από τα κύρια προβλήματα. Παρόλα αυτά η εντατική βελτίωση που αποσκοπούσε στην αύξηση της παραγωγής και την ομοιομορφία του είδους οδήγησε στην απώλεια πολλών χρήσιμων γονιδίων μέσα στα είδη. Σήμερα η ανάγκη για βελτίωση μας οδήγησε στην αναζήτηση γονιδίων από συγγενή ή ακόμα και από άγρια είδη χρησιμοποιώντας όλο και πιο πολύ την ενδειδική και διειδική βελτίωση.

Όμως βασικό εμπόδιο της εκτεταμένης εφαρμογής του υβριδισμού μεταξύ των ειδών ή γενών είναι η μικρή πιθανότητα επιτυχίας. Η διεργασία της δημιουργίας νέων ειδών στηρίζεται στην ανάπτυξη εμποδίων που οδηγούν στην αναπαραγωγική απομόνωση ενός πληθυσμού, ο οποίος εξελίσσεται έτσι σε νέο είδος. Αν δεν υπήρχαν οι φραγμοί αυτοί τότε τα είδη θα συγχωνεύονταν μεταξύ τους και θα είχαν ένα κοινό γενετικό απόθεμα.

Λεπτομερής περιγραφή των διεργασιών εξέλιξης και των φραγμών αναπαραγωγής ανάμεσα στα είδη έχει προταθεί από τον Stebbins το 1971. Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Stebbins οι φραγμοί αναπαραγωγικής απομόνωσης διακρίνονται σε εξωτερικούς (ή εξωγενής) και σε εσωτερικούς (ή ενδογενής). Όμως ο K.R. Shivanna πρότεινε την ταξινόμηση σε 3 κύριες κατηγορίες από τις οποίες η πρώτη αφορά φυσικούς (I) και οι επόμενες δυο φυσιολογικούς φραγμούς (II και III).

I. Προσωρινή και μερική απομόνωση των ειδών

Οι φυσικοί φραγμοί περιλαμβάνουν τη φυσική απομόνωση δυο πληθυσμών γεωγραφικά (σε διαφορετικές περιοχές), χρονικά (διαφορετική χρονική στιγμή άνθισης) ή οικολογικά (προσαρμογή σε διαφορετικές οικολογικές συνθήκες).

Οι εξωτερικοί φραγμοί απομόνωσης ανάμεσα σε πληθυσμούς του ίδιου είδους μπορεί να είναι η αιτία για να αρχίσει η εξέλιξη νέων ειδών με την επίδραση της φυσικής επιλογής υπό διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος. Ένας απομονωμένος πληθυσμός μπορεί να παρουσιάσει γενετικές διαφορές από το αρχικό είδος σε τέτοια έκταση ώστε ακόμη όταν έλθει σε επαφή με το αρχικό είδος να έχουν δημιουργηθεί πια εσωτερικοί φραγμοί απομόνωσης οι οποίοι δεν επιτρέπουν τη διασταύρωσή τους.

II. Φραγμοί πριν την γονιμοποίηση

Μέχρι το 1960 δεν είχαν γίνει και πολλές κυτολογικές μελέτες που αφορούσαν τους αναπαραγωγικούς φραγμούς λόγω της απουσίας κατάλληλων τεχνικών για την μελέτη της βλάστησης όπως και της αύξησης της γύρης μέσα στο στύλο. Οι Shivanna και Johri, 1985 προσπάθησαν στη δημιουργία μεθόδου καθαρισμού και χρώσης της γύρης η οποία όμως δεν ήταν επιτυχής.

Η πιο αποτελεσματική τεχνική για την παρακολούθηση της αύξησης της γύρης είναι η μέθοδος που αναπτύχθηκε κατά την δεκαετία του 1950, όπου η τεχνική χρησιμοποιεί το φθορισμό που προκαλεί το μπλε της ανιλίνης

(aniline blue) (Linskens and Esser 1957; Martin 1959; Shivanna and Rangaswamy 1992). Η μέθοδος βασίζεται στην έλξη που προκαλείται στην καλλόζη από το Fluorochrome (υδατοδιαλυτή aniline blue). Επειδή οι γυρεοσωλήνες αποθέτουν καλλόζη κατά μήκος των τοιχωμάτων του στύλου, μπορούν να παρατηρηθούν κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού εάν ακολουθηθεί η συγκεκριμένη μέθοδος.

α. Μονομερής ασυμβατότητα (Unilateral Incompability)

Αναφέρεται στην ασυμβατότητα που δημιουργείται σε διειδικές και διαγενετικές διασταυρώσεις όπου η ασυμβατότητα λειτουργεί μόνο προς μια κατεύθυνση σε αμοιβαίες διασταυρώσεις. Είναι συνηθισμένο φαινόμενο όταν οι διασταυρώσεις αφορούν ένα αυτοσυμβιβαστό είδος και ένα αυτοασυμβίβαστο είδος. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι παρουσιάζεται και σε διασταυρώσεις μεταξύ άγριων και καλλιεργούμενων ειδών.

Δυο υποθέσεις έχουν ειπωθεί που να εξηγούν την μονομερής ασυμβατότητα. Σύμφωνα με τους Lewis και Crowe (1958), το αλληλόμορφο του αυτοασυμβίβαστου έχει διπλή δράση. Εκτός του ότι αναστέλλει την βλάστηση του γυρεοκόκκου που μεταφέρει το ίδιο γονίδιο ασυμβίβαστου, αναστέλλει και την βλάστηση γυρεοκόκκων που μεταφέρουν το γονίδιο της αυτοασυμβατότητας.

Σύμφωνα με την δεύτερη υπόθεση τα γονίδια αυτοασυμβατότητας δεν παίζουν κανένα ρόλο (Grum and Aubertin 1966; Abdalla and Hermsen 1972). Σύμφωνα με αυτούς η αναστολή της βλάστησης γυρεοκόκκων που μεταφέρουν το γονίδιο της αυτοασυμβατότητας προκαλείται από άλλα ειδικά γονίδια δεν ανήκουν στο S-locus.

β. Ενεργή – Παθητική αναστολή (Active versus passive inhibition)

Η αναστολή της αυτοασυμβατότητας είναι το αποτέλεσμα της ενεργούς αναγνώρισης του γυρεοκόκκου. Η θετική αναγνώριση των γυρεοκόκκων του ίδιου είδους έχει σαν αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των προϊόντων του S αλληλομόρφου στο γυρεοκόκκο και στο στύλο.

Πολλοί ερευνητές επέδειξαν ότι ενεργή αναγνώριση επιτυγχάνεται διαμέσου του S αλληλομόρφου στη διειδική ασυμβατότητα. Σύμφωνα με τον Pandley (1968,1969) το γονίδιο S μεταδίδει δυο ειδών ειδικεύσεις (α). την πρωτογενή ειδίκευση, η οποία ελέγχει την διειδική ασυμβατότητα και (β). την δευτερογενή ειδίκευση, η οποία ελέγχει την αυτόασυμβατότητα. Σύμφωνα με τον Sampson (1962) η αλληλεπίδραση μεταξύ γυρεοκόκκου και σύλου εξαρτάται από την συμπληρωματικότητα των μορίων του γυρεοκόκκου και του στίγματος.

Οι Shivanna και Johri 1985 απόδειξαν ότι σε διειδικές διασταυρώσεις μεταξύ συγγενικών ειδών που περιλάμβαναν ένα ή και δυο αυτοασυμβίβαστους γονείς, η αναστολή της βλάστησης του γυρεόκοκκου, ήταν το αποτέλεσμα της ενεργούς αναγνώρισης του γυρεόκοκκου διαμέσου της δράσης του S γονιδίου.

Στη πλειονότητα όμως των διειδικών διασταυρώσεων, η αποτροπή της γονιμοποίησης οφείλεται κυρίως σε παθητικά γεγονότα και είναι το αποτέλεσμα της έλλειψης συμπροσαρμοστικότητας μεταξύ γυρεόκοκκου και σύλου. Τέτοιου είδους παθητική αναστολή λόγω της έλλειψης γενετικής πληροφορίας από τον ένα γονέα για ένα κατάλληλο χαρακτήρα για τον άλλο γονέα αναφέρεται ως 'ασυμφωνία'(incongruity) (Hogenboom 1973, 1984).

γ. Αναστολή στην επιφάνεια του στίγματος

Είναι από τους πιο συχνούς αναπαραγωγικούς φραγμούς σε απομακρυσμένα γενετικά είδη (Robbelen 1960; Martin 1970; Knox *et al.* 1976; Stettler *et al.* 1990, Barone *et al.* 1992; Gundimeda *et al.* 1992). Η αναστολή της βλάστησης του γυρεόκοκκου μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη αποτελεσματικής προσκόλλησης του γυρεόκοκκου, στην έλλειψη ενυδάτωσης ή στην έλλειψη κατάλληλων παραγόντων βλάστησης του γυρεόκοκκου στο στίγμα (Ca. B, κατάλληλο pH).

δ. Αναστολή στο στίγμα και σύλο

Η αναστολή του γυρεοσωλήνα και η αποτροπή του να φτάσει την ωοθήκη είναι ο πιο συχνός διειδικός αναπαραγωγικός φραγμός. Αυτό

οφείλεται στην αναστολή του γυρεοσωλήνα μέσα στο στίγμα ή λίγο πιο κάτω από το στίγμα ή ακόμα και αρκετά κάτω από στο στύλο. Τέτοιοι γυρεοσωλήνες συχνά παρουσιάζουν ανωμαλίες με την μορφή χοντρώτερων σωλήνων, αυξημένης απόθεσης καλλόζης, φουσκωμένα άκρα και ανάπτυξη διακλαδώσεων. (Lewis and Crowe 1958; Robbelen 1960; Hogenboom 1973; De Nettancourt 1977; Purdir and Singh 1985; Fritz and Hanneman 1989; Barone et al. 1992; Gundimeda et al. 1992)

Ο γυρεοσωλήνας κατά την πορεία αύξησης του αξιοποιεί τα θρεπτικά στοιχεία του στύλου. Ένας από τους λόγους αναστολής της βλάστησης του μπορεί να οφείλεται στην ανικανότητα του να προσλάβει αυτά τα θρεπτικά συστατικά ή λόγω έλλειψης τους ή ακόμα και λόγω απουσίας κατάλληλων ένζυμων στο γυρεοσωλήνα.

ε. Αναστολή μέσα στην ωοθήκη

Σε αντίθεση με την αναστολή των γυρεοσωλήνων μέσα στο στύλο, η αναστολή τους μέσα στην ωοθήκη δεν έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό. Επειδή η είσοδος του γυρεοσωλήνα στην ωοθήκη φαίνεται να εξαρτάται από την παρουσία χημειοτροπικής ουσίας στην μικροπύλη, η αποτυχία των γυρεοσωλήνων να εισέλθουν την μικροπύλη μπορεί να οφείλεται στην απουσία αυτής της ουσίας. Ακόμα και αν οι γυρεοσωλήνες φτάσουν τον εμβρυόσακκο μπορεί να υπάρξουν διαταραχές στη διπλή γονιμοποίηση ενώ παρατηρείται αύξηση του εμβρύου χωρίς ανάπτυξη του ενδοσπερμίου και πιο σπάνια και το αντίθετο.

Στα φυτά που φέρουν πολύχωρες ωοθήκες, απαιτείται γονιμοποίηση ενός ελάχιστου αριθμού ωοθηκών για αρχίσει η ανάπτυξη του καρπού. Σε πολλές διειδικές διασταυρώσεις μπορεί αυτό να μην συμβεί, αποτρέποντας έτσι την ανάπτυξη του καρπού.

III. Φραγμοί μετά την γονιμοποίηση

Η περίπτωση αυτή οφείλεται κυρίως στην αποτυχία των γονιμοποιημένων ωοθηκών να αναπτυχθούν σε ώριμους σπόρους και σε

διδεικτικές διασταυρώσεις είναι πιο διαδεδομένοι από τους φραγμούς πριν την γονιμοποίηση. Αυτοί οι φραγμοί μπορούν να συμβούν σε οποιοδήποτε στάδιο κατά την διάρκεια ανάπτυξης του εμβρύου ή κατά την διάρκεια της βλάστησης ή ανάπτυξης του F₁ υβριδίου.

2.7.1 Μέτρα για να ξεπεραστούν οι αναπαραγωγικοί φραγμοί

Επειδή το φαινόμενο της ασυμβατότητας στις ενδοειδικές διασταυρώσεις λόγω της δράσης του S αλληλομόρφου και το φαινόμενο της ασυμφωνίας στις διειδικές διασταυρώσεις είναι σύνηθες στις διασταυρώσεις υβριδισμού μεταξύ των ειδών είναι απαραίτητο να ξεπεραστούν αυτοί οι φραγμοί που περιορίζουν την αναπαραγωγή.

Για αυτό το λόγο δημιουργήθηκαν διάφορες τεχνικές που καταλύουν τους αναπαραγωγικούς φραγμούς

α. Τεχνικές που υπερνικούν τους φραγμούς στο στίγμα και το στύλο

1) γενετική παραλλακτικότητα στην ικανότητα διασταύρωσης

Η ικανότητα διασταύρωσης σύμφωνα με Hermsen (1984a) καθορίζεται και από γενετικούς όπως και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, και γι αυτό είναι απαραίτητο να εξετάσουμε και τους δυο γονείς ως προς την ικανότητα διασταύρωσης μεταξύ τους σε ένα εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών και σε διάφορους συνδυασμούς.

2) Χρήση μίγματος γύρης (mentor)

Η χρήση μίγματος γύρης, δηλαδή ένα μείγμα συμβατής και μη συμβατής γύρης (Adiwilaga and Brown 1991) και γύρης mentor, δηλαδή συμβατής γύρης γενετικά όμως ανενεργή με τη χρήση ακτινοβολίας όμως να είναι ακόμα ικανή να βλαστώνει (αναμειγμένη με μη συμβατή γύρη) είναι ικανό για να ξεπεράσει την αναστολή που προκαλείται από το στίγμα και το στύλο.

3) Επηρεασμός από τις περιβαλλοντικές συνθήκες

Η επιτυχία της γονιμοποίησης εξαρτάται από το αν η επικοινωνία γίνει σε επιδεκτικό ή όχι, στίγμα. Η επιδεκτικότητα του στίγματος μπορεί να ποικίλει

από μερικές ώρες έως και εβδομάδες σε μερικά είδη (Κρίνα). Και αυτό καθορίζει την κατάλληλη ώρα επικονίασης.

Επίσης θετικό αποτέλεσμα μπορεί να έχει στην άρση των αναπαραγωγικών φραγμών και η υψηλή θερμοκρασία, ζεσταίνοντας τον στύλο ή επικονιάζοντας σε υψηλές θερμοκρασίες σε μερικά είδη. Μπορεί να έχει το αντίθετο αποτέλεσμα σε είδη ευαίσθητα στην θερμοκρασία.

4) Χειρισμοί του στύλου και της ωοθήκης

Διάφορες επεμβάσεις στο στύλο και στην ωοθήκη μπορεί να έχει θετικά αποτελέσματα, όπως το κόψιμο και αφαίρεση του στίγματος μαζί με μέρος ή και ολόκληρου του στύλου και ακολουθούμενη με επικονίαση από τον εναπομείναντα μέρος του στύλου (stump pollination ή cut-style ή intrastylar ή amputated pollination).

Μια άλλη τεχνική είναι η μεταμόσχευση στύλου (stylar graft) κατά την οποία οι γυρεόκοκκοι αφήνονται να βλαστήσουν σε ένα συμβατό στίγμα και μετά από μια μέρα ο στύλος κόβεται 1-2 mm πάνω από την ωοθήκη και μεταμοσχεύεται στην ωοθήκη άλλου φυτού.

5) Χημικές μεταχειρίσεις

Η χρησιμοποίηση διαφόρων ρυθμιστών ανάπτυξης όπως αυξίνες, κυτοκινίνες και γιββεριλλίνες στο μίσχο του άνθους ή στην ωοθήκη κατά την επικονίαση ή και λίγο μετά μπορεί να βελτιώσει την δημιουργία καρπού ή σπόρου κατά τις διειδικές διασταυρώσεις. (Emsweller and Stuart 1948; Dionne 1958; Al Yasiri and Coyne 1964; Pittarelli and Stavely 1975).

Η χρήση ανοσοκαταστολέων όπως αμινο-ν-καπρικό οξύ, το σαλικυλικό οξύ και η ακριφλαβίνη έχει χρησιμοποιηθεί στα δημητριακά και στα όσπρια για την παραγωγή υβριδίων. Γίνεται με μεταχείριση του θηλυκού γονέα με αυτά, πριν από την επικονίαση, κατά την διάρκεια ή ακόμα και μετά, και το προκύπτον έμβρυο καλλιεργείται σε κατάλληλο μέσο.

β. Τεχνικές που υπερνικούν τους φραγμούς μετά την γονιμοποίηση

1) Καλλιέργεια ωοθηκών

Η καλλιέργεια ωοθηκών έχει εφαρμοστεί σε πολλά είδη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν η αποβολή συμβαίνει παρά πολύ νωρίς και ο μητρικός ιστός δεν επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των σπόρων. Τότε οι νεαροί καρποί μπορούν να αναπτυχθούν *in vitro* μέχρι το στάδιο όπου είναι εφικτή η ανατομία του εμβρύου.

Σε μερικά είδη που η ωοθήκη είναι αρκετά μεγάλη ,τότε δίνετε να τεμαχιστεί σε μικρά κομματάκια και να καλλιεργηθεί *in vitro* για την διάσωση των εμβρύων.

2) Καλλιέργεια ωαρίων

Η καλλιέργεια ωαρίων εφαρμόζεται στα φυτά όπου ο καρπός αποβάλλεται προτού η καλλιέργεια του εμβρύου να μπορεί να εφαρμοστεί. Οι D.N Vlachostergios, A. G. Mavromatis, S.K. Kantarzi και D. G. Roupakias αναφέρουν ότι η *in vitro* καλλιέργεια ωαρίων, κατά την μελέτη επικονίασης γύρης από *Abelmoschus esculentus* σε άνθη βαμβακιού, μπορεί να οδηγήσει σε γόνιμα ανευπλοειδή μερικώς διειδικά φυτά βαμβακιού τα οποία συνδυάζουν χαρακτηριστικά και από τα δυο είδη *G.hirsutum* και *G.barbadense*. Οι A. G. Mavromatis *et al* , 2005 αναφέρουν ότι η καλλιέργεια ωαρίων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή γενεοτυπικά ανεξάρτητων μερικών διειδικών σειρών βαμβακιού όταν χρησιμοποιείται σαν επικονίασης το *Hibiscus cannabinus*.

3) Καλλιέργεια εμβρύων

Η καλλιέργεια εμβρύων μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στις διασταυρώσεις κατά τις οποίες τα επικονιαζόμενα άνθη παραμένουν στο φυτό για ένα δεδομένο χρονικό διάστημα πριν την φυσική τους αποκοπή.

Η μέθοδος έχει τροποποιηθεί έτσι ώστε να αποφευχθεί το πρόβλημα της απομόνωσης των νεαρών εμβρύων από τις ωοθήκες για την παροχή των απαραίτητων συνθηκών για την επιβίωση τους. Αυτό επιτυγχάνεται με κοπή της ωοθήκης σε κομμάτια και μετά ακολουθεί η καλλιέργεια των κομματιών ή μόνο των κομματιών που περιέχουν το έμβρυο σε κατάλληλο υγρό μέσο.

γ. Ολοκληρωμένες τεχνικές για την υπερνίκηση των φραγμών πριν όπως και μετά την γονιμοποίηση

Σε πολλές διειδικές και διαγενικές διασταυρώσεις έχουν εφαρμοστεί ολοκληρωμένες τεχνικές για την υπερνίκηση των φραγμών που παρατηρούνται τόσο πριν όσο και μετά την γονιμοποίηση. Μια τέτοια τεχνική είναι η *in vitro* επικονίαση και γονιμοποίηση. Σε σχέση με τις άλλες τεχνικές που διατηρούνται μόνο στην ζώνη αναστολής βλάστησης και μεταχειρίζονται την βλάστηση του γυρεόκοκκου και την ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα για την υπερνίκηση των αναπαραγωγικών φραγμών, η *in vitro* επικονίαση φέρνει σε άμεση επαφή του γυρεόκοκκους και γι' αυτό θεωρείται πιο αποτελεσματική (Rangaswamy 1977).

δ. Τεχνικές για την υπερνίκηση της στειρότητας των F_1 υβριδίων

Μετά την επιτυχή διάσωση του εμβρύου μπορεί να προκύψουν αναπαραγωγικοί φραγμοί όπως η κατάρρευση του υβριδίου και η στειρότητα των F_1 υβριδίων. Η κατάρρευση του υβριδίου έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια του υβριδίου πριν από την άνθηση και είναι το αποτέλεσμα ανισορόπητων νέων γονιδιακών ανασυνδιασμών. Η στειρότητα των F_1 διειδικών υβριδίων είναι σύνηθες φαινόμενο και προέρχεται από το αποτέλεσμα της ελλιπούς ζεύξης χρωμοσώμων κατά την διάρκεια της μείωσης.

1) Διπλασιασμός των χρωμοσώμων

Τα διειδικά υβρίδια F_1 ίσως παρουσιάσουν στειρότητα λόγω της έλλειψης χρωμοσώμων κατά την διάρκεια της μείωσης, η οποία επηρεάζει την περεταίρω βελτίωση. Ο σωματικός όμως διπλασιασμός των χρωμοσώμων, με την χρήση ουσιών όπως η κολχικίνη και η οριζαλίνη, ίσως προκαλέσει την ζεύξη των χρωμοσώμων και να επαναφέρει έτσι την γονιμότητα (Hermesen 1984a, b).

2) Εφαρμογή 2n γαμετών

Η χρησιμοποίηση του μειωτικού πολυπλοειδισμού στα διειδικά βελτιωτικά προγράμματα για την introgression χαρακτήρων από διπλοειδή σε τετραπλοειδή. Σε πολλά είδη ο πολυπλοειδισμός είναι το επακόλουθο των λειτουργικών 2n γαμετών από τον ένα ή και από τους δύο γονείς. Τέτοιοι γαμέτες είναι το επακόλουθο μηχανισμών της μειωτικής αποκατάστασης.

2.8 Γενετική Βελτίωση στο βαμβάκι

2.8.1 Γενικά

Μια από τις μεγαλύτερες αλλαγές στην ιστορία της παγκόσμιας γεωργίας προήλθε με τη χρήση των υβριδίων και το ξεπέραςμα της χρήσης πληθυσμών και καθαρών σειρών. Με τον όρο υβρίδια εννοούμε πληθυσμούς που είναι οι πρώτοι απόγονοι διασταυρώσεων γενετικά ανόμοιων γονέων που ανήκουν όμως στο ίδιο είδος ή σε συγγενή είδη (Καλτσίκης Π., 1989, σ.219). Η χρήση τους οδήγησε σε αύξηση της παραγωγικότητας με συνήθως όμως αυξημένες απαιτήσεις και σε εισροές. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι για να παραχθούν οι σπόροι των υβριδίων θέλουν συγκεκριμένες διαδικασίες που μόνο εξειδικευμένοι επιστήμονες μπορούν να πραγματοποιήσουν καθώς και ότι αν οι σπόροι τους χρησιμοποιηθούν για την αναπαραγωγή καλλιεργούμενων φυτών δίνουν συνεχώς μειωμένη παραγωγή.

2.8.2 Μέθοδοι βελτίωσης βαμβακιού

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση του βαμβακιού διαφέρουν από μεθόδους που χρησιμοποιούνται σε άλλα αυτογονιμοποιούμενα φυτά όπως το σιτάρι ή τη σόγια λόγω της μερικής σταυρογονιμοποίησης και των αποτελεσμάτων που έχει στην ανακατανομή του γενετικού υλικού μέσα στους πληθυσμούς του βαμβακιού. Τα καλλιεργούμενα βαμβάκια σπάνια φτάνουν στο σημείο να είναι καθαρές σειρές όπως στα δημητριακά ή τη σόγια. Μια μετρίου βαθμού ετερογένεια και ετεροζυγωτία είναι επιθυμητή στο βαμβάκι έτσι ώστε να εξασφαλίζει μερική

ετέρωση ώστε να διατηρηθεί το υψηλό παραγωγικό δυναμικό. Ο στόχος των βελτιωτών είναι να 'καθαρίσουν' τις σειρές σε τέτοιο βαθμό έτσι ώστε να επιτύχουν ομοιομορφία, αλλά και να διατηρήσουν επαρκή ετεροζυγωτία έτσι ώστε οι καλλιέργειες να είναι εύρωστες και παραγωγικές. Αυτό επιτυγχάνεται με την τελική επιλογή των σειρών στις πρώτες γενεές όπου η ετεροζυγωτία είναι ακόμα παρούσα, ή αναμειγνύοντας συγγενείς σειρές ή οικογένειες κατά την τελική παραγωγή της καλλιέργειας. Τελικά οι σειρές είναι ομοιόμορφες ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, την ανοχή σε ασθένειες και έντομα, την ποιότητα της ίνας αλλά παράλληλα διατηρούν επαρκή ποσοστό ετεροζυγωτίας έτσι ώστε να είναι εύρωστες και να έχουν εύρος οικολογικής προσαρμοστικότητας.

Καθορισμός της ποικιλιακής καθαρότητας (Deteriotation in cultivar purity)

Η απομόνωση των γενεών οδηγεί σε απόκλιση του γονιδιώματος από τον αρχικό καλλιεργητικό τύπο και σε καθορισμό της ποικιλιακής καθαρότητας, αναγκάζοντας κάθε φορά τους σποροπαραγωγούς να παράγουν καινούργιο απόθεμα σε σπόρο προερχόμενο από το σπόρο του βελτιωτή. Η στρατηγική των βελτιωτών βαμβακιού είναι η διατήρηση της ομοιομορφίας στα φυτά, η ανοχή σε ασθένειες και σε έντομα και η διατήρηση ή η βελτίωση των επιθυμητών χαρακτηριστικών της ίνας.

Όπως και στα αυτογονιμοποιούμενα φυτά, ο υβριδισμός χρησιμοποιείται για την δημιουργία νέων γενετικά συνδυασμών και η επαναδιασταύρωση αξιοποιείται στο να προσθέσει συγκεκριμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά σε ήδη υπάρχουσες καλές εμπορικές ποικιλίες. Η επαναλαμβανόμενη επιλογή (Recurrent selection) μπορεί να αξιοποιηθεί στο να συγκεντρωθούν επιθυμητά γονίδια για συγκεκριμένα κληρονομήσιμα ποσοτικά χαρακτηριστικά σε ένα βελτιούμενο γενετικό υλικό.

Εισαγωγή, Εγκλιματισμός και αξιοποίηση του γενετικού υλικού (introduction, acclimatization and germplasm utilization)

Ο εγκλιματισμός παίζει σοβαρότερο ρόλο στην ανάπτυξη του γενετικού υλικού στο βαμβάκι από ότι σε άλλα αυτογονιμοποιούμενα φυτά όπως σιτηρά ή σόγια. Τα πρώτα βαμβάκια ήταν κατά ένα μεγάλο βαθμό μεικτοί πληθυσμοί με διάφορα ποσοστά σταυρογονιμοποίησης και ετεροζυγωτίας τα οποία έδιναν πλαστικότητα και δυνατότητα για γενετικές αλλαγές. Ήταν εκ καταγωγής τροπικά φυτά, ολοετή, φωτοπεριοδικά ευαίσθητα και δεν άνθιζαν σε συνθήκες μακράς ημέρας. Παρόλα αυτά με τη χρήση της επαναλαμβανόμενης επιλογής οι επόμενες γενεές άνθιζαν πρόωρα και ήταν φωτοπεριοδικά ουδέτερες. Η εισαγωγή γενετικού υλικού συνεχίζει να είναι πηγή συγκεκριμένων γονιδίων χρήσιμων σε προγράμματα βελτίωσης.

Η επιλογή στα βελτιωτικά προγράμματα στο βαμβάκι

Η επιλογή καθαρής σειράς δεν έχει πρακτική εφαρμογή στο βαμβάκι γιατί οδηγεί σε ομοζυγωτία, μειώνοντας την ευρωστία και το παραγωγικό δυναμικό. Αντίθετα χρησιμοποιείται μια μορφή γονικής επιλογής έτσι ώστε να διατηρηθεί η καθαρότητα της καλλιέργειας ώστε σταδιακά να βελτιωθεί όπως και η παραγωγή νέων σειρών σε απομονωμένους πληθυσμούς όταν ακολουθούνται από διασταυρώσεις σε ένα πρόγραμμα διασταυρώσεων. Η επαναλαμβανόμενη επιλογή χρησιμοποιείται στο να 'ενισχύσει' τα γονίδια για ένα ποσοτικά κληρονομήσιμο χαρακτηριστικό. Η γενετική και η κυτοπλασματική αρρενοστεριρότητα χρησιμοποιείται έτσι ώστε να απλοποιηθεί η μέθοδος της επαναλαμβανόμενης επιλογής.

Ο υβριδισμός στα βελτιωτικά προγράμματα στο βαμβάκι

Ο υβριδισμός είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος βελτίωσης για την παραγωγή νέων ποικιλιών βαμβακιού. Ο υβριδισμός αξιοποιείται στο να συνδυάσει γονίδια για επιθυμητά χαρακτηριστικά, στο να προσθέσει ένα

γονίδιο για ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό μέσω της επαναδιασταύρωσης, ή στο να ενισχύσει (intensify) γονίδια για ένα ποσοτικό χαρακτηριστικό σε ένα πρόγραμμα επαναλαμβανόμενης επιλογής. Κατά τη διάρκεια των απομονωμένων γενεών γενικά ακολουθείται η διαδικασία της γενεαλογικής επιλογής. Η επιλογή τερματίζεται σε πρόωρο στάδιο, έτσι ώστε να παραμένει μερικό ποσοστό ετεροζυγωτίας, ενώ σπάνια επιδιώκεται μέχρι να φτάσει σε ομοζυγωτία. Οι σειρές διαφέρουν γενετικά αλλά συγχωνεύονται στο να δημιουργήσουν τη νέα ποικιλία.

Υβρίδια βαμβακιού

Το ενδιαφέρον στην αξιοποίηση της υβριδικής ρώμης στο βαμβάκι, καλλιεργώντας υβρίδια πρώτης γενεάς, αυξήθηκε ακολουθώντας την ανακάλυψη της κυτοπλασματικής αρρενοστεριότητας η οποία επιτεύχθηκε μεταφέροντας τα γονίδια από το *G. hirsutum* σε κυτόπλασμα του *G. harkessii*. Η επαναφορά της γονιμότητας γίνεται με τη χρησιμοποίηση του γονιδίου επαναφοράς της γονιμότητας (Rf) προερχόμενο από το *G. harkessii* και ενός γονιδίου προερχόμενο από το βαμβάκι Pima το οποίο ενισχύει τη γονιμότητα.

Στην Ινδία σπόροι υβριδικού βαμβακιού παράγονται εμπορικά με ευνουχισμό και επικονίαση με το χέρι, ή με το χέρι επικονίαση γενετικά αρρενόστειρου βαμβακιού. Το σύστημα παραγωγή υβριδικού βαμβακιού είναι το ίδιο με αυτό στο σιτάρι και σόργο, αξιοποιώντας A-, B- και R- σειρές.

2.9 Ταξινόμηση των υβριδίων βαμβακιού

2.9.1 Γενικά

Στο βαμβάκι, οι διαφορετικοί τύποι υβριδίων που αναπτύσσονται για εμπορική καλλιέργεια μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες ομάδες βάσει:

- α. Των ειδών που συμμετέχουν στη διασταύρωση
- β. Του επίπεδου πλοειδίας ή του αριθμού των χρωμοσωμάτων των μητρικών φυτών, και
- γ. Της μεθόδου παραγωγής του υβριδικού σπόρου.

2.9.2 Ταξινόμηση με βάση των ειδών που συμμετέχουν στη διασταύρωση

Η ταξινόμηση των υβριδίων βαμβακιού βάσει των ειδών που συμμετέχουν στη διασταύρωση μπορεί να χωριστεί σε δυο υποκατηγορίες στα (i) τα ενδοειδικά υβρίδια, και (ii) στα διειδικά υβρίδια.

2.9.2.1 Ενδοειδικά υβρίδια

Ένα υβρίδιο μεταξύ γενετικά διαφορετικών γενοτύπων που ανήκουν στο ίδιο είδος αναφέρεται ως ενδοειδικό υβρίδιο. Τα ενδοειδικά υβρίδια είναι πάντα γόνιμα. Στο βαμβάκι, τα ενδοειδικά υβρίδια έχουν απελευθερωθεί για την εμπορική καλλιέργεια στο *G.hirsutum* σε τετραπλοειδές επίπεδο και στο *G.arboreum* σε διπλοειδές επίπεδο.

Τα περισσότερα από τα ενδοειδικά υβρίδια έχουν αναπτυχθεί με τη συμβατική μέθοδο δηλαδή, με ευνουχισμό και γονιμοποίηση με το χέρι ενώ, πολύ λίγα έχουν παραχθεί μέσω της χρήσης της αρρενοστεριότητας. Μέχρι τώρα στο είδος *G.hirsutum*, ένα υβρίδιο έχει αναπτυχθεί μέσω χρήσης της γενετικής αρρενοστεριότητας (υβρίδιο Suguna) και τρία υβρίδια μέσω της χρήσης της κυτταροπλασματικής γενετικής αρρενοστεριότητας (υβρίδια PKVHy 3, PKVHy 4 και MECH 4).

Τα ενδοειδικά υβρίδια των *G.hirsutum* και *G.arboreum* παρουσιάζουν ανεκτικότητα σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Τα ενδοειδικά υβρίδια του *G.arboreum* είναι ιδιαίτερα ανεκτικά στα ζιζάνια όπως και στις συνθήκες ξηρασίας. Αλλά η ποιότητα της ίνας και η δυνατότητα παραγωγής των ενδοειδικών υβριδίων *G.hirsutum* είναι καλύτερη από ότι στα υβρίδια του *G.arboreum*. Και τα ενδοειδικά υβρίδια του *G.hirsutum* και του *G.arboreum* έχουν ευρύτερη προσαρμοστικότητα.

Έχουν αναπτυχθεί περισσότερα ενδοειδικά υβρίδια σε *G.hirsutum* σε σχέση με το *G.arboreum* με όλα υβρίδια που αναπτύσσονται σε *G.hirsutum* και *G.arboreum* να είναι απλά διασταυρωμένα υβρίδια.

Στο *G.hirsutum*, το πρώτο ενδοειδικό υβρίδιο απελευθερώθηκε το 1970 με το κωδικό H4 από τον κύριο ερευνητικό σταθμό βαμβακιού, Σουράτ του γεωργικού πανεπιστημίου του Gujarat. Το H4 είναι το πρώτο υβρίδιο

βαμβακιού που απελευθερώθηκε για εμπορική καλλιέργεια. Το πρώτο ενδοειδικό υβρίδιο *G.arboreum* απελευθερώθηκε το 1994 με τον κωδικό LDH 11 από τον ερευνητικό σταθμό βαμβακιού του γεωργικού πανεπιστημίου του Punjab, Ludhiana. (www.ikisan.com)

2.9.2.2 Διειδικά υβρίδια

Οι F₁ απόγονοι μεταξύ δύο διαφορετικών ειδών του ίδιου γένους αναφέρονται ως διειδικά υβρίδια. Η ανάπτυξη των πλήρως γόνιμων διειδικών υβριδίων είναι δυνατή μόνο μεταξύ εκείνων των ειδών που έχουν την πλήρη χρωμοσωμική ομολογία. Στο βαμβάκι, τα διειδικά υβρίδια είναι πλήρως γόνιμα μεταξύ *G.hirsutum* και *G.barbadense* και μεταξύ του *G.arboreum* και *G.herbaceum*. Τα διειδικά υβρίδια που έχουν απελευθερωθεί μεταξύ *G.hirsutum* και *G.barbadense* είναι σε τετραπλοειδές επίπεδο και μεταξύ του *G. arboreum* και *G.herbaceum* σε διπλοειδές επίπεδο, με όλα να έχουν αναπτυχθεί με τη συμβατική μέθοδο. Τα περισσότερα από τα διειδικά υβρίδια που έχουν απελευθερωθεί είναι σε τετραπλοειδές επίπεδο και πολύ λίγα είναι σε διπλοειδές επίπεδο.

Τα ενδοειδικά υβρίδια μπορούν να καλλιεργηθούν υπό αρδεύμενες συνθήκες αλλά όχι υπό συνθήκες ξηρασίας γιατί ο γονέας *G.barbadense* σε τέτοια υβρίδια είναι ευαίσθητος στη ξηρασία. Εντούτοις, τα διειδικά διπλοειδή υβρίδια μπορούν να καλλιεργηθούν και υπό τις δυο συνθήκες άρδευσης και μη.

Τα διειδικά τετραπλοειδή υβρίδια είναι ευαίσθητα στη παρουσία παρασίτων, ενώ τα διειδικά διπλοειδή υβρίδια είναι ιδιαίτερα ανεκτικά στα παράσιτα. Με τα διειδικά τετραπλοειδή υβρίδια να έχουν την καλύτερη ποιότητα ινών και την υψηλότερη παραγωγή σε σχέση με τα διειδικά διπλοειδή υβρίδια. (Clark *et al.* 1998; Akdemir *et al.* 2001; Dong *et al.* 2004)

Επίσης τα διειδικά υβρίδια παράγουν περισσότερη ποσότητα σπόρου και ίνα σε σχέση με το *G. hirsutum*, και με ποιότητα των ινών (μήκος, λεπτότητα και αντοχή) ισοδύναμη με αυτή του *G. barbadense* (Davis 1978; Clark *et al.* 1998; Akdemir *et al.* 2001; Venkateswarlu 2001).

Όλα τα διειδικά υβρίδια που αναπτύσσονται στο τετραπλοειδές και διπλοειδές βαμβάκι είναι μέχρι τώρα απλά διασταυρούμενα υβρίδια.

Στο τετραπλοειδές βαμβάκι, το πρώτο διειδικό υβρίδιο αναπτύχθηκε το 1972 με το όνομα Varalaxmi από τον ερευνητικό σταθμό βαμβακιού, Dharwad, πανεπιστήμιο των γεωργικών επιστημών στη Βαγκαλόρη. Στο διπλοειδές βαμβάκι, το πρώτο διειδικό υβρίδιο απελευθερώθηκε το 1985 από τον κύριο ερευνητικό σταθμό βαμβακιού, Σουράτ του γεωργικού πανεπιστημίου του Gujarat για την καλλιέργεια στο κράτος του Gujarat.

2.9.3 Ταξινόμηση με βάση το επίπεδο πλοειδίας

Με βάση το επίπεδο πλοειδίας τα υβρίδια βαμβακιού μπορούν να χωριστούν σε δυο είδη (i) σε τετραπλοειδή υβρίδια, και (ii) σε διπλοειδή υβρίδια.

Εκείνα τα υβρίδια που αναπτύσσονται στα τετραπλοειδή είδη αναφέρονται ως τετραπλοειδή υβρίδια και εκείνοι που παράγονται στα διπλοειδή είδη αναφέρονται ως διπλοειδή υβρίδια.

2.9.3.1 Τετραπλοειδή υβρίδια

Τα τετραπλοειδή υβρίδια αναπτύσσονται στο *G.hirsutum* και *G.barbadense*. Τα τετραπλοειδή υβρίδια είναι δύο τύπων, δηλαδή, ενδοειδικά και διειδικά. Τα ενδοειδικά υβρίδια έχουν αναπτυχθεί μόνο σε *G.hirsutum*.

2.9.3.2 Διπλοειδή υβρίδια

Είναι τα διπλοειδή υβρίδια που αναπτύσσονται μεταξύ των ειδών *G.arboreum* και *G.herbaceum*. Τα διπλοειδή υβρίδια μπορεί να είναι δύο τύπων, ενδοειδικά και διειδικά. Τα ενδοειδικά υβρίδια έχουν αναπτυχθεί μόνο μεταξύ γενοτύπων του είδους *G.arboreum*.

Τα διπλοειδή υβρίδια έχουν υψηλή ανεκτικότητα στα έντομα, τις ασθένειες και τις συνθήκες ξηρασίας. Το κύριο μειονέκτημα των διπλοειδών υβριδίων είναι ότι η μικρή παραγωγικότητα υβριδισμένου σπόρου, λόγω της φτωχής παραγωγής σπόρου στα διασταυρωμένα καρύδια.

2.9.4 Ταξινόμηση με βάση τη μέθοδο παραγωγής σπόρου των υβριδίων

Με βάση τη μέθοδο παραγωγής σπόρου των υβριδίων, αυτά διαχωρίζονται σε:

2.9.4.1 Συμβατικά υβρίδια

Είναι τα υβρίδια όπου ο ευνουχισμός και η γονιμοποίηση γίνεται με το χέρι. Η πλειοψηφία των υβριδίων βαμβακιού αναπτύσσεται με τη συμβατική μέθοδο. Τα συμβατικά υβρίδια έχουν αναπτυχθεί στα τετραπλοειδή και στα διπλοειδή βαμβάκια τόσο σε ενδοειδικό όσο και σε διειδικό επίπεδο.

Υπάρχουν δύο κύρια μειονεκτήματα των συμβατικών υβριδίων. Αρχικά, ο σπόρος τέτοιων υβριδίων είναι πολύ ακριβός επειδή οι εργάτες είναι δεσμευμένοι καθημερινά για τη διαδικασία ευνουχισμού κατά τη διάρκεια της περιόδου των διασταυρώσεων. Αφετέρου, δε ο ευνουχισμός με το χέρι προκαλεί πιθανόν τραυματισμό στο θηλυκό μέρος, με συνέπεια τη φτωχή υβριδική παραγωγή σπόρου.

2.9.4.2 Αρρενόστειρα υβρίδια

Τέτοια υβρίδια αναπτύσσονται μέσω της χρήσης είτε της γενετικής αρρενοστειρότητας είτε της κυτταροπλασματικής γενετικής αρρενοστειρότητας.

Στο βαμβάκι, πολύ λίγα υβρίδια έχουν αναπτυχθεί μέσω της χρήσης της αρρενοστειρότητας. Όλα τα αρρενόστειρα υβρίδια έχουν απελευθερωθεί μόνο σε ενδοειδικά υβρίδια *G.hirsutum* μέχρι τώρα.

Το πρώτο υβρίδιο αναπτύχθηκε το 1978 με το όνομα Suguna μέσω της χρήσης της γενετικής αρρενοστειρότητας. Σήμερα υπάρχουν τρία υβρίδια, τα PKVHy 3, PKVHy 4 και MECH 4 τα οποία έχουν αναπτυχθεί μέσω της χρήσης της κυτταροπλασματικής γενετικής αρρενοστειρότητας.

Υπάρχουν δύο κύρια πλεονεκτήματα αυτών των υβριδίων. Αρχικά, ο σπόρος τέτοιων υβριδίων είναι φτηνότερος λόγω της απουσίας της διαδικασίας ευνουχισμού. Αφετέρου δε, η παραγωγή σπόρου σε τέτοια υβρίδια είναι υψηλότερη επειδή δεν υπάρχει κανένας τραυματισμός της

ωοθήκης λόγω της απουσίας της διαδικασίας ευνουχισμού. Εντούτοις, η παραγωγή προς το παρόν των απελευθερωμένων αρρενόστερων υβριδίων είναι 10-15% χαμηλότερη από των συμβατικών υβριδίων που περιλαμβάνει τους ίδιους γονείς.

2.9.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των υβριδίων

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της χρήσης των υβριδίων βαμβακιού είναι η ανώτερη στρεμματική απόδοση που συνδέεται με την καλύτερη ποιότητα των ινών, ενώ παράλληλα έχουν ευρύτερη προσαρμοστικότητα.

Από την άλλη πλευρά τα υβρίδια παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα όπως το υψηλό κόστος παραγωγής του σπόρου. Στο βαμβάκι, ο υβριδικός σπόρος παράγεται συνήθως με ευνουχισμό και γονιμοποίηση με το χέρι, διαδικασία που είναι πολύ δαπανηρή και αυτό το υψηλό κόστος του σπόρου δεν μπορεί να προσφερθεί από τους παραγωγούς. Ακόμα και αν χρησιμοποιείται η αρρενοστεριότητα, η γονιμοποίηση πρέπει να γίνει με το χέρι γεγονός που ανεβάζει πάλι το κόστος.

Άλλο μειονέκτημα είναι το υψηλό κόστος της καλλιέργειας. Η καλλιέργεια των υβριδίων είναι εντατική σε εισροές από την άποψη των λιπασμάτων και των φυτοφαρμάκων από τις ποικιλίες. Το υψηλό κόστος του σπόρου και η περισσότερο απαιτητική καλλιέργεια ενεργούν ως εμπόδια στην επέκταση της καλλιεργούμενης περιοχής από το υβριδικό βαμβάκι.

Υπάρχει δυσκολία στην παραγωγή σπόρου, κυρίως στα διπλοειδή υβρίδια. Η παραγωγή σπόρου σε διπλοειδή διασταυρώσεις είναι πολύ χαμηλή (περίπου 25%).

Επίσης το πρόβλημα κόμπων και των άγονων ωαρίων είναι μεγαλύτερο στα διειδικά υβρίδια απ' ότι στα ενδοειδικά. Η παρουσία τους έχει επιπτώσεις στην ποιότητα των νημάτων και οδηγεί στην άσχημη εμφάνιση του νήματος.

2.10 *In vitro* καλλιέργεια

In vitro καλλιέργεια σημαίνει καλλιέργεια μέσα σε γυαλί και πιο συγκεκριμένα είναι η καλλιέργεια κυττάρων, ιστών και οργάνων κάτω από ασηπτικές συνθήκες και σε ελεγχόμενα περιβάλλοντα.

Ιστορικά η πρώτη *in vitro* καλλιέργεια έγινε το 1902 από τον Haberlandt, αλλά η πρώτη εμπορική χρήση της έγινε δεν έγινε μέχρι την δεκαετία του 1920 όπου χρησιμοποιήθηκε για την βλάστηση και ανάπτυξη φυτών ορχιδέας. Δεν ήταν όμως μέχρι το 1962 με την ανακάλυψη του θρεπτικού μέσου από τους Murashige and Skoog όπου μπόρεσε πραγματικά να αξιοποιηθεί εμπορικά. Τις δεκαετίες του 60 και 70 που ακολούθησαν, είχαμε την πρώτη κλωνοποίηση φυτών από τον Murashige, ενώ παράλληλα είχαμε την πρώτη παραγωγή απλοειδών καθώς καθώς και σύντηξη πρωτοπλάστων.

Τα πλεονεκτήματα της *in vitro* καλλιέργειας είναι:

1. Γρήγορη παραγωγή ακριβών αντιγράφων φυτών με επιθυμητά γνωρίσματα
2. Ταχύτερη παραγωγή ώριμων φυτών
3. Παραγωγή φυτών από γενετικά τροποποιημένα φυτικά κύτταρα
4. Παραγωγή φυτών ελευθέρων από ασθένειες
5. Παραγωγή απλοειδών φυτών
6. Παραγωγή φυτών των οποίων η ανάπτυξη μέσω σπόρου έχει χαμηλές πιθανότητες επιτυχίας
7. Εισαγωγή νέων ποικιλιών και γενοτύπων

2.10.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ιστοκαλλιέργεια

Κυρίως η ιστοκαλλιέργεια επηρεάζεται από τέσσερις παράγοντες, (i) το υπόστρωμα ανάπτυξης, (ii) περιβαλλοντικούς παράγοντες, (iii) ποια είναι η πηγή των εκφύτων, καθώς και (iv) γενετικούς παράγοντες.

1. Υπόστρωμα ανάπτυξης

Είναι απαραίτητη η παρουσία κάποιων θρεπτικών συστατικών μέσα στο υπόστρωμα ανάπτυξης, καθώς και μια οργανική πηγή άνθρακα. Ουσίες

όπως σάκχαρα (σουκρόζη), βιταμίνες (B1), συνένζυμα, οργανικά συμπληρώματα, ρυθμιστές ανάπτυξης και άγαρ, είναι απαραίτητα στην *in vitro* καλλιέργεια.

2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Μεγάλο ρόλο παίζουν οι συνθήκες του περιβάλλοντος στην *in vitro* καλλιέργεια. Η ένταση, η διάρκεια του φωτός, η θερμοκρασία, οι παρουσίες ασηπτικών συνθηκών και το είδος υποστρώματος, είναι μερικές τις παραμέτρους που πρέπει να προσαρμοστούν ανάλογα με το είδος του φυτού.

3. Πηγή των έκφυτων

Ένας από τους παράγοντες που επηρεάζει την *in vitro* καλλιέργεια είναι και η πηγή των εκφύτων, δηλαδή η ηλικία και το είδος του φυτού. Διαφορετικά είδη φυτών απαιτούν διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας, καθώς και ιστοί μεγάλης ηλικίας απαιτούν διαφορετική μεταχείριση.

4. Γενετικοί παράγοντες

Οι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν σε αρκετά μεγάλο βαθμό την *in vitro* καλλιέργεια, αφού διαφορές στην ιστοκαλλιέργεια δεν έχουμε μόνο ανάμεσα σε διαφορετικά είδη φυτών, αλλά αρκετές φορές μπορεί να απαιτούνται και διαφορετικές συνθήκες από φυτό σε φυτό.

2.10.2 Εφαρμογές της *in vitro* καλλιέργειας

. Η τεχνολογία της *in vitro* καλλιέργειας βασίζεται σε μία ποικιλία μεθόδων που σχετίζονται με την χρήση συγκεκριμένου εκφύτου και τον επιδιωκόμενο στόχο. Εφαρμογές όπως η κλωνική αναπαραγωγή, η καλλιέργεια γαμετοφύτων και η καλλιέργεια πρωτοπλαστών αλλά και άλλες, συνέφεραν στην παραγωγή νέων γενοτύπων.

A. Μικροπολλαπλασιασμός

Η πρώτη εφαρμογή είναι αυτή του μικροπολλαπλασιασμού. Βασική αρχή του μικροπολλαπλασιασμού είναι η παραγωγή πανομοιότυπων

αντιγράφων ενός φυτού τα οποία είναι όμοια με το μητρικό. Σημαντικό είναι η χρησιμοποίηση μεριστωματικού ιστού σαν έκφυτο, και προσπαθούμε να αποφύγουμε το στάδιο του κάλλου. Αποφεύγοντας το στάδιο του κάλλου, αποφεύγουμε και τις συνέπειες που συσχετίζονται με την καλλιέργεια του, όπως η σωματοκλωνική παραλλακτικότητα, και στο τέλος έχουμε την παραγωγή πραγματικών κλώνων. Η ιστοκαλλιέργεια μπορεί να γίνει και με άλλες πηγές εκφύτου ακόμη και κάλλου, αλλά συνήθως μπορεί να παρουσιαστούν προβλήματα.

Ο μικροπολλαπλασιασμός αποτελείται από 5 στάδια: Το πρώτο στάδιο, το Στάδιο 0 όπως αναφέρετε, είναι η επιλογή και η προετοιμασία του ιστού για αποστείρωση. Το επόμενο στάδιο είναι η τοποθέτηση του αποστειρωμένου ιστού μέσα σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα με μακροστοιχεία και μικροστοιχεία. Στο επόμενο στάδιο προσπαθούμε να προκαλέσουμε αύξηση βλαστών με αυξημένη παρουσία ορμονών και πιο συγκεκριμένα τις κυτοκινίνες. Το επόμενο στάδιο είναι να προκαλέσουμε έναρξη της ριζοβολίας με αυξημένες ποσότητες αυξινών. Αφού έχουν δημιουργηθεί οι βλαστοί και οι ρίζες, το επόμενο στάδιο είναι να μεταφέρουμε τα φυτά στο έδαφος για σκληραγώγηση.

B. Διατήρηση του γενετικού υλικού

Η επόμενη εφαρμογή είναι η διατήρηση του γενετικού υλικού. Είναι μια προέκταση του μικροπολλαπλασιασμού. Χρησιμοποιείται όταν τα φυτά δεν μπορούν να παράγουν σπόρους ή αποθηκεύσιμους σπόρους ή όταν πρέπει να διατηρηθούν σαν ακριβή κλώνοι για βελτιωτικά ή ερευνητικά προγράμματα. (π.χ. πατάτες)

Υπάρχουν δυο κύριες μέθοδοι. Η πρώτη αναφέρεται σε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του γενετικού υλικού. Για να το επιτύχουμε αυτό χρησιμοποιούμε διάφορες τεχνικές όπως η διατήρηση των φυτικών οργάνων σε χαμηλές θερμοκρασίες (γύρω στους 4 °C για τα καλλιεργούμενα είδη και γύρω στους 10-14 °C για τα τροπικά είδη), με μείωση του φωτισμού και με αφυδάτωση των ιστών. Με αυτό τον τρόπο οι ιστοί μπορούν να διατηρηθούν για χρονικό διάστημα από 1-4 χρόνια.



Εικόνα 5: Διατήρηση γενετικού υλικού κάτω από ειδικές συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού

Γ. Κρυοδιατήρηση

Η επόμενη μέθοδος είναι η κρυοδιατήρηση. Στην κρυοδιατήρηση χρησιμοποιούμε ακόμη πιο χαμηλές θερμοκρασίες με την χρήση υγρού αζώτου. Σε αυτές τις θερμοκρασίες σταματούν οι κυτταρικές διαιρέσεις και όλες οι μεταβολικές διαδικασίες. Υπό αυτές τις συνθήκες ο χρόνος διατήρησης είναι θεωρητικά επ' άριστον.

Δ. Δημιουργία σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας

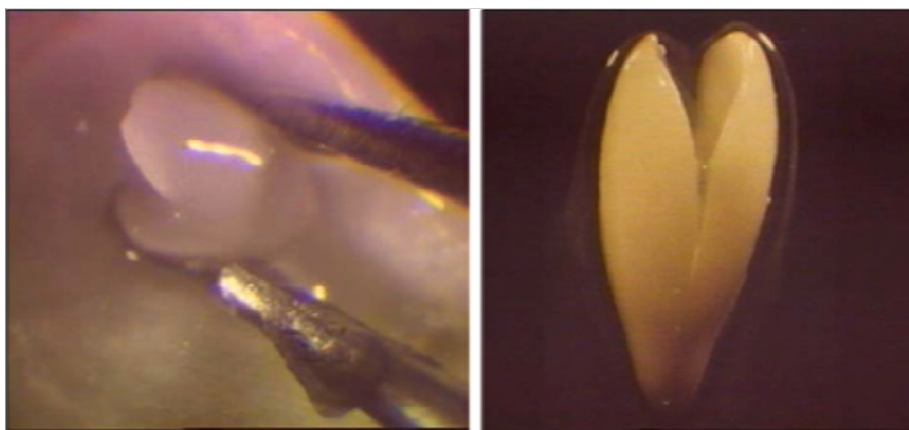
Η επόμενη εφαρμογή είναι αυτή της δημιουργίας σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας. Η σωματοκλωνική παραλλακτικότητα είναι ένα γενικό φαινόμενο που παρατηρείται σε φυτά προερχόμενα από ιστοκαλλιέργεια που περιλαμβάνει το στάδιο του κάλλου. Η σωματοκλωνική παραλλακτικότητα είναι μια χρήσιμη πηγή για την εισαγωγής γενετικής παραλλακτικότητας η οποία μπορεί να είναι χρήσιμη στους βελτιωτές. Μπορεί να είναι μια απλή γονιδιακή μετάλλαξη στον πυρήνα ή σε άλλα οργανίδια, που όμως να αποκαλύψει επιθυμητά χαρακτηριστικά στον γενότυπο, όπως η αντοχή σε ασθένειες και ζιζανιοκτόνα.

Μπορεί να έχει δυο μορφές. Η πρώτη είναι κληρονομήσιμη στους απογόνους και προκαλεί αλλαγές στο DNA. Η άλλη είναι σταθερή μεν, αλλά δεν είναι κληρονομήσιμη, απλώς προκαλεί αλλαγές στην έκφραση του γονιδίου (επιγενετικές αλλαγές).

Ε. Καλλιέργεια εμβρύων

Η επόμενη εφαρμογή είναι η καλλιέργεια εμβρύων. Η εμβρυοκαλλιέργεια προήλθε από την ανάγκη για διάσωση των εμβρύων που προέρχονται από διασταυρώσεις μακριά συγγενικών ειδών επειδή δεν μπορούσε το έμβρυο να αναπτυχθεί.

Η καλλιέργεια εμβρύων χρησιμοποιείται κυρίως για την διάσωση F1 υβριδίων που προέρχονται από διασταυρώσεις μακριά συγγενικών ειδών όπως διασταυρώσεις μεταξύ καλλιεργούμενων και άγριων ειδών. Επίσης με την προσθήκη κατάλληλων ορμονών (GA) στο θρεπτικό μέσο μπορούμε να ξεπεράσουμε το λήθαργο του σπόρου. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να ξεπεραστεί η ανωριμότητα των σπόρων και με αυτό τον τρόπο μπορούμε να έχουμε αύξηση των γενεών ανά έτος, το οποίο είναι χρήσιμο στα βελτιωτικά προγράμματα ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάσωση πολύτιμων γενοτύπων.



Εικόνα 6: Καλλιέργεια εμβρύου πατάτας

ΣΤ. Παραγωγή Απλοειδών και διαπλοειδών φυτών

Η επόμενη εφαρμογή είναι η παραγωγή απλοειδών και διαπλοειδών φυτών. Απλοειδή φυτά είναι φυτά ,τα οποία έχουν τον μονό αριθμό χρωμοσώμων στα σωματικά τους κύτταρα και μπορούν να παραχθούν με τρεις τρόπους:

1. Μέσω της διάσωσης εμβρύων που προέρχονται από διειδικές διασταυρώσεις, τα οποία έχουμε την δημιουργία αλλόπολυπλοειδών όπως το triticales.

2. Από καλλιέργεια ανθέρων ή γύρης, όπως και

3. Από καλλιέργεια αγονιμοποίητων ωαρίων.

Με αυτό των τρόπο έχουμε παραγωγή ώριμου φυτού από ένα μόνο μικροσπόριο ή μακροσπόριο.

Τα απλοειδή είναι αδύνατα και στείρα φυτά. Για αυτό το λόγο πρέπει να κάνουμε διπλασιασμό των χρωμοσώμων για παραγωγή διαπλοειδών φυτών, τα οποία έχουν κανονική ανάπτυξη και γονιμότητα.. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με δυο τρόπους : μπορεί να γίνει αυθόρμητα, ένα γεγονός που συμβαίνει σε όλα τα απλοειδή ή με την χρήση κολχικίνης.

Τα απλοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση των απογόνων της F_1 γενιάς και πιο συγκεκριμένα για την αξιολόγηση τους για υποτελή και ποσοτικά χαρακτηριστικά. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία F_2 οικογενειών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών, ή για την σταθεροποίηση καθαρών σειρών.

Θεωρητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την μείωση της ομομεικτικής εξασθένησης. Αν κάνουμε έλεγχο για επιβλαβή γονίδια και σε μεγάλους πληθυσμούς, θεωρητικά μπορούμε να μειώσουμε ή να εξαφανίσουμε την ομομεικτική εξασθένηση.

Z. *In vitro* υβριδοποίηση

Η επόμενη εφαρμογή είναι αυτή της *in vitro* υβριδοποίησης. Οι πρωτοπλάστες είναι κύτταρα στα οποία απουσιάζει το κυτταρικό τοίχωμα. Μπορούμε να τους απομονώσουμε από όλα τα μέρη του φυτού φύλλα, άνθη, βλαστούς, ρίζες, ανθήρες, στήμονες

Χρησιμοποιούνται δυο τρόποι για την απομόνωση τους :

1. Μηχανικά και

2. Ενζυματικά, χρησιμοποιώντας ένα μίγμα από ένζυμα που περιέχουν κελουλάσες (*Trichoderma reesei*), ημικελουλάσες και πηκτινάσες (Macerozyme) .

Υπάρχουν 3 μέθοδοι για να πετύχουμε την σύντηξη: Η πρώτη είναι με την χρήση ηλεκτρικού πεδίου και γίνεται σε δυο φάσεις. Στην πρώτη φάση γίνεται τοποθέτηση των πρωτοπλαστών σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο υψηλής συχνότητας που οδηγεί στο σχηματισμό αλυσίδων. Στην επόμενη φάση που ακολουθεί μερικά ms αργότερα οι πρωτοπλάστες τοποθετούνται σε συνεχές ηλεκτρικό πεδίο το οποίο οδηγεί σε σύντηξη.



Εικόνα 7: Η πρώτη φάση (αριστερά) και η δεύτερη φάση (κέντρο και δεξιά) της σύντηξης

Η δεύτερη μέθοδος είναι αυτή της πολυαιθυλικής γλυκόλης που προκαλεί συγχώνευση πολλών τύπων σωματιδίων, μεταξύ των οποίων και οι πρωτοπλάστες, όταν αυτοί φυγοκεντρίζονται παρουσία της.

Η τρίτη μέθοδος κάνει χρήση ιόντων ασβεστίου και απαιτεί χρήση υψηλού pH.

Η σύντηξη των πρωτοπλαστών μπορεί να υπάρξει και αυθόρμητα στη φύση, όμως αυτό σπάνια συμβαίνει, εξαιτίας αμοιβαίας απώθησης λόγω αρνητικά φορισμένων πλασματικών μεμβρανών.

Οι πρωτοπλάστες έχουν αρκετές χρήσεις στην επιστημονική κοινότητα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον συνδυασμό δυο γενωμάτων, έχοντας έτσι την δημιουργία αλλοπολυπλοειδών. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την μερική μεταφορά γενώματος και την μεταφορά οργανιδίων, όπως χλωροπλαστών και μιτοχονδρίων και χρησιμοποίηση ιονίζουσας ακτινοβολίας για την καταστροφή του μη επιθυμητού πυρηνικού DNA. Τα τελευταία χρόνια βρίσκουν και εφαρμογή στη γενετική μηχανική και χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή ενός ή περισσότερων γονιδίων μέσα σε ένα κύτταρο στόχο.

Η. Παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών

Η επόμενη εφαρμογή είναι η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών όπως αλκαλοειδή, τερπενοειδή, στεροειδή, ανθοκυανίνες, Ανθρακουινόνες, Πολυφαινόλες, ουσίες εμπορικά πολύτιμες αλλά και πολύπλοκες ενώσεις που δεν μπορούν να παραχθούν στο εργαστήριο. Οι ουσίες αυτές συνήθως δεν είναι μέρος του κυρίως μεταβολισμού του φυτού και δεν έχουν γνωστή λειτουργία στο φυτό.

Η τεχνική που χρησιμοποιείται για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών είναι αυτή της καλλιέργειας κυττάρων. Και μπορούμε να το επιτύχουμε με δυο διαφορετικές κατευθύνσεις . Η πρώτη είναι με γρήγορη ανάπτυξη των κυττάρων που οδηγεί σε παραγωγή τους σε μεγάλες ποσότητες και η δεύτερη είναι η ανάπτυξη και ακολούθως η σταθεροποίηση των κυττάρων για παραγωγή σταθερής ποσότητας ουσιών για παρατεταμένο χρονικό διάστημα

Συνήθως η ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται στην αναγέννηση μεταμορφωμένων φυτικών ειδών μετά από εισαγωγή ξένου προς αυτά DNA για την δημιουργία επιθυμητών γενοτύπων όπως φυτά με ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα και έντομα. Με το ίδιο τρόπο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της λειτουργία των γονιδίων που εισάγονται.

2.11 Καλλιέργεια πρωτοπλαστών

Το πρώτο βήμα στην καλλιέργεια πρωτοπλαστών είναι η ανάπτυξη του κυτταρικού τοιχώματος γύρω από την κυτταρική μεμβράνη των πρωτοπλαστών. Αυτό ακολουθείται από την έναρξη της διαίρεσης του νεοσυσταθέντος κυττάρου δημιουργώντας έτσι μικρές ομάδες κυττάρων (colonies). Με χειρισμό τόσο των θρεπτικών, όσο των φυσιολογικών συνθηκών στο θρεπτικό μέσο, οι μικρές ομάδες μπορεί να αναπτυχθούν σε κάλλο ή ακόμη να αναγεννηθούν σε ολόκληρα φυτά. Οι καλλιεργητικές μέθοδοι και οι απαιτήσεις των απομονωμένων πρωτοπλαστών είναι σχεδόν πάντα όμοιες με αυτές των μεμονωμένων κυττάρων.

Οι απομονωμένοι πρωτοπλάστες ή τα υβρίδια αυτών καλλιεργούνται είτε σε υγρό καλλιεργητικό μέσο ή σε άγαρ. Μια κοινή χρήση είναι η χρησιμοποίηση υγρού υποστρώματος στο οποίο είναι ενσωματωμένοι οι πρωτοπλάστες ή τα ετεροκάρυα υπό την μορφή λεπτού στρώματος από θρεπτικά συστατικά μέσα σε σφραγισμένους με parafilm δίσκους petri. Τότε αφήνονται σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού σε θερμοκρασίες 25-28 °C.

2.11.1 Θρεπτικοί παράγοντες

Τα καλλιεργητικά μέσα των πρωτοπλαστών συνήθως αποτελούνται με θρεπτικά συστατικά παρόμοια με αυτά που απαιτούνται για την καλλιέργεια του κάλλου και των καλλιεργειών αιωρημάτων (suspension cultures). Παρόλα αυτά, η συγκέντρωση του σιδήρου, του ψευδαργύρου και του αζώτου, που χρησιμοποιείται για στην ιστοκαλλιέργεια μπορεί να είναι πολύ υψηλή για την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών. Κυρίως κατάλληλα για την καλλιέργεια πρωτοπλαστών θεωρούνται τα άλατα B5 και το καλλιεργητικό μέσο MS με μερικές όμως μετατροπές. Αυξάνοντας την συγκέντρωση του Ca^{2+} στο καλλιεργητικό μέσο, δυο με τέσσερις φορές περισσότερο από την κανονική συγκέντρωση, μπορεί να έχει ευεργετικό αποτέλεσμα στην διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης (Torres 1989). Γενικά όμως, το καλλιεργητικό μέσο, πρέπει να περιέχει 3-5% σουκρόζη, όμως σε μερικά φυτά όπως ο καπνός απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση σουκρόζης (1,5%). Επίσης στο σύστημα απαιτείται και μια οργανική πηγή αζώτου υπό την μορφή CH, ενώ άζωτο με την μορφή NH_4NO_3 απαιτείται σαν πηγή ανόργανου αζώτου.

Οι βιταμίνες που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια πρωτοπλαστών είναι παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται και στην ιστοκαλλιέργεια.

Οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια πρωτοπλαστών σε διαφορετικούς συνδυασμούς έτσι ώστε να προκαλέσουν τον σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος αλλά και των κυτταρικών διαιρέσεων στους απομονωμένους πρωτοπλάστες. Οι πρωτοπλάστες των δημητριακών απαιτούν 2,4 D το οποίο από μόνο του μπορεί να είναι επαρκές, αλλά θα έχουμε καλύτερα αποτελέσματα αν συνδυαστεί με κυτοκινίνη (Vasil and Vasil, 1980). Παρόλα αυτά, η χρησιμοποίηση μόνο 2,4 D σαν αυξητικού παράγοντα, προκαλεί την απώλεια μορφογενετικού δυναμικού στους νεοδιαριεμένους κάλλους. Άλλες αυξίνες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι το IAA και το NAA. Οι κυριότερες κυτοκινίνες που χρησιμοποιούνται είναι το BAP, κινητίνη, 2iP και η ζεατίνη. Παρόλο ο ακριβής συνδυασμός των ορμονών που απαιτούνται στο καλλιεργητικό μέσο διαφέρει ανάλογα με το είδος, γενικά έχει παρατηρηθεί ότι οι πρωτοπλάστες που προέρχονται από καλλιέργεια με ζωηρό ρυθμό ανάπτυξης απαιτούν μεγαλύτερο λόγο

αυξίνης/κινητίνης για να διαιρεθούν, ενώ αυτοί που προέρχονται από διαφοροποιημένα κύτταρα, όπως κύτταρα φύλλου, απαιτούν υψηλό λόγο κινιτίνης/αυξίνης για να αναγεννηθούν.

2.11.2 Ωσμωτικό μέσο (Osmoticum)

Κατά την διάρκεια της απομόνωσης και της καλλιέργειας των πρωτοπλαστών, οι πρωτοπλάστες απαιτούν ωσμωτική προστασία μέχρι τουλάχιστον να αναγεννήσουν το κυτταρικό τους τοίχωμα. Η προσθήκη ενός ωσμωτικού μέσου, τόσο κατά την απομόνωση, όσο και στην καλλιέργεια αποτρέπει την ρήξη των πρωτοπλαστών. Μια ποικιλία ιοντικών, καθώς και μη ιοντικών διαλυτών έχει δοκιμαστεί για την ρύθμιση του ωσμωτικού δυναμικού σε διάφορα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια πρωτοπλαστών. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ωσμωτικό μέσο στο καλλιεργητικό μέσο, όπως και στο ενζυμικό διάλυμα, είναι ένας συνδυασμός από σορβιτόλη, μανιτόλη, γλυκόζη ή σουκρόζη. Γενικά όμως, οι πρωτοπλάστες είναι πιο σταθεροί στην παρουσία ενός ελαφρώς υποτονικού διαλύματος. Για τους πρωτοπλάστες που προέρχονται από το μεσόφυλλο (δημητριακά και μπιζέλι) απαιτείται σορβιτόλη ή μανιτόλη σαν ωσμωτικός σταθεροποιητής, ενώ στις πατάτες, την βρώμη και στην cassava, καταλληλότερη θεωρείται η παρουσία σουκρόζης ή μανιτόλης, ενώ για τον καπνό η γαλακτόζη και η φρουκτόζη. Η συγκέντρωση του ωσμωτικού μέσου μειώνεται σταθερά καθώς οι πρωτοπλάστες αρχίζουν να δημιουργούν κυτταρικό τοίχωμα, προσθέτοντας κάθε φορά και λιγότερη ποσότητα φρέσκου ωσμωτικού μέσου στο καλλιεργητικό υπόστρωμα.

Η παρουσία ιοντικών ουσιών βελτιώνει την ζωτικότητα των πρωτοπλαστών. Συνήθως το ενζυμικό διάλυμα περιέχει ορισμένα άλατα ($5-100 \text{ mmolL}^{-1} \text{ CaCl}_2$) μαζί με μη ιοντικούς ωσμωτικούς σταθεροποιητές. Οι Cocky και Peberdy (1974) ανέπτυξαν ένα διάλυμα για "πλύσιμο" των πρωτοπλαστών (CPW salts) το οποίο περιείχε άλατα και κατάλληλο ωσμωτικό μέσο, το οποίο παρέχει μεγαλύτερη σταθερότητα καθώς και οι πρωτοπλάστες ήταν πιο "καθαροί".

2.11.3 Συγκέντρωση πρωτοπλαστών στο καλλιεργητικό μέσο

Καταλληλότερη θεωρείται μια πυκνότητα της τάξης των 1×10^4 έως 1×10^5 πρωτοπλάστες ανά mL, αφού σε τέτοιες υψηλές συγκεντρώσεις οι κυτταρικές ομάδες (colonies) που προέρχονται από μεμονωμένους πρωτοπλάστες τείνουν να αυξάνονται σχετικά σε νωρίτερο στάδιο στην καλλιέργεια. Πειράματα όμως πάνω στον σωματικό υβριδισμό ή στην μεταλλαξογένεση απαιτούν την κλωνοποίηση μεμονωμένων κυττάρων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μόνο με χαμηλή πυκνότητα (100-500 πρωτοπλάστες ανά mL). Στις χαμηλές αυτές πυκνότητες η διαδικασία της ανάπτυξης των μεμονωμένων πρωτοπλαστών μπορεί να παρατηρηθεί πιο εύκολα, και ακολούθως να αναγνωριστούν οι υβριδικές αποικίες. Τα θρεπτικά συστατικά που χρησιμοποιούνται συνήθως στα καλλιεργητικά δεν είναι επαρκή για να προκαλέσουν διαιρέσεις των πρωτοπλαστών όταν αυτοί βρίσκονται σε έτσι χαμηλές συγκεντρώσεις.

Οι Kao και Michayluk (1975) ανέπτυξαν ένα πολύπλοκο καλλιεργητικό μέσο (KM8p) στο οποίο οι πρωτοπλάστες του *Vicia hajastana* είναι ικανοί να διαιρούνται μέχρι τον σχηματισμό του κάλλου. Το ίδιο καλλιεργητικό μέσο προκαλεί γρηγορότερες διαιρέσεις σε πρωτοπλάστες που προέρχονται από το μεσόφυλλο σε μηδική, μπιζέλι, πατάτα και σε υβριδικούς πρωτοπλάστες (τομάτας)Χ(πατάτας). Το καλλιεργητικό μέσο τοποθετείται στο σκοτάδι, λόγω του ότι το καλλιεργητικό μέσο δp μετατρέπεται σε φυτοτοξικό στην παρουσία φωτός υψηλής έντασης.

2.11.4 Αναγέννηση πρωτοπλαστών

α. Σχηματισμός του κυτταρικού τοιχώματος

Η διαδικασία του σχηματισμού του κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να ολοκληρωθεί από 2 μέρες μέχρι και αρκετές μέρες, παρόλο που οι πρωτοπλάστες ξεκινούν τον σχηματισμό νέου κυτταρικού τοιχώματος μέσα σε λίγες μόνο ώρες μετά την απομόνωση. Οι πρωτοπλάστες χάνουν το χαρακτηριστικό σφαιρικό τους σχήμα μόλις ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του κυτταρικού τοιχώματος. Ο σχηματισμός του κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να

καταδειχθεί χρησιμοποιώντας την φθορίζουσα χρωστική Calcafluor White ST (American Cyanamide Co, USA). Η παρουσία κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να δοκιμαστεί με το να τοποθετήσουμε τους πρωτοπλάστες σε διάλυμα Calcafluor συγκέντρωσης 0,1% ή 0,01%, σε παρουσία ωσμωτικού σταθεροποιητή για 5 λεπτά. Οι πρωτοπλάστες τότε ξεπλένονται για να αφαιρεθεί η περίσσεια χρωστικής και τοποθετούνται σε καλλιεργητικό μέσο με κατάλληλο ωσμωτικό δυναμικό. Το Calcafluor δένεται με συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και φθορίζει στην παρουσία λάμπας υδραργύρου υπό φίλτρων BG12 και K510. Μια παρόμοια χρωστική που συμπεριφέρεται με παρόμοιο τρόπο είναι και το διάλυμα Tinapol (Geigy, UK Ltd).

Το νεοσυσταθέν κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από χαλαρά διευθετημένες μικροΐνες και απαιτεί μέσα στο καλλιεργητικό μέσο την παρουσία μια εξωγενούς πηγής άνθρακα που να μπορεί μεταβολίζεται εύκολα, όπως η σουκρόζη.

Υπάρχει μια γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στο σχηματισμό κυτταρικού τοιχώματος και των κυτταρικών διαιρέσεων. Οι πρωτοπλάστες με όχι καλά αναπτυγμένο κυτταρικό τοίχωμα συχνά έχουν καλύτερη ανάπτυξη από αυτούς που δεν ήταν ικανοί να αναπαράγουν κυτταρικό τοίχωμα. Αυτό οφείλεται στο λόγο ότι οι δεύτεροι δεν υφίστανται σε μίτωση.

β. Ανάπτυξη του κάλλου / Αναγέννηση ολόκληρων φυτών

Σύντομα μετά τον σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος γύρω από τους πρωτοπλάστες, τα νεοσυσταθέν κύτταρα είναι γενικά μεγαλύτερα σε μέγεθος και μέσα στην πρώτη εβδομάδα αρχίζουν οι πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις. Οι επακόλουθες διαιρέσεις έχουν σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό μικρών ομάδων κυττάρων (colonies), που αρχίζουν να φαίνονται μακροσκοπικά μέσα στις επόμενες 2-3 εβδομάδες. Σε αυτό το στάδιο, μπορούν να μεταφερθούν σε καλλιεργητικό μέσο στο οποίο δεν περιέχεται ωσμωτικός σταθεροποιητής, για να αναπτυχθεί τότε ο κάλλος. Ακολούθως ο κάλλος μπορεί είτε να διαφοροποιηθεί σε κάποιο όργανο (οργανογένεση) ή να αναγεννηθεί σε ολόκληρο φυτό. Η πρώτη αναγέννηση φυτού έχει αναφερθεί από τους Takebe *et al* (1971) και από τότε η λίστα με τα αναγεννημένα φυτά έχει αυξηθεί δραματικά.

2.12 Η καλλιέργεια πρωτοπλαστών στο βαμβάκι

Από τον 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο, η θέση του βαμβακιού σαν επικρατούσα ίνα στην κλωστοϋφαντουργία, άρχισε να απειλείται από την ανάπτυξη συνθετικών ινών. Για να μείνει το βαμβάκι ανταγωνιστικό, ήταν απαραίτητη μια συνεχόμενη έρευνα για να βελτιωθεί η ποιότητα των ινών του βαμβακιού, τόσο βασική, όσο και εφαρμοσμένη.

Οι εντατικές προσπάθειες της κλασσικής βελτίωσης, είχε σαν αποτέλεσμα την δημιουργία των υψηλοαποδοτικών και εξαιρετικής ποιότητας, τετραπλοειδών βαμβακιών. Η αντοχή στην αλατότητα, η αντίσταση τόσο σε έντομα όσο και σε ασθένειες, η δημιουργία φυτών με τους προστατευτικούς αδένες αλλά απουσία αυτών από τους σπόρους, αλλά και η προσαρμογή του σε πληθώρα περιβάλλοντα, ήταν πάντα οι στόχοι σε όλα τα βελτιωτικά προγράμματα. Παρόλο που υπάρχει ακόμη ένα τεράστιο γενετικό απόθεμα που περιμένει να εκμεταλλευθεί στην φύση, η περεταίρω βελτίωση στο βαμβάκι μέσω της υβριδοποίησης είναι ιδιαίτερα δύσκολη, λόγω της ασυμβατότητας μεταξύ τους.

Αυτοί περιορισμοί είχαν σαν αποτέλεσμα να βρεθούν εναλλακτικοί τρόποι βελτίωσης του γενώματος του βαμβακιού. Αναπτύχθηκαν διαφορετικές τεχνικές για να μεταφέρουν νέα γονίδια στα φυτά και έτσι είχαμε την δημιουργία των πρώτων γενετικά τροποποιημένων φυτών βαμβακιού. Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένας τέτοιος φορέας ικανός να μεταφέρει γονίδια σε αρκετά είδη φυτών. Όμως υπόκειται σε περιορισμούς, λόγω του μικρού εύρους ξενιστών του βακτηρίου, του μικρού ποσοστού αποτελεσματικότητας στην μεταφορά, προβλήματα με την αφαίρεση του βακτηρίου μετέπειτα, καθώς και στην διαχείριση του DNA σε μεγάλα πλασμίδια. Εναλλακτικές μέθοδοι για την μεταφορά γονιδίων, όπως το γονιδιακό πιστόλι και η καλλιέργεια πρωτοπλαστών έχουν υψηλές προσδοκίες.

2.12.1 Στόχοι της καλλιέργειας πρωτοπλαστών

Οι πρωτοπλάστες είναι ένα ακόμη αναγνωρισμένο μέσο, ιδανικό για την μεταφορά γονιδίων (Potrykus, 1991) λόγω του ότι το κυτταρικό τοίχωμα

αφαιρείται (δεν είναι πλέον φυσικός φραγμός) έτσι το πλασμαλύμμα είναι πιο επιδεκτικό σε επιδράσεις. Η συχνότητα κατά την οποία τα γονίδια φτάνουν και εισέρχονται στον πρωτοπλάστη αυξάνεται σημαντικά. Η εισαγωγή του DNA γίνεται πλέον φυσική διεργασία. Και επειδή δεν υπάρχει ανάγκη για κάποιο φυσικό φορέα, αυξάνεται το εύρος των ξενιστών. Η ηλεκτροπόρωση (electroporation) και η τεχνική της μικροένεσης (microinjection) είναι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στους πρωτοπλάστες.

Η γενετική βελτίωση μπορεί επίσης να επιτευχθεί μέσω της σύντηξης πρωτοπλαστών που έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία σωματικών υβριδίων. Η χημική σύντηξη χρησιμοποιώντας polyethylene glycol και η ηλεκτοσύντηξη (electrofusion) είναι οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην σύντηξη πρωτοπλαστών. Από τους πρωτοπλάστες έχουμε την ικανότητα της παραγωγής φυτών από μόνο ένα κύτταρο (άρα όχι χίμαιρα) και στην επιλογή κλώνων με νέα χαρακτηριστικά μέσω της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας. Μέχρι σήμερα η αναγέννηση φυτών βαμβακιού από πρωτοπλάστες περιορίζεται μόνο στην εφαρμογή τεχνικών τροποποίησης των πρωτοπλαστών.

2.12.2 Πρόσφατα επιτεύγματα στην καλλιέργεια πρωτοπλαστών βαμβακιού

Για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν οι πρωτοπλάστες στην γενετική βελτίωση, ήταν απαραίτητη η έρευνα για να δημιουργηθεί η κατάλληλη τεχνολογία και γνώση. Αρχικά οι πρωτοπλάστες αποκομίζονταν μέσω μηχανικής απομόνωσης, σήμερα όμως οι πρωτοπλάστες αποκομίζονται μέσω ενζυματικής διάλυσης των κυτταρικών τοιχωμάτων χρησιμοποιώντας κυρίως cellulase και pectinase. Η απομόνωση γίνεται με τέτοιο τρόπο που οι πρωτοπλάστες δεν παθαίνουν ζημιά και διατηρούν την ικανότητα να συνθέσουν νέο κυτταρικό τοίχωμα, όπως και την ικανότητα να διαιρεθούν και να αναγεννηθούν σε ακέραια φυτά.

Τα πρώτα πειράματα με απομόνωση και καλλιέργεια πρωτοπλαστών βαμβακιού έγιναν το 1977 από τους Bhojwani *et al* (Bhojwani *et al*, 1977). Οι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν από κάλλο προερχόμενο από υποκοτύλες *G.hirsutum*. Ακολούθως οι πρωτοπλάστες καλλιεργήθηκαν σε υγρό

καλλιεργητικό μέσο. Οι πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις παρατηρήθηκαν μετά από 6 μέρες από όπου προέκυψαν ομάδες 25-30 κυττάρων μετά από 5 εβδομάδες.

Οι Finer και Smith (1982) περιγράφουν την καλλιέργεια πρωτοπλαστών από εύθραυστους κάλλους που προήλθαν από υποκοτύλες του *G. Klotzscianum*. Αναφέρουν πως η αποτελεσματικότητα της απομόνωσης επηρεάστηκε από την ηλικία του κάλλου, τον χρόνο επώασης στο ενζυματικό μίγμα, την συγκέντρωση του ωσμωτικού μέσου και την ταχύτητα ανατάραξης κατά την διάρκεια της ενζυματικής χώνεψης. Η πρώτη διαίρεση παρατηρήθηκε μετά από 3 μέρες μετά την απομόνωση και οι πολυκυτταρικές αποικίες εμφανίστηκαν μετά από 2 εβδομάδες.

Σε πειράματα των Finoozobady και DeBoer (1986) φαίνεται ότι η ικανότητα αναγέννησης των πρωτοπλαστών που απομονώθηκαν απευθείας από ιστούς που προέρχονταν από υποκοτύλες ή από νεαρούς μίσχους, να είναι πιο περιορισμένη, σε σχέση με αυτούς που απομονώθηκαν από κάλλο, αφού όσοι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν απευθείας από κοτυληδόνες σχημάτισαν ομάδες κυττάρων με μόνο 2-3 κύτταρα στο *G. hirsutum* και 5-8 κυττάρων στο *G. barbadense*. Ο Finoozobady (1986) απόδειξε ότι η ικανότητα των πρωτοπλαστών να αναπαράγουν νέο κυτταρικό τοίχωμα και να υφίστανται σε διαιρέσεις, εξαρτάται από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου κατά την διάρκεια της απομόνωσης, το οποίο ακολούθως εξαρτάται από την ηλικία και την ανάπτυξη του δότη ιστού.

Οι Thomas και Katterman (1984) απομόνωσαν πρωτοπλάστες που προέρχονταν από ανθήρες του *G. hirsutum*. Παρατήρησαν ότι η απόδοση σε ζωντανούς πρωτοπλάστες είναι ιδιαίτερα αυξημένη όταν προστεθούν προστατευτικοί παράγοντες στο ενζυματικό μίγμα. Το Ca^{2+} , Mg^{2+} και ορισμένα αμινοξέα, εμποδίζουν την αυθόρμητη λύση των πρωτοπλαστών κατά την διάρκεια της προετοιμασίας της cellulase. Χρησιμοποιώντας αυτούς του προστατευτικούς παράγοντες, εμφανίστηκε κάλλος, το μέγεθος του οποίου μπορούσε να φανεί μακροσκοπικά μετά από καλλιέργεια 3 εβδομάδων.

Οι Saka *et al.* (1987) αναφέρουν μια μέθοδος για την απομόνωση και καλλιέργεια πρωτοπλαστών προερχόμενοι από κάλλο που προήλθε από μίσχο του *G. hirsutum*, η οποία οδηγεί σε ιστό κάλλου που αναπτύσσεται κανονικά.

2.13 Αναγέννηση βαμβακιού (Ratna Kumria *et al*, 2003)

Η *in vitro* αναγέννηση του βαμβακιού είναι ένας πάρα πολύ δύσκολος στόχος, για το λόγο ότι η φυσιολογική ανταπόκριση είναι γενετικά εξαρτημένη και οι περισσότερες ελίτ ποικιλίες δεν υπόκεινται σε γενετικό χειρισμό (genetic manipulation). Η σωματική υβριδοποίηση είναι η προτιμώμενη μέθοδος έναντι τη οργανογένεσης, επειδή τα αναγεννημένα φυτά προέρχονται από μονό ένα κύτταρο και τα σωματικά έμβρυα δεν έχουν σχέση με το είδος μητρικού ιστού, άρα υπόκεινται πιο εύκολα σε *in vitro* χειρισμούς (Shoemaker *et al.* 1986). Μια ποικιλία γενοτύπων, όπως και διαφόρων καλλιεργητικών μέσων έχει ερευνηθεί από διάφορους ερευνητές για να βρεθεί μια λογική μορφογενετική ποικιλία της σειράς Coker, η οποία να προάγεται σε εμβρυικό κάλλο στην παρουσία αυξίνης. Υπάρχει αρκετή παραλλακτικότητα μεταξύ ποικιλιών, όπως και ανάμεσα στην ποικιλία για το γενετικό δυναμικό που έχει για να δώσει κάλλο, όπως και το γενετικό δυναμικό να πολλαπλασιαστεί και να δώσει αναγεννημένο φυτό. Παρόλο που οι χειρισμοί του καλλιεργητικού μέσου και των ορμονών που χορηγούνται μπορούν να προκαλέσουν αναγέννηση στην επιθυμητή ποικιλία, πρέπει να λάβουμε υπόψη και την κληρονομήσιμη παραλλακτικότητα ανάμεσα στους σπόρους. Έχει αναπτυχθεί μια καθαρή σειρά της ποικιλίας Coker 310, με υψηλό δυναμικό αναγέννησης, το χαρακτηριστικό της οποίας εισάχθηκε σε F1 υβρίδια άλλων ποικιλιών (Kumar *et al.* 1998). Παρομοίως έχουν αναπτυχθεί σειρές της ελίτ ποικιλίας Acala, με υψηλό δυναμικό αναγέννησης, επιλέγοντας μόνο το δυναμικό αναγέννησης (Mishra *et al.* 2003).

Εκτός από την επιλογή για ποικιλίες που έχουν την ικανότητα να αναγεννιούνται και ακολούθως να γίνεται επιλογή για υψηλό αναγεννητικό δυναμικό κατά την διάρκεια της ανάπτυξης μια καθαρής σειράς, έχουν δοκιμαστεί και διάφορες παραλλαγές στις καλλιεργητικές τεχνικές για να βελτιωθεί η ικανότητα του βαμβακιού να αναγεννιέται. Η διαχείριση των πρωτοπλαστών ήταν μια πιθανή λύση στο πρόβλημα της γενοτυπικής εξάρτησης βαμβακιού στην αναγέννηση. Βρέθηκε ότι οι πρωτοπλάστες του βαμβακιού δημιουργούσαν μικρο-κάλλους αλλά δεν παρατηρήθηκε αναγέννηση (Bhjowani *et al.* 1977; Finer and Smith 1982; Firoozabady and DeBoer 1986; Saka *et al.* 1987). Οι Peeters *et al.* (1994) αναφέρουν για

πρώτη φορά την αναγέννηση από πρωτοπλάστες που απομονώθηκαν από υποκοτύλες της ποικιλίας Coker 312.

Έχει ήδη επιχειρηθεί αναγέννηση φυτών βαμβακιού από ακραία μεριστώματα και εμβρυικούς άξονες (axes), για επιτευχθεί η γενοτυπική ανεξαρτησία και να ξεπεραστεί η γενετική ζημιά που προκαλείτο από τις παρατεταμένες καλλιεργητικές περιόδους. Αυτές οι διαδικασίες οδήγησαν στο σχηματισμό πολλαπλών βλαστών από μεταμορφωμένους μεριστωματικούς ιστούς. Η κινιτίνη (Kn), μαζί με το Naphthalene Acetic Acid (NAA) έχουν χρησιμοποιηθεί για να προκαλέσουν την αναγέννηση βλαστών από μεριστώματα και από εμβρυικούς άξονες (Gould *et al.* 1991; Hemphill *et al.* 1998; Zapata *et al.* 1999; Saeed *et al.* 1997). Η χρησιμοποίηση υψηλής συγκέντρωσης Benzyl Adenine (BA) προκάλεσε τον σχηματισμό πολλαπλών βλαστών προερχόμενους από εμβρυικούς άξονες (Morre *et al.* 1998).

Η σωματική εμβρυογένεση αναφέρθηκε πρώτα στο *G.klotzschianum*, όμως δεν παρήχθησαν ώριμα φυτά (Price and Smith 1979). Ακολούθως οι Davidonis και Hamilton (1983) περιέγραψαν την αναγέννηση φυτών μετά από αυθόρμητη εμβρυογένεση από διετή καλλιέργεια κάλλου, ο οποίος προήλθε από δωδεκαπλοειδής ιστούς κοτυληδόνας του *G.hirsutum* var. 310 μέσω σωματικής υβριδοποίησης. Οι Ragan (1993) και Mitten (1985), επίσης περιέγραψαν σωματική εμβρυογένεση και αναγέννηση στο βαμβάκι. Η διαδικασία όμως περιελάμβανε μια μακροχρόνια καλλιέργεια η οποία ήταν δύσκολο να επαναληφθεί. Οι Shoemaker *et al.* (1986) δοκίμασαν 17 ποικιλίες βαμβακιού για το δυναμικό αναγέννησης τους σε τρία διαφορετικά καλλιεργητικά μέσα για την δημιουργία κάλλου, που περιείχαν γλυκόζη. Ο ώριμος εμβρυικός κάλλος μεταφέρθηκε ακολούθως στο μέσο που περιείχε την σουκρόζη για να προκαλέσει την βλάστηση του εμβρύου σε δυο εμβρυικές ποικιλίες, την Coker 210 και την Coker 315. Τα τρία καλλιεργητικά μέσα για την δημιουργία του κάλλου περιείχαν Kn και IAA ή NAA σε αναλογία 1:2 και ο κάλλος αφέθηκε να ωριμάσει στην παρουσία N6-isopentenyl-adenine (2iP). Οι Trolinder και Goodin (1988a and b) έχουν ερευνήσει εκτεταμένα τις ορμονικές απαιτήσεις και το είδος του εκφύτου για μια αποτελεσματική σωματική εμβρυογένεση και αναγέννηση της ποικιλίας Coker 312. Στα συμπεράσματα τους συστήνουν την χρήση 2,4 D στην παρουσία Kn για την δημιουργία αλλά και την διατήρηση του εμβρυικού κάλλου. Ένα καλλιεργητικό

μέσο υψηλό με νιτρικά έχει χρησιμοποιηθεί για τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των εμβρύων.

Πολλοί ερευνητές έχουν εργαστεί εκτεταμένα στην αναγέννηση φυτών βαμβακιού μέσω της εμβρυογένεσης, όχι μόνο στην ποικιλία Coker (Finer 1988; Firoozabady and DeBoer 1993; Trolinder and Xhixian 1989; Chaudhary *et al.* 2003) αλλά επίσης στις ποικιλίες Sicala, Siokara (Cousins *et al.* 1991; Rangan and Rajasekaran 1993), την κινέζικη ποικιλία Simian-3 (Zhang *et al.* 2001) και στην Acala (Rangan and Rajasekaran 1996). Παρόλο που η αποτελεσματικότητα της αναγέννησης μέσω της εμβρυογένεσης έχει βελτιωθεί, υπάρχουν ακόμη μερικά προβλήματα που σχετίζονται με την αναγέννηση του βαμβακιού. Αυτά είναι η διαφορετική απόκριση ανάλογα με τον γενότυπο, ο παρατεταμένος χρόνος ιστοκαλλιέργειας, το υψηλό ποσοστό ανάπτυξης αφύσικων εμβρύων, ο χαμηλός ρυθμός μετατροπής των σωματικών εμβρύων σε φυτά και απουσία επιμύκησης των βλαστών.

Οι μακροχρόνιες ιστοκαλλιέργειες που οδηγούν στην αναγέννηση μορφολογικά αφύσικων εμβρύων και στείρων φυτών μπορούν να αποφευχθούν με την χρησιμοποίηση φρεσκοδημιουργημένου κάλλου ή κρυοδιατηρημένου κάλλου για την αναγέννηση (Rajasekaran, 1996). Μια εμβρυϊκή σειρά με υψηλό δυναμικό αναγέννησης μπορεί να κρυοδιατηρηθεί και να χρησιμοποιηθεί ανά διαστήματα για αναγέννηση. Οι Kumria *et al.* (2003) αναφέρουν την υψηλή συχνότητα επιταχυνόμενης παραγωγής και ανάπτυξης σωματικών εμβρύων, τα οποία μεγάλωναν σε κανονικά φυτά σε διάστημα 5-6 μηνών, μετά την δημιουργία του κάλλου μέσω της διαχείρισης θρεπτικών μέσων και των συνθηκών του μικροπεριβάλλοντος. Ο εμβρυϊκός κάλλος προερχόταν από υποκοτυλιδονικούς ή κοτυλιδονικούς ιστούς που τοποθετήθηκαν σε MS θρεπτικά μέσα που περιείχαν 2,4 D, Kn και maltose.

2.14 Απομόνωση, καλλιέργεια και σύντηξη πρωτοπλαστών στο κενάφ (Nancy A. Reichert and Donglong Liu, 1996)

Λόγω της περιορισμένης γενετικής παραλλακτικότητας ανάμεσα σε σεξουαλικά συμβατούς γενοτύπους του κενάφ, η δημιουργία σωματοκλωνικής

παραλλακτικότητας και σωματικών υβριδίων μπορεί να προσφέρει νέα χρήσιμα χαρακτηριστικά ή να αλλάξει μερικά από τα ήδη προϋπάρχουσα. Μπορεί να επιτραπεί η διασταύρωση ανάμεσα σε συγγενή είδη, όπως το *Hibiscus sabdariffa* L., και να συνδυαστούν χαρακτηριστικά όπως η πρωιμότητα, η υψηλή ποιότητα ίνας και αντοχή στο νηματώδη, χαρακτηριστικά που απουσιάζουν από τις σημερινές ποικιλίες.

Οι καλλιέργεια πρωτοπλαστών έχει χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας σε μεγάλους αριθμούς κυττάρων σε αρκετά είδη. Στο κενάφ, οι McLean *et al.* (1992) έχουν προκαλέσει τυχαία αναγέννηση μεσογονατίων της ποικιλίας Tainung I σε μια πληθώρα καλλιεργητικών μέσων όμως δεν έχουν καμία αναφορά για την απομόνωση και καλλιέργεια πρωτοπλαστών.

Οι Nancy A. Reichert και Donglong Liu (1996) αναφέρουν την επιτυχή απομόνωση, καλλιέργεια και σύντηξη πρωτοπλαστών στο κενάφ. Οι βέλτιστες ποσότητες ενζύμων για την ενζυματική χώνεψη ήταν ένας συνδυασμός cellulysin (1.0%) και macerase (0.5%) από τις οποίες πάρθηκαν $0,9 \times 10^5$ έως $5,8 \times 10^6$ πρωτοπλάστες ανά g^{-1} φρέσκου φυτικού ιστού, ενώ η ζωτικότητα των πρωτοπλαστών ήταν ανάμεσα στο 53 – 87%. Στο καλλιεργητικό μέσο προστέθηκαν οι ορμόνες 2,4 D και kin σε 1,4 μM και 13,8 μM αντίστοιχα. Όσο αφορά την σύντηξη πρωτοπλαστών, αναφέρουν ότι οι βέλτιστες συνθήκες σύντηξης με το μεγαλύτερο ποσοστό βιωσιμότητας πρωτοπλαστών (46%) προέκυψαν σε τάση σύντηξης 2,0 $kV\ cm^{-1}$.

Οι Xiang *et al.* (2006) αναφέρουν την απομόνωση πρωτοπλαστών στο κενάφ, χρησιμοποιώντας για ενζυματική χώνεψη των κυτταρικών τοιχωμάτων 0.8% cellulase and 0.5% macerase για 16 ώρες σε θερμοκρασία 25 °C. Οι μέσες αποδόσεις ήταν 2210^5 έως 1210^6 πρωτοπλάστες g^{-1} φρέσκου φυτικού ιστού.

2.15 Η δημιουργία κάλλου και αναγέννηση φυτών στην μπάμια *Abelmoschus esculentus* (L.)

Η μπάμια επηρεάζεται συνήθως από μια πληθώρα ασθενειών, ιώσεων, βακτηριδίων, μηκοπλάσματος και νηματωδών, όμως η συμβατική γενετική βελτίωση της έχει φτάσει στα όρια της. Στην περίπτωση της

αυτογονιμοποίησης, υπάρχουν εμπόδια στην διαδικασία βελτίωσης, λόγω της απουσίας γενετικής παραλλακτικότητας. Για αυτό ήταν αναγκαία η δημιουργία αποτελεσματικών τεχνικών που θα χρησιμοποιούνταν είτε στην δημιουργία γενετικής παραλλακτικότητας, είτε στην εισαγωγή της με την δημιουργία γενετικά μεταμορφωμένων σειρών.

Πάνω στην ιστοκαλλιέργεια της μπάμια δούλεψαν αρκετοί (Ganesan *et al.*, 2007; Haider *et al.*, 1993) αλλά οι Kabir *et al.* (2008) προσπάθησαν να βελτιστοποιήσουν τις συνθήκες καλλιέργειας της μπάμιας. Στην έρευνα τους αναφέρουν ότι το βέλτιστο καλλιεργητικό μέσο για την δημιουργία του κάλλου, ήταν το καλλιεργητικό μέσο που προτάθηκε από τους *Murashige and Skoog*, (1962) και περιείχε επιπρόσθετα 0,5 mg/L BAP και 2,0 mg/L IAA με την χρήση τμημάτων από υποκοτύλες. Στην ίδια έρευνα απόδειξαν ότι η χρήση υποκοτύλων είχε καλύτερα αποτελέσματα από την χρήση φύλλων σαν δότης ιστού στην ιστοκαλλιέργεια.

2.16. Σκοπός της Εργασίας

Πρωταρχικός στόχος της εργασίας ήταν η αξιολόγηση ανάμεσα σε τρία διαφορετικά πρωτοκόλλα όσο αφορά την αποτελεσματικότητα τους στην καλλιέργεια των εκφύτων, καθώς και του είδους του εκφύτου (υποκοτύλες, κοτυληδόνες), απομόνωση και καλλιέργεια πρωτοπλαστών. Στόχος της εργασίας ήταν και αξιολόγηση ανάμεσα στις 8 διαφορετικές ποικιλίες βαμβακιού, 1 ποικιλία κενάφ και 1 ποικιλία μπάμιας ως προς την αποτελεσματικότητα τους στην απομόνωση και ακολούθως το ποσοστό βιωσιμότητας αυτών, κατά την απομόνωση τόσο σε υπερκείμενο, όσο και στο υποκείμενο του διαλύματος απομόνωσης καθώς και σύγκριση των ποικιλιών ως προς την καλλιέργεια πρωτοπλαστών.

Επίσης για ακαδημαϊκούς λόγους έγινε και σύντηξη πρωτοπλαστών ανάμεσα σε 2 διαφορετικές ποικιλίες βαμβακιού.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Γενετικό Υλικό

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 8 ποικιλίες βαμβακιού, 1 ποικιλία κενάφ και μία ποικιλία μπάμιας. Οι ποικιλίες βαμβακιού Candia, St474, St463, Speed, Celia, DP419, Flora και Αλέξανδρος, η ποικιλία κενάφ Tainnung 2 και μια εμπορική ποικιλία μπάμιας κρίθηκαν οι καταλληλότερες ποικιλίες λόγω των χαρακτηριστικών τους και το ότι πρόκειται για ευρέως χρησιμοποιούμενες εμπορικές ποικιλίες παγκοσμίως.

Για το πείραμα κρίθηκαν κατάλληλα τρία διαφορετικά πρωτόκολλα με διαφορετικές μεθοδολογίες. Το πρώτο πρωτόκολλο ήταν στο πρωτόκολλο υπό αριθμό WO/2001/000785 με τον τίτλο “Regeneration of cotton plants” και εμπειρείχε μεθοδολογίες για αναγέννηση φυτών βαμβακιού από μεταμορφωμένους και μη πρωτοπλάστες βαμβακιού. Το δεύτερο πρωτόκολλο ήταν αυτό από τους Xi Yang *et al.* (2007) με τον τίτλο “Production and characterization of asymmetric hybrids between upland cotton Coker 201 (*Gossypium hirsutum*) and wild cotton (*G. klotzschianum* Anderss)”. Το πρωτόκολλο των Xi Yang *et al.* βασίζεται στο πρωτόκολλο που ανέπτυξαν οι Sun *et al.* (2004) και είναι το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται ευρέως στον σωματικό υβριδισμό σήμερα. Το τρίτο πρωτόκολλο προέρχεται από τους Kumria *et al.* (2003) με τίτλο “High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress” το οποίο ήταν μια εναλλακτική μέθοδος καλλιέργειας του κάλλου σε σχέση με το δεύτερο πρωτόκολλο.

3.2. Πείραμα 1: Πρωτόκολλο WO/2001/000785

Γενετικό υλικό

Στο πείραμα για την απομόνωση και καλλιέργεια πρωτοπλαστών χρησιμοποιήθηκε η ποικιλία βαμβακιού Celia.

1.1 Αποστείρωση του αρχικού υλικού

Οι σπόροι των εμπορικών ποικιλιών τοποθετήθηκαν σε φιάλη που περιείχε νερό βρύσης, για 10 λεπτά σε αναλογία περίπου 400mL/100 σπόρους και ανακατεύονταν γρήγορα έτσι ώστε να αφαιρεθεί το εξωτερικό

προστατευτικό στρώμα από μυκητοκτόνο. Οι σπόροι μετά μεταφέρθηκαν σε ένα σουρωτήρι τσαγιού και από εκεί ακολούθως τοποθετήθηκαν για 60 δευτερόλεπτα σε 70% αιθανόλη και εφαρμοζόταν συνεχές ανακάτεμα. Από εκεί οι σπόροι μεταφέρονται για 25 λεπτά σε διάλυμα υποχλωριώδες νατρίου συγκέντρωσης 2°. Προστέθηκε μια σταγόνα Tween 20 ανά 100 mL έτσι ώστε να βελτιωθεί η διαδικασία διαβροχής των σπόρων. Οι σπόροι ανακατεύονταν συνεχώς έτσι ώστε να αυξηθεί η επαφή τους με το αποστειρωτικό μέσο. Μετά την αποστείρωση οι σπόροι τοποθετήθηκαν 3 φορές για πλύσιμο σε 400 mL αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού για 5, 10 και 15 λεπτά. Μετά μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο δίσκο petri για περαιτέρω χρήση.

1.2 Βλάστηση των σπόρων

Για την βλάστηση των σπόρων χρησιμοποιήθηκαν μεγάλες γυάλινες φιάλες (συνολικού όγκου 400mL, 9 cm σε ύψος) που περιείχαν 40 mL μέσου βλάστησης. Το μέσο βλάστησης αποτελείτο από Stewards medium (Steward & Hsu, 1977, Pisnta 137,113-117) χωρίς όμως την σουκρόζη και στερεοποιήθηκε με 2g/L Phytigel (Sigma, St. Louis, USA). Στην κορυφή του καλλιεργητικού μέσου τοποθετήθηκαν 8 σπόροι ανά γυάλινη φιάλη και τοποθετήθηκαν στους 25 °C σε φως (2500 lux, Philips TLD 84° fluorescent) για 4-5 μέρες. Μετά την 4η μέρα (ή την 5η εξαρτάται από την γενετική παραλλακτικότητα και την ταχύτητα της βλάστησης) οι κοτυληδόνες είχαν πλήρως εμφανιστεί αλλά ήταν ακόμη μερικώς διπλωμένες και το χρώμα τους δεν ήταν ακόμη σκούρο πράσινο. Σε αυτό το στάδιο οι κοτυληδόνες συλλέχθηκαν για την απομόνωση πρωτοπλαστών.

1.3 Απομόνωση πρωτοπλαστών

Όλα τα διαλύματα για την απομόνωση, είχαν πρώτα αποστειρωθεί με την βοήθεια φίλτρου πριν από την χρήση. Μόνο κοτυληδόνες από το συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης είχαν επιλεγεί σαν αρχικό υλικό για την απομόνωση πρωτοπλαστών. Στις συλλεγμένες κοτυληδόνες είχαν αφαιρεθεί οι μίσχοι και οι 4-6 κύριες νευρώσεις.

Ο υπόλοιπος ιστός μεταφέρθηκε σε δίσκο petri 9 cm (Greiner, Tissue Culture Quality) που περιείχε 10 mL μέσου επώασης. Περίπου 12 κοτυληδόνες (6 σπόροι) χρειάστηκαν για να παρθεί το απαιτούμενο 1 g για

κάθε απομόνωση. Το μέσο επώασης αποτελείται από CPW salts (Frearson EM, Power JB & Cocking EC 1973, Dev Biol 33,130-137) με επιπρόσθετα 9% mannitol, 3.8% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 0.1 mM n-propyl gallate (nPG), και το pH 5.8. Χρησιμοποιώντας μια καινούργια χειρουργική λεπίδα οι κοτυληδόνες τεμαχίστηκαν σε κομμάτια του 1-2 mm και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30-60 λεπτά. Το μέσο επώασης, που τώρα περιείχε θραύσματα κυττάρων αφαιρέθηκε και αντικαταστάθηκε από το διάλυμα με τα ένζυμα χώνεψης. Αυτό αποτελείται από CPW salts, 9% mannitol, 5mM 2- (N-morpholino) ethane sulfonic acid (MES), 0.1 mM nPG και τα ένζυμα διάλυσης των κυτταρικών τοιχωμάτων Cellulase R-10 (0.5%, Yakult-Honsha, Tokyo, Japan), Macerozyme R-10 (0.1%, Yakult-Honsha, Tokyo, Japan) και Driselase (0.2%, Sigma, St. Louis USA). Όλα τα διαλύματα ρυθμίστηκαν σε pH 5.8 και πέρασαν από φίλτρο πριν από την χρήση. Το διάλυμα τότε τοποθετήθηκε σε σκοτάδι στους 25 °C σε περιστροφικό αναδευτήρα (35 rpm και πλάτος 1,5 cm) κατά την διάρκεια της νύχτας. Πριν τον καθαρισμό για περεταίρω διάλυση του αιωρήματος, μια πιπέτα χρησιμοποιήθηκε για αναρρόφηση και εκρόφηση του αιωρήματος και ακολούθως το αιώρημα πέρασε από νάιλον φίλτρα 2, 5 και 55 μm . Οι ζωντανοί πρωτοπλάστες καθαρίστηκαν πρώτα με φυγοκέντρηση στα 55 g για 5 λεπτά. Το ίζημα (pellet) τότε αναμείχτηκε ξανά σε 10 mL CPW που περιείχε 4g/L mannitol και 0.1 mM nPG και φυγοκεντρήθηκε ξανά. Το δεύτερο ίζημα ξαναδιαλύθηκε σε CPW που περιείχε 15% sucrose και 0.1 mM nPG που στην κορυφή του οποίου τοποθετήθηκε προσεκτικά 1 mL aliquot διάλυμα 9% mannitol μαζί με 1 mM CaCl_2 . Μετά την τρίτη φυγοκέντρηση οι ζωντανοί πρωτοπλάστες μπορούσαν να συλλεχθούν στο πάνω μέρος του διαλύματος. Η συγκέντρωση των πρωτοπλαστών μπορούσε να προσδιοριστεί με αιματοκυτόμετρο και όπου ήταν αναγκαίο η ζωτικότητα προσδιοριστική χρησιμοποιώντας χρώση FDA test (Widholm JM, Stain Technol. 47,189-194,1972).

1.4 Καλλιέργεια πρωτοπλαστών

Πριν την καλλιέργεια, οι πρωτοπλάστες εμπεδώθηκαν σε calcium alginate. Πρώτα η συγκέντρωση των πρωτοπλαστών ρυθμίστηκε στους 100,000 πρωτοπλάστες ανά mL διαλύματος mannitol και τότε πέρασαν προσεκτικά μέσα από φίλτρο για αποστείρωση από sodium alginate (Sigma,

St. Louis, USA). Οι aliquotes (1 mL) τότε τοποθετήθηκαν σε Ca agar (0.9% Daichin agar, 7.25% mannitol και 50 mM CaCl₂·2H₂O, 5 mL ανά δίσκο Petri 6 cm) και αφέθηκε για να στερεοποιηθεί για μια ώρα. Οι Ca alginate δίσκοι (τώρα με 1% Ca alginate ο καθένας περιείχε 50,000 πρωτοπλάστες) αφαιρέθηκαν και μεταφέρθηκαν σε δίσκους petri των 6 cm (Greiner, TC quality) που περιείχαν 4 mL καλλιεργητικού μέσου. Οι δίσκοι τότε σφραγιστήκαν με parafilm διπλού στρώματος και καλλιεργήθηκαν στο σκοτάδι στους 32 °C (*G. hirsutum*) Το καλλιεργητικό μέσο ήταν ένα τροποποιημένο K8p καλλιεργητικό μέσο, όπως αυτό περιγράφηκε από τους Kao jazz Michayluk [19-5 (Planta 126,105-110)] αλλά χωρίς την χρησιμοποίηση Sequestrene και Casamino acids, αλλά με επιπρόσθετα 0.1 mM nPG, 37 mg/L Na₂EDTA, 28 mg/L FeSO₄·7H₂O και 6.84% glucose, ρυθμισμένα σε pH 5.8. Οι φυτοορμόνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν NAA (2 mg/L) και Ζεατίνη (0.8mg/L).

Τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου

1.1 Αποστείρωση του αρχικού υλικού

Οι σπόροι τοποθετήθηκαν αρχικά για 15 λεπτά σε μυκητοκτόνο benomyl σε συγκέντρωση περίπου 20 γρ. ανά 250 mL, ακολούθως τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά σε διάλυμα χλωρίνης 2^ο και ακολούθως για 60 δευτερόλεπτα σε διάλυμα αλκοόλης 70%. Ακολούθησε ξέπλυμα των σπόρων τρεις φορές σε αποσταγμένο αποστειρωμένο νερό για 5, 10 και 15 λεπτά και ακολούθως τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί μέσα σε αποστειρωμένο δίσκο petri για να φύγει η περίσσεια νερού πριν τοποθετηθούν στο υπόστρωμα. Η αποστείρωση λάμβανε χώρα σε θάλαμο νηματώδους ροής.

1.2 Βλάστηση των σπόρων

Για την βλάστηση των σπόρων χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι petri (9=cm) που περιείχαν περίπου 20-25 mL μέσου βλάστησης. Το μέσο βλάστησης αποτελείτο από θρεπτικό μέσο MS (Murashige and Skoog, 1962) που στερεοποιήθηκε με χρήση agar gel σε συγκέντρωση 6 g/L. Στην κορυφή του καλλιεργητικού μέσου τοποθετήθηκαν 5 περίπου σπόροι ανά τριβείο και

τοποθετήθηκαν σε φως σε θερμοκρασία δωματίου για 4-5 μέρες. Μετά την 4η μέρα (ή την 5η εξαρτάται από την γενετική παραλλακτικότητα και ταχύτητα της βλάστησης) οι κοτυληδόνες είχαν πλήρως εμφανιστεί αλλά ήταν ακόμη μερικώς διπλωμένες και το χρώμα τους δεν ήταν ακόμη σκούρο πράσινο. Σε αυτό το στάδιο οι κοτυληδόνες συλλέχθηκαν για την απομόνωση πρωτοπλαστών.

1.3 Απομόνωση πρωτοπλαστών

Μετά την ενζυματική διάλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων το διάλυμα με τα αιωρημένα κύτταρα πέρασε από ένα μεταλλικό φίλτρο (0,45 μm) Η διαδικασία ακολούθως ήταν ακριβώς η ίδια με το πρωτόκολλο αλλά με την διαφορά η συγκέντρωση των πρωτοπλαστών δεν μπορούσε να προσδιοριστεί λόγω της απουσίας αιματοκυτόμετρου.

3.3 Πείραμα 2: Πρωτόκολλο Xi Yang *et al.* (2007)

Γενικά για το πείραμα

Σαν γενετικό υλικό για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 8 ποικιλίες βαμβακιού, 1 ποικιλία κενάφ και μία ποικιλία μπάμιας. Οι ποικιλίες βαμβακιού ήταν οι Candia, St474, St463, Speed, Celia, DP419, Flora και Αλέξανδρος, η ποικιλία κενάφ ήταν η Tainnung 2 και η εμπορική ποικιλία μπάμιας. Το πείραμα έγινε σε δυο επαναλήψεις.

Για την σύντηξη των πρωτοπλαστών, απομονώθηκαν πρωτοπλάστες από τις ποικιλίες Celia και St474, από τις οποίες έγινε σύντηξη μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα της σύντηξης παρακολούθηθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο, ενώ ο έλεγχος της ζωτικότητας τους έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού μετά την προσθήκη φθορίζουσας χρωστικής.

Διαδικασία Πειράματος:

Ο νεοδημιουργημένος εμβρυικός κάλλος της Coker 201 παράχθηκε σύμφωνα με τους Wu *et al.* (2004) και είχε χρώμα ανοιχτού κίτρινου. Η εδραίωση της καλλιέργειας εναιώρησης (suspension culture) έγινε σύμφωνα με τους Sun *et al.* (2004).

Wu *et al.* (2004)

Τα έκφυτα προετοιμάστηκαν όπως περιγράφηκε από τους Zhang *et al.* (1991). Οι σπόροι του βαμβακιού αποστειρώθηκαν επιφανειακά χρησιμοποιώντας διάλυμα 0.1% (w/v) mercuric chloride (HgCl₂) για 7–8 λεπτά, ακολουθούμενη από 4 ξεπλύματα με αποστειρωμένο νερό. Οι αποστειρωμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο MS μισής δύναμης (Murashige and Skoog, 1962) για βλάστηση. Μετά από 7 μέρες οι υποκοτύλες κόπηκαν σε τεμάχια 0.5–1.0 cm σε μήκος.

Sun *et al.* (2004)

Οι τεμαχισμένες υποκοτύλες τοποθετήθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο με 2.5 μM IBA και 0.46 μM KIN. Τότε εμβολιάστηκαν σε 40 mL υγρού MSB καλλιεργητικού μέσου σε φυάλες Erlenmeyer των 100 mL που περιείχαν 18.8 mM KNO₃, 13.7 mM glutamine, 7.6 mM asparagine, και 3% (w/v) glucose για την δημιουργία καλλιέργειας εναιώρησης για την απομόνωση πρωτοπλαστών. Το υγρό καλλιεργητικό μέσο αφαιρούταν κάθε 7 μέρες και αναπληρωνόταν με 40 mL φρέσκου υγρού καλλιεργητικού μέσου. Η δημιουργία του κάλλου και η καλλιέργεια πρωτοπλαστών έγινε στους 28 °C είτε σε απόλυτο σκοτάδι ή κάτω από συνθήκες φωτισμού σε φωτοπερίοδο 14/10-h (ημέρας/νύχτας) με την ένταση του φωτός στα 33 μmol m⁻² s⁻¹.

Γύρω στο 1g φρέσκιας καλλιέργειας εναιώρησης αναμείχθηκε με 3 mL ενζυμικού διαλύματος που αποστειρώθηκε με φίλτρο και τοποθετήθηκαν σε πλάκα των 60 mm. Το ενζυμικό διάλυμα ήταν 1,5% (m/v) cellulose onozuka R-10, 1% (m/v) macerozyme R-10 (yakult) 1.5% (m/v) hemicellulase (sigma) και διαλύθηκαν σε διάλυμα CPW9M [CaCl₂ · 2H₂O 10 mM, KH₂PO₄ · 0.2 mM,

KNO₃ 1.0 mM, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 mM, CuSO₄ · 5H₂O 0.1 mM, KI 10 mM, 2, (N-morpholino) ethane sulfonic acid (MES) 15.37 mM, 9% (m/v) mannitol, ρυθμισμένο σε pH 5.8]. Το διάλυμα αφέθηκε σε αναδευτήρα (40 rpm) στους 28-30 °C στο σκοτάδι για περίπου 14-16 ώρες, και τότε το μείγμα πρωτοπλάστων-ενζύμων περάστηκε πρώτα από ένα κόσκινο διπλού στρώματος από ανοξειδωτο ασάλι (100 και 38,5mm) και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε CPW9M στα 80 g για 5 λεπτά. Οι πρωτοπλάστες τότε τοποθετήθηκαν σε 1,5 mL CPW9M αφού αφαιρέθηκε το επιφανειακό στρώμα, και μετά προστέθηκαν απαλά στην επιφάνεια 3 mL CPW25S (αντικαθιστούμε την 9% mannitol με 25% sucrose στο CPW9M) σε ένα άλλο tube. Οι πρωτοπλάστες που επέπλεαν μαζεύτηκαν από το διάλυμα μετά από φυγοκέντρηση στα 80 g για 7 λεπτά, και τότε επανατοποθετήθηκαν στο buffer σύντηξης [10% (w/v) mannitol, 0.25 mM CaCl₂] στα 10⁶ mL⁻¹ για την σύντηξη.

Ο έλεγχος για την ζωτικότητα τους έγινε με την χρήση χρωστικής fluorescein diacetate (FDA) κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού (Sun *et al.* 2004). Η ζωτικότητα υπολογίστηκε σαν το μέσο ποσοστό των φθορίζουσων πρωτοπλαστών από το σύνολο των πρωτοπλαστών στο ίδιο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου για 10 οπτικά πεδία. Η κυτταρική διαίρεση και η αποτελεσματικότητα του plating υπολογίστηκε με βάση το ποσοστό των πρωτοπλαστών οι οποίοι ξεκίνησαν να διαιρούνται και συνέχισαν να σχηματίζουν κυτταρικές ομάδες και κάλλο.

Διαδικασία χρώσης FDA (Sun *et al.* 2004)

Για να αναγνωρισθεί η ζωτικότητα, οι πρωτοπλάστες βάφτηκαν με την βοήθεια χρωστικής 0.048 μM fluorescein diacetate (FDA) μετά τον καθαρισμό. Η ζωτικότητα μετρήθηκε σαν ποσοστό των φθορίζουσων πρωτοπλαστών σε σχέση με τους συνολικούς πρωτοπλάστες στο ίδιο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου (10×, 100–150 πρωτοπλάστες/οπτικό πεδίο, 10 οπτικά πεδία/δείγμα).

Για την σύντηξη των πρωτοπλαστών ίσα ποσοστά πρωτοπλαστών του δότη και του δέκτη αναμείχθηκαν για την σύντηξη σε πυκνότητα 1*10⁶ mL⁻¹. Για την σύντηξη χρησιμοποιήθηκε ένας SSH-2 somatic hybridizer (Shimadzu, Toyota, Japan). Γύρω στα 1,6 mL των αναμειγμένων πρωτοπλαστών

τοποθετήθηκε με την χρήση πιπέτας σε ένα θάλαμο σύντηξη FTC-4. Η διαδικασία της σύντηξη περιγράφηκε από τους Sun *et al.* (2004)

Διαδικασία σύντηξης Sun *et al.* (2004)

Οι πρωτοπλάστες τοποθετήθηκαν στο διάλυμα σύντηξης το οποίο περιείχε 0.50 mM mannitol και 0.25 mM CaCl₂ σε πυκνότητα 1×10⁶ mL⁻¹. Οι πρωτοπλάστες των δύο διαφορετικών ειδών αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:1.

Οι αναμειγμένοι πρωτοπλάστες ευθυγραμμίστηκαν σε ένα εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο (AC) των 100 V/cm σε μια συχνότητα 1 MHz για 60 δευτερόλεπτα, και μετά η διαδικασία της σύντηξη διευκολύνθηκε με την εφαρμογή συνεχούς τάσης (DC) για 5 φορές, σε παύσεις των 0,5 ms, που προκαλεί αναστρέψιμες βλάβες στους πρωτοπλάστες, σε ισχύ των 1,250 V/cm και διάρκεια 10 δευτερολέπτων έτσι ώστε να γίνει η σύντηξη και αφέθηκαν οι πρωτοπλάστες σε κατάσταση ηρεμίας για 20 λεπτά, έτσι ώστε τα προϊόντα της σύντηξης να αποκτήσουν το κανονικό τους σχήμα. Τα προϊόντα τότε φυγοκεντρήθηκαν στα 80 g για 5 λεπτά.

Οι πρωτοπλάστες resuspended και καλλιεργήθηκαν σε διπλού στρώματος καλλιέργεια σε KM8p (Kao and Michayluk 1975) καλλιεργητικό μέσο σε πυκνότητα 5 x 10⁵ /mL. Γύρω στα 5 mL λιωμένου στερεού MS καλλιεργητικού μέσου + βιταμίνες B5 (MSB) τοποθετήθηκε στο δισκίο. Μετά την στερεοποίηση 2 mL πρωτοπλαστών-KM8P μείγματα σε πυκνότητα 5.10⁵/mL προστέθηκαν στο δισκίο.

Όλα τα δισκία έκλεισαν με parafilm και επωάστηκαν στα σκοτεινά στους 28±1 °C . Δεκαπέντε μέρες αργότερα, 2 mL φρέσκου υγρού καλλιεργητικού μέσου με την μισή συγκέντρωση mannitol προστέθηκε σταδιακά στις καλλιέργειες για να επιταχύνει την κυτταρική διαίρεση και τον σχηματισμό μικρο-κάλλου. Όταν σχηματίστηκε το μικρο-κάλλι (1-5 mm σε μέγεθος) όλοι οι μικρο-κάλλοι μεταφέρθηκαν σε στερεό MSB στο οποίο είχε προστεθεί 2.460 mM indole-3-butyric acid (IBA), 0.698 mM kinetin, 6.8 mL glutamine, 3.8 mM asparagine, 0.25% (w/v) Phytigel, και 3% (w/v) glucose.

Έγινε υποκαλλιέργεια ανά διαστήματα των 15 ημερών για την επαγωγή σωματικού εμβρύου. Τα ζωντανά έμβρυα μεταφέρθηκαν σε MS μισής

δύναμης που περιείχε 2% glucose και στερεοποιήθηκε με 0,27 % phytigel. Τα αναγεννημένα φυτά μεταφέρθηκαν στο έδαφος όπως περιέγραψαν οι Jin *et al* 2005.

Τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου

2.1 Αποστείρωση του αρχικού υλικού

Οι σπόροι τοποθετήθηκαν αρχικά για 15 λεπτά στο μυκητοκτόνο benomyl σε συγκέντρωση περίπου 20g ανά 250 mL, μετά για 5 λεπτά σε διάλυμα χλωρίνης 2^ο και ακολούθως για 60 δευτερόλεπτα σε διάλυμα αλκοόλης 70%. Ακολούθησε ξέπλυμα των σπόρων τρεις φορές σε αποσταγμένο αποστειρωμένο νερό για 5, 10 και 15 λεπτά και ακολούθως τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί μέσα σε αποστειρωμένο δίσκο petri για να φύγει η περίσσεια νερού πριν τοποθετηθούν στο υπόστρωμα. Η αποστείρωση λάμβανε χώρα σε θάλαμο νηματώδους ροής.

2.2 Βλάστηση των σπόρων

Για την βλάστηση των σπόρων χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι petri (9cm) που περιείχαν περίπου 20-25 mL μέσου βλάστησης. Το μέσο βλάστησης αποτελείτο από θρεπτικό μέσο MS (Murashige and Skoog, 1962) που στερεοποιήθηκε με χρήση agar gel σε συγκέντρωση 6 g/L. Στην κορυφή του καλλιεργητικού μέσου τοποθετήθηκαν 5 περίπου σπόροι ανά τριβλείο και τοποθετήθηκαν σε σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 4-5 μέρες. Μετά την 4η μέρα (ή την 5η εξαρτάται από την γενετική παραλλακτικότητα και ταχύτητα της βλάστησης) οι κοτυληδόνες είχαν πλήρως εμφανιστεί αλλά ήταν ακόμη μερικώς διπλωμένες και το χρώμα τους δεν ήταν ακόμη σκούρο πράσινο. Σε αυτό το στάδιο οι κοτυληδόνες συλλέχθηκαν για την απομόνωση πρωτοπλαστών.

2.3 Δημιουργία κάλλου

Για την δημιουργία του κάλλου, καταλληλότερο θεωρήθηκε το πρωτόκολλο σύμφωνα με τους Kumria *et al* 2003. Το πρωτόκολλο προτείνει τις ορμόνες 2,4D και KIN σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις 0,1 mg και 0,5 mg. Για

να επιτύχουμε γρηγορότερη και εμφανέστερη την εδραίωση του κάλλου χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις ορμονών 1 mg 2,4D και 2 mg KIN.

Οι διαδικασίες για την δημιουργία κάλλου στο κενάφ και όπως και όλες οι υπόλοιπες διαδικασίες ήταν οι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν με το πρωτόκολλο για το βαμβάκι.

2.4 Απομόνωση πρωτοπλαστών

Οι ποσότητες των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν έγινε σύμφωνα με τις απαιτούμενες ποσότητες στο πρωτόκολλο WO/2001/000785

2.5 Σύντηξη πρωτοπλαστών

Η σύντηξη πρωτοπλαστών έγινε με την χρήση electroporator 2510 (Eppendorf AG, Germany), με την χρήση συνεχούς ηλεκτρικού παλμού 600 V/cm με διάρκεια 60 msec, για δυο συνεχόμενες φορές έτσι ώστε να επιτύχουμε την σύντηξη.

2.6 Καλλιέργεια πρωτοπλαστών

Για την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικοί μέθοδοι.

- 2.6.1

Η πρώτη έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο

- 2.6.2

Στη δεύτερη χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα δύο στοιβάδων με την πάνω να είναι υπόστρωμα MS και άγαρ 0.7 % και στην κάτω υπόστρωμα KM8P σε άγαρ 1.5%.

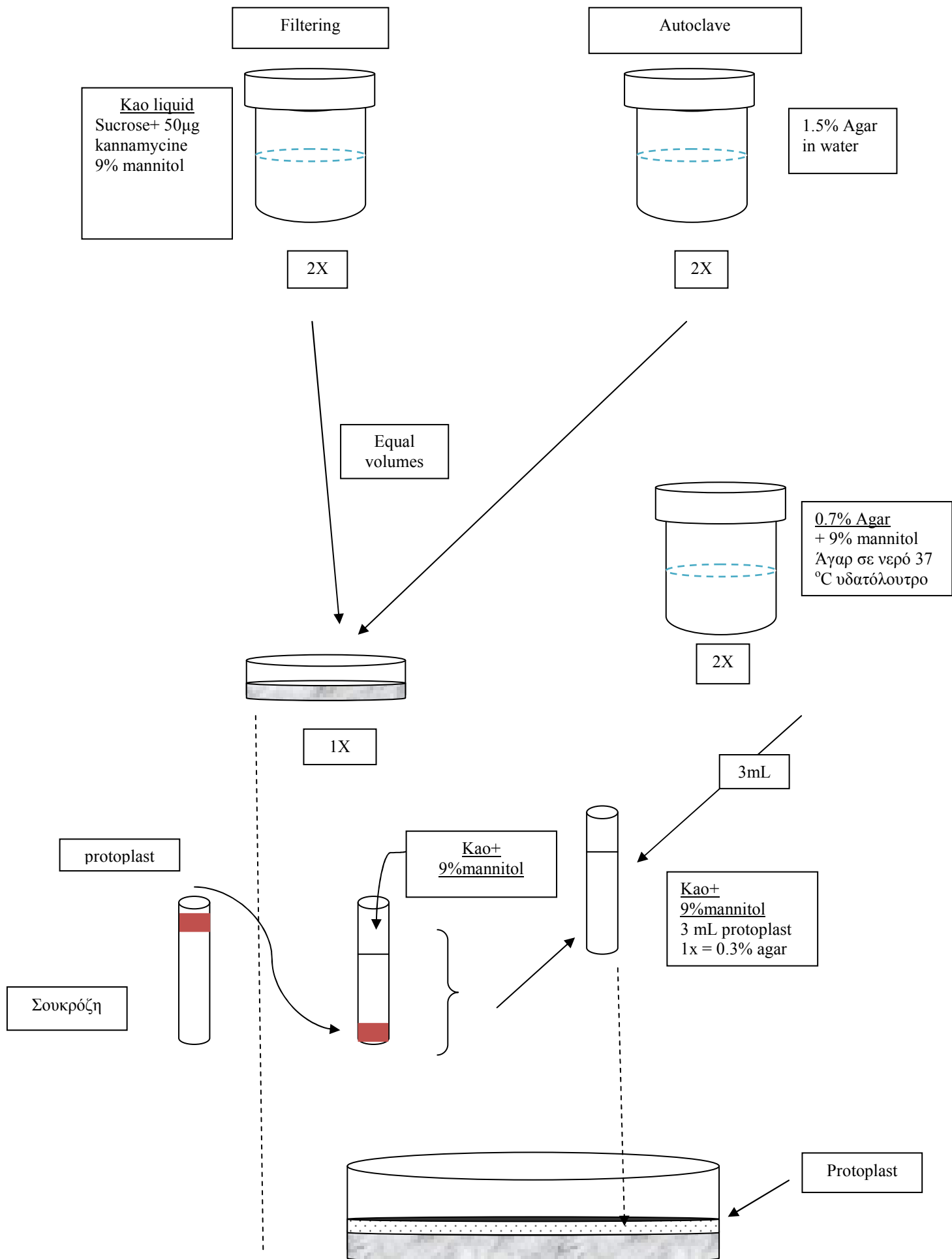
Παρασκευή υποστρώματος – Τοποθέτηση πρωτοπλαστών στο υπόστρωμα (Εικόνα 8)

Δημιουργήθηκαν δύο ξεχωριστά διαλύματα όπου η τελική συγκέντρωση τους να είναι διπλάσια από το κανονικό. Στο πρώτο τοποθετήθηκαν το διάλυμα KM8p, σουκρόζη 3%, 50μg kanpamycine και 9% mannitol και περάστηκαν από συσκευή με φίλτρο 0,45 μm. Στο δεύτερο τοποθετήθηκαν 1,5% άγαρ και νερό και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο για αποστείρωση στους 121 °C για 30 λεπτά. Ακολούθως αναμείχτηκαν ίσοι όγκοι και από τα δυο διαλύματα και τοποθετήθηκαν μέσα σε δίσκους petri και αφήνονται να στερεοποιηθούν.

Ακολούθως παρασκευάζουμε ένα τρίτο διάλυμα με την μισή ποσότητα agar (0,7%) και νερό και το τοποθετούμε σε κλίβανο για αποστείρωση στους 121°C για 30 λεπτά.

Όταν φυγοκεντήσουμε τους πρωτοπλάστες σε σουκρόζη, αυτοί ανεβαίνουν στην επιφάνεια. Ακολούθως αφαιρούμε το υπερκείμενο και το τοποθετούμε σε διάλυμα KM8p το οποίο περιέχει και 9% mannitol.

Αναμιγνύουμε τότε 3 mL από το τρίτο διάλυμα μαζί με τους πρωτοπλάστες και του τοποθετούμε προσεκτικά πάνω στην επιφάνεια του στερεοποιημένου διαλύματος στους δίσκους petri.



Εικόνα 8: Διαδικασία υποστρώματος του πειράματος 2

3.4 Πείραμα 3: Πρωτόκολλο Kumria *et al.* (2003)

3.4.1 Γενικά για το πείραμα

Σαν γενετικό υλικό για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 4 ποικιλίες βαμβακιού και μία ποικιλία μπάμιας. Οι ποικιλίες βαμβακιού ήταν οι St474, St463, Celia, DP419, και Αλέξανδρος και η εμπορική ποικιλία μπάμιας. Το πείραμα έγινε σε δυο επαναλήψεις. Στην Δεύτερη επανάληψη για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι ποικιλίες Celia και St463.

Οι σπόροι αποστειρωθήκαν σε διάλυμα αιθανόλης 70% για ένα λεπτό και ακολούθως ξεπλύθηκαν σε αποστειρωμένο νερό πριν τοποθετηθούν σε διάλυμα 0.1% HgCl₂ για ένα λεπτό. Οι αποστειρωμένοι πλέον σπόροι αφέθηκαν σε αποστειρωμένο νερό κατά την διάρκεια της νύχτας για να μαλακώσει το περίβλημα τους. Ακολούθως αφέθηκαν να βλαστήσουν σε υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog 1962), 1/5 της δύναμης του, το οποίο περιείχε 1% σουκρόζη. Όλοι οι ρυθμιστές ανάπτυξης τοποθετήθηκαν πριν την τοποθέτηση του θρεπτικού μέσου σε κλίβανο για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 121 °C, εκτός του γιββερινικού οξέως. Το pH ρυθμίστηκε στο 5,8-6 πριν τοποθετηθεί στον κλίβανο.

Τα έκφυτα πάρθηκαν από 5-7 ημερών φρέσκα φυτά. Τόσο και οι υποκοτύλες (4–6 mm), όσο και οι κοτυληδόνες (15 mm²) τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS το οποίο περιείχε with 0.1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/l Kn και 3% μαλτόζη για 8 εβδομάδες. Ακολούθως ο κάλλος από τα έκφυτα καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο MS απουσία ορμονών αλλά παρουσίας 3% μαλτόζης για 4 εβδομάδες. Ακολούθως, η αναπτυσσόμενη πλέον μάζα του κάλλου μεταφέρθηκε σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε 3% μαλτόζη και την διπλάσια από την κανονική συγκέντρωση KNO₃ για την δημιουργία εμβρυογενικού κάλλου (Trolinder and Goodin 1988b).

Ακολούθως ο παραγόμενος εμβρυϊκός κάλλος διαχειριζόταν έτσι ώστε να βλαστήσει και να ωριμάσει σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 1% μαλτόζη σαν πηγή άνθρακα.

Όλες οι καλλιέργειες διατηρούνταν σε θερμοκρασία 28 °C σε φωτοπερίοδο 16/8-h (ημέρα/νύχτα) και σε ένταση φωτισμού 60 E m⁻²s⁻¹. Τα αναγεννημένα φυτά τοποθετούνταν σε θερμοκήπιο για να σκληραγωγηθούν.

Τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου

Αποστείρωση του αρχικού υλικού

Οι σπόροι τοποθετήθηκαν αρχικά για 15 λεπτά στο μυκητοκτόνο benomyl σε συγκέντρωση περίπου 20g ανά 250 mL, μετά για 5 λεπτά σε διάλυμα χλωρίνης 2° και ακολούθως για 60 δευτερόλεπτα σε διάλυμα αλκοόλης 70%. Ακολούθησε ξέπλυμα των σπόρων τρεις φορές σε αποσταγμένο αποστειρωμένο νερό για 5, 10 και 15 λεπτά και ακολούθως τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί μέσα σε αποστειρωμένο δίσκο petri για να φύγει η περίσσεια νερού πριν τοποθετηθούν στο υπόστρωμα. Η αποστείρωση λάμβανε χώρα σε θάλαμο νηματώδους ροής.

Βλάστηση των σπόρων

Για την βλάστηση των σπόρων χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι petri (9cm) που περιείχαν περίπου 20-25 mL μέσου βλάστησης. Το μέσο βλάστησης αποτελείτο από θρεπτικό μέσο MS (Murashige and Skoog, 1962) που στερεοποιήθηκε με χρήση agar gel σε συγκέντρωση 6 g/L. Στην κορυφή του καλλιεργητικού μέσου τοποθετήθηκαν 5 περίπου σπόροι ανά τριβλέιο και τοποθετήθηκαν σε σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 4-5 μέρες. Μετά την 4η μέρα (ή την 5η εξαρτάται από την γενετική παραλλακτικότητα και ταχύτητα της βλάστησης) οι κοτυληδόνες είχαν πλήρως εμφανιστεί αλλά ήταν ακόμη μερικώς διπλωμένες και το χρώμα τους δεν ήταν ακόμη σκούρο πράσινο. Σε αυτό το στάδιο οι κοτυληδόνες συλλέχθηκαν για την απομόνωση πρωτοπλαστών.

Ανά διάστημα 15 ημερών τα έκφυτα τοποθετούνταν σε καινούργια υποστρώματα ενώ τα μολυσμένα έκφυτα αφαιρούνταν και δεν τοποθετούνταν στο καινούργιο υπόστρωμα.

4. Αποτελέσματα

4.1 Ρυθμός αντίδρασης στο υπόστρωμα

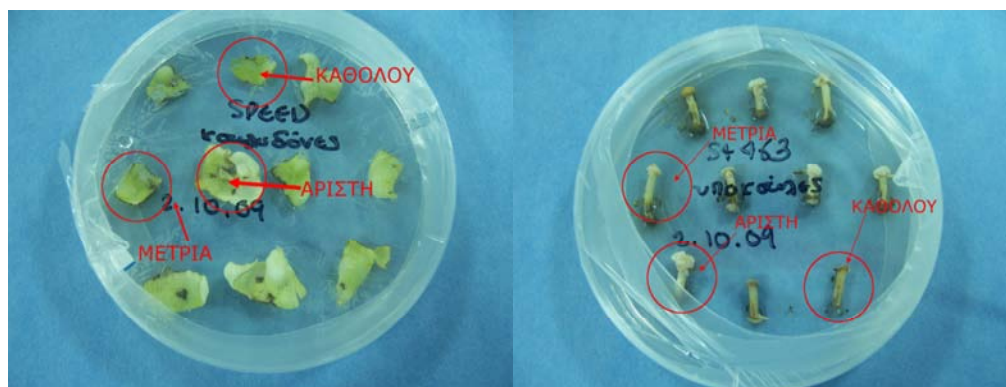
4.1.1 Πείραμα 1

Από το πείραμα 1 δεν ήταν δυνατό να παρθούν μετρήσεις λόγω της αυξημένης προσβολής βακτηρίων και μυκήτων κατά την διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας.

4.1.2 Πείραμα 2

Κατά την διάρκεια του πειράματος, ανά 20 περίπου μέρες, φωτογραφίζονταν τα τριβλία για να παρατηρηθεί η αντίδραση τόσο των υποκοτύλων, όσο και των κοτυληδόνων στα διάφορα υποστρώματα.

Παρατηρήθηκε η αντίδραση του εκφύτου ως προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα και κάθε ξεχωριστό έκφυτο δινόταν ένας χαρακτηρισμός. Χαρακτηρίζονταν ως Άριστη αντίδραση, Μέτρια αντίδραση και Καθόλου αντίδραση (Εικόνα 9), ανάλογα με τον ρυθμό αντίδρασης τους ως προς το υπόστρωμα κατά την συγκεκριμένη ημερομηνία. Όσα έκφυτα μολύνονταν δεν δινόταν χαρακτηρισμός. Ο χαρακτηρισμός των εκφύτων αφέθηκε στην κρίση του παρατηρητή. Από τις παραπάνω παρατηρήσεις πάρθηκαν οι ακόλουθοι πίνακες:



Εικόνα 9: Χαρακτηρισμός εκφύτων ως προς το ρυθμό ανάπτυξης (κοτυληδόνες αριστερά, υποκοτύλες δεξιά)

Πίνακας 1: Επανάληψη 1 Υποκοτύλες

Είδος εκφύτου υποκοτύλες								
Γενότυπος	Αριθμός τοποθετημένων εκφύτων	Τοποθέτηση στο υπόστρωμα	Χαρακτηρισμός εκφύτων κατά την ημερομηνία					
			02/10/2009			12/10/2009		
			Άριστη	Μέτρια	Καθόλου	Άριστη	Μέτρια	Καθόλου
CANDIA	10		10	0	0	8	0	0
ST474	10		5	4	1	9	1	0
SPEED	10		6	0	4	3	6	1
CELIA	9		9	0	0	0	0	0
DP419	10		0	7	3	10	0	0
FLORA	10		5	3	2	9	0	1
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ	10		3	0	7	9	1	0
Kenaf (Tainnung 2)	10		0	2	8	2	1	0
ST463	10		5	0	5	7	1	1
OKRA	10		0	0	10	0	0	0
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ	10		1	0	9	4	6	0

Πίνακας 2: Επανάληψη 1 κοτυληδόνες

Είδος εκφύτου κοτυληδόνες								
Γενότυπος	Αριθμός Τοποθετημένων εκφύτων	Τοποθέτηση στο υπόστρωμα	Χαρακτηρισμός εκφύτων κατά την ημερομηνία					
			02/10/2009			12/10/2009		
			Άριστη	Μέτρια	Καθόλου	Άριστη	Μέτρια	Καθόλου
CANDIA	10		6	4	0	8	2	0
ST474	10		6	2	2	2	5	3
SPEED	10		5	5	0	8	2	0
CELIA	10		9	1	0	9	1	0
DP419	10		8	2	0	10	0	0
FLORA	10		8	1	1	4	0	6
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ	10		10	0	0	10	0	0
Kenaf (Tainnung 2)	10		5	3	2	0	0	0
ST463	11		11	0	0	0	0	0
OKRA	9		8	1	0	0	0	10

Πίνακας 3: Επανάληψη 2 Υποκοτύλες

Γενότυπος	Αριθμός Τοποθετημένων εκφύτων	Τοποθέτηση στο υπόστρωμα	Είδος εκφύτου υποκοτύλες											
			10/10/2009			21/10/2009			3/11/2009			30/11/2009		
			Άριστη	Μέτρια	Καθόλου	Άριστη	Μέτρια	Καθόλου	Άριστη	Μέτρια	Καθόλου	Άριστη	Μέτρια	Καθόλου
CANDIA	10		7	3	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0
ST474	10		10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0
SPEED	10		9	1	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CELIA	6		5	1	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0
DP419	10		9	1	0	9	1	0	9	1	0	10	0	0
FLORA														
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ	10		0	1	9	4	6	0	10	0	0	10	0	0
Kenaf (Tainnung 2)	9		0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ST463	9		4	5	1	7	1	0	10	0	0	10	0	0
OKRA														
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ														

Πίνακας 4: Επανάληψη 2 Κοτυληδόνες

Γενότυπος	Αριθμός Τοποθετημένων εκφύτων	Είδος εκφύτου υποκοτύλες												
		Τοποθέτηση στο υπόστρωμα			10/10/2009			21/10/2009			3/11/2009			30/11/2009
		Χαρακτηρισμός εκφύτων κατά την ημερομηνία												
		Άριστη	Μέτρια	Καθόλου	Άριστη	Μέτρια	Καθόλου	Άριστη	Μέτρια	Καθόλου	Άριστη	Μέτρια	Καθόλου	
CANDIA	10	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	
ST474	10	10	0	0	10	0	0	10	0	0	9	0	0	
SPEED	10	8	2	0	5	3	3	1	5	4	0	0	0	
CELIA	10	8	0	2	7	1	0	8	0	0	0	0	0	
DP419	10	7	2	1	5	3	1	9	1	0	0	0	0	
FLORA														
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ	10	0	7	3	0	3	3	6	0	0	0	0	0	
Kenaf (Tainnung 2)	10	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ST463	10	10	0	0	9	1	0	10	0	0	0	0	0	
OKRA														
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ														

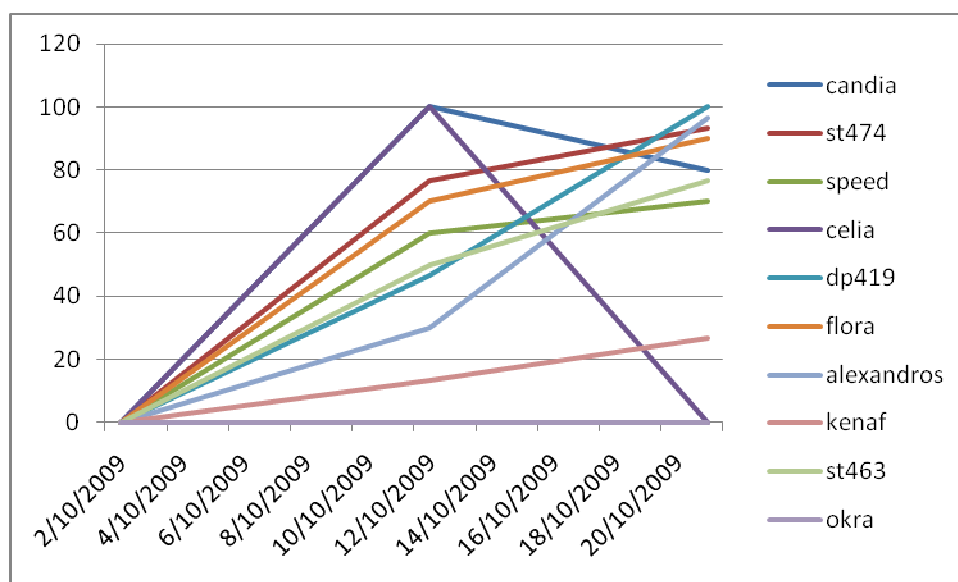
Από τους παραπάνω πίνακες από κάθε έκφυτο που χαρακτηρίστηκε με ρυθμό αντίδρασης ως Άριστη, Μέτρια και Καθόλου αντίδραση δινόταν μια βαθμολογία. Ανάλογα με τον ρυθμό αντίδρασης δινόταν η βαθμολογία 0, 2 και 3 χαρακτηρίζοντας την αντίδραση ως προς το υπόστρωμα Καθόλου, Μέτρια και Άριστη αντίστοιχα.

Για να ποσοτικοποιηθούν οι παρατηρήσεις και να βρεθεί το επί τοις εκατό ποσοστό αντίδρασης, προστίθετο η συνολική βαθμολογία για κάθε τριβλίο και διαιρούταν με την μέγιστη βαθμολογία (αριθμός εκφύτων X 3) και το αποτέλεσμα πολλαπλασιαζόταν με το 100.

Από τις παραπάνω μετρήσεις πάρθηκαν τα ακόλουθοι πίνακες και οι αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις:

Πίνακας 5: Επανάληψη 1 Υποκοτύλες

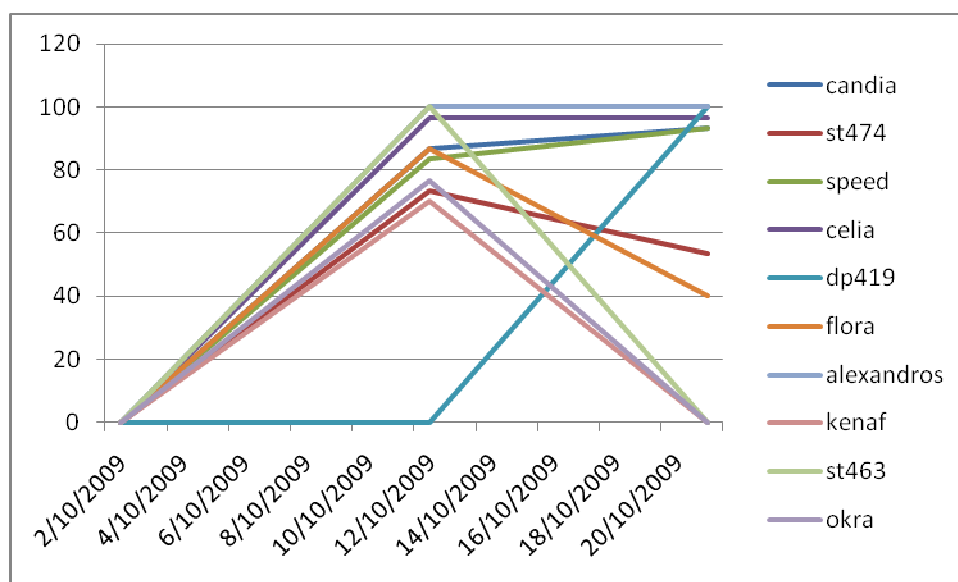
Γενότυπος	Ποσοστό αντίδρασης κατά την ημερομηνία		
	02/10/2009	12/10/2009	21/10/2009
CANDIA	0	100	80
ST474	0	76,66	93,33
SPEED	0	60	70
CELIA	0	100	0
DP419	0	46,66	100
FLORA	0	70	90
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ	0	30	96,66
Kenaf (Tainnung 2)	0	13,33	26,66
ST463	0	50	76,66
OKRA	0	0	0



Γράφημα 1: Επανάληψη 1 Υποκοτύλες

Πίνακας 6: Επανάληψη 1 κοτυληδόνες

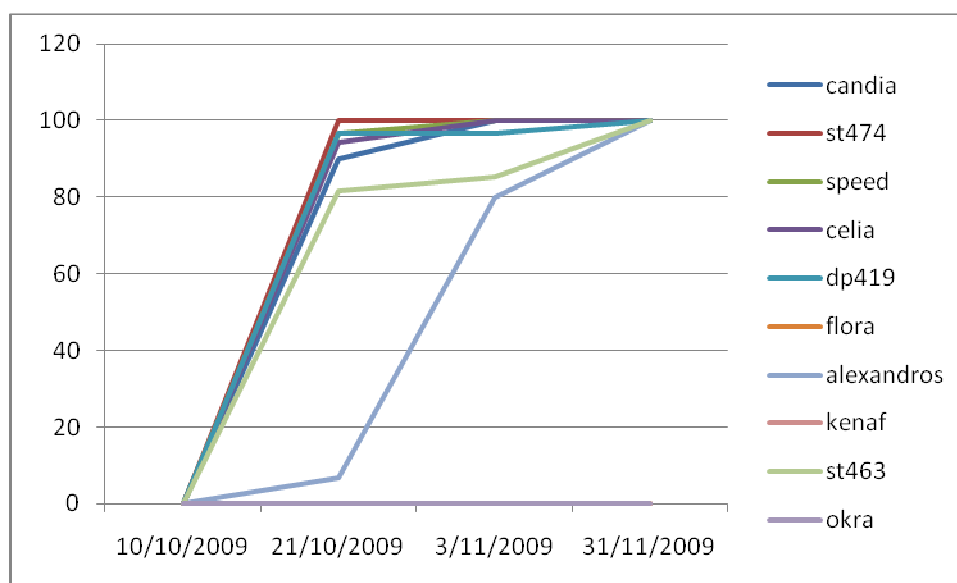
Γενότυπος	Ποσοστό αντίδρασης κατά την ημερομηνία		
	02/10/2009	12/10/2009	21/10/2009
CANDIA	0	86,66	93,33
ST474	0	73,33	53,33
SPEED	0	83,33	93,33
CELIA	0	96,66	96,66
DP419	0	93,33	100
FLORA	0	86,66	40
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ	0	100	100
Kenaf (Tainnung 2)	0	70	0
ST463	0	100	0
OKRA	0	76,66	0



Γράφημα 2: Επανάληψη 1 κοτυληδόνες

Πίνακας 7: Επανάληψη 2 Υποκοτύλες

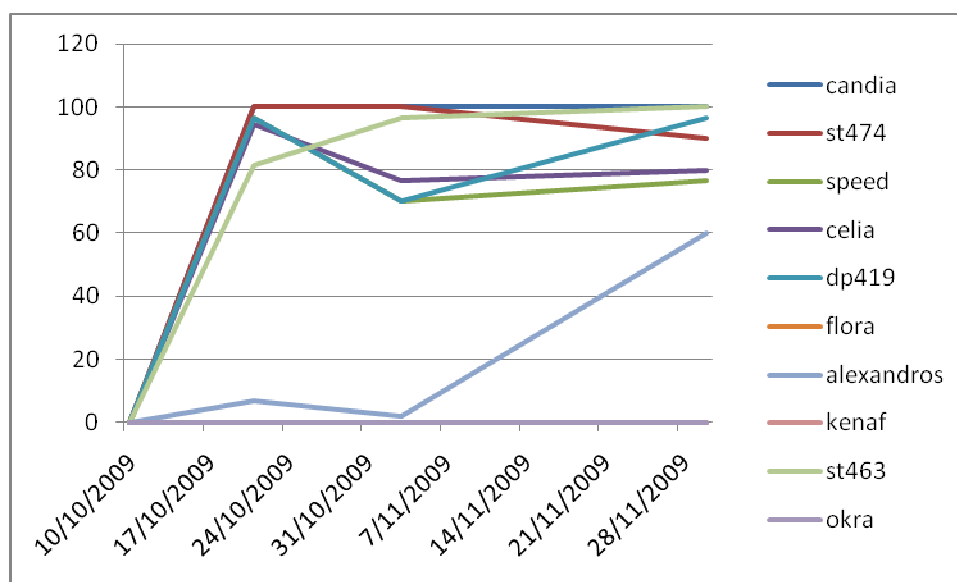
Γενότυπος	Ποσοστό αντίδρασης κατά την ημερομηνία			
	10/10/2009	21/10/2009	3/11/2009	30/11/2009
CANDIA	0	90	100	100
ST474	0	100	100	100
SPEED	0	96,66	100	100
CELIA	0	94,4	100	100
DP419	0	96,66	96,66	100
FLORA	0	0	0	0
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ	0	6,66	80	100
Kenaf (Tainnung 2)	0	0	0	0
ST463	0	81,48	85,18	100
OKRA	0	0	0	0



Γράφημα 3: Επανάληψη 2 Υποκοτύλες

Πίνακας 8: Επανάληψη 2 κοτυληδόνες

Γενότυπος	Ποσοστό αντίδρασης κατά την ημερομηνία			
	10/10/2009	21/10/2009	3/11/2009	30/11/2009
CANDIA	0	100	100	100
ST474	0	100	100	90
SPEED	0	96,66	70	76,66
CELIA	0	94,4	76,66	80
DP419	0	96,66	70	96,66
FLORA	0	0	0	0
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ	0	6,66	2	60
Kenaf (Tainnung 2)	0	0	0	0
ST463	0	81,48	96,66	100
OKRA	0	0	0	0



Γράφημα 4: Επανάληψη 2 κοτυληδόνες

4.1.3 Πείραμα 3

Κατά την διάρκεια του πειράματος, ανά 20 περίπου μέρες, φωτογραφίζονταν τα τριβλία για να παρατηρηθεί η αντίδραση τόσο των υποκοτύλων, όσο και των κοτυληδόνων στα διάφορα υποστρώματα.

Παρατηρήθηκε η αντίδραση του εκφύτου ως προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα και κάθε ξεχωριστό έκφυτο δινόταν ένας χαρακτηρισμός, Χαρακτηριζόταν ως Άριστη αντίδραση, Μέτρια αντίδραση και Καθόλου αντίδραση (Εικόνα 9), ανάλογα με τον ρυθμό αντίδρασης τους ως προς το υπόστρωμα κατά την συγκεκριμένη ημερομηνία. Όσα έκφυτα μολύνονταν δεν δινόταν χαρακτηρισμός. Ο χαρακτηρισμός των εκφύτων αφέθηκε στην κρίση του παρατηρητή. Από τις παραπάνω παρατηρήσεις πάρθηκαν οι ακόλουθοι πίνακες:

Πίνακας 9: Επανάληψη 3 Υποκοτύλες

Είδος εκφύτου υποκοτύλες					
Γενότυπος	Αριθμός τοποθετημένων εκφύτων	Τοποθέτηση στο υπόστρωμα	Χαρακτηρισμός εκφύτων κατά την ημερομηνία		
			26/6/2009	15/7/2009	
			Άριστη	Μέτρια	Καθόλου
CANDIA					
ST474	10		0	1	0
SPEED					
CELIA	9		0	0	0
CELIA	9		0	0	0
FLORA					
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ					
Kenaf (Tainnung 2)					
ST463	10		0	0	0
OKRA	10		0	0	0

Πίνακας 10: Επανάληψη 3 κοτυληδόνες

Είδος εκφύτου κοτυληδόνες								
Γενότυπος	Αριθμός τοποθετημένων εκφύτων	Τοποθέτηση στο υπόστρωμα	Χαρακτηρισμός εκφύτων κατά την ημερομηνία					
			26/6/2009		15/7/2009		28/9/2009	
			Άριστη	Μέτρια	Καθόλου	Άριστη	Μέτρια	Καθόλου
CANDIA								
ST474	9		7	1	0	3 από 4	1	0
SPEED								
CELIA	9		6	2	0			
DP419								
FLORA								
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ								
Kenaf (Tainnung 2)								
ST463	9		0	0	0	4 από 5	1	0
OKRA	8		3	0	0			

Πίνακας 11: Επανάληψη 4 Υποκοτύλες

Είδος εκφύτου υποκοτύλες						
Γενότυπος	Αριθμός τοποθετημένων εκφύτων	Τοποθέτηση στο υπόστρωμα	Μεταφορά σε φρέσκο MS	Χαρακτηρισμός εκφύτων κατά την ημερομηνία		
				1/7/2009	14/7/2009	15/7/2009
				Άριστη	Μέτρια	Καθόλου
Αντίδραση						
CANDIA						
ST474						
SPEED						
CELIA	10			0	10	0
DP419						
FLORA						
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ						
Kenaf (Tainnung 2)						
ST463	10			0	0	0
OKRA						
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ						

Πίνακας 12: Επανάληψη 4 κοτυληδόνες

Γενότυπος	Αριθμός τοποθετημένων εκφύτων	Είδος εκφύτου κοτυληδόνες		
		Τοποθέτηση στο υπόστρωμα	Μεταφορά σε φρέσκο MS	Χαρακτηρισμός εκφύτων κατά την ημερομηνία
		1/7/2009	14/7/2009	15/7/2009
Αντίδραση		Άριστη	Μέτρια	Καθόλου
CANDIA				
ST474				
SPEED				
CELIA	10	7	2	0
DP419				
FLORA				
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ				
Kenaf (Tainnung 2)				
ST463	10	7	2	0
OKRA				
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ				

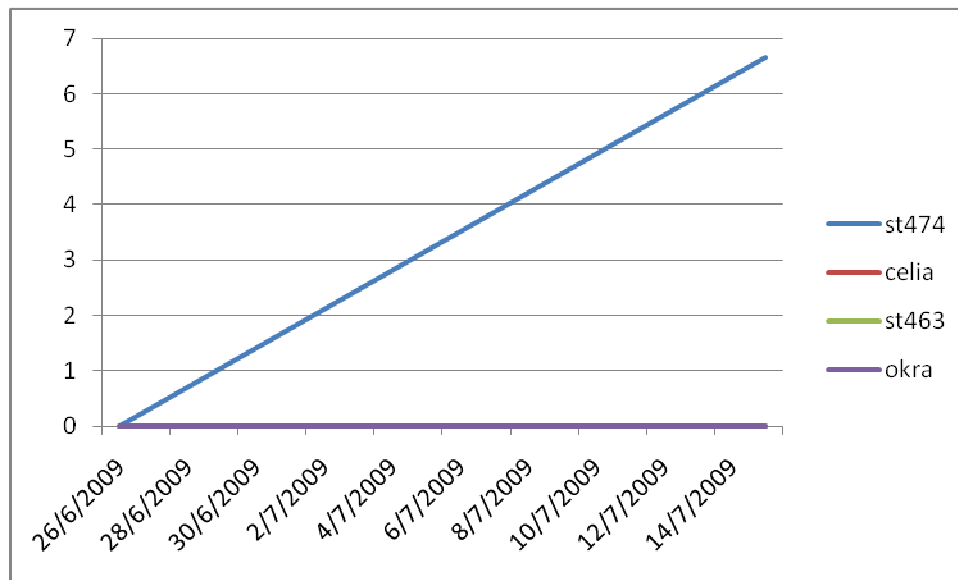
Από τους παραπάνω πίνακες από κάθε έκφυτο που χαρακτηρίστηκε με ρυθμό αντίδρασης ως Άριστη, Μέτρια και Καθόλου αντίδραση δινόταν μια βαθμολογία. Ανάλογα με τον ρυθμό αντίδρασης δινόταν η βαθμολογία 0, 2 και 3 χαρακτηρίζοντας την αντίδραση ως προς το υπόστρωμα Καθόλου, Μέτρια και Άριστη αντίστοιχα.

Για να ποσοτικοποιηθούν οι παρατηρήσεις και να βρεθεί το επί τοις εκατό ποσοστό αντίδρασης, προστίθετο η συνολική βαθμολογία για κάθε τριβλίο και διαιρούταν με την μέγιστη βαθμολογία (αριθμός εκφύτων X 3) και το αποτέλεσμα πολλαπλασιαζόταν με το 100.

Από τις παραπάνω μετρήσεις πάρθηκαν τα ακόλουθοι πίνακες και οι αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις:

Πίνακας 13: Επανάληψη 3 Υποκοτύλες

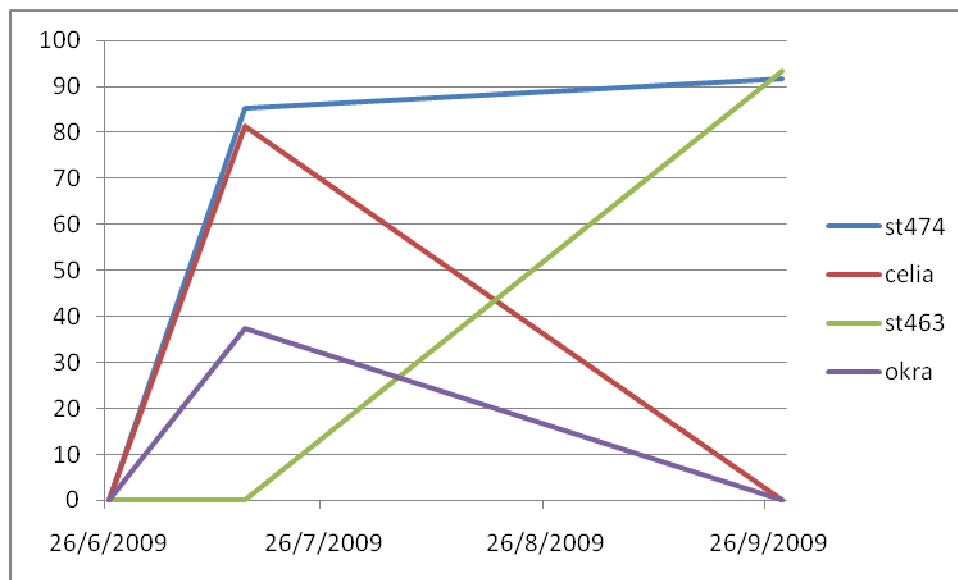
Γενότυπος	Ποσοστό αντίδρασης κατά την ημερομηνία	
	26/06/2009	15/07/2009
ST474	0	6,66
CELIA	0	0
ST463	0	0
OKRA	0	0



Γράφημα 5: Επανάληψη 3 Υποκοτύλες

Πίνακας 14: Επανάληψη 3 κοτυληδόνες

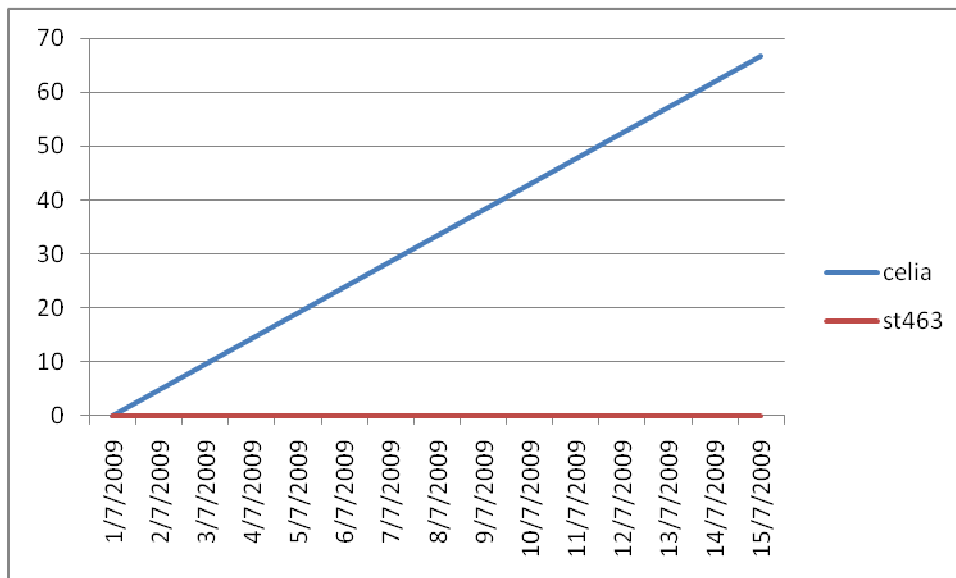
Γενότυπος	Ποσοστό αντίδρασης κατά την ημερομηνία		
	26/06/2009	15/07/2009	28/09/2009
ST474	0	85,18	91,66
CELIA	0	81,48	0
ST463	0	0	93,33
OKRA	0	37,5	0



Γράφημα 6: Επανάληψη 3 κοτυληδόνες

Πίνακας 15: Επανάληψη 4 υποκοτύλες

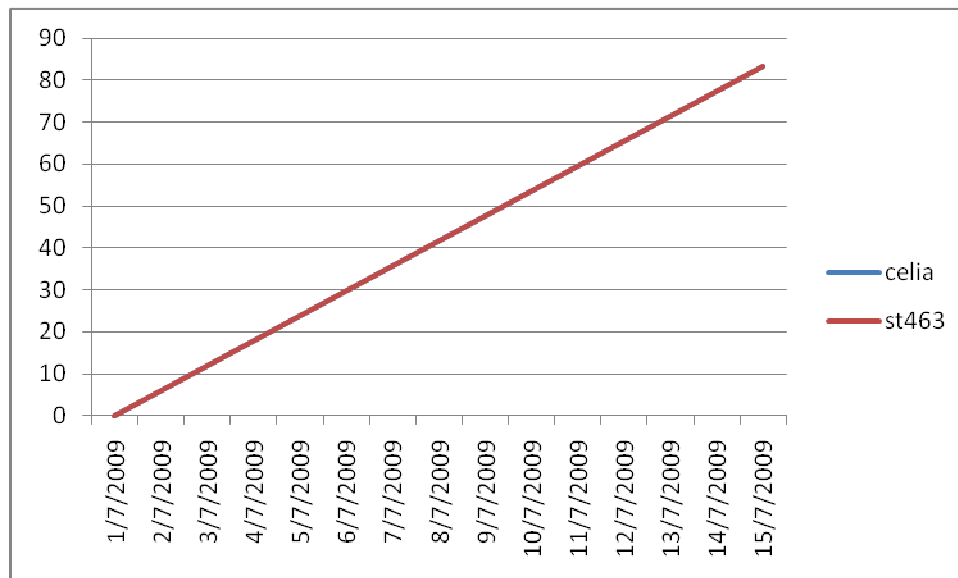
Γενότυπος	Ποσοστό αντίδρασης κατά την ημερομηνία	
	01/07/2009	15/07/2009
Celia	0	66,66
St463	0	0



Γράφημα 7: Επανάληψη 4 υποκοτύλες

Πίνακας 16: Επανάληψη 4 κοτυληδόνες

Γενότυπος	Ποσοστό αντίδρασης κατά την ημερομηνία	
	01/07/2009	15/07/2009
Celia	0	0
St463	83,33	83,33



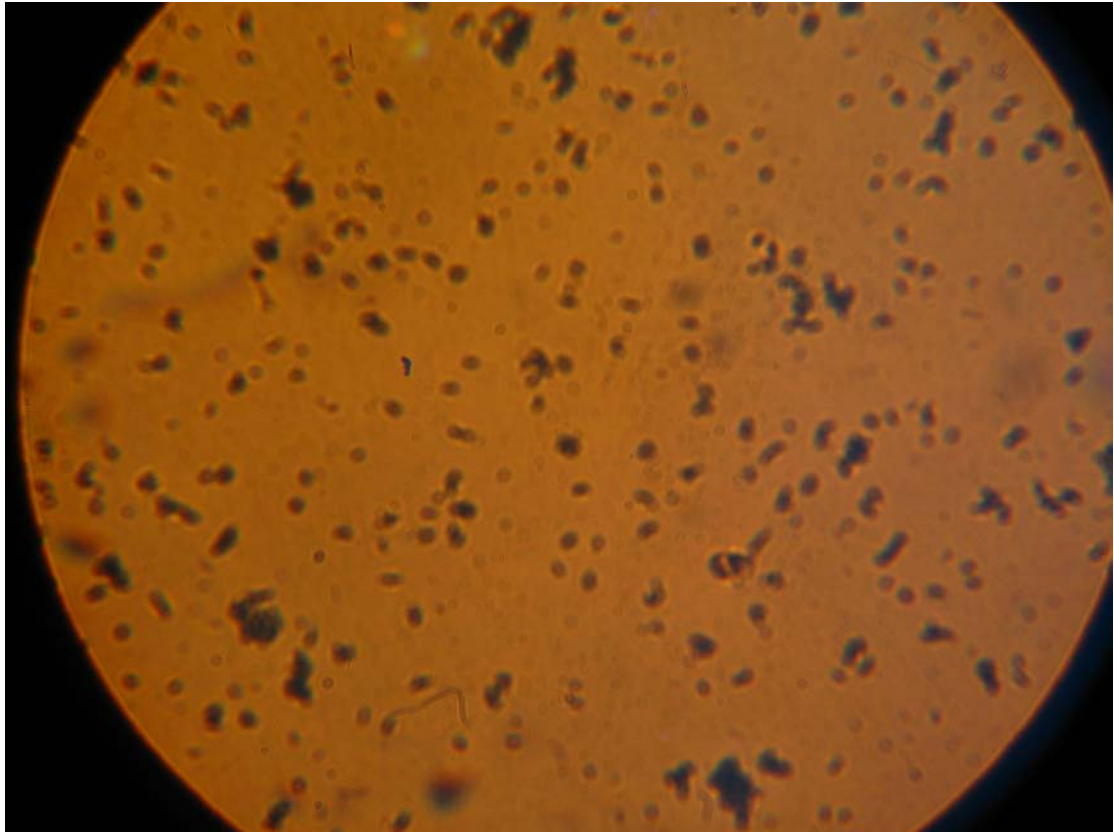
Γράφημα 8: Επανάληψη 4 κοτυληδόνες

4.2 Χρώση πρωτοπλαστών

Τόσο οι κοτυληδόνες, όσο και οι υποκοτύλες, από κάθε μια από τις 8 ποικιλίες βαμβακιού, την 1 ποικιλία κενάφ και 1 ποικιλία μπάμιας, φωτογραφήθηκαν με την χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής, σε μικροσκοπίου φθορισμού (Εικόνα 10), αφού πρώτα χρώστικαν οι πρωτοπλάστες με την χρήση χρωστικής fluorescein diacetate (FDA). Σύνολο 8 περίπου φωτογραφιών πάρθηκαν από κάθε ποικιλία και κάθε φωτογραφία αντιπροσώπευε ένα οπτικό πεδίο. Η ζωτικότητα μετρήθηκε σαν ποσοστό των φθορίζουσων πρωτοπλαστών σε σχέση με τους συνολικούς πρωτοπλάστες στο ίδιο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου.



Εικόνα 10: Μικροσκόπιο φθορισμού



Εικόνα 11: Νεκροί πρωτοπλάστες της ποικιλίας Celia, Δεν φθορίζουν στο μικροσκόπιο φθορισμού αλλά φαίνονται το οπτικό μικροσκόπιο



Εικόνα 12: Ζωντανοί φθορίζον πρωτοπλάστες της ποικιλίας St474

4.4 Απομόνωση πρωτοπλαστών

Για συγκριτικούς σκοπούς για το που βρίσκονταν οι περισσότεροι πρωτοπλάστες στο διάλυμα απομόνωσης, μικρή ποσότητα τόσο από το υπερκείμενο, όσο και από το υποκείμενο του διαλύματος απομόνωσης των πρωτοπλαστών, τοποθετήθηκε εντός αντικειμενοφόρου πλάκας για να παρατηρηθεί σε οπτικό μικροσκόπιο.

4.5 Σύντηξη πρωτοπλαστών

Αμέσως μετά την σύντηξη των πρωτοπλαστών, αφού αφέθηκε το διάλυμα σύντηξης να ηρεμήσει, μικρή ποσότητα διαλύματος τοποθετήθηκε επί αντικειμενοφόρου πλάκας και ακολούθως αυτή τοποθετήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο, από όπου οι πρωτοπλάστες φωτογραφήθηκαν με την χρήση ψηφιακής φωτογραφικής (Canon PowerShot S80).

Ακολούθως οι πρωτοπλάστες χρώστηκαν με την χρήση χρωστικής fluorescein diacetate (FDA) για να παρακολουθεί αν οι πρωτοπλάστες επιβίωσαν της σύντηξης.

5. Συμπεράσματα - Συζήτηση

5.1 Αποτελεσματικότητα ως προς τον ρυθμό εδραίωσης του κάλλου

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν διαφοροποίηση στην αντίδραση των πρωτοπλαστών βαμβακιού τόσο ως προς το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο απομόνωσης και καλλιέργειας όσο και ως προς γενότυπο των αξιολογούμενων ποικιλιών βαμβακιού.

Η κατά σειρά αντίδραση των ποικιλιών βαμβακιού σε σχέση με το πρωτόκολλο παρουσιάζεται στον Πίνακα 17. Συγκεκριμένα, στο πείραμα 2 ήταν η ακόλουθη Celia>Candia >St474>DP419>St463, ενώ και στο πείραμα 3 φαίνεται να υπερτερεί σαφώς η ποικιλία Celia. Στο πείραμα 1 δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση λόγω του αυξημένου ποσοστού προσβολής εξαιτίας φυτοπαθογόνων (βακτηρίων).

Πίνακας 17: Μέσος Όρος ποσοστού αντίδρασης στις 10 ημέρες μετά την πρώτη τοποθέτηση στο υπόστρωμα

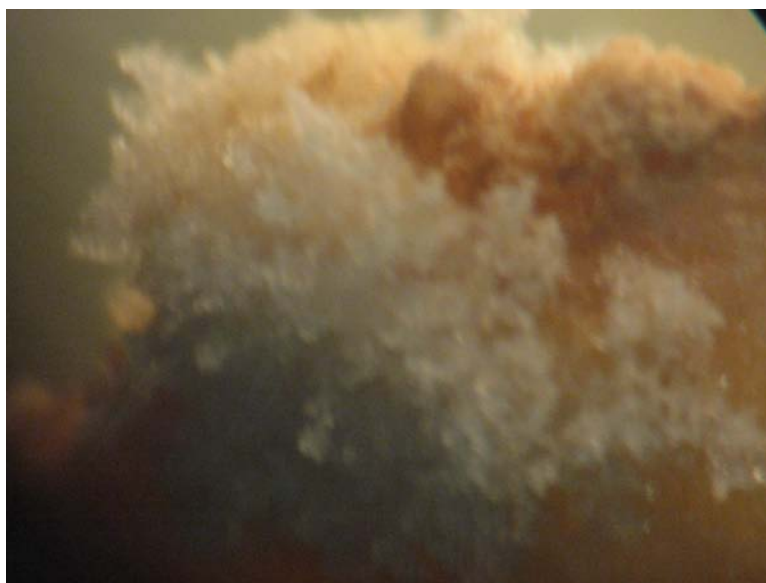
Γενότυπος	Μ.ο. Ποσοστού αντίδρασης 10 ημέρες μετά την τοποθέτηση στο υπόστρωμα	
	Υποκοτύλες	Κοτυληδόνες
CANDIA	95	93,33
ST474	88,33	86,66
SPEED	78,33	89,99
CELIA	97,2	95,53
DP419	71,66	94,99
FLORA	70	86,66
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ	18,33	53,33
Kenaf (Tainnung 2)	13,33	70
ST463	67,24	90,74
OKRA	-	76,66

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες (Θερμοκρασία, Υγρασία) όπου τοποθετήθηκαν τα έκφυτα ήταν οι ίδιες σε όλες τις ποικιλίες του πειράματος. Κατά συνέπεια ένας κύριος λόγος διαφοροποίησης ως προς τον ρυθμό εδραίωσης του κάλλου μπορεί να οφείλεται στην ίδια την ποικιλία. Ως γνωστό η ιστοκαλλιέργεια στο βαμβάκι είναι γενοτυπικά εξαρτημένη, μια πιθανή εξήγηση που μπορεί να δοθεί ότι κάποιος δευτερογενής μεταβολίτης

παραγόμενος από τα έκφυτα (πιθανόν οι φαινόλες ή οι ρυθμιστές ανάπτυξης) ίσως επηρεάζουν τον ρυθμό εδραίωσης του κάλλου.

Οι ποικιλίες Celia και Candia προέρχονται από στενή γενετική βάση κάτω από την εμπορική επωνυμία του οίκου Fibermax[®] (Bayer[®]), ενώ κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με τις ποικιλίες St474 και St463 που κυκλοφορούν κάτω από την εμπορική επωνυμία του οίκου Stoneville[®] (Pioneer[®]). Η ποικιλία DP419 ανήκει στην Monsanto[®] κάτω από την εμπορική επωνυμία του οίκου Deltapine[®]. Από τα αποτελέσματα του πειράματος, βρέθηκε να υπερτερούν οι ποικιλίες κάτω την εμπορική επωνυμία Fibermax[®] και να ακολουθούν οι ποικιλίες Deltapine[®] και Stoneville[®].

Πιθανή σύνδεση μπορεί να υπάρχει με την έρευνα του Millard C. Calhoun από το Πανεπιστήμιο του Τέξας (2004), ο οποίος διεξήγαγε πειράματα πάνω στη διατροφική αξία και την ποσότητα γκοσσυπόλης εντός των σπόρων σε 24 ποικιλίες βαμβακιού. Από τα αποτελέσματα του πειράματος ως προς την συγκέντρωση γκοσσυπόλης, οι ποικιλίες Fibermax[®] φαίνεται να έχουν την μικρότερη συγκέντρωση ολικής γκοσσυπόλης, με μέσο όρο 1,10% ανά μονάδα ξηράς ουσίας, ενώ ακολουθούν οι ποικιλίες Deltapine[®] με μέσο όρο 1,31% ανά μονάδα ξηράς ουσίας και οι ποικιλίες



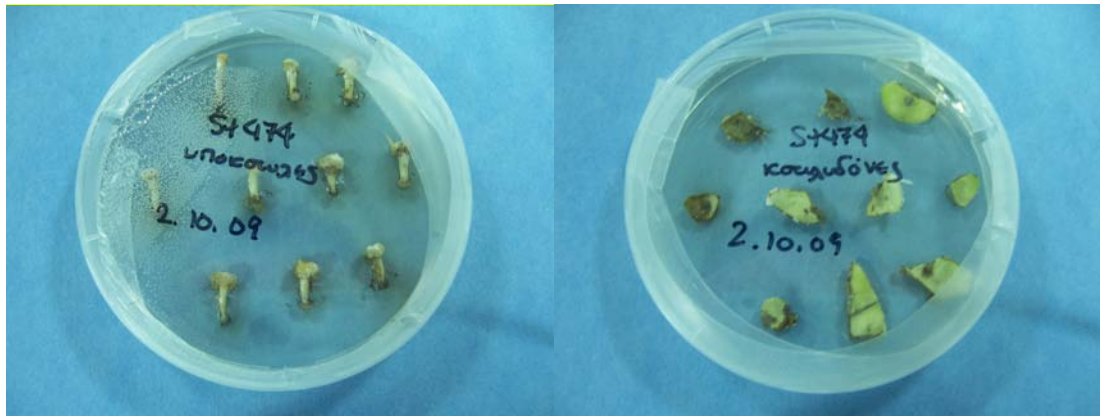
Εικόνα 13: Εύθραυστος κάλλος προερχόμενος από κοτυληδόνες της ποικιλίας Candia

Stoneville® με το μεγαλύτερο ποσοστό γκοσσυπόλης 1,74% ανά μονάδα ξηράς ουσίας. Η ποικιλία St474 είχε το μικρότερο ποσοστό γκοσσυπόλης σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες Stoneville® που εξετάστηκαν με μέσο όρο 1,55% ανά μονάδα ξηράς ουσίας και με ένα εύρος τιμών από 1,30-1,88% ξηράς ουσίας. Η ταξινόμηση που παρατηρήθηκε από τα δεδομένα του πειράματος, έρχεται να συμφωνήσει με τα αποτελέσματα του Calhoun, και δικαιολογείται ακόμη το γεγονός ότι η ποικιλία St474 είχε καλύτερη αντίδραση στο υπόστρωμα σε σχέση με την ποικιλία DP419 (Deltapine®).

Συγκρίνοντας τα δεδομένα και των δυο πειραμάτων (Calhoun και το παρόν πείραμα), μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα πως υπάρχει μια αρνητική συσχέτιση της συγκέντρωσης γκοσσυπόλης στα έκφυτα ως προς τον ρυθμό εδραίωσης του κάλλου. Αυτό έρχεται να συμφωνήσει με τα αποτελέσματα των ZHU Shuijin και Ji Daofan (2001) όπου φτάνουν σε ανάλογο συμπέρασμα, με την επιπρόσθετη παρατήρηση ότι μια συγκέντρωση της τάξεως των 0,1mg/L γκοσσυπόλης, δρα θετικά στη σταθερότητα της ανάπτυξης του κάλλου.

Με βάση τα δεδομένα, αν γίνει σύγκριση ως προς την πηγή του εκφύτου σε σχέση με τον ρυθμό αντίδρασης προς το υπόστρωμα, φαίνεται καθαρά ότι η ταχύτερη αντίδραση παρατηρείται όταν χρησιμοποιείται ως πηγή εκφύτου, οι υποκοτύλες σε σχέση με τη χρησιμοποίηση των κοτυληδόνων. Όπως φαίνεται και από τις εικόνες 14, η χρησιμοποίηση υποκοτύλων είχε ταχύτερη αντίδραση και περισσότερο εμφανή αποτελέσματα. Οι παρατηρήσεις στα αποτελέσματα βρίσκουν σύμφωνους αρκετούς συγγραφείς που αναφέρουν την καταλληλότητα της χρησιμοποίησης υποκοτύλων έναντι κοτυληδόνων για την δημιουργία κάλλου (Peeters and Swennen, 1993; Zhang *et al.*, 2001; Zouzou Michel *et al.*, 2008).

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν κατάλληλα για να προκαλέσουν ικανοποιητική αντίδραση τόσο σε κενάφ, όσο και στην μπάμια. Η μπάμια έδειξε μερική αντίδραση στο υπόστρωμα του 2ου πρωτοκόλλου, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά. Πιθανός λόγος για τον οποίο η μπάμια και το κενάφ δεν είχαν ικανοποιητική αντίδραση στο υπόστρωμα, οφείλεται ίσως στο γεγονός ότι τα πρωτόκολλα δεν ήταν προσαρμοσμένα για τα δυο αυτά είδη.



Εικόνα 14: Σύγκριση μεταξύ υποκοτύλων και κοτυληδόνων που καλλιεργήθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα, την ίδια χρονική περίοδο

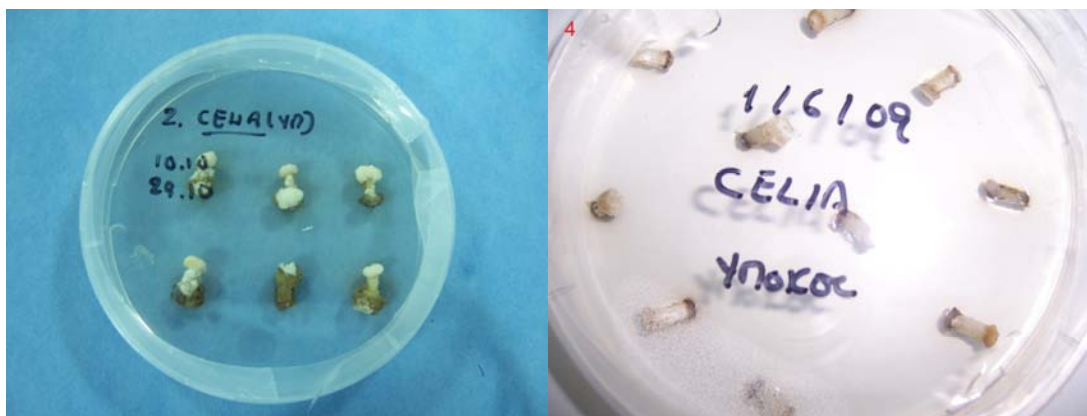
Η παρουσίαση μειωμένης ανάπτυξης στα γραφήματα σε σχέση με τον προηγούμενο ρυθμό ανάπτυξης, οφείλεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στο γεγονός ότι αρκετά από τα έκφυτα μολύνονταν και αυτό είχε επιπτώσεις στην συνολική βαθμολογία.

Από την απομόνωση πρωτοπλαστών και ακολούθως την παρακολούθησή τους σε οπτικό μικροσκόπιο, τόσο πρωτοπλαστών που προέρχονταν από το υπερκείμενο, όσο και πρωτοπλαστών που προέρχονταν από το υποκείμενο του διαλύματος απομόνωσης, παρατηρήθηκε ότι οι περισσότεροι πρωτοπλάστες βρίσκονταν εντός του υποκειμένου του διαλύματος απομόνωσης. Η παρατήρηση συμφωνεί με τη διαδικασία απομόνωσης και των τριών πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν (Kumria *et al.*, 2003; Πρωτόκολλο WO/2001/000785; Xi-yan Yang *et al.*, 2007)

Μετά από χρώση των πρωτοπλαστών δεν παρατηρήθηκαν ζωντανοί πρωτοπλάστες στις περισσότερες ποικιλίες βαμβακιού, του κενάφ και της μπάμιας. Αυτό υποδεικνύει ότι οι πρωτοπλάστες δεν επιβίωσαν της διαδικασίας απομόνωσης τους, είτε λόγω ανθρώπινου σφάλματος κατά την διαδικασία απομόνωσης, είτε κάποιου σφάλματος στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου απομόνωσης.

Η παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων αυξητικών ορμονών στο υπόστρωμα φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο ως προς το ρυθμό αντίδρασης του εκφύτου. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του 1 mg 2.4D και των 2 mg KIN του πρωτοκόλλου του πειράματος 1, έχουν αυξημένο ρυθμό αντίδρασης σε σχέση με την συγκέντρωση των 0,1 mg 2.4D και 0.5 mg KIN

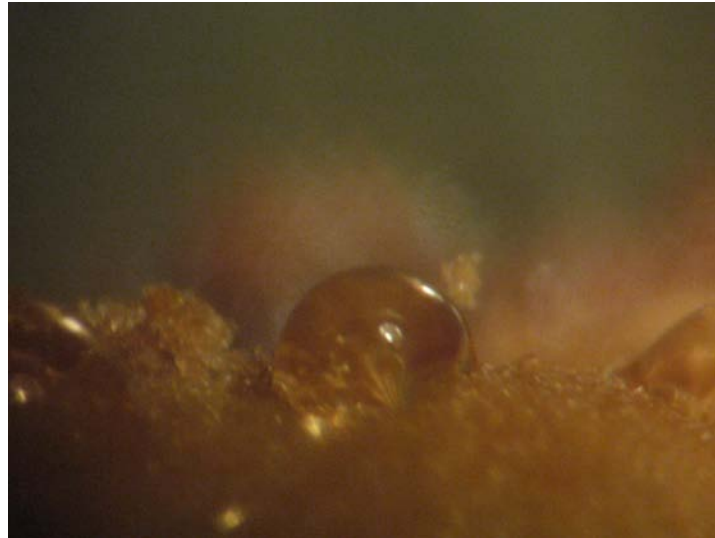
του πρωτοκόλλου των Kumria *et al* (2003). Πολλές αναφορές έχουν γίνει σχετικά με την αναγκαιότητα της αυξητικής ορμόνης 2.4D για την έναρξη της καλλογένεσης (Davidonis and Hamilton, 1983; Zhang, 2000; Lee *et al*, 2004 ; Wang *et al.*, 2004 ; Sun *et al.*, 2006; Burbulis *et al.*, 2007), η οποία από το πείραμα φαίνεται να παίζει ρόλο στο ρυθμό ανάπτυξης του κάλλου. Τα αποτελέσματα του πειράματος έρχονται σε αντιπαράθεση με τα αποτελέσματα των Zouzou Michel *et al.* (2008) όπου αναφέρουν ότι οι βέλτιστες συγκεντρώσεις αυξητικών ορμονών για το βαμβάκι ήταν οι 0,1 mg 2.4D και 0.5 mg KIN.



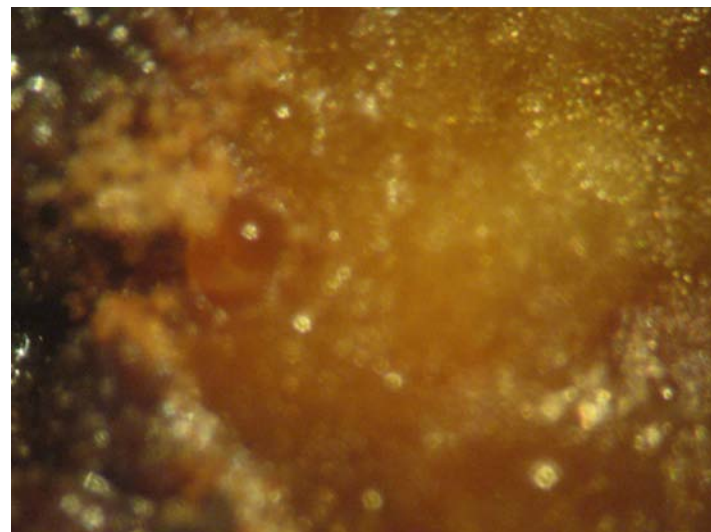
Εικόνα 15: Σύγκριση μεταξύ πειράματος 1 και πειράματος 2 μετά από 1 μήνα ιστοκαλλιέργειας

Μετά από παρατεταμένο χρόνο καλλιέργειας, τα έκφυτα παρουσίαζαν ένα καφετί χρωματισμό, ενώ μερικά παρουσίαζαν εκκρίσεις φαινολικών ουσιών στο καλλιεργητικό μέσο. Έρευνες σχετικά με την ιστοκαλλιέργεια δείχνουν ότι οι φαινολικές ουσίες και συγκεκριμένα η γκοσσυπόλη, έχουν υποστεί κάποιο βαθμό οξειδωσης, με συνέπεια να έχουν αρνητική επίδραση στην *in vitro* καλλιέργεια (Arnaldos *et al.*, 2001). Το καφέ χρώμα των εκφύτων οφείλεται στην αναστολή της ενζυμικής λειτουργίας που προκαλείται από οξειδωμένες φαινολικές ουσίες (Laukkanen *et al.*, 1999; Compton *et al.*, 1986). Η προσθήκη αντιοξειδωτικών όπως το κιτρικό οξύ, το ασκορβικό οξύ, το PVP (polyvinyl pyrrolidone) και ο ενεργός άνθρακας στο θρεπτικό μέσο μπορεί να μειώσουν το βαθμό οξειδωσης των φαινολικών (Toth *et al.*, 1994). Οι συγκεντρώσεις φαινολικών αυξάνονται και μειώνονται ανάλογα με το

στάδιο βλάστησης των φυτών (Thomas and Ravindra, 1999). Οι Ibrahim Ilker Ozyigit *et al* (2007) προτείνουν την καλλιέργεια των εκφύτων πριν τις 7 ημέρες ή μετά την 28η ημέρα από την βλάστηση των σπόρων, στο στάδιο δηλαδή όπου τα φαινολικά έχουν την μικρότερη συγκέντρωση. Επίσης προτείνεται η συχνή επανακαλλιέργεια των εκφύτων σε ανανεωμένα θρεπτικά υποστρώματα.



Εικόνα 16: Έκκριση φαινολών σε κάλλο δύο μηνών της ποικιλίας Candia



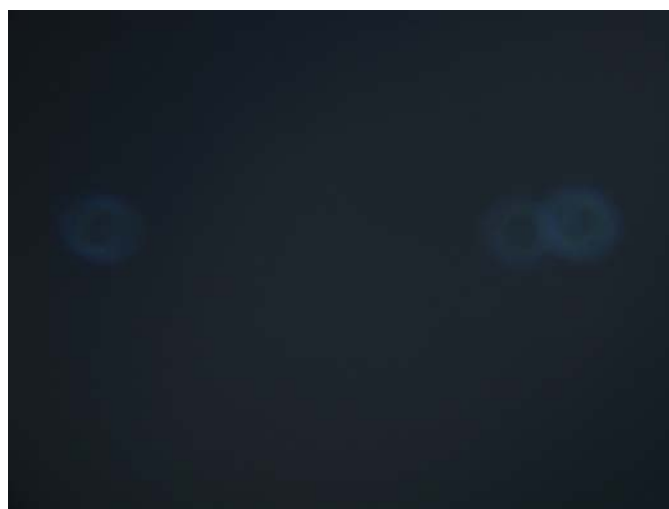
Εικόνα 17: Έκκριση φαινολών σε δίμηνο κάλλο προερχόμενο από κοτυληδόνες της ποικιλίας Candia

Από την σύντηξη πρωτοπλαστών φαίνεται καθαρά στο μικροσκόπιο, ο σχηματισμός αλυσίδων ανάμεσα στους πρωτοπλάστες. Ο σχηματισμός αλυσίδων υποδεικνύει ότι μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη σύντηξη ήταν επιτυχής, όμως είναι αδύνατο σε αυτό το στάδιο να καταλάβουμε αν οι πρωτοπλάστες ανήκουν στο ίδιο είδος ή σε διαφορετικό.



Εικόνα 18: Σχηματισμός αλυσίδων μετά από σύντηξη των ποικιλιών Celia και St474

Μετά την χρώση των προϊόντων της σύντηξης με την χρωστική FDA παρατηρήθηκαν ζωντανοί πρωτοπλάστες, γεγονός που αποδεικνύει ότι η διαδικασία και οι συνθήκες κατά την διάρκεια της σύντηξης ήταν επιτυχής.



Εικόνα 19: Ζωντανοί πρωτοπλάστες μετά από σύντηξη των ποικιλιών Celia x St474

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων φαίνεται ότι η ποικιλία Celia να υπερτερεί έναντι των υπολοίπων ποικιλιών. Αυτό οφείλεται, κατά τον συγγραφέα, στην χαμηλή συγκέντρωση γκοσσυπόλης που χαρακτηρίζει την συγκεκριμένη ποικιλία (Millard C. Calhoun, 2004). Λόγω του παραπάνω, οι ποικιλίες με την εμπορική επωνυμία Fibermax[®] βρέθηκαν καταλληλότερες για την χρησιμοποίησή τους στην ιστοκαλλιέργεια σε σχέση με τις Deltapine[®] και Stoneville[®] αλλά χρειάζεται όμως περαιτέρω έρευνα. Παρόλα αυτά ο συγγραφέας προτείνει τον έλεγχο κάθε ποικιλίας για την συγκέντρωση γκοσσυπόλης και χρησιμοποίησή αυτών με την μικρότερη συγκέντρωση, που όμως να μην είναι μικρότερη από τα 0,1mg/L γκοσσυπόλης. Οι επιλεγμένες ποικιλίες τότε θα αφεθούν να βλαστήσουν και η προετοιμασία των εκφύτων για την τοποθέτηση στο υπόστρωμα πρέπει να γίνει το αργότερο μέχρι την έβδομη μέρα όπου τα επίπεδα φαινολικών είναι στην μικρότερη συγκέντρωση. Τα έκφυτα τότε πρέπει να τοποθετηθούν σε MS θρεπτικό μέσο παρουσία ορμονών 1 mg 2.4D και 2 mg KIN, ενώ συνιστάται η συχνή επανακαλλιέργεια σε ανανεωμένα θρεπτικά υποστρώματα.

Παρόλο που έχουν αναφερθεί τεχνικές που είναι γενοτυπικά ανεξάρτητες (Katageri *et al.*, 2007; Gould and Maria Magallenes-Cedeno 1998; Zapata *et al.*, 1999; Chinchane *et al.*, 2004), η ικανότητα καλλιέργειας του βαμβακιού σε *in vitro* καλλιέργεια δεν παύει να είναι γενοτυπικά εξαρτημένη. Μέχρι τώρα υποσχόμενα αποτελέσματα υπάρχουν μόνο στην ποικιλία Coker 312, που όμως δεν έχει μεγάλη οικονομική σημασία από εμπορική άποψη. Η κατεύθυνση προς μια γενοτυπικά ανεξάρτητη *in vitro* καλλιέργεια θα ανοίξει νέους ορίζοντες στην γενετική βελτίωση του βαμβακιού η οποία και δεν θα περιορίζεται πλέον μόνο στις συμβατικές μεθόδους βελτίωσης, αλλά θα συνεισφέρει επικουρικά στην αποτελεσματικότητά τους.

Βιβλιογραφία:

- Abdalla, M.M.F.; Hermsen, J.G.Th.: Unilateral incompatibility: hypotheses, debate and its implications for plant breeding. *Euphytica* 21. 32–47 (1972)
- Adiwilaga K D, Brown C R. 1991. Use of 2n pollen-producing triploid hybrids to introduce tetraploid Mexican wild species germplasm to cultivated tetraploid potato gene pool. *Theoretical and Applied Genetics* 81:645–652.
- A. G. Mavromatis, S. K. Kantartzi, D. N. Vlachostergios, I. N. Xynias, G. N. Skarakis and D. G. Roupakias 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* *Australian Journal of Agricultural Research* 56(10) 1101 – 1109
- Akdemir, H., Gurel, A., Emiroglu, S. H. et al. 2001. Investigations adaptation of long staple cotton varieties. – J. Aegean Agric. Res. Inst., J. of Anatolia, Izmir (2).
- Al-Yasiri, A. and D.P. Coyne. 1964. Effects of growth regulators in delaying pod abscission and embryo abortion in the interspecific cross *Phaseolus vulgaris* × *P. acutifolius*. *Crop Science* 4: 433–435.
- Arnaldos TL., Munoz R, Ferrer MA, Calderon AA. (2001). Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiol. Plant.* 113: 315-3223
- Bajaj Y.P.S ,1998,Biotechnology in Agriculture and Forestry 42, Cotton, Springer.
- Barone, A. Giudice and N. Q. Ng, (1992), Barriers to interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* and *Vigna vexillata*, SEXUAL PLANT REPRODUCTION Volume 5, Number 3, 195-200
- Bhojwani SS, Power JB and Cocking EC (1977) Isolation, culture and division of cotton callus protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 8 : 85

- Brown MS, Menzel MY (1950) New trispecies hybrids in cotton. J Hered 41:291–295
- Brubaker CL, Paterson AH, Wendel JF (1999) Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. Genome 42:184–203.
- Burbulis N, Blinstrubiene A, Sliesaravicius A, Kupriene R (2007) Some factors affecting callus induction in ovary culture of flax (*Linum usitatissimum* L.). Biologia 53:21-23.
- Chaudhary B, Kumar S, Prasad KVSK, Oinam GS, Burma PK and Pental D (2003) Slow desiccation leads to high-frequency shoot recovery from transformed somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 310 FR). Plant Cell Rep. (in press).
- Chinchane, B.N., Nandeshwar, S.B., Deshpande, L.A. And Chinchane, V.N., 2004, Agrobacterium mediated transformation and regeneration in *Gossypium arboreum* L. cotton (cv. PV-255). International Symposium on “Strategies for Sustainable Cotton Production- A Global Vision” 1. Crop Improv., pp.23-24.
- Clark, L. J., Carpenter, E. W., Hart, G. L. et al. 1998. Pima cotton regional variety trial, Safford Agric. Center, 1997. Cotton. A College of Agric. Rep., The Univ. of Arizona, Tucson, AZ. Series P-112:204–208.
- Compton ME, Preece JE (1986). Exudation and explant establishment. NS Int. Assn. Plant Tissue Cult. 50: 9-18.
- Cousins YL, Lyon BR and Llewellyn DJ (1991) Transformation of an Australian cotton cultivar: Prospects for cotton through genetic engineering. Aust J Plant Physiol 18 : 481-494.
- Cronn RC, Zhao X, Paterson AH, Wendel JF (1996) Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. J Mol Evol 42:685–705.

- Davidonis GH, Hamilton RH (1983) Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. *Plant Sci Lett* 32:89-93.
- Davis D. D. (1978). Hybrid cotton specific problems and potentials. *Adv. Agron.* 30: 129– 153.
- D.E. Evans, J.O.D. Coleman and A. Kearns. 2003. *Plant Cell Culture*. Bios Scientific Publishers, London.
- De Nettancourt, D. 1977. *Incompatibility in angiosperms*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.
- Dionne, L. A., 1958: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid as an aid to seed production when widely separated *Solanum* species are crossed. *nature* 181, 361.
- D. N. Vlachostergios, A. G. Mavromatis, S. K. Kantartzi and D. G. Roupakias, 2007, In-vitro development of ovules obtained after pollination of cotton (*Gossypium spp*) flowers with pollen from okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench), *PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE*, Volume 88, Number 1, 109-115.
- Dong H. Z., Li W. J., Tang W. *et al.* , (2004). Development of hybrid Bt cotton in China-a successful integration of transgenic technology and conventional techniques. *Curr. Sci.* 86: 778– 782.
- Emsweller, S.L. and N.W. Stuart. 1948. Use of growth regulating substances to overcome incompatibilities in *Lilium*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 51: 581–589.
- Endrizzi, J. E., Turcotte, E. L., and Kohel, R. J. 1984. Qualitative Genetics, Cytology, and Cytogenetics. pp. 82-129. In Kohel, R. J. and Lewis, C. F., Editors. *Cotton*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin. 605 pp.
- Endrizzi JE, Turcotte EL, Kohel RJ (1985) Genetics, cytology, and evolution of *Gossypium*. *Adv Genet* 23:271–375.

- Finer JJ and Smith RH (1982) Isolation and culture of protoplasts from cotton (*Gossypium klotzschianum* Anderss) callus cultures. Plant Sci. Lett. 26 : 147-151.
- Finer JJ (1988) Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton. *Gossypium hirsutum* L. Plant Cell Rep. 7: 399-402.
- Firoozabady E and DeBoer DL (1986) Isolation, culture and cell division in cotyledon protoplasts of cotton (*Gossypium hisutum* and *G. barbadense*). Plant Cell Rep. 5 : 127-131.
- Firoozabady E (1986) The effects of cell cycle parameters on cell wall regeneration and cell division of cotton protoplast. J. Exp. Botany, 37, 1211.
- Franklin W. Martin (1970), Self- and Interspecific Incompatibility in the Convolvulaceae, *Botanical Gazette*, Vol. 131, No. 2 (Jun., 1970), pp. 139-144 .
- Fritz FK and RE Hanneman, Jr. 1989. Interspecific incompatibility due to stylar barriers in tuber-bearing and closely related non-tuber-bearing Solanums. Sex Plant Reprod 2:184-192.
- Fryxell PA. 1980 The natural history of the cotton tribe (Malvaceae, tribe Gossypieae). College Station & London: Texas A & M University Press, n.d xviii, 245p.
- Fryxell PA, 1992, A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). Rheedea 2:108-165.
- Galau GA, Wilkins TA (1989) Alloplasmic male sterility in AD allotetraploid *Gossypium hirsutum* upon replacement of its resident A cytoplasm with that of D species *G. harknessii*. Theor Appl Genet 78:23–30.
- Ganesan, M., Chandrasekar, R., Kumari, B., Jayabalan, N. (2007). Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Abelmoschus esculentus* through suspension culture 51 (3): 414-420.
- Gould JH, Banister S, Hasegawa O, Fahima M and Smith RH (1991) Regeneration of *Gossypium hirsutum* and *G. barbedense*

from shoot apex tissues for transformation. *Plant Cell Rep.* 10 : 12-16.

- Gould, J. and Maria Magallenes-Cedeno, 1998, Adaptation of cotton shoot apex to *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Mol. Boil. Rep.*, 16: 1-10.
- Grun, P.; Aubertin, M.: The inheritance and expression of unilateral incompatibility in *Solanum*. *Heredity* 21, 131–138 (1966).
- Gundimeda HR, Prakash S, Shivanna KR (1992) Intergeneric hybridization between *Enarthrocarpus lyratus*, a wild species and crop brassicas. *Theor Appl Genet* 83:655–662.
- Haider, S.A., Islam, R., Kamal, A.H.M., Rahman, S.M. and Joarder, O.I. (1993). Direct and indirect organogenesis in cultured hypocotyl explants of *Abelmoschus esculentus* L. Moench. *Plant Tissue Cult.* 3(2): 85-89.
- Hemphill JK, Maier CGA and Chapman KD (1998) Rapid in vitro plant regeneration of cotton (*Gossypium hisutum* L.). *Plant Cell Rep.* 17 : 273-278.
- Hermsen, J. G. Th., 1984a. Mechanisms and genetic implications of 2n-gamete formation. *Iowa State J. Res.* 58: 421–434.
- Hermsen, J.G. 1984b. The potential of meiotic polyploidization in breeding allogamous crops. *Iowa State J. Res.*, vol. 58, No. 4, 421-435.
- Hutchinson et al., 1947 J.B. Hutchinson, R.A. Silow and S.G. Stephens, *The Evolution of Gossypium and the Differentiation of the Cultivated Cottons*, Oxford University Press, London (1947).
- Hutchinson JB (1959) *The application of genetics to cotton improvement*. Cambridge Univ Press, UK.
- Hogenboom, N.G.: A model for incongruity in intimate partner relationships. *Euphytica* 22, 219–233 (1973).
- Hogenboom NG (1984) Incongruity: non-functioning of intercellular and intracellular partner relationships through nonmatching of information. In: Linskens HF, Heslop-Harrison J (eds)

Cellular interactions. (Encyclopedia of plant physiology, NS, vol 17) Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 641–654.

- Ibrahim Ilker Ozyigit et al, 2007, Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.), African Journal of Biotechnology Vol. 6 (1), pp. 003-008.
- Iyengar, N.K. 1938. Pollen-tube studies in *Gossypium*. J. Genet. 37:69-106.
- Kabir, A.H., Sarker, K.K., Sharmin, S.A., Islam, M.S. and Alam, M.F. (2008). Callus induction and plantlet regeneration in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. Journal of Agricultural Technology 4(1): 193-204.
- Καλτικής Π. (1989). Βελτίωση φυτών, αρχές και μέθοδοι. Εκδ. Α.Σταμούλης. Πειραιάς.
- Katageri, I.S., Vamadevaiah, H.M., Udikeri, S.S., Khadi, B. M. and Kumar, P.A., 2007, Genetic transformation of an elite Indian genotype of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) for insect resistance. Current Sci., 93(12): 1843-1847.
- Katterman, F. R. H., Ergle, D. R.: A study of quantitative variations of nucleic acids in *Gossypium*. Phytochemistry 9, 2007-2010 (1970).
- Knox RB, Clarke A, Harrison S, Smith P, Marchalonis JJ (1976) Cell recognition in plants: determinants of the stigma surface and their pollen interactions. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1976;73:2788-2792.
- Kumar S and Pental D (1998) Regeneration of Indian cotton variety MCU-5 through somatic embryogenesis. Curr. Sci. 74 : 538-540.
- Kumria et al. (2003), High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress, Plant Cell Rep (2003) 21:635–639.
- Κωνσταντίνος Α. Ποντίκης . 1994. Πολλαπλασιασμός Καρποφόρων Δένδρων και θάμνων. Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα.

- Laukkanen H, Häggman H, Kontunen-Soppela S, Hohtola A (1999). Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiologica Plantarum* 106: 337-343.
- Lee S, Kim B, Won S, Jo J, Kim K, Park G, Sung B, Lee H, Lee B (2004) Factors affecting callus induction and plant regeneration from mature seed of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *J Kor Soc Gras Sci* 24 (1):29-36.
- Lewis D, Crowe LK. 1958. Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants. *Heredity* 12: 233–256.
- Linskens HF, Esser K (1957) über eine spezifische Anfärbung der Pollenschläuche in Griffel und die Zahl der Kallosepfropfen nach Selbstung und Fremdung. *Naturwissenschaften* 44:16
- Liu, B., C. L. Brubaker, G. Mergeai, R. C. Cronn, and J. F. Wendel. 2001. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome* 44: 321-330.
- Martin FW (1959) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol* 34:125–128.
- McLean KS, Lawrence GW & Reichert NA (1992) Callus induction and adventitious organogenesis of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Plant Cell Rep.* 11:532-534.
- M-C. Peeters and R. Swennen, 1992, Cotton Protoplast Culture, Laboratory of Tropical Crop Husbandry, Catholic University Leuven, Kardinaal Mercierlaan.
- Menzel MY, Brown MS (1954) The significance of multivalent formation in three-species *Gossypium* hybrids. *Genetics* 39:546–557.
- Millard C. Calhoun, 2004, Variation in the Nutrient and Gossypol Content of Whole Cottonseed and Cottonseed Meal, Texas Agricultural Experiment Station, Texas A&M University System, San Angelo, TX.
- Mishra R, Wang H, Yadav NR and Wilkins T (2003) Development of a highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum*

cv. Maxxa) – A step towards genotype independent regeneration. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 73 : 21-35.

- Mitten DH (1985) Somatic embryogenesis in *Gossypium hirsutum* L. In: Proc. Beltwide Cotton Production Research Conference. National Cotton Council, Memphis, TN. 57-58.
- Morre JL, Permingeat HR, Romagnoli MV, Heisterborg CM and Vallejos RH (1998) Multiple shoot induction and plant regeneration from embryonic axes of cotton. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54: 131-136.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nancy A. Reichert and Donglong Liu, 1996, Protoplast isolation, culture, and fusion protocols for kenaf (*Hibiscus cannabinus*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 201-210.
- Pandey KK (1968) Compatibility relationships in flowering plants: role of the S-gene complex. *Am Nat* 102:475–489.
- Pandey, K.K.: Elements of the S-gene complex V. Interspecific cross-compatibility relationships and theory of the evolution of the S-complex. *Genetica* 40, 447–474 (1969).
- Peeters M, Swennen R (1993) Cotton biotechnology, State of Art. In: African Crop Science Society (eds) Proceedings of 1st African Crop Science Conf., Kampala, Uganda, pp. 1-16.
- Peeters MC, Willems K and Swenen R (1994) Protoplast-to-plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 312) using feeder layers. *Plant Cell Rep.* 13 : 208-211.
- Pittarelli, G.W. and J.R. Stavely. 1975. Direct hybridisation of *Nicotiana rependa* × *N. tabacum*. *Journal of Heredity* 66: 281–284.
- Potrykus, I. Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 42:205-225; 1991.

- Price HJ and Smith RH (1979) Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzschianum* Anders. *Planta* 145 : 305-307.
- Price H. J. and R.H. Smith, 1984, Fiber and wood, Cotton, Handbook of plant culture, Vol 3, Macmillant publishing co, New York, pp. 487-510.
- Rajasekaran K (1996) Regeneration of plants from cryopreserved embryogenic cell suspension and callus cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.* 15 : 859-86.
- Rangan TS (1993) Regeneration of cotton. USA patent 5 : 244, 802.
- Rangan TS and Rajasekaran K (1996) Regeneration of cotton plants in suspension culture. USA patent 5 : 583, 036.
- Rangaswamy, N.S.: Applications of *in vitro* pollination and *in vitro* fertilization. In: Plant cell, tissue, and organ culture. Eds. J. Reinert and Y.P.S. Bajaj. Berlin-Heidelberg-New York Springer: (1977).
- Ratna Kumria, Sadhu Leelavathi, Raj K. Bhatnagar and Vanga Siva Redd, 2003, Regeneration and Genetic Transformation of Cotton: Present Status and Future Perspectives, *Plant Tissue Cult.* 13(2) : 211-225.
- ROBBELEN G., 1960 Beitr'dge zur analyse des Brassica-genoms. *Chromosoma* 11: 205-228.
- Saeed NA, Zafar Y and Malik KA (1997) A simple procedure of *Gossypium* meristem shoot tip culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51 : 201-207.
- Saka *et al* (1987). Cell regeneration and sustained division of protoplast from cotton. *Plant Cell Reports*, 6, 470.
- Sampson DR (1962) Intergeneric pollen-stigma incompatibility in Cruciferae. *Can J Genet Cytol* 4:38–49.
- Seelanan, T., A. Schnabel and J.F. Wendel. 1997. Congruence and consensus in the cotton tribe. *Systematic Botany* 22:259-290.

- Senchina DS, Alvarez I, Cronn RC, Liu B, Rong JK, Noyes RD, Paterson AH, Wing RA, Wilkins TA, Wendel JF (2003) Rate variation among nuclear genes and the age of polyploidy in *Gossypium*. *Mol Biol Evol* 20:633–643
- Shivanna KR, Johri BM. 1985 The angiosperm pollen: structure and function. New Delhi etc.: Wiley Eastern Ltd xv, 374p.
- Shivanna K. R., Rangaswamy N. S. (1992) Pollen biology — a laboratory manual. Springer, Berlin.
- Shoemaker RC, Couche LJ and Galbraith DW (1986) Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Plant Cell Rep.* 3 : 178-181.
- Small RL, Ryburn JA, Cronn RC, Seelanan T, Wendel JF (1998) The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. *Am J Bot* 85:1301–1315.
- Smith, C. Wayne. Crop Production, 1995, Evolution, History and Technology. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Stettler RF, Heilmann PE, Hinckley TM. 1990. Genetics/physiology of short rotation biomass production with *Populus*. In: WernerD,MüllerP, eds. *Fast growing trees and nitrogen fixing trees*. New York, USA: Gustav Fischer Verlag, 194–200.
- Sun YQ, Zhang XL, Nie YC, Guo XP, Jin SX, Liang SG (2004) Production and characterization of somatic hybrids between upland cotton (*Gossypium hirsutum*) and wild cotton (*G. klotzschianum* Anderss) via electrofusion. *Theor Appl Genet* 109:472–479.
- Sun YQ, Nie YC, Guo XP, Huang C, Zhang XL (2006) Somatic hybrids between *Gossypium hirsutum* L. (4·) and *G. davidsonii* Kellog (2·) produced by protoplast fusion. *Euphytica* 151:393–400.

- Thomas J. and Katterman, F., 1984. The control of spontaneous lysis of protoplast from *Gossypium hirsutum* anther callus. *Plant Sci, Letters*, 36, 149.
- Thomas P, Ravindra MB (1999). Shoot tip culture in mango: Influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. *J. Horticultural Sci.* 72(5): 713-722.
- Toth K, Haapala, Hohtola A (1994). Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments. *Biol. Plant.* 36: 511-517.
- Trolinder NL and Xhixian C (1989) Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton. *Plant Cell Rep.* 8 : 133-136.
- Venkateswarlu D. and Da Corta L. , (2001). Transformations in age and gender of unfree workers on hybrid cottonseed farms in Andhra Pradesh. *J. Peasant Stud.* 28: 1– 36.
- Vlachostergios D. N., Mavromatis A. G., Kantartzi S. K., Roupakias D. G. In-vitro development of ovules obtained after pollination of cotton (*Gossypium* spp) flowers with pollen from okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 2007 88(1). p.109.
- Vycotski, K., 1930, Work on interspecific hybridization in cotton at the Turkestan Breeding Station, *Bulletin of the Scientific Research Cotton Institution* 1930 Vol. 1 pp. 26-2
- Wang J, Sun Y, Hu J, Cui G (2004) Factors affecting the frequencies of callus induction and plantlet regeneration in maize immature embryo culture. *Acta Agron Sin* 30:398-402.
- WEBBER, H. J. ,1903. IMPROVEMENT OF COTTON BY SEED SELECTION. U.S. Dept. Agr. Yearbook 1902, pp. 365-386.
- Wendel, J.F. 1989. New World tetraploid cottons contain Old World cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86: 4132-4136.

- Wendel, J. F. and V. A. Albert. 1992. Phylogenetics of the cotton genus (*Gossypium* L.): Character-state weighted parsimony analysis of chloroplast DNA restriction site data and its systematic and biogeographic implications. *Systematic Botany* 17: 115-143.
- Wendel JF, Cronn RC (2003) Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Adv Agron* 78:139–186
- WO/2001/000785, (2001), Regeneration of cotton plants.
- Wu JH, Zhang XL, Nie YC, Jin SX, Liang SG (2004) Factors affecting somatic embryogenesis and plant regeneration from a range of recalcitrant genotypes of Chinese Cottons (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40:371–375.
- X. Liang, S. Ding and S. Wong, 2002, Development of a kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) protoplast system for a replication study of Hibiscus chlorotic ringspot virus , *Plant Cell Rep* (2002) 20:982–986.
- Xi Yang *et al.* (2007), Production and characterization of asymmetric hybrids between upland cotton Coker 201 (*Gossypium hirsutum*) and wild cotton (*G. klotzschianum* Anderss), *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2007) 89:225–235.
- Χρηστίδης , Β., 1965 : Το βαμβάκι. Θεσσαλονίκη.
- Zapata, C., Park, S., El-Zik, K.M. and Smith, R.H., 1999, Transformation of Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex. *Theor. Appl. Gene.* 98: 252-256.
- Zhang BH (2000), Regulation of plant growth regulators on cotton somatic embryogenesis and plant regeneration. *Biochemistry* 39:156.
- Zhang B, Feng R, Liu F, Wang Q (2001) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Bot Bull Acad Sin* 42:9-16.

- Zhang TZ, Yuan YL, Yu J, Guo WZ, Kohel RJ (2003) Molecular tagging of a major QTL for fiber strength in Upland cotton and its marker-assisted selection. *Theor Appl Genet* 106:262–268
- ZHU Shuijin και JI Daofan, 2001 Effects of pigment glands and gossypol on somatic cell culture of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Chinese Science Bulletin* Vol. 46 No. 23 December 2001.
- Zouzou Michel *et al.*, 2008, Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Australian Journal of Crop Science* 2(1): 1-9 (2008), ISSN: 1835-2707 .

Internet

- <http://www.genome.clemson.edu/projects/cotton/> Clemson University Genomics Institute
- <http://r0.unctad.org/infocomm/anglais/cotton/characteristics.htm>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Okra>
- <http://www.ikisan.com>