

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

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**« ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ
ΧΑΡΤΩΝ ΣΤΟ ΒΑΜΒΑΚΙ (*GOSSYPIUM SPP*) ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΤΥΠΟΥ RAPD' S»**



ΓΑΝΟΠΟΥΛΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΜΑΥΡΟΜΑΤΗΣ

ΒΟΛΟΣ, 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4867/1

Ημερ. Εισ.: 08-08-2006

Δωρεά: Συγγραφέα

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΦΠΑΠ

2005

ΓΑΝ

Επιβλέπων Καθηγητής

Αθανάσιος Μαυρομάτης
Λέκτορας

Μέλη Συμβουλευτικής Επιτροπής

Παπαδόπουλος Νικόλαος
Επίκουρος Καθηγητής

Βέλλιος Ευάγγελος
Λέκτορας

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τον Λέκτορα της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. κ. Αθανάσιο Μαυρομάτη, επιβλέποντα στην πτυχιακή μου διατριβή για τη διδασκαλία της υπέροχης επιστήμης της γενετικής βελτίωσης των φυτών, για την ανάθεση αυτού του θέματος και την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου καθώς και για τις χρήσιμες υποδείξεις του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. κ. Νικόλαο Παπαδόπουλο Επίκουρο Καθηγητή της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τις εύστοχες υποδείξεις του, για τη βοήθειά του στην εγκατάσταση του πειράματος στον αγρό καθώς και τις εποικοδομητικές συζητήσεις αλλά και το ενδιαφέρον που έδειξε προς το πρόσωπό μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέλος της επιτροπής κ. κ. Ευάγγελο Βέλλιο Λέκτορα κ της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύ καλή συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά του στην συγγραφή της εργασίας.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον κ. Κορκόβελο Αθανάσιο για την πολύ ενδιαφέρουσα συνεργασία που είχα μαζί του κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος, για τις γόνιμες συζητήσεις και την μετάδοση της προσωπικής εμπειρίας του πάνω στο αντικείμενο της βελτίωσης των φυτών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την οικογένειά μου και τους φίλους για την αμέριστη συμπαράστασή τους.

Ευχαριστίες	3
1 Εισαγωγή	6
2 Ανασκόπηση βιβλιογραφίας	8
2.1. Ταξινόμηση και καταγωγή των ειδών βαμβακιού	8
2.2. Οικονομική σημασία του βαμβακιού.....	11
2.3 Μορφολογία και ανάπτυξη του βαμβακιού	12
2.3.1. Σπόρος.....	12
2.3.2. Ρίζα	13
2.3.3. Φύλλο.....	13
2.3.4. Βλαστός	13
2.3.5. Άνθος	14
2.3.6. Επικονίαση και Γονιμοποίηση.....	15
2.3.7. Ανάπτυξη και ωρίμανση της ίνας	15
2.3.8. Χαρακτηριστικά της ίνας.....	16
3 Η βελτίωση του βαμβακιού	17
3.1. Αξιοποίηση της αρρενοστειρότητας στην παραγωγή υβριδίων	18
3.2. Υβρίδια μεταξύ <i>G. hirsutum</i> x <i>G. barbadense</i>	19
3.3. Παραγωγή μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού	20
4 Η χρήση των μοριακών δεικτών στην βελτίωση των φυτών.....	23
4.1 Τύποι μοριακών δεικτών.....	23
4.1.1 Τεχνικές μη βασιζόμενες στην PCR	23
4.1.2 PCR τεχνικές (με τυχαίο εκκινητή)	23
4.1.3 Διαδικασία προσέγγισης	23
4.2 Μοριακοί δείκτες τύπου RAPD'S	25
4.3 Μοριακοί δείκτες τύπου RFLP'S	27
4.4 Μοριακοί δείκτες τύπου SSR'S.....	29
4.5 Εφαρμογές των μοριακών δεικτών για τη δημιουργία γενετικών χαρτών	34
4.6 Γενετική ανάλυση με τη βοήθεια μοριακών δεικτών τύπου RAPD	36
4.6.1 Εκτίμηση γενετικής συγγένειας με RAPD ανάλυση	38
4.7 Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα των RAPDs	40
5 Η σημασία των γενετικών χαρτών.....	45
5.1 Χαρτογράφηση πληθυσμών.....	46
5.2. Υπολογισμός των χιασμάτων και του ανασυνδιασμού γονιδίων.	48
5.3. Γενετικοί χάρτες στο βαμβάκι	50
6 Υλικά και Μέθοδοι	61
6.1 Γενετικό υλικό	61
6.2 Εγκατάσταση του πειράματος.....	62
6.3 Μετρήσεις και παρατηρήσεις	63
6.4 Αξιολόγηση γενοτύπων με την βοήθεια μοριακών δεικτών.....	64
6.4.1 Απομόνωση DNA	64
6.4.1.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός DNA	64
6.4.1.2 Ανάλυση κατά RAPD	64
6.5 Στατιστική ανάλυση.....	66
6.6 Μοριακή στατιστική ανάλυση	67
7 Μετρήσεις ποιοτικών χαρακτηριστικών της ίνας του βαμβακιού.....	70
7.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	70
7.2 Εκκοκισμός σύσπορου βαμβακιού	70
7.3 Μήκος και ομοιομορφία της ίνας.	70
7.4 Micronaire.....	71
7.5 Αντοχή της ίνας	72
8 Αποτελέσματα και συζήτηση.....	74

8.1	Μορφολογικά χαρακτηριστικά F ₆ φυτών.....	74
8.2	Μελέτη μορφολογικών γνωρισμάτων.....	76
8.3	Εκτίμηση της πρωιμότητας άνθησης με βάση την απόδοση στο πρώτο χέρι	78
8.4	Απόδοση των φυτών	78
8.5	Ποιοτικά χαρακτηριστικά σειρών μερικώς διειδικών υβριδίων.....	84
8.6	Αποτελέσματα μοριακών αναλύσεων.....	87
9	Συμπεράσματα	92
10	Βιβλιογραφία	93

1 Εισαγωγή

Το βαμβάκι (*Gossypium spp.*), είναι ένα από τα περισσότερο διαδεδομένα καλλιεργούμενα φυτά στον κόσμο, κατέχει περίοπτη θέση στη λίστα ενδιαφέροντος της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας. Πολλές είναι οι εργασίες που κάθε χρόνο αφιερώνονται στην έρευνα των χαρακτηριστικών αυτού του φυτού και στην αξιολόγηση του γενετικού υλικού του, προκειμένου να βελτιωθούν ή να τροποποιηθούν διάφορα από τα χαρακτηριστικά του.

Σημαντική συμβολή στη Βελτίωση του είδους, έχει η γενετική μελέτη και η δημιουργία γενετικών χαρτών. Οι γενετικοί χάρτες στο βαμβάκι αναπτύχθηκαν μετά το 1989 και επικεντρώθηκαν σε γονιδιακές θέσεις οι οποίες συνδέονται με την ποιότητα της ίνας καθώς επίσης και με την ύπαρξη κυτταροπλασματικής αρρενοστεριότητας. Ο εμπλουτισμός των χαρτών αυτών είναι αρκετά μεγάλος εξαιτίας της ανάπτυξης των μοριακών δεικτών. Με τον όρο μοριακοί δείκτες εννοούμε ορισμένες γνωστές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, ικανές να εντοπίζουν περιοχές του γονιδιώματος που συνδέονται με γονιδιακές θέσεις και εκφράζονται στον φαινότυπο. Η χρήση των μοριακών δεικτών αποδείχθηκε χρήσιμο εργαλείο που μπορεί να βοηθήσει το βελτιωτή στην πρόωμη αξιολόγηση και επιλογή επιθυμητών γενοτύπων αλλά και στον εντοπισμό περιοχών του γονιδιώματος που εκφράζουν ποσοτικά χαρακτηριστικά τα οποία δύσκολα μπορούν να μελετηθούν με βάση τη Μενδελική κληρονομηση.

Οι μοριακοί γενετικοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη ατόμων ή πληθυσμών προκειμένου να εκτιμηθεί η γενετική παραλλακτικότητα και η γενετική συγγένεια των ατόμων εντός και μεταξύ των πληθυσμών γεγονός που επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων για τη δομή των πληθυσμών, για την ομαδοποίησή τους (clustering) και τον έλεγχο της ισορροπίας Hardy-Weinberg συγκεκριμένου αριθμού γονιδιακών θέσεων (multilocus equilibrium).

Επιπλέον, όσον αφορά τη συμβολή των μοριακών δεικτών στην επιλογή "MAS" (Marker Assisted Selection), προκύπτει η δυνατότητα για επιλογή που μπορεί να βασίζεται σε έμμεσα κριτήρια, όπως η ανθεκτικότητα σε κάποια ασθένεια ή εχθρούς, η ανεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις (π.χ. ξηρασία, αλατότητα κ.α.), ή και σε ποιοτικά χαρακτηριστικά για το υπό μελέτη επιθυμητό γνώρισμα (π.χ. απόδοση). Σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτή η έμμεση επιλογή είναι επιτυχής ενώ σε άλλες παραμένει αναποτελεσματική. Τα κυριότερα μειονεκτήματα εφαρμογής τους είναι: το κόστος χρήσης τους, την ανάγκη για εξειδικευμένο προσωπικό και ο χρόνος που απαιτείται για

την ανάλυση μεγάλου αριθμού δεικτών μέχρι να διαπιστωθεί η σύνδεση τους με επιθυμητά QTL'S γονίδια. Παρόλα αυτά όμως, η συγκέντρωση πληροφοριών που προκύπτουν από τις πρόδρομες αναλύσεις μπορεί να δώσει τη δυνατότητα καλύτερης κατανόησης των μηχανισμών της φυσιολογίας και της γενετικής σχέσης με αγρονομικά χαρακτηριστικά και κατ' επέκταση να κάνει περισσότερο λειτουργική την επιλογή.

Η συμβολή των μοριακών δεικτών στην επιλογή διάφορων μονογονιδιακών κυρίως χαρακτηριστικών είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστική. Για τα αγρονομικά γνωρίσματα μεγάλης οικονομικής σημασίας η ανάλυση με μοριακούς δείκτες πρέπει να βασίζεται και σε αποτελέσματα που προέρχονται από τον αγρό και είναι επαναλήψιμα ώστε να αποφεύγεται η επίδραση του περιβάλλοντος. Έτσι η μεθοδολογία της επιλογής με μοριακούς δείκτες συμπληρώνει την κλασική βελτίωση.

Μοριακοί γενετικοί δείκτες διαφόρων τύπων είναι σήμερα διαθέσιμοι για μια ποικιλία φυτικών ειδών, συμπεριλαμβανομένου και του βαμβακιού. Η χρησιμότητά τους έχει ξεπεράσει τις ανάγκες χαρτογράφησης και γενετικής αποτύπωσης στα πλαίσια της γενετικής πληθυσμών, όπου η προσοχή επικεντρώνεται περισσότερο στις συχνότητες των αλληλομόρφων παρά στα άτομα αυτά καθ'αυτά. Η μελέτη των αλλαγών στις γονιδιακές συχνότητες που εκφράζεται με πολυμορφισμούς στο DNA ενδιαφέρει τους βελτιωτές, επειδή η παρακολούθηση των αλλαγών μπορεί να γίνει ευκολότερα, βοηθώντας έτσι την αποτελεσματική επιλογή. Η μελέτη της παραλλακτικότητας που εκφράζεται μέσω των μοριακών δεικτών, επιτρέπει τη γενετική κατάταξη των πληθυσμών δίνοντας ενδείξεις της συγγενειάς τους ενώ μπορεί ακόμη να οδηγήσει στην κατανόηση της φυλογενετικής πορείας τους καθώς και των αλλαγών που υπέστησαν κατά τη βελτίωσή τους.

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν:

1) η μελέτη των μεθόδων δημιουργίας γενετικών χαρτών με εκτενή αναφορά στο βαμβάκι

2) η γενετική ανάλυση μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού (*G. hirsutum* x *G. barbadense*) με βάση αγρονομικά χαρακτηριστικά τους, συστατικά απόδοσης και την χαρακτηριστικά ποιότητας της ίνας τους

3) η μοριακή ανάλυση με δείκτες τύπου RAPD'S για μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας τόσο μεταξύ όσο και εντός των εξεταζόμενων μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού.

2 Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

2.1. Ταξινόμηση και καταγωγή των ειδών βαμβακιού

Η αρχική χρήση του βαμβακιού από τον άνθρωπο ανάγεται στα χρόνια της προϊστορίας. Οι αρχαιότερες ενδείξεις προέρχονται από την Ινδία. Σε ανασκαφές που έγιναν σε μια περιοχή κοντά στον ποταμό Ινδό, βρέθηκαν υπολείμματα από υφάσματα και σχοινιά από βαμβάκι, που υπολογίστηκε ότι χρονολογούνται στο 3000π.Χ (Balls, 1912). Η πρώτη γραπτή μαρτυρία για το βαμβάκι βρίσκεται σε ένα πανάρχαιο βιβλίο των Ινδών, που γράφτηκε γύρω στο 1500 π.Χ.. Μερικές εκαντοταετίες αργότερα, γύρω στο 800 π.Χ., στο ιερό βιβλίο που εκτίθεται η διδασκαλία του βραχμανισμού, καθορίζεται και η εργασία εκείνων που ασχολούνταν με τον καθαρισμό και την ύφανση των βαμβακερών υφασμάτων (Fryxell 1979).

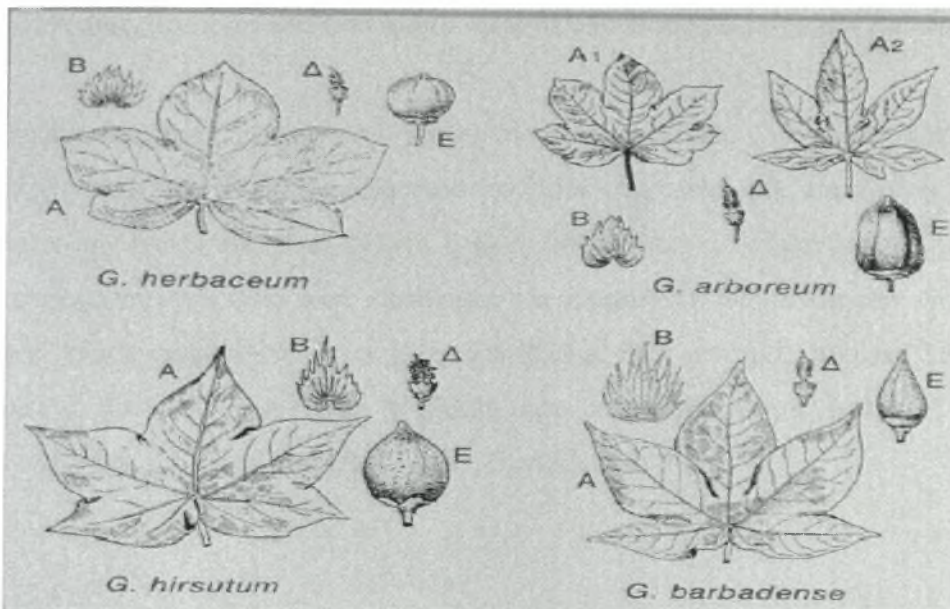
Η καλλιέργεια του βαμβακιού ήταν άγνωστη στην αρχαία Ελλάδα. Η πρώτη αναφορά έγινε από τον Ηρόδοτο (445 π.Χ.) ο οποίος αναφέρει ότι οι Ινδοί ήταν ενδεδυμένοι με “είματα από ξύλων πεποιημένα”, δηλαδή με βαμβακερά υφάσματα.

Η καλλιέργεια του βαμβακιού στην αρχαία Ελλάδα αναφέρεται για πρώτη φορά από τον Πausανία, κατά τον 2^ο π.Χ. αιώνα. Την εποχή εκείνη το βαμβάκι ήταν γνωστό με το όνομα βυσσός. Το όνομα “βαμβάκι” αναφέρεται για πρώτη φορά στη νομοθεσία του Ιουστινιανού και φαίνεται να προέρχεται από τη λέξη βόμβυξ λόγω της ομοιότητας του με το μετάξι. Κατά την εποχή του Ιουστινιανού, γύρω στο 552 μ.Χ., η καλλιέργεια του βαμβακιού κατέχει πρωτεύουσα θέση στις γεωργικές εκτάσεις της Ελληνικής Επικράτειας, καθιστώντας την έτσι ως τη μεγαλύτερη παραγωγό χώρα της εποχής εκείνης.

Το βαμβάκι ανήκει στο γένος *Gossypium* (*Gossypium spp.*) και είναι το σπουδαιότερο είδος της οικογένειας Malvaceae. Στο γένος *Gossypium*, ανήκουν 44 διπλοειδή είδη ($2n=26$), τα οποία υποδιαιρούνται σε 7 γενωμικές ομάδες (A,B,C,D,E,F,G). Υπάρχουν τρεις κυρίες ομάδες διπλοειδών ειδών ($2n=2x=26$), που προέρχονται από 3 ηπείρους: την Αυστραλία (C, G, K γενώματα), την Αμερική (D γενώματα) και την Αφρική (A,B,E και F). Επίσης υπάρχουν έξι αλλοτετραπλοειδή ($2n=52$) που φέρουν το καθένα δυο διαφορετικά γενώματα A και D. Όλα τα είδη είναι άγρια με εξαίρεση δύο διπλοειδή είδη, το *G.herbaceum* (A₁) και το *G.arboreum* (A₂), καθώς και δυο αλλοτετραπλοειδή, το *G.hirsutum* (AD)₁ και το *G.barbadense* (AD)₂ (πινακας 1) (Endrizzi et al. 1985).

Η ταξινόμηση των ειδών βασίζεται, κυρίως, στο σχετικό μέγεθος των χρωμοσωμάτων και δευτερευόντως στη μορφολογία του φυτού και στην καταγωγή του (Stephens, 1950) (Εικ. 1).

Η καταγωγή του γένους *Gossypium* έχει εντοπιστεί στην Κεντρική και Νότια Αμερική. Υποθέτοντας ότι η πρώτη διαφοροποίηση (divergence) του γένους σε διαφορετικές γενωμικές ομάδες έλαβε χώρα πριν ή κατά την διάρκεια διαχωρισμού των ηπείρων κατά την Κρητιδική περίοδο (Cretaceous period), πολλές θεωρίες έχουν αναπτυχθεί για την εξέλιξη του κάθε είδους. Παρόλο που οι απόψεις των επιστημόνων δίστανται σχετικά με τον πρωταρχικό προγονό του γένους *Gossypium*, με βάση κυττογενετικά και μοριακά δεδομένα, επικρατέστερα θεωρούνται τα είδη της γενωμικής ομάδας D ή της ομάδας B, καθώς παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιομορφία φυλογενετικών χαρακτήρων.



Εικόνα 1: Μορφολογικά χαρακτηριστικά ειδών του γένους *Gossypium*

Ο κύριος όγκος της παγκόσμιας παραγωγής (85%) αφορά το βαμβάκι αμερικανικού τύπου **upland**, που ανήκει στο είδος *Gossypium hirsutum*. (εικ. 2). Αυτό το είδος προέρχεται από την Κεντρική Αμερική και το Νότιο Μεξικό, όπου αρχικά είχε τη μορφή πολυετούς θάμνου με παρατεταμένη άνθηση. Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες μετά από βελτίωση έχουν ετήσιο χαρακτήρα, με υψηλή απόδοση, καλή ποιότητα ίνας και μήκος που κυμαίνεται από 25 έως 32 mm.



Εικόνα 2: Άνθος, βράκτια και ανθοφόρα όργανα του είδους *Gossypium hirsutum*

Τα μακρόινα βαμβάκια αιγυπτιακού τύπου, ανήκουν στο είδος *Gossypium barbadense*, και αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό ποσοστό (15%) της συνολικής παραγωγής (εικ. 3). Η ποιότητα των ινών τους είναι άριστη (μήκος 28-38 mm) με σημαντικό μειονέκτημα τον παρατεταμένο βιολογικό τους κύκλο και την κλιμακωτή ωρίμανση των ινών τους. Ορισμένοι τύποι εμφανίζουν αντοχή σε ασθένειες και έντομα, κυρίως λόγω της γκοςυπόλης που περιέχουν. Οι ποικιλίες που περιλαμβάνονται στο είδος αυτό, διακρίνονται στους εξής τύπους: Sea island, Egyptian και Pima.



Εικόνα 3: *Gossypium barbadense*

2.2. Οικονομική σημασία του βαμβακιού

Το βαμβάκι καλλιεργείται από τον άνθρωπο για πάνω από 5000 χρόνια και συνδέεται άρρηκτα με την οικονομική και πολιτισμική ανάπτυξη των χωρών, που πρώτες επιδόθηκαν στη γεωργική εκμετάλλευση αυτού του είδους (Ινδία, Αίγυπτος, περιοχές Κεντρικής και Νότιας Αμερικής)

Το βαμβάκι συνεχίζεται να καλλιεργείται σε πάρα πολλές χώρες της Γης. Η ζώνη ανάπτυξης του εκτείνεται από τον 32^ο νότιο γεωγραφικό παράλληλο μέχρι και τον 37^ο βόρειο παράλληλο. Το μεγαλύτερο όμως μέρος της παραγωγής, προέρχεται από το Βόρειο Ημισφαίριο.

Στις μέρες μας το βαμβάκι παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον από άποψη βελτίωσης, καθώς η καλλιέργεια του επηρεάζει την οικονομική ανάπτυξη και προσδιορίζει την ευημερία σε πολλές χώρες του κόσμου. Σε παγκόσμιο επίπεδο καλλιεργείται σε έκταση που ξεπερνά τα 500 εκατομμύρια στρέμματα, ενώ το 75% της παραγωγής συγκεντρώνεται σε τέσσερις μόνο χώρες: την Κίνα, τις Η.Π.Α., την Ινδία και το Πακιστάν. Το προϊόν που παράγεται στην Ελλάδα αντιπροσωπεύει περίπου το 2,5% της παγκόσμιας παραγωγής, γεγονός που την καθιστά τη μεγαλύτερη παραγωγό χώρα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Το βαμβάκι αποτελεί το μοναδικό φυτό που συνδυάζει την παραγωγή φυτικής ίνας πολλαπλών χρήσεων και σπόρου πλούσιου σε έλαιο και πρωτεΐνη. Πιο συγκεκριμένα, η ίνα του βαμβακιού αποτελεί την πρώτη ύλη για ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικής δραστηριότητας που περιλαμβάνει τα εκκοκκιστήρια, την κλωστοϋφαντουργία και τη βιομηχανία ενδυμάτων. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι αξιοποιούνται ακόμα και οι κόντες ίνες που απομένουν μετά την πρώτη εκκόκκιση του βαμβακιού (linters), για την παραγωγή βισκόζης, νιτροκυτταρίνης, χαρτιού και ιατρικού υδρόφιλου βαμβακιού. Σε ότι αφορά το τον βαμβακόσπορο, θα πρέπει να επισημανθεί οτιαποτελεί σημαντική πηγή κελουλόζης, ενώ το έλαιο του χρησιμοποιείται στη διατροφή, στην παρασκευή καλλυντικών προϊόντων και γλυκερίνης. Επίσης, το βαμβακάλευρο είναι εξαιρετική πηγή πρωτεΐνης (σε περιεκτικότητα 65%) κατάλληλη για τη διατροφή των ζώων. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί η εκμετάλλευση των βλαστών του φυτού για το ραφινάρισμα του πετρελαίου και την παρασκευή φουρφουρολών και πλαστικών (Τόλης, 1986).

2.3 Μορφολογία και ανάπτυξη του βαμβακιού

Η δυσκολία που προκύπτει από την ανάλυση της μορφολογίας του βαμβακιού οφείλεται στο ότι το φυτό αναπτύσσεται ταυτόχρονα, τόσο βλαστικά όσο και αναπαραγωγικά. Λόγω αυτής της συνήθειας, το βαμβάκι έχει την πιο συνθέτη μορφολογία από κάθε άλλο καλλιεργούμενο ετήσιο είδος (Mauney, 1984).

2.3.1. Σπόρος

Ο σπόρος του βαμβακιού έχει σχήμα ελλειψοειδές και αποτελείται από το περισπέρμιο, το έμβρυο και ελάχιστα υπολείμματα του ενδοσπερμίου. Το πιο φαρδύ και στρογγυλεμένο άκρο του ονομάζεται χάλαζα ενώ στο στενότερο, βρίσκεται η μικροπύλη, η οποία είναι το σημείο σύνδεσης του σπόρου με τον πλακούντα της ωοθήκης του 'καρυδιού'. Το επιδερμικό στρώμα του περισπερμίου φέρει δυο τύπους ινών, τις μακριές (lint) και τις κοντές (χνούδι) (Χρησιτίδης 1965). Στο εσωτερικό του σπόρο βρίσκεται το έμβρυο το οποίο συνίσταται από το ριζίδιο, την υποκοτύλη, την ελαφρά αναπτυγμένη επικοτύλη και τις αναδιπλωμένες κοτυληδόνες. Η βλαστική ικανότητα του σπόρου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, κυριότεροι των οποίων είναι η κατάσταση του εμβρύου, οι συνθήκες κατά τη συγκομιδή και διατήρηση του σπόρου, καθώς και οι

συνθήκες που επικρατούν κατά την περίοδο της βλάστησης του σπόρου, με καθοριστικότερη όλων τη θερμοκρασία του εδάφους (Χρηστιδης 1965).

2.3.2. Ρίζα

Καθώς ο σπόρος φυτρώνει, το ριζίδιο αναπτύσσεται γρήγορα ανοίγοντας δρόμο από την μικρούλη και με κατεύθυνση την κατακόρυφη διεύθυνση στο υπόστρωμα (χώμα, θρεπτικό μέσο κ.λπ.). Η ανάπτυξη της κυρίας ρίζας εμφανίζει θετικό γεωτροπισμό και μεγάλη ταχύτητα. Σε θερμοκρασία εδάφους 18° C μεγαλώνει 0,9 mm / ώρα, ενώ στους 22° C φτάνει έως και 1,25 mm / ώρα (Τόλης 1986).

Η κύρια ρίζα του βαμβακόφυτου αποτελείται περιφερειακά από το περιδερμα και το φλοιό, ενώ προς το εσωτερικό από τον ξυλώδη ιστό. Το μήκος της ρίζας μπορεί να φτάσει τα 12 cm πριν ακόμη οι κοτυληδόνες εκπτυχθούν πάνω από το έδαφος. Στη φάση αυτή αρχίζει και ο σχηματισμός των δευτερευουσών ριζιδίων.

2.3.3. Φύλλο

Ανάλογα με το είδος και την ποικιλία του βαμβακιού, τα φύλλα παρουσιάζουν χαρακτηριστικό μέγεθος, σχήμα και υφή. Τα πρόφυλλα είναι δυσδιάκριτα και συνήθως μένουν απαρατήρητα. Τα πρώτα φύλλα βρίσκονται στη βάση του στελέχους και στα σημεία κάθε κλαδίσκου και έχουν μέγεθος έως 5 mm ενώ μοιάζουν με τα βράκτια φύλλα. Τα ώριμα φύλλα αποτελούνται από το μίσχο και το έλασμα. Το έλασμα είναι πεντάλοβο και το βάθος των κόλπων εξαρτάται από το γενότυπο. Ως προς την υφή του, μπορεί να είναι λείο, όπως στο Αιγυπτιακό βαμβάκι (*G. barbadense*) ή χνουδωτό, όπως στο Αμερικανικό (*G. hirsutum*). Στην κάτω κυρίως επιφάνεια του ελάσματος υπάρχουν στομάτια, σε αναλογία 40-280 / mm², που είναι υπεύθυνα για τη λειτουργία της διαπνοής (Τόλης 1986).

2.3.4. Βλαστός

Το ύψος του κύριου στελέχους ως κληρονομικό γνώρισμα, εξαρτάται άμεσα από το είδος και το γενότυπο. Για τα καλλιεργούμενα βαμβάκια κυμαίνεται από 60-180 cm. μορφολογικά είναι κυλινδρικό με ή χωρίς χνούδι σε κανονική σπειροειδή διάταξη.

Οι κατώτεροι μασχαλιαίοι οφθαλμοί δίνουν φυλλοφόρους βλαστούς (μονοπόδια), ενώ οι πλευρικοί και οι μασχαλιαίοι που βρίσκονται προς την κορυφή του φυτού παράγουν

συνήθως ανθοφόρους βλαστούς (συμπόδια). Ο πρώτος ανθοφόρος κλαδίσκος αναπτύσσεται μετά το 5^ο-6^ο γόνατο πάνω από τις κοτυληδόνες. Με το τέλος της ανάπτυξης του, φέρει 6-8 λουλούδια από τα οποία δίνει τελικά περισσότερα από το 80% αυτών (Χρησιτίδης 1965).

2.3.5. Άνθος

Τα άνθη του βαμβακιού αποτελούνται από τα εξής μέρη: (εικ. 4)

Τα **βράκτια φύλλα**. Αυτά είναι συνήθως άνισα και μπορούν να μένουν είτε ελευθέρως (αμερικανικά βαμβάκια) είτε να είναι ενωμένα μεταξύ τους (ασιατικά).

Τον **κάλυκα**. Αυτός αποτελείται από πέντε μικρά ακανόνιστα σέπαλα, που είναι ενωμένα στη βάση του λουλουδιού.

Τη **στεφάνη**, που αποτελείται από πέντε μεγάλα πέταλα, ενωμένα μεταξύ τους. Αυτά έχουν χρώμα λευκό ή κρεμ στα αμερικανικά βαμβάκια, ενώ στις αιγυπτιακές ποικιλίες ζωηρό κίτρινο, που στη βάση τους παρουσιάζουν μια ευμεγέθη κηλίδα κόκκινου χρώματος.

Τους **στήμονες** που είναι 90-100 και αναπτύσσονται πάνω σε μια σωληνωτή θήκη η οποία περιβάλλει εντελώς το στύλο, εκτός από το τμήμα του στίγματος. Οι ανθηρές είναι δίχωροι και όταν ανοίξουν ελευθερώνουν μεγάλους γυρεόκοκκους με αγκάθια στην επιφάνεια.

Τον **ύπερο**, μια μικρή κωνική πολύχωρη ωοθήκη, το **στύλο** και το **στίγμα**. Ο ύπερος αποτελείται από τόσα καρπόφυλλα, όσοι είναι οι χώροι της ωοθήκης. Στο είδος *G. barbadense*, οι χώροι είναι τρεις (κάποτε και δυο), ενώ στο *G. hirsutum*, 4-5 (σπανιότερα τρεις, κάποτε όμως και έξι) (Τόλης 1986).



Εικόνα 4. Άνθη με ή χωρίς κηλίδα στη βάση των πετάλων
(διασταυρώσεις *G. hirsutum* x *G. barbadense*)

2.3.6. Επικονίαση και Γονιμοποίηση

Κατά την άνθιση, η ώριμη γύρη μεταφέρεται στο στίγμα, βλαστάνει και ο γυρεόκοκκος αρχίζει να αναπτύσσεται, εκπτύσσοντας μια σωληνοειδή προβολή με κατεύθυνση το βάθος της ωοθήκης. Η ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα διαρκεί 12-30 ώρες, μετά το πέρας των οποίων γίνεται η συνάντηση με τη σπερμοβλάστη και έτσι επιτελείται η γονιμοποίηση. Την επόμενη ημέρα από τη γονιμοποίηση, σχηματίζεται το μικρό “καρύδι”, η στεφάνη του άνθους πέφτει και αρχίζει η φάση της ανάπτυξης του “καρυδιού” (Μαυρομάτης, 1996).

2.3.7. Ανάπτυξη και ωρίμανση της ίνας

Η διεύρυνση των σπερμοβλαστών και η επιμήκυνση των επιδερμικών τους κυττάρων, που οδηγούν στο σχηματισμό της ίνας, ακολουθούν παράλληλη πορεία με την ανάπτυξη του “καρυδιού”. Ο ρυθμός επιμήκυνσης είναι ταχύτερος έως και την 9^η ημέρα μετά την άνθιση, ενώ διακόπτεται την 30^η ημέρα μετά την άνθιση. Τα επιδερμικά τριχίδια των σπερμοβλαστών που οδηγούν στην αναπαραγωγή ίνας, επιμηκύνονται σε γραμμική αναλογία για περίπου 20 ημέρες και αποκτούν τελικό μήκος 25-35 mm, εξαρτημένο από το γενότυπο και τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Η πάχυνση της ίνας γίνεται με την εναπόθεση κυτταρίνης σε ομοκεντρικά στρωματά

και αρχίζει μετά την ολοκλήρωση της κατά μήκος αύξησης της ίνας. Η δευτερογενής λέπτυνση της ίνας ξεκινάει 16-19 ημέρες μετά την άνθηση και συνεχίζεται μέχρι την τελική της ωρίμανση, όποτε και χάνει υγρασία αποκτώντας και χαρακτηριστική περιέλιξη (Μαυρομάτης, 1996)

2.3.8. Χαρακτηριστικά της ίνας

Το βαμβάκι καλλιεργείται κυρίως για τις εμπορικές χρήσεις της ίνας του. Επειδή υπάρχει ανταγωνισμός από τις συνθετικές ίνες, οι τεχνολόγοι επιμένουν στη βελτίωση των ιδιοτήτων που καθορίζουν την ποιότητα της ίνας, οι οποίες και παρουσιάζονται παρακάτω:

Μήκος. Το μήκος είναι το φυσιολογικό μάκρος ενός τυπικού μέρους των ινών από ένα δείγμα βαμβακιού και εκφράζεται συνήθως σε mm. Από όλα τα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την ποιότητα, το μήκος της ίνας είναι εκείνο που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την αξία του προϊόντος. Οι διαφορές που παρουσιάζει το γνώρισμα αυτό μεταξύ των διαφόρων ειδών και ποικιλιών είναι σημαντικές. Αυτές μπορούν να αποδοθούν σε γενετικούς λόγους, αλλά και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Schubert, 1975).

Αντοχή. Η αντοχή της ίνας σχετίζεται με την επιφάνεια που παρουσιάζουν σε τομή τα κυτταρικά τοιχώματα. Το μήκος της ίνας φαίνεται να επιδρά στην αντοχή, καθώς τα δυο γνώρισμα συνδέονται με μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση. Η αντοχή είναι ένας χαρακτήρας κληρονομικός που επηρεάζεται και από το περιβάλλον (Hseih *et al.*, 1994).

Λεπτότητα. Το σπρουδαίο αυτό γνώρισμα σχετίζεται με τη διάμετρο της ίνας και το πάχος των τοιχωμάτων. Ίνες με κανονική πάχυνση, είναι ανώτερες σε ποιότητα σε σχέση με όσες έχουν παραμείνει χωρίς δευτερογενή εναπόθεση και φαίνονται λεπτές. Το γνώρισμα επίσης ελέγχεται από ρολλά γονίδια και εμφανίζει διακύμανση ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Schubert *et al.* 1973).

Ωριμότητα. Η πάχυνση της ίνας πραγματοποιείται κατά ομόκεντρα στρώματα. Ο αριθμός των στρωμάτων ταυτίζεται με αυτόν των ημερών που διαρκεί η πάχυνση (25-40 ημέρες). Όλες οι ίνες του βαμβακιού δεν είναι το ίδιο ώριμες. Για διάφορους γενετικούς και οικολογικούς λόγους, οι ίνες είναι δυνατό να μείνουν με τα αρχικά στρώματα κυτταρίνης. Τέτοιες ίνες είναι νεκρές και συμβάλλουν στο σχηματισμό κόμπων (pups) του νήματος. Ένα ποιοτικό βαμβάκι έχει πάνω από 65% κανονικές ίνες και λιγότερο από 10% νεκρές (Χρησιτίδης 1965).

Σημαντική γενετική παραλλακτικότητα έχει παρατηρηθεί για τα περισσότερα γνωρίσματα της ίνας, γεγονός που καθιστά δυνατή τη μεταχείριση τους με συμβατικές μεθόδους βελτίωσης (Meredith *et al.* 1996).

3 Η βελτίωση του βαμβακιού

Οι συστηματικές προσπάθειες βελτίωσης του βαμβακιού και η έναρξη εφαρμογής των κλασσικών μεθόδων στο είδος αυτό, έγιναν στις αρχές του αιώνα που διανύουμε με αφορμή την εμφάνιση του εντόμου *Anthonomus grandis* (Niles & Feaster 1984). Έτσι με σκοπό την προστασία του φυτού από το έντομο που αφάνιζε κυριολεκτικά την παραγωγή βαμβακιού στις Ν.Α. πολιτείες των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, επιχειρήθηκε αναδόμηση του φυτού. Με κύριο στόχο την αύξηση της πρωιμότητας (άνθησης και ωρίμανσης) και έτσι τον αποσυγχρονισμό από το βιολογικό κύκλο του εντόμου και παράλληλα τη διατήρηση της παραγωγικότητας και της ποιότητας της ίνας σε αποδεκτά επίπεδα, ελήφθησαν τα πρώτα αποτελέσματα με τις ποικιλίες τύπου Acala (Μαυρομάτης, 1996).

Οι ισχυρές εντάσεις επιλογής που εφαρμόστηκαν τα επόμενα χρόνια με τις μεθόδους της κλασσικής βελτίωσης είχαν κυρίως θετικά αλλά και ορισμένα αρνητικά αποτελέσματα στη συμπεριφορά του φυτού.

Ως θετικά αποτελέσματα χαρακτηρίζονται (Μαυρομάτης, 1996)

- Η γρήγορη βλάστηση των σπορών και το χάσιμο του λήθαργου,
- Η μείωση στο μέγεθος του φυτού και αλλαγές στις συνήθειες του, όπως η διαφοροποίηση ανθέων και ο ετήσιος χαρακτήρας του,
- Η αύξηση της παραγωγικότητας, με συνδυασμό του μεγέθους και του αριθμού των "καρυδιών" ανά φυτό αλλά και της ποσότητας των ινών ανά σπόρο,

Ως αρνητικά σίγουρα θεωρούνται

- Ο περιορισμός του διαθέσιμου αποθέματος γενετικού υλικού,
- Οι υπερβολικές απαιτήσεις των καλλιεργούμενων γενοτύπων σε λίπανση και νερό,
- Η ευαισθησία των ποικιλιών βαμβακιού στις προσβολές από εχθρούς και ασθένειες με άμεση συνέπεια την επιφόρτιση της καλλιέργειας και του περιβάλλοντος με φυτοφάρμακα,

Οι βασικές επιδιώξεις στη βελτίωση του βαμβακιού από την αρχή της βελτίωσής του μέχρι σήμερα, δεν άλλαξαν ριζικά. Εξακολουθούν και παραμένουν στην πρώτη σειρά ενδιαφέροντος :

1. η αύξηση της παραγωγικότητας και άρα της συνολικής απόδοσης,
2. η βελτίωση της ποιότητας της ίνας (μήκος, ισχύς, ομοιομορφία),
3. η συγκεντρωμένη καρποφορία σε κοντόσωμα κυρίως φυτά,
4. η πρωιμότητα άνθησης και η ταυτόχρονη ωρίμανση ,
5. η αύξηση του δυναμικού των φυτών για καλύτερη αξιοποίηση των εδαφικών πόρων

Στις μέρες μας, η παράλληλη δράση της κλασσικής βελτίωσης με την πολλά υποσχόμενη εφαρμοσμένη βιοτεχνολογία, δημιουργούν νέες τάσεις που συγχρονίζονται με τις απαιτήσεις των καιρών, τα σύγχρονα συστήματα εκμετάλλευσης και προπαρασκευάζει τις μελλοντικές μας ανάγκες και προοπτικές.

Συγκεκριμένα η σύγχρονη βελτιωτική πρακτική, εκτός των ήδη αναφερόμενων (Μαυρομάτης, 1996) στρέφεται στην:

- I. Μείωση των εισροών (αφού το βαμβάκι δέχεται τις περισσότερες χημικές επεμβάσεις από όλα τα καλλιεργούμενα είδη) και επέκταση της καλλιέργειας του οικολογικού βαμβακιού
- II. Ανάπτυξη αντοχής στις συνθήκες καταπόνησης (ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίες, άλατα, βαρέα μέταλλα) με αξιοποίηση τόσο των *in vivo* όσο και των *in vitro* συνθηκών.
- III. Βελτίωση της ποιότητας του σπόρου
- IV. Αναβάθμιση της ποιότητας του βαμβακέλαιου
- V. Αξιοποίηση των φυσικά χρωματισμένων ινών (έγχρωμο βαμβάκι)
- VI. Τροποποίηση των βλαστικών τμημάτων του φυτού με σκοπό την αξιοποίηση τους από τη βιομηχανία

3.1. Αξιοποίηση της αρρενοστειρότητας στην παραγωγή υβριδίων

Έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια στο βαμβάκι για να βρεθούν πηγές αρρενοστειρότητας που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία υβριδίων. Μέχρι τώρα έχουν αναγνωρισθεί αρκετά γονίδια αρρενοστειροτητας. Υπάρχει ένα υπολειπόμενο γονίδιο αρρενοστειρότητας, το ms_2 που δίνει συνήθως

πλήρη στειρότητα. Από τα άλλα γονίδια αρρενοστειρότητας, τουλάχιστον δυο δίνουν μερική στειρότητα, τρία είναι κυρίαρχα και σε μια περίπτωση χρειάζονται δυο υπολειπόμενα αλληλόμορφα σε ομοζυγωτική κατάσταση για την πλήρη στειρότητα. Τα υπολειπόμενα γονίδια αρρενοστειρότητας θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διευκόλυνση της σταυρεπικονίασης σε προγράμματα που βασίζονται στην Βελτίωση πληθυσμών αν και αυτό δεν κρίνεται και πολύ απαραίτητο αφού στο βαμβάκι η φυσική σταυρεπικονίαση παρατηρείται έτσι και αλλιώς (σημαντικό ποσοστό 5-40 %).

Κυτταροπλασματικά αρρενόστειρο βαμβάκι έχει παραχθεί με τη μεταφορά χρωμοσωμάτων από το είδος *G. harknessii* στο είδος *G. hirsutum*. Το υπάρχον επανορθωτικό γονίδιο όμως δεν επαναφέρει πάντα τη γονιμότητα στον επιθυμητό βαθμό στις εμπορικές ποικιλίες τύπου upland. Η γονιμότητα μπορεί να αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό με την ενδιάμεση μεταφορά ενός γονιδίου από την ποικιλία Pima-s. Η επάρκεια του συστήματος αυτού, δηλαδή κυτταροπλασματική αρρενοστειρότητα και επανορθωτικά γονίδια, για την παραγωγή υβριδίων στο βαμβάκι, θα προσδιοριστεί μόνο μετά από πειράματα υπό συνθήκες αγρού επί αρκετά χρόνια σε μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλόντων (Soltis, D. E., 1999).

3.2. Υβρίδια μεταξύ *G. hirsutum* x *G. barbadense*

Ο συνδυασμός των επιθυμητών χαρακτήρων από τα δυο είδη βαμβακιού *G. hirsutum* και *G. barbadense* σε έναν απόγονο, θα αποτελέσει μια υπέρβαση, σταθμό στη βελτίωση του βαμβακιού, τόσο στην εξέλιξη όσο και στην προοπτική του ως καλλιεργούμενο είδος. Η υψηλή απόδοση θα συνδυαστεί με την εξαιρετική ποιότητα ίνας και την αντοχή σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, με όλες τις θετικές συνέπειες στην παραγωγή και τη βιομηχανία (Mavromatis and Rousakias, 1993).

Τα είδη *G. hirsutum* και *G. barbadense* διασταυρώνονται εύκολα μεταξύ τους, εξαιτίας του κοινού (Α-γενώματος και των παραπλήσιων D₁ και D₂ γενωμάτων που φέρουν, με αποτέλεσμα την παραγωγή γονίμων και εύρωστων F₁ υβριδίων (Kohe κ.ά 1974). Αυτά φέρουν μεγάλη αναλογία σπόρου και ίνας, υψηλό lint, μέτρια προσαρμοστικότητα και εξαιρετική αντοχή σε μυκητολογικές και εντομολογικές προσβολές (Niles & Feaster, 1984). Επιχειρώντας όμως τη σταθεροποίηση των παραπάνω γνωρισμάτων με την εφαρμογή αυτογονιμοποιήσεων, παρουσιάζεται το πρόβλημα του ισχυρού υβριδικού εκφυλισμού που οδηγεί σε μια τάση διατήρησης της ατομικότητας του ενός ή του άλλου

είδους με το πέρας των γενεών. Οι τεχνικές της κλασικής βελτίωσης δεν κατόρθωσαν μέχρι σήμερα να αντιμετωπίσουν το συγκεκριμένο πρόβλημα, ενώ η επιθυμία για βελτίωση του είδους με τη δημιουργία σταθεροποιημένων ομοζύγων σειρών που θα συνδυάζουν τους επιθυμητούς χαρακτήρες των δυο ειδών (μερικώς ειδικά υβρίδια), αναμένεται να ικανοποιηθεί με την εφαρμογή βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων (Mavromatis & Rousakis, 1993).

Η καλλιέργεια διειδικών F₁ υβριδίων, δοκιμάστηκε στην Αμερική με θετικά αποτελέσματα, αφού εμφανίστηκαν ετερωτικές επιδράσεις σε χρήσιμους αγρονομικούς χαρακτήρες, όπως η απόδοση που ξεπέρασε το 40% σε σχέση με τους γονείς. Η ανάπτυξη και η επέκταση της καλλιέργειας τους όμως, κρίθηκε ασύμφορη οικονομικά λόγω των εκτεταμένων προγραμμάτων παραγωγής υβριδίων που θα πρέπει να εφαρμοσθούν. Βέβαια, σε χώρες με φθηνά εργατικά και διαθέσιμα χέρια, όπως η Ινδία, καλλιεργούνται σήμερα, 250.000 εκτάρια υβριδίων βαμβακιού ετησίως, τα περισσότερα των οποίων είναι μεταξύ *G. hirsutum* και *G. barbadense* (Lee *et al.*, 1984). Οι σπόροι των F₁ υβριδίων παράγονται μετά από διασταυρώσεις που γίνονται με το χέρι, χρησιμοποιώντας παράλληλα το υποτελές χαρακτηριστικό της αρρενοστειρότητας στους θηλυκούς γονείς. Το σύστημα φυσικά κρίνεται ασύμφορο για την ανακρίβεια των διασταυρώσεων που παρέχει και την μη χρησιμοποίηση των ¾ των φυτών που αποτελούν τους γονείς της διασταύρωσης (Lee κ.ά 1984). Ένα γεγονός που συνεπάγεται υψηλότερο κόστος ιδιαίτερα δυσβάσταχτο ακόμη και για τις αναπτυγμένες γεωργικά χώρες που ασχολούνται με την καλλιέργεια του βαμβακιού.

3.3. Παραγωγή μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού

Η αποτυχία της κλασικής μεθοδολογίας να απομονώσει ομοζύγωτα φυτά βαμβακιού που να συνδυάζουν τις καλές ιδιότητες του *Gossypium barbadense* με αυτές του *Gossypium hirsutum*, οδήγησε τους ερευνητές στην αναζήτηση εναλλακτικών προτάσεων για λύση του προβλήματος. Συγκεκριμένα, προτάθηκε η δημιουργία των μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού με κυτταρογενετικές μεθόδους (White *et al.* 1967, Endrizzi & Ramsay, 1979).

Η αποτυχία της παραγωγής τους, όπως προτάθηκε από τους White *et al.* (1967), οδήγησε τους Mavromatis & Rousakis (1994) να προτείνουν την παραγωγή μερικώς διειδικών υβριδίων δημιουργώντας ομοζύγωτα φυτά και από τα δύο είδη, που φέρουν στον πυρήνα τους μη ομόλογα χρωμοσώματα ή χρωμοσωμικά τμήματα τόσο από το *G. hirsutum* όσο και από το *G. barbadense*. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί σήμερα εάν

αναπτυχθεί μια τεχνική παραγωγής απλοειδών φυτών από την F_1 γενεά. Τα χρωμοσώματα ενός γαμέτη της F_1 γενεάς (*G. hirsutum* x *G. barbadense*) θα αποτελούνται από χρωμοσωμικά τμήματα του *G. hirsutum* και του *G. barbadense*, ανάλογα με το ποσοστό ανταλλαγής που θα λαμβάνει χώρα στο κάθε μητρικό κύτταρο γυρεόκοκκων. Παραγωγή απλοειδών φυτών από τέτοιους γαμέτες και διπλασιασμός του αριθμού των χρωμοσωμάτων θα οδηγούσε στην παραγωγή καθαρών σειρών μερικώς διειδικών υβριδίων. Έτσι η παραγωγή των διαπλοειδών φυτών σε μεγάλους αριθμούς πιθανόν να οδηγήσει στην απομόνωση φυτών, που θα συνδυάζουν τα καλά χαρακτηριστικά των δυο ειδών. Επιπλέον, η ανάπτυξη τέτοιου συστήματος, θα επέτρεπε την ταχύτερη παραγωγή ενδοειδικών καθαρών σειρών και επομένως την σταθεροποίηση της ετέρωσης που υπάρχει σε πολλές F_1 ενδοειδικές διασταυρώσεις (Roupakias *et al*, 1995).

Ποικίλες μέθοδοι ακολουθήθηκαν για την παραγωγή μερικώς διειδικών υβριδίων στο βαμβάκι. Αρχικά, η απομόνωση των μονοσωμικών του βαμβακιού (Endrizzi & Ramsay 1979) και η δυνατότητα παραγωγής σειρών αντικατάστασης, που δημιούργησαν τις προϋποθέσεις για την αναγνώριση των χρωμοσωμάτων τα οποία φέρουν τα γονίδια που ελέγχουν τους επιθυμητούς χαρακτήρες των δυο ειδών. Η προσπάθεια να δομηθούν οι σειρές αντικατάστασης δυο ποικιλιών ('' Σίνδος 80'', ποικιλία *G. hirsutum* και ''Pima S4'', ποικιλία *G. barbadense*) δεν απέδωσε, καθώς οι μονοσωμικοί φαινότυποι δεν ήταν εμφανείς, όταν οι διαφορετικές σειρές επαναδιασταυρώθηκαν για αρκετές γενεές με τις αρχικές ποικιλίες (Roupakias & Galanopoulou-Sendouka, 1988).

Επίσης επιχειρήθηκε η παραγωγή μερικώς διειδικών υβριδίων με τη βοήθεια των ημιγαμετικών σειρών. Τα ημιγαμετικά φυτά είναι το αποτέλεσμα της μη ομαλής διαδικασίας γονιμοποίησης, κατά την οποία ο αρσενικός και ο θηλυκός γαμέτης αποτυγχάνουν να ενωθούν. Τελικά, το ωάριο και ο σπερματικός πυρήνας διαιρούνται ανεξάρτητα και καταλήγουν να δώσουν έναν απλοειδή χμαιρικό ιστό (Turcotte & Feaster 1967, 1969). Η διασταύρωση ημιγαμετικών φυτών με γύρη διειδικών F_1 υβριδίων βαμβακιού (*G. hirsutum* x *G. barbadense*), με στόχο την παραγωγή μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού έδωσε μικρό αριθμό φυτών. Για το λόγο αυτό η μέθοδος εγκαταλείφθηκε ως αναποτελεσματική και μη συμφέρουσα.

Στην προσπάθεια δημιουργίας μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού επιστρατεύτηκαν και βιοτεχνολογικές μέθοδοι. Ειδικότερα, εφαρμόστηκε η *in vitro* καλλιέργεια ανθέρων και αγονιμοποίητων σπερμοβλαστών. Συγκεκριμένα, η καλλιέργεια ανθέρων διενεργήθηκε για πρώτη φορά στο βαμβάκι από τους Barrow *et al*.

(1978). Η προσπάθεια αυτή αφορούσε την καλλιέργεια ανθέρων από δυο γενότυπους των ειδών *G. hirsutum* και *G. barbadense*, που είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κάλου, χωρίς να υπάρχει δυνατότητα αναγέννησης φυτών.

Η δυνατότητα παραγωγής φυτών, που προέρχονται από την καλλιέργεια ανθέρων της F_1 γενεάς (*G. hirsutum* x *G. barbadense*), θα έδινε φυτά που να συνδυάζουν στο απλοειδές επίπεδο τα χαρακτηριστικά των δυο ειδών. Έτσι, γρήγορα και αποτελεσματικά θα ήταν δυνατή η παραγωγή σειρών βαμβακιού με την υψηλή παραγωγικότητα και πρωιμότητα του *G. hirsutum*, καθώς και την άριστη ποιότητα ίνας και αντοχή σε προσβολές του *G. barbadense*, ξεπερνώντας το φαινόμενο του εκφυλισμού που εμφανίζεται σε προχωρημένες γενεές (Mavromatis & Roupakias, 1993). Αντίθετα όμως από τη συμπεριφορά άλλων ειδών, όπως του σιταριού (Laurie & Bennet 1988) και του κρεμμυδιού (Smith *et al.*, 1991) που στην καλλιέργεια ανθέρων παρουσίασαν υψηλή εμβρυογενετική ικανότητα, το βαμβάκι εμφάνισε χαμηλά ποσοστά εμβρυόμορφων κατασκευών (0.1-0.6%), χωρίς καμία εκδήλωση διαφοροποίησης (Mavromatis, 1996).

Επίσης, παραγωγή απλοειδών επιχειρήθηκε και μέσω της καλλιέργειας αγωνιμοποίητων σπερμοβλαστών (Beasley & Ting 1973) και μικροσπορίων (Tuarev & Shamina 1993). Η εφαρμογή της καλλιέργειας ωαρίων από φυτά της F_1 γενεάς (*G. hirsutum* x *G. barbadense*) οδήγησε σε αδιέξοδο, καθώς προέκυψαν εμβρυόμορφες κατασκευές που δεν βλάστησαν (Βλαχοστέργιος 1997).

Ως διέξοδος διαφάνηκε η εργασία των Zhou Shi-Qui *et al.* (1991), οι οποίοι επικονίασαν άνθη βαμβακιού με γύρη προερχόμενη από το είδος *Hibiscus cannabinus* και κατόρθωσαν την *in situ* παραγωγή ώριμων σπόρων. Κυτταρολογική μελέτη των παραγόμενων φυτών, που προέκυψαν από αυτούς τους σπόρους, έδειξε ότι ο αριθμός των χρωμοσωμάτων αυτών κυμαινόταν από 24-49. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές αναφέρουν ότι τα φυτά αυτά ήταν μερικώς γόνιμα, αλλά κανένα από αυτά δεν είχε 52 χρωμοσώματα.

Τα τελευταία χρόνια οι Mavromatis *et al.* (1998) προσπάθησαν να αναπτύξουν ένα σύστημα παραγωγής μερικώς διειδικών φυτών στο βαμβάκι, που να προέρχονται από την επικονίαση των υβριδίων *G. hirsutum* x *G. barbadense* με γύρη, κυρίως από τα είδη *Hibiscus cannabinus* και *Abelmoschus esculentum*. Οι εργασίες αυτές είχαν ως αποτέλεσμα να προκύψουν τέσσερα φυτά μετά από επικονίαση ανθέων διειδικων υβριδίων βαμβακιού με γύρη του *Hibiscus cannabinus* και ένα γόνιμο φυτό μετά από επικονίαση ανθέων διειδικών υβριδίων βαμβακιού με γύρη του *Abelmoschus esculentum*.

4 Η χρήση των μοριακών δεικτών στην βελτίωση των φυτών

4.1 Τύποι μοριακών δεικτών

Για την ανίχνευση πολυμορφισμών σε επίπεδο DNA έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές και η επιλογή της κατάλληλης κάθε φορά, αποτελεί για το συγκεκριμένο πρόγραμμα ουσιαστικά το πρώτο από τα προβλήματα που καλείται να λύσει ο ερευνητής. Στην πραγματικότητα, υπάρχουν τρεις κατηγορίες στις οποίες κατατάσσεται κάθε τεχνική: α) προσεγγίσεις που δεν βασίζονται στην PCR, β) μέθοδοι βασιζόμενοι στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) γ) συνδιασμός RT-PCR συγκεκριμένου στόχου και αλληλούχηση.)

4.1.1 Τεχνικές μη βασιζόμενες στην PCR

Στην κατηγορία αυτή ανήκει η RFLP ανάλυση (Restriction Fragment Length Polymorphism) που αποτελεί και την πρώτη τεχνολογία που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση των πολυμορφισμών σε επίπεδο αλληλουχίας DNA. Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει τεμαχισμό του DNA με περιοριστικά ένζυμα, διαχωρισμό των τμημάτων DNA που προκύπτουν με πηκτή ηλεκτροφόρησης, διαχωρισμό των τμημάτων σε μεμβράνη και υβριδισμό ανιχνευτών στα ξεχωρισμένα τμήματα.

4.1.2 PCR τεχνικές (με τυχαίο εκκινητή)

4.1.3 Διαδικασία προσέγγισης

Η ανάλυση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεοτιδίων, όπως πολλές αναλυτικές διαδικασίες, συχνά εμποδίζεται από την παρουσία ξένων υλών ή από την υπερβολικά μικρή ποσότητα υλικού που είναι διαθέσιμα για εξέταση. Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) ξεπερνά αυτά τα εμπόδια. Η τεχνική αυτή είναι ικανή να εμπλουτίσει επιλεκτικά μια συγκεκριμένη DNA αλληλουχία έως 10^6 φορές, διευκολύνοντας σημαντικά τον επακόλουθο αναλυτικό χειρισμό.

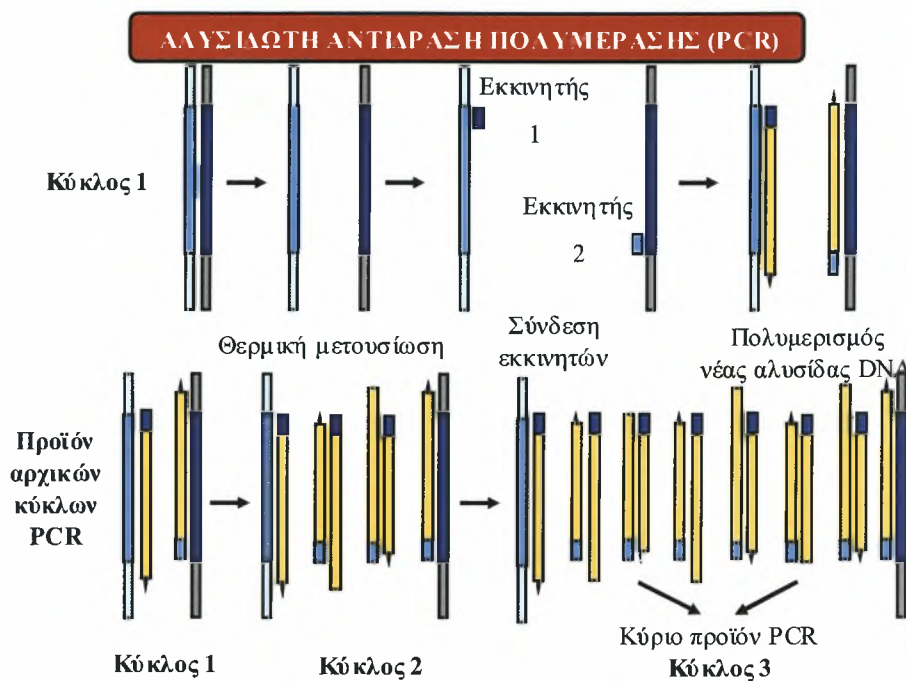
Η ενίσχυση με PCR περιλαμβάνει δύο ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές οι οποίοι προσεγγίζουν το τμήμα του DNA που θα ενισχυθεί και μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους θέρμανσης του μίγματος, οι δύο αλυσίδες του DNA ανοίγουν και χωρίζουν η μία από την άλλη (στάδιο denaturation). Ακολουθεί ο υβριδισμός του εκκινητή στις συμπληρωματικές αλληλουχίες (στάδιο annealing) και η προσθήκη τριφωσφορικών

δεοξυριβονουκλεοτιδίων, μέσω του ενζύμου Taq Polymerase στο 3' άκρο των εκκινητών χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο της ανοιγμένες αλυσίδες του DNA (στάδιο extension). Αφού τα προϊόντα ης επέκτασης είναι επίσης συμπληρωματικά των εκκινητών και μπορούν να τους δεσμεύουν, κάθε επιτυχημένος κύκλος ουσιαστικά διπλασιάζει το ποσό του DNA που συντέθηκε στον προηγούμενο κύκλο. Το γεγονός αυτό καταλήγει στην εκθετική συσσώρευση του συγκεκριμένου τμήματος-στόχου, περίπου 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων.

Με την εμφάνιση της PCR έγινε διαθέσιμη μια σειρά τεχνικών για αξιολόγηση της γενετικής παραλλακτικότητας. Αυτές δεν απαιτούν προηγούμενη γνώση των αλληλουχιών και γ'αυτό μπορούν να εφαρμοσθούν απευθείας σε οποιοδήποτε οργανισμό. Βασίζονται στη χρήση ενός τυχαίου εκκινητή ο οποίος μέσω μιας αντίδρασης PCR μπορεί να "τρέξει" το γενωμικό DNA ενός οργανισμού. Στην αντίδραση αυτή, ο εκκινητής συνδέεται με το γενωμικό DNA σε δύο διαφορετικές θέσεις στις συμπληρωματικές αλυσίδες του πρότυπου DNA. Αν οι δύο αυτές θέσεις βρίσκονται αρκετά κοντά μεταξύ τους, παράγεται ένα διακριτό προϊόν διαμέσου θερμοκυκλικής ενίσχυσης (Karp & Edwards, 1995)

Οι Weeden et al. (1992) αναφέρουν ως κατάλληλες συνθήκες για την αντίδραση της PCR, τους 94°C για 1 min, 2 min στους 35°C και 2 min στους 72°C. Μετά από 35 κύκλους για 8 min στους 72°C πριν την ψύξη στους 5°C. Οι τυπικές συνθήκες αντίδρασης και οι παράμετροι του κύκλου φαίνεται να είναι οι κατάλληλες για ένα μεγάλο εύρος φυτών (Weeden et al., 1992).

Ένας αριθμός παρόμοιων τεχνικών που βασίζονται στην αρχή αυτή, αναπτύχθηκε την ίδια εποχή και συνολικά αναφέρονται ως MAAP (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling). Στην πιο κοινή προσέγγιση χρησιμοποιούνται εκκινητές 10 ως 20 βάσεων και τα προϊόντα ενίσχυσης διαχωρίζονται σε πηκτή αγαρόζης παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και παρουσιάζονται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Δυο παρόμοιες τεχνικές AP-PCR (Arbitrary Primed PCR) και DAF (DNA Amplification Fingerprinting) διαφέρουν από την προηγούμενη προσέγγιση κυρίως στο μήκος του εκκινητή, στην αυστηρότητα με τη οποία τηρούνται οι συνθήκες και τη μέθοδο διαχωρισμού και ανίχνευσης των τμημάτων του DNA. Σε όλες τις περιπτώσεις οι πολυμορφισμοί ανιχνεύονται ως παρουσία ή απουσία ζωνών στην ηλεκτροφόρηση που προκαλούνται από διαφορές στην αλληλουχία στη μία ή και στις δύο θέσεις σύνδεσης του εκκινητή (Karp & Edwards, 1995).



Σχήμα 1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

4.2 Μοριακοί δείκτες τύπου RAPD'S

Η τεχνολογία της RAPD'S κέρδισε γρήγορα την αποδοχή και την εφαρμογή γιατί αποτελεί ένα εργαλείο γενετικής ανάλυσης των βιολογικών συστημάτων που προηγουμένως δεν ήταν δυνατόν να μελετηθούν με τη χρήση των μοριακών δεικτών. Βέβαια εξαιτίας της στοχαστικής φύσης της ενίσχυσης του DNA με τυχαίους εκκινητές αλληλουχιών, είναι σημαντικό να διατηρηθούν σταθερές οι συνθήκες αντίδρασης που έχουν βελτιστοποιηθεί για την ενίσχυση του αναπαραγωγικού DNA. Αρκετοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης του πρότυπου DNA, της συγκέντρωσης μαγνησίου, της θερμοκρασίας annealing (αναδόμηση) του εκκινητή, του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του εκκινητή επηρεάζουν την αντίδραση και θα πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά (Tingey *et al.*, 1992).

Η συγκέντρωση του DNA είναι μια παράμετρος που εμφανίζει δυσκολίες στην εκτίμηση, ιδιαίτερα όταν η εργασία γίνεται με μικρές ποσότητες φυτικών ιστών. Σχεδόν ίδιοι RAPD φαινότυποι παρατηρήθηκαν για ποσότητες DNA-εκμαγείου ανάμεσα σε 3-30 ng. Στα όρια αυτά οι συγκεντρώσεις του εκκινητή που δίνουν επαναλήψιμα αποτελέσματα κυμάνθηκαν μεταξύ 0.2-1.0 μM. Μικρότερες συγκεντρώσεις τείνουν να ενισχύουν μεγαλύτερα τμήματα (1500-3000 bp). Τα τμήματα αυτά εξαφανίζονται όταν αυξάνεται η συγκέντρωση των εκκινητών και συχνά αντικαθίστανται από πολύ

4.3 Μοριακοί δείκτες τύπου RFLP'S

Μια άλλη μοριακή προσέγγιση η οποία σχεδιάστηκε για την αναγνώριση γενετικών δεικτών συνδεδεμένων με συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος περιέγραψαν οι Arnheim et al. (1985). Η τεχνική αυτή επιτρέπει τη στόχευση RFLP δεικτών σε μια περιοχή του γενώματος που δεν βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας λόγω εφαρμοζόμενης επιλογής σε μια γονιδιακή θέση της περιοχής αυτής. Η στρατηγική απαιτεί την εξαγωγή γενωμικού DNA από άτομα γενετικά τροποποιημένα (genetically fixed) στη συγκεκριμένη γονιδιακή θέση. Οι δείκτες που συνδέονται με τη θέση αυτή αναγνωρίζονται από την ανισορροπία σύνδεσης στην οποία βρίσκονται σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό. Οι περιορισμοί της προσέγγισης αυτής είναι ότι βασίζονται σε RFLP τεχνολογία, που είναι σχετικά αναποτελεσματική όσον αφορά την αναγνώριση πολυμορφικών περιοχών σε ένα γένωμα, πάντα με την προϋπόθεση ότι υπάρχει ανισορροπία σύνδεσης κοντά στη θέση που ενδιαφέρει μέσα σε έναν πληθυσμό-πηγή.

Πρόσφατα οι Michelmore et al. (1991) περιέγραψαν μια μέθοδο που καλείται BSA (Bulk Segregant Analysis) και βασίζεται στη μελέτη δείγματος DNA που εξήχθη από ομάδα ατόμων που διαφοροποιούνται σε έναν πληθυσμό. Συγκεκριμένα κάθε μαζικό δείγμα συντίθεται από άτομα που διαφέρουν κατά ένα συγκεκριμένο φαινότυπο ενός διασπώμενου πληθυσμού. Για απλά γενετικά χαρακτηριστικά, όλες οι γονιδιακές θέσεις στο γένωμα θα πρέπει να εμφανίζονται σε ισορροπία σύνδεσης εκτός από την περιοχή του γενώματος που είναι κοντά στην επιλεγμένη γονιδιακή θέση. Οι δείκτες που βρίσκονται στη θέση αυτή θα πρέπει να εμφανίζουν πολυμορφία μεταξύ των δειγμάτων για τα διάφορα πατρικά αλληλόμορφα. Επειδή πολλά διασπώμενα άτομα χρησιμοποιούνται για να παραχθούν τα δείγματα, υπάρχει μικρή μόνο πιθανότητα οι περιοχές του γενώματος που δεν είναι συνδεδεμένες στη θέση-στόχο να είναι επίσης πολυμορφικές ανάμεσα στα δείγματα. Τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά τυχαίοι εκκινητές για την ενίσχυση των επιθυμητών γονιδιακών θέσεων κάθε δείγματος και για την αναγνώριση RFLP πολυμορφισμών που συνδέονται με το χαρακτηριστικό που ενδιαφέρει. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνολογίας είναι ότι οι δείκτες στοχεύουν σε μια πολύ μικρότερη γονιδιακή περιοχή και η πιθανότητα αναγνώρισης περισσότερων δεικτών από όσους πραγματικά υπάρχουν είναι μικρή σε σχέση με την ανάλυση σχεδόν ισογονιδιακών σειρών (Michelmore et al. 1991). Τα άτομα που επιλέγονται από έναν F_2 πληθυσμό θα πρέπει να βρίσκονται πάντα σε ανισορροπία σύνδεσης όσον αφορά τις επιλεγμένες περιοχές και οι δείκτες μπορούν να

στοχεύσουν σε οποιαδήποτε γονιδιακή θέση ώστε να μπορεί να εφαρμοσθεί επιλογή, είτε φαινοτυπική είτε γενοτυπική.

Οι Giovannoni *et al.* (1991) επέδειξαν ότι η χρήση μιας pooling strategy βασισμένη σε γνωστούς RFLP γενότυπους από πληθυσμούς για τους οποίους υπάρχει χαρτογράφηση, προκειμένου να δημιουργήσουν δείγματα DNA από άτομα ομόζυγα για αντίθετα αλληλόμορφα των γονέων τους σε ένα χρωμοσωμικό τμήμα-στόχο. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για να στοχεύσουν RAPD δείκτες σε περιοχές του γενώματος της τομάτας που ευθύνεται για την ωρίμανση του καρπού. Οι Reiter *et al.* (1992) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο αυτή για να αναγνωρίσουν 100 RAPD δείκτες εξειδικευμένους στο χρωμόσωμο 1 της *Arabidopsis thaliana*. Καθώς οι γενετικοί χάρτες πλησιάζουν στην ολοκλήρωσή τους, η δημιουργία μαζικών δειγμάτων στο φαινότυπο ή το γενότυπο θα επιτρέψει στους ερευνητές να ξεφύγουν από την τυχαία προσέγγιση της πλήρους χαρτογράφησης και να συγκεντρωθούν πιο αποτελεσματικά σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος (Tingey *et al.*, 1992).

Πιο πρόσφατα η Keygene ανέπτυξε μια μέθοδο που εφαρμόζεται παγκοσμίως και η οποία αποκαλύπτει πολύ υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού ενώ εμφανίζει υψηλή επαναληψιμότητα. Η διαδικασία αυτή που ονομάζεται AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) είναι ουσιαστικά μια ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ RFLPs και RAPDs με την έννοια ότι κατά το πρώτο στάδιο γίνεται η πέψη του γενωμικού DNA αλλά μετά ακολουθούν επιλεκτικοί γύροι ενίσχυσης με PCR των κομμένων τμημάτων.

Ο σχεδιασμός εκκινητών με στόχο γνωστές περιοχές του γενώματος αποτελεί μια άλλη προσέγγιση στη μοριακή ανάλυση. Στην περίπτωση αυτή το ενισχυμένο προϊόν το οποίο στοχεύθηκε μπορεί να συγκριθεί σε πηκτή αγαρόζης με ένα αντίστοιχο προϊόν από ένα άλλο άτομο αλλά η ανάλυση των δύο θα ανιχνεύσει μόνο διαφορές στο μήκος του τμήματος που απορρέουν από πολλές αλλαγές στα ζεύγη των βάσεων (Karp & Edwards, 1995).

Τέλος αναφέρεται η τεχνική με μικροδορυφόρους (microsatellites). Οι μικροδορυφόροι (SSR'S) είναι η κατηγορία επαναλαμβανόμενων ακολουθιών DNA που είναι παρούσες σε όλους τους οργανισμούς, τόσο στους ευκαρυωτικούς (Morgante, M., Hanafier, M. and Powell, W., 2002) όσο και στους προκαρυωτικούς (Gur-Arie, *et al.*, 2000).

4.4 Μοριακοί δείκτες τύπου SSR'S

Οι μοριακοί δείκτες τύπου SSR'S αποτελούνται από "δίδυμες" επαναλαμβανόμενες ακολουθίες διάφορων νουκλεοτιδίων, (συνήθως 2-6), έκτασης μέχρι και 102 bp, οι οποίες κατανέμονται σε ολόκληρο το γονιδίωμα (αν και η κατανομή τους ποικίλλει ανάλογα το είδος και το χρωμόσωμα) και πλαισιώνονται από ιδιαίτερα συντηρημένες ακολουθίες (Chambers, G.K. and MacAvoy, 2000). Πριν από μερικά χρόνια το επαναλαμβανόμενο DNA οριζόταν ως DNA "junk" επειδή θεωρήθηκε ότι δεν είχε κάποια λειτουργία. Σήμερα, αν και ο ρόλος των microsatellites στο DNA των φυτών είναι ακόμα άγνωστος, έχει γίνει ένα σημαντικό εργαλείο για τους ερευνητές. Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των microsatellites, όπως η παρουσία τους στα γονιδιώματα όλων των οργανισμών, το υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού που εμφανίζουν, ο συγκυρίαρχος τρόπος κληρονομιάς και η δυνατότητα για αυτοματοποιημένη ανάλυση τους κάνει άριστους μοριακούς δείκτες για διάφορες εργασίες, όπως η χαρτογράφηση έως και η μελέτη των σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων (Rafalski *et al.*, 1993) Είναι ιδιαίτερα ελκυστικοί στην περίπτωση των ειδών που παρουσιάζουν χαμηλό επίπεδο γενετικής παραλλακτικότητας, όπως οι ομομεικτικοί πληθυσμοί και οι κλειστοί γεωγραφικά πληθυσμοί όπου η διαφοροποίηση μπορεί να είναι δύσκολο να διακριθεί από τη χρήση άλλων εργαλείων.

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση των SSR'S δεικτών έχει αυξηθεί αρκετά (Zane *et al.*, 2002). Οι μικροδορυφόροι ή αλλιώς επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Simple Sequence Repeats) είναι περιοχές που υφίστανται συχνά μεταλλάξεις. Το πρόβλημα της χρήσης τους για γενετική ανάλυση είναι ότι οι επαναλαμβανόμενες αυτές αλληλουχίες εδράζονται σε πολλές περιοχές του γενόματος με συνέπεια να είναι δύσκολη σε ορισμένες περιπτώσεις η επεξήγηση των αποτελεσμάτων. Ο σχεδιασμός όμως εκκινητών που ενισχύουν μία και μόνη μικροδορυφική περιοχή δίδουν αποτελέσματα περισσότερο κατανοητά, αφού ακολουθούν μενδελική κληρονομία που επιτρέπει τη σαφή διάκριση των ατόμων μεταξύ τους.

Η υπεροχή της γενετικής ανάλυσης μέσω μικροδορυφόρων προκύπτει από: 1) την ανάλυση μίας και μόνης γενωμικής περιοχής, 2) Επειδή υπόκεινται συχνά σε μεταλλάξεις την ταυτόχρονη παρατήρηση πολλών αλληλομόρφων, 3) την συγκυριαρχική τους κληρονομία 4) την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων τόσο στο χρόνο όσο και στο χώρο (μεταξύ διαφόρων εργαστηρίων) και 5) τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού που εμφανίζουν. Όπως και με τους δείκτες VNTRs έτσι και με τους SSRs, η παραλλακτικότητα που παρατηρείται μέσω των πολυμορφισμών οφείλεται σε αλλαγές

στον αριθμό της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας. Τα αποτελέσματα ενίσχυσης διαχωρίζονται κατά περίπτωση ανάλογα με τις διαφορές μήκους των ενισχυόμενων τμημάτων (μεγάλες ή μικρές) σε πηκτή αγαρόζης ή σε πηκτή ακρυλαμίδης. Βέβαια η ανάλυση μέσω μικροδορυφόρων υπόκειται και σε περιορισμούς: όπως : 1) ο τρόπος παραλλαγής τους στον χρόνο κατά την εξέλιξη των ειδών 2) η δημιουργία νέων αλληλόμορφων μέσω άνισης σύζευξης και λόγω συχνών μεταλλάξεων γεγονός που περιορίζει την χρήση τους για εκτίμηση της συγγένειας ατόμων μεταξύ τους σε ένα μικρό αριθμό γενεών. 3) ο μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων δυσκολεύει την εκτίμηση των συχνοτήτων τους 4) η συχνότητα εμφάνισης τέτοιων μικροδορυφορικών περιοχών στους φυτικούς οργανισμούς είναι πολύ μικρότερη απ' αυτή των ζωικών οργανισμών, οπότε απαιτούνται εκτενείς αναλύσεις του γενώματος για την εύρεσή τους. Για να είναι χρήσιμοι τέτοιοι μοριακοί δείκτες πρέπει η περιοχή η οποία ενισχύουν να υπάρχει και να είναι πολυμορφική σε επίπεδο γένους και όχι μόνο είδους. Γενικότερα η μοριακή γενετική ανάλυση μέσω μικροδορυφορικών περιοχών, είναι κατάλληλη για διάκριση μεταξύ ατόμων πολύ στενά συγγενών στο επίπεδο του πληθυσμού.

Η δυνατότητα εφαρμογής των μικροδορυφόρων στην ανάλυση γονιδιώματος αρχικά εξαρτάται στις περισσότερες περιπτώσεις από την σταθερότητα στην μενδελική κληρονομηση (Ellegren, 1993). Είναι ιδιαίτερα άφθονοι στα γονιδιώματα ευκαριωτικών οργανισμών αλλά και εμφανίζονται και σε προκαρυωτικούς με τις χαμηλότερες συχνότητες. Περιλαμβάνουν σπάνια περισσότερο από 70 επαναλαμβάνες μονάδες και είναι διασπαρτοι σε όλο το γονιδίωμα. Αυτές οι μικρές επαναλαμβανόμενες ακολουθίες DNA παρέχουν τη βάση για ένα πολυ-αλληλόμορφο, συγκυρίαρχο σύστημα γενετικών δεικτών. Η υψηλή συχνότητα των ανιχνεύσιμων πολυμορφισμών μέσω των αλλαγών στους αριθμούς επανάληψης προκαλείται από έναν ενδομοριακό μηχανισμό μετάλλαξης αποκαλούμενο ως ολίσθηση του DNA. Εντούτοις, οι πιο κοινές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν το κέρδος ή την απώλεια μιας ενιαίας επαναληπτικής μονάδας (Schlotterer και Tautz, 1992). Οι περιοχές που πλαισιώνουν τους μικροδορυφορους διατηρούνται γενικά μεταξύ γενότυπων του ίδιου είδους. Τα SSRs θεωρούνται σήμερα ως δείκτες επιλογής για αυτογονιμοποιούμενες ποικιλίες με μικρο ενδοειδικό πολυμορφισμό (Roder *et Al*, 1998).

Επιπλέον, η δυνατότητα αναπαραγωγής SSRs είναι τέτοια ώστε μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά από διαφορετικά εργαστήρια για να παράγουν δεδομένα, τα οποία να είναι χρήσιμα για τα προγράμματα χαρτογράφησης γονιδιώματος και τα αποτελέσματα μιας επιτυχούς απομόνωσής τους και εφαρμογές σε πολλά είδη

φυτών (Dib *et Al*, 1996 Schmidt and Heslop, 1998). Τα πολλαπλά δοχεία των εγχυτήρων SSR και η ημιαυτόματη ανίχνευση των ενισχυμένων προϊόντων είναι οι βασικοί παράγοντες για την υψηλή-παραγωγή γενοτύπων και της αποδοτικότητας της γενετικής χαρτογράφησης και των marker-assisted προγραμμάτων που χρησιμοποιούν τους δείκτες SSR. Το κρίσιμότερο βήμα για την καθιέρωση της πολλαπλής PCRs είναι η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών, ο συνδυασμός των εκκινήτων και η επιλογή της θερμοκρασίας αποδιάταξης Αυτό το βήμα μπορεί να αποφευχθεί με την ενίσχυση των μικροδορυφορικών γεωμετρικών τύπων ξεχωριστά και στη συνέχεια με συγκέντρωση των προϊόντων της PCR.

Η τρέχουσα ανάλυση μικροδορυφόρων στηρίζεται στον προσδιορισμό μεγέθους ολόκληρου του προϊόντος της PCR που αποτελείται από τις περιοχές επαναλαμβανόμενων ακολουθιών. Ο αριθμός των επαναλήψεων μπορεί να υπολογιστεί από την αφαίρεση των πλευρικών νουκλεοτιδίων και τη διαίρεση των υπόλοιπων ζευγαριών βάσεων ανάλογα με το μέγεθος της μονάδας επανάληψης. Εμπειρικά, η ικανότητα διαχωρισμού από το πήκτωμα (gel) πρέπει να είναι τουλάχιστον το μισό μέγεθος της μονάδας επανάληψης.

Επομένως, η ταξινόμηση των PCR προϊόντων στα πηκτώματα αγαρόζης για τους περισσότερους μικροδορυφόρους δεν είναι κατάλληλη δεδομένου ότι παρέχουν επίσης μικρή ικανότητα διαχωρισμού. Ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος τύπος πηκτής (gel) είναι το πήκτωμα αποδιάταξης πολυακρυλαμίδης (6%) ως ετερόδιπλων μορίων που θα οδηγήσουν σε μια τρίτη ζώνη (μερικές φορές και σε μια τέταρτη), το οποίο μπορεί να προκαλέσει μια ανακριβή ανάθεση των αλληλόμορφων. (Schlotterer, 1998). Η αρχική και πιο ευαίσθητη προσέγγιση για την ανίχνευση των μικροδορυφορών, είναι βασισμένη στη ραδιενέργεια με δύο διαφορετικές μεθόδους για την σήμανση των προϊόντων PCR: ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων σήμανσης και τελική σήμανση ενός εκ των PCR εκκινήτων. Εντούτοις υβριδοποίηση με χρωστικές ουσίες φθορισμού σε αυτοματοποιημένες συσκευές προσδιορισμού αλληλουχιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μη-ραδιενεργές μέθοδοι ανίχνευσης. Η χρήση χρωστικών ουσιών φθορισμού σε αυτοματοποιημένες συσκευές προσδιορισμού αλληλουχιών είναι μια σχετικά νέα μέθοδος ανίχνευσης όπου τα PCR προϊόντα ενίσχυσης μπορούν να σημανθούν με μια χρωστική ουσία φθορισμού (καθεμία ενσωματώνεται κατά τη διάρκεια της PCR ή με τη χρησιμοποίηση μιας τελικής-σήμανσης του εκκινήτη). Όταν ενεργοποιείται από το φως του λείζερ, αυτή η χρωστική ουσία εκπέμπει ένα σήμα που μπορεί να ανιχνευθεί και συγκρίνοντας το σήμα του PCR προϊόντος με έναν δείκτη

μοριακού βάρους (ladder), τότε είναι πιθανή η ακριβής ταξινόμηση κατά μέγεθος (Schlotterer, 1998).

Στο βαμβάκι, οι SSRs αντιπροσωπεύουν μια νέα κατηγορία γενετικών δεικτών. Ο Liu *et al.*, (2000) χρησιμοποίησε 65 ζεύγη εκκινητών SSR για να ενισχύσει 70 γεωμετρικούς τόπους δεικτών που εντοπίζονται σε ένα συγκεκριμένο χρωμόσωμα ή γονίδιο βαμβακιού. Οι δείκτες SSR παρέχουν ένα μοριακό χάρτη που μπορεί να συνδιαστεί με ένα περαιτέρω συμβατικό χάρτη σύνδεσης με άλλους δείκτες DNA (π.χ. RAPD, RFLP κ.α.), για να επεκτείνει τη γονιδιωματική κάλυψη του γενετικού χάρτη βαμβακιού. Στην πραγματικότητα, ένας χάρτης σύνδεσης που παρήχθη πρόσφατα με χρήση 199 RAPD και SSR δεικτών DNA ώστε να διευκολύνει την επιλογή για την στοματική αγωγιμότητα βαμβακιού στηρίχθηκε σε δύο υποθετικά QTL που συνδέονται με αυτό το δύσκολο φυσιολογικό γνώρισμα που προσδιορίστηκε με τη βοήθεια δύο ομάδων σύνδεσης βαμβακιού (Ulloa *et al*, 2000)

Επιλέγοντας αυτή τη μέθοδο αποβάλλουμε τα προβλήματα που προκαλούνται με το χειρισμό των συστημάτων που βασίζονται στη ραδιενέργεια, (η έκθεση των ερευνητών στη ραδιενέργεια, το υψηλό κόστος της επεξεργασίας των ραδιενεργών αποβλήτων, την χρονοβόρα γραφειοκρατία που αφορά τη χρήση ραδιοϊσοτόπων, και τους σύντομους χρόνους ημίσειας ζωής των ραδιοϊσοτόπων.). Οι εκκινητές που σημάνθηκαν με χρωστικές ουσίες φθορισμού παραμένουν αναλώσιμες για χρόνια εάν αποθηκευτούν κατάλληλα (David and Menotti-Raymond, 1998).

Οι χάρτες γενώματος βασισμένοι, τουλάχιστον εν μέρει, στους δείκτες μικροδορυφόρων έχουν εφαρμοστεί σε διάφορα είδη φυτών, όπως το *Arabidopsis thaliana* (Bell and Ecker, 1994), την ντομάτα (Broun and Tanksley, 1996), το ρύζι (Cho *et al*, 2000), το σιτάρι (Borner *et al*, 2000), την τετραπλοειδή πατάτα (Bradshaw *et al*, 1998) και άλλα είδη ζώων και φυτών Powell *et al.*, 1996; Gyapay *et al.*, 1994; Sverdlov *et al.*, 1998). Ο Masojc (2002) σημείωσε τέσσερις σημαντικές στρατηγικές για έναν μοριακό δείκτη στενά συνδεδεμένο με ένα γονίδιο αγρονομικής σπουδαιότητας. Η πρώτη προσέγγιση χρησιμοποιεί NILs που διαφοροποιούνται μόνο από τα αλληλόμορφα ζεύγη στο γονίδιο που μας ενδιαφέρει και στην παρακείμενη χρωμοσωμική περιοχή. Ο δεύτερος περιλαμβάνει BSA. Ο τρίτος περιλαμβάνει τον προσδιορισμό QTLs, και η τελευταία στρατηγική περιλαμβάνει τις βάσεις δεδομένων υπολογιστών. Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν διάφορα παραδείγματα SSRs για αυτούς τους λόγους. Πρόσφατα, με τη βοήθεια της στρατηγικής BSA, προσδιορίστηκαν δείκτες SSR που συνδέθηκαν άμεσα με τα γονίδια που παρέχουν ανθεκτικότητα ενάντια στον ιό του

μωσαϊκού των ζαχαροκάλαμων στον αραβόσιτο-*Scm1* και *Scm2* (DuBle *et al*, 2003) και της σκωρίασης των φύλλων στο κριθάρι-*Rph5* (Mammadov *et al*, 2003). Οι Zhou *et al.* (2003) στο καλαμπόκι έδειξαν ότι η MAS επιλογή με σκοπό τη σημαντικότερη σύνδεση των QTL με τους SSR δείκτες που συνδυάστηκαν με τη φαινοτυπική επιλογή ήταν αποτελεσματικότερη από την επιλογή βασισμένη μόνο στη φαινοτυπική αξιολόγηση στις πρώτες γενιές. Οι συγγραφείς προσδιόρισαν τους δείκτες που συνδέονταν με το σημαντικότερο QTL στο χρωμόσωμα 3BS στον αρχικό πληθυσμό χαρτογράφησης. Μία άλλη ενδιαφέρουσα εφαρμογή των SSRs, περιγράφηκε από τους Liu και Wu (1998) και αναφερόταν στην βελτίωση ρυζιού. Οι ερευνητές αυτοί έδειξαν ότι είναι δυνατό να προβλεφθεί η ετέρωση και η υβριδική απόδοση από την ανίχνευση των χρωμοσωμικών περιοχών που επηρεάζουν την παραγωγή. Εντούτοις, η χρήση των δεικτών SSR είναι ακόμα σχετικά ακριβή για την εφαρμογή σε μια μεγάλη κλίμακα στα προγράμματα βελτίωσης.

Οι Prasad *et al.*, 1996 οι οποίοι εξέτασαν 55 γενοτύπους σιταριού με τους δείκτες SSR, διαπίστωσαν ότι ένα σύνολο μόνο 12 ζευγών εκκινήτων επέτρεψε σε 48 γενοτύπους να διακριθούν μεταξύ τους. Σε μια άλλη μελέτη που δημοσιεύεται από τους Ashkenazi *et al.*, δύο δείκτες SSR ήταν επαρκείς για να γίνει γενετική διάκριση μεταξύ 12 ποικιλιών πατάτας.

Σύμφωνα με πειράματα που έλαβαν χώρα σε έναν BC₁ διειδικό πληθυσμό επαναδιασταύρωσης *Gossypium hirsutum* X *G. barbadense*, εβδομήντα πέντε φυτά του πληθυσμού από αυτά αξιολογήθηκαν με χρήση 1014 δεικτών. Ο χάρτης που αναπτύχθηκε αποτελείται από 888 γονιδιακές θέσεις που προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια 465 AFLPs, 229 SSRs, 192 RFLPs, και 2 μορφολογικών δεικτών. Οι προαναφερθείσες γονιδιακές θέσεις (loci) που είναι διατεταγμένες σε 37 ομάδες σύνδεσης, αντιπροσωπεύουν τα περισσότερα από τα 26 χρωμοσώματα, καλύπτοντας συνολικά 4400 cM (G.-M.Lacape *et al.*, 2003). Εξαιτίας του βασικού γενώματος οι μικροδορυφόροι στα φυτά μπορεί να είναι μέχρι και δέκα φορές πλιό μεταβλητοί από άλλους δείκτες. Συστήνονται ιδιαίτερα για τη γενετική ανάλυση της ποικιλομορφίας. σε επίπεδο ειδών και γενοτύπων εκτός του είδους Οι Russell *et al.* συνέκριναν το επίπεδο πολυμορφισμού στο κριθάρι όπως ανιχνεύεται από τέσσερις τύπους δεικτών: RFLPs, AFLPs, SSRs και RAPDs. Αν και οι τέσσερις τύποι δεικτών ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν τον πολυμορφισμό μεταξύ 18 καλλιεργούμενων ποικιλιών κριθαριού, ο δείκτης ομοιότητας ήταν ο χαμηλότερος στην περίπτωση των SSRs και για τις ποικιλίες της άνοιξης και για αυτές του χειμώνα ενώ ο δείκτης ποικιλομορφίας που υπολογίστηκε

βασιζόμενος στους SSR ήταν παρόμοιος με αυτόν που λήφθηκε από τους AFLPs. Το υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού στους SSRs τους καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμους για αυτογονιμοποιούμενα είδη όπως το σιτάρι (Röder *et al*, 1995) και το κριθάρι (Becker *et al*, 1995). Εντούτοις, έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης επιτυχώς σε σταυρογονιμοποιούμενα φυτά όπως η σίκαλη (Saal, B. and Wricke, G.1999) ή ο αραβόσιτος (Taramino, G. and Tingey, 1996). Στη σίκαλη, ένα χαρακτηριστικό σταυρογονιμοποιούμενο είδος, οι Saal και Wricke ανέφεραν ότι η αναμενόμενη ετερωζυγωτία και ο αριθμός των αλληλόμορφων γονιδίων που παρήχθησαν από SSRs ήταν πολύ υψηλότεροι έναντι εκείνων που παρήχθησαν με χρήση RFLPs δεικτών (0,62 αντί 0,43 και 5,9 αντί 3,4 ,αντίστοιχα). Σύμφωνα με τα προηγούμενα η αξιολόγηση πληθυσμών ή άλλου διασπόμενου γενετικού υλικού, μπορεί να γίνει με συμβατική ή μοριακή προσέγγιση προκειμένου να εκτιμηθεί η αξία των πληθυσμών για ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά.

4.5 Εφαρμογές των μοριακών δεικτών για τη δημιουργία γενετικών χαρτών

Οι εφαρμογές των μοριακών δεικτών μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει τη βασική γνώση της λειτουργίας του γενετικού υπόβαθρου κάποιου οργανισμού και η δεύτερη αφορά την άμεση εφαρμογή στα προγράμματα βελτίωσης. Η πρώτη κατηγορία μπορεί να διαιρεθεί σε δύο κύριες ομάδες :

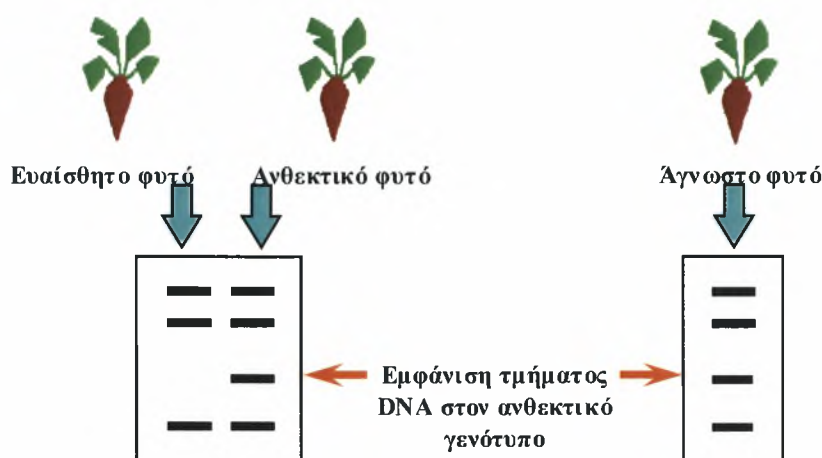
- 1) Η δημιουργία υψηλής πυκνότητας γενετικού χάρτη, με μοριακούς δείκτες που καλύπτουν ολόκληρο το γονιδίωμα. Μερικά παραδείγματα φυτών στα οποία έχει βρει εφαρμογή είναι το *Arabidopsis*, το ρύζι, το καλαμπόκι, το κριθάρι κ.α.
- 2) Ο εντοπισμός γενετικών τόπων που φέρουν γονίδια και η κλωνοποίηση των συγκεκριμένων γονιδίων. Η απομόνωση των γονιδίων γίνεται για να διερευνηθεί η λειτουργία τους. Η απομόνωση μπορεί να γίνει με βάση τη προσδιοριζόμενη τους θέση και το "χρωμοσωμικό βάδισμα". Αν και οι διαδικασίες αυτές δεν παρουσιάζουν άμεση εφαρμογή, εντούτοις τα αποτελέσματα που προκύπτουν δημιουργούν τη βάση αξιοποίησης τους στο μέλλον (Dietrich, 1996 Dib *et Al*, 1996 Schmidt and Heslop, 1998).

Η δεύτερη κατηγορία μπορεί να διαιρεθεί στις ακόλουθες κύριες ομάδες:

1. Ταξινόμηση γενετικού υλικού, ταυτοποίηση ποικιλιών και πιστοποίηση γνησιότητας υβριδίων (και υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού με χρήση μοριακών δεικτών που συμπεριλαμβάνουν ή αποκλείουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά γνωρίσματα).
2. Πρόβλεψη της απόδοσης υβριδίων και του γενετικού υποβάθρου των γονέων. Επιλογή γονέων με βάση τη γνωστή γενετική υπόσταση τους που προκύπτει από τους κοινούς και μη κοινούς μοριακούς δείκτες. Έτσι, ελλατώνεται σημαντικά και ο αριθμός των γονέων, με αποτέλεσμα και την ελάττωση του αριθμού των διασταυρώσεων.
3. Ταυτοποίηση ανασυνδυασμού και ταυτόχρονη μείωση του αριθμού των επαναδιασταυρώσεων. Η μεταφορά επιθυμητών γονιδίων από το γονέα-δότη, συνήθως επιτυγχάνεται με την ταυτόχρονη μεταφορά των επιθυμητών γενετικών τόπων που συνήθως δεν είναι άμεσα εμφανείς. Για την απομάκρυνση τους απαιτούνται διαδοχικές διασταυρώσεις που μέσω ανασυνδιασμού θα αντικατασταθούν με γενετικό υλικό του δέκτη. Η δημιουργία τέτοιου ανασυνδιασμού ταυτοποιείται πολύ πιο εύκολα και γρήγορα με τη χρήση μοριακών δεικτών.
4. Ταυτοποίηση και αξιοποίηση του γενετικού υποβάθρου των άγριων ειδών. Μετά από διασταυρώσεις το γενετικό απόθεμα των άγριων ειδών αναγνωρίζεται και ταυτοποιείται με σχετική ευκολία στα καλλιεργούμενα φυτά αυξάνοντας έτσι τη γενετική παραλλακτικότητα και τα περιθώρια βελτίωσης ορισμένων χαρακτηριστικών.
5. Ανάλυση και διαχωρισμός των QTL σε απλά κληρονομικά χαρακτηριστικά.

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ (I)

Επιλογή Χαρακτήρων με Μοριακούς Δείκτες (MAS)



Σχήμα 3. Αξιοποίηση μοριακών δεικτών στη βελτίωση των φυτών.

4.6 Γενετική ανάλυση με τη βοήθεια μοριακών δεικτών τύπου RAPD

Υπάρχουν αρκετές εφαρμογές των RAPD δεικτών, κάθε μια από τις οποίες αξιοποιεί την αποτελεσματικότητα ανίχνευσης των πολυμορφισμών που βασίζονται σε αλληλουχίες του DNA. Ο τομέας της έρευνας με τη μεγαλύτερη ανάπτυξη όσον αφορά τη χρήση της RAPD τεχνολογίας είναι αυτός της γενετικής πληθυσμών (Hedrick, 1992). Οι RAPD δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για να δημιουργήσουν αποτυπώματα DNA για τη μελέτη της ταυτότητας και της ταξονομικής σχέσης στους ευκαρυωτικούς και τους προκαρυωτικούς οργανισμούς (Caetano-Anollés *et al.*, 1991; Hadrys *et al.*, 1992; Hu and Quiros, 1991; Kresovich *et al.*, 1992; Lark *et al.*, 1992; Stiles *et al.*, 1992; Welsh *et al.*, 1991; Wilde *et al.*, 1992; Wöstemeyer *et al.*, 1991).

Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν αναφέρει τη χρησιμότητα των RAPD δεικτών ως πηγή φυλογενετικών πληροφοριών. Οι Arnold *et al.* (1991) πέτυχαν να χρησιμοποιήσουν τους RAPD δείκτες για να ελέγξουν τη διεϊδική ροή γονιδίων μεταξύ των ειδών *Iris fulva* και *I. hexagona* και να μελετήσουν την υποτιθέμενη καταγωγή του υβριδίου *I. nelsonii*. Οι Hu και Quiros (1991) έδειξαν ότι τα προϊόντα ενίσχυσης μόνο από 4 τυχαίους εκκινητές ήταν αρκετά για να ξεχωρίσουν μεταξύ τους 14 διαφορετικές ποικιλίες μπρόκολου και 12 κουνουπιδιού. Οι RAPD δείκτες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας σε συλλογές γενετικού υλικού.

Χρησιμοποιώντας μόνο 25 διαφορετικούς δεκαμερείς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, οι Kresovich *et al.* (1992) κατάφεραν να συλλέξουν πληροφορίες για 140 διαφορετικούς πολυμορφικούς χαρακτήρες σε μια δοκιμή ελέγχου ατόμων που αντιπροσωπεύουν τα είδη *Brassica oleracea* L. και *B. para* L. Από τα δεδομένα φάνηκε η χρησιμότητα της δοκιμής για το διαχωρισμό μεταξύ διαφορετικών ατόμων σε μια συλλογή γενετικού υλικού και ότι η ικανότητα να διαχωρίζονται στενά συγγενή άτομα ήταν απλά μια λειτουργία του αριθμού των ζωνών RAPD που παρατηρούνταν. Οι RAPD δείκτες έδωσαν μια αποτελεσματική τεχνολογία για την ανακάλυψη τέτοιων πολυμορφικών χαρακτήρων. Χρησιμοποιώντας έναν τυχαίο μικρό εκκινητή μήκους 5 μόνο νουκλεοτιδίων, σε συνδυασμό με σήμανση αργύρου για να αυξηθεί η ευαισθησία ανίχνευσης των ζωνών οι Caetano-Anollés *et al.* (1991) παρήγαγαν ένα λεπτομερές αποτύπωμα DNA για αρκετά διαφορετικά είδη. Η προσέγγιση αυτή, που ονομάστηκε DAF (DNA amplification fingerprinting) υπόσχεται να δώσει περισσότερες γενετικές πληροφορίες μετά από κάθε ενίσχυση.

Η ιχνηλάτηση (fingerprinting) των φυτών έχει πολλές εφαρμογές στο εμπόριο και σε νομικές υποθέσεις. Μια εξ'αυτών περιλαμβάνει τη χρήση της σε βελτιωτικά προγράμματα προκειμένου να καθοριστεί η συγγένεια των γενοτύπων και η πιστοποίηση των απογόνων, ενώ επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για την πιστοποίηση των απογόνων των καταγεγραμμένων ζώων, το σπέρμα και τα έμβρυα αυτών. Επίσης οι τεχνικές αποτύπωσης DNA μπορεί να χρησιμεύσουν στη δημιουργία, απόκτηση και ενίσχυση των ιδιοκτησιακών δικαιωμάτων στα φυτά. (Jondle, R.J., 1992).

Ιστορικά, πολλά προβλήματα στα διάφορα καλλιεργητικά συστήματα δεν μπορούσαν να λυθούν λόγω έλλειψης γενετικών δεικτών. Για παράδειγμα, η ανάλυση της γενετικής σύνδεσης στα κωνοφόρα ήταν αρχικά αργή λόγω του μεγάλου μεγέθους του γενώματος και λόγω της έμφυτης δυσκολίας παραγωγής ενός διασπώμενου F₂ πληθυσμού (Carlson *et al.*, 1991). Οι Carlson *et al.* (1991) και Chaparro *et al.*, (1992) πρόσφατα έδειξαν ότι η ταχύτητα και η αποτελεσματικότητα της RAPD ανάλυσης έχουν συνεισφέρει ιδιαίτερα στην χαρτογράφηση των κωνοφόρων.

Μια από τις πρώτες πρακτικές εφαρμογές των RAPD δεικτών ήταν η δημιουργία γενετικών χαρτών υψηλής πυκνότητας. Χρησιμοποιώντας μια πιο αποτελεσματική δοκιμή οι Reiter *et al.* (1992) κατάφεραν να τοποθετήσουν περισσότερους από 250 νέους γενετικούς δείκτες σε μια ανασυνδυασμένη καθαρή σειρά *Arabidopsis thaliana* σε 4 μόνο ανθρωπομήνες, δείχνοντας καθαρά τη χρησιμότητα των RAPD δεικτών για γρήγορη ολοκλήρωση ενός γενετικού χάρτη.

Επίσης, αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει τη μεθοδολογία των RAPD'S ως αποτελεσματικό εργαλείο προκειμένου να αναγνωρίσουν μοριακούς δείκτες που βρίσκονται μέσα σε περιοχές ενός γενώματος που ενσωματώθηκε κατά την ανάπτυξη σχεδόν ισογονιδιακών σειρών (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1991; Paran *et al.*, 1991). Ωστόσο υπάρχουν δύο μειονεκτήματα στη χρησιμοποίηση σχεδόν ισογονιδιακών σειρών για την αναγνώριση δεικτών συνδεδεμένων με ένα γενετικό χαρακτηριστικό: το πρώτο είναι ότι χρειάζονται αρκετές γενεές αναδιασταύρωσης για να δημιουργηθεί η σχεδόν ισογονιδιακή σειρά, ενώ το δεύτερο είναι ότι συχνά υπάρχουν αρκετές περιοχές του γενώματος-δότη που έχουν ακούσια ενσωματωθεί στην σχεδόν ισογονιδιακή σειρά (Young and Tanksley, 1989). Αυτό καταλήγει στην αναγνώριση των πολυμορφισμών των δεικτών μεταξύ near-isogenic σειρών που δεν συνδέονται απαραίτητα με το μελετούμενο χαρακτηριστικό (Tingey *et al.*, 1992).

4.6.1 Εκτίμηση γενετικής συγγένειας με RAPD ανάλυση

Οι τεχνικές που σχετίζονται με τη μέτρηση του βαθμού γενετικής συγγένειας με τη χρήση ισοενζύμων και RFLPs μπορούν να εφαρμοσθούν με μια μικρή τροποποίηση και σε δεδομένα ανάλυσης με RAPD δείκτες. Οι Gower (1985) και Jackson *et al.* (1989) συνόψισαν τις επιλογές που αφορούν την επιλογή του εκτιμητή γενετικής απόστασης. Οι τέσσερις πιθανές παρατηρήσεις της σύγκρισης δύο γενοτύπων για έναν RAPD δείκτη κατατάσσονται ανάλογα με την παρουσία ('1') ή την απουσία ('0') ενός RAPD δείκτη για κάθε γενότυπο (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Πίνακας πιθανοτήτων που δείχνει τα 4 πιθανά αποτελέσματα της σύγκρισης δύο γενοτύπων για την παρουσία ή απουσία ενός RAPD δείκτη.

		Γενότυπος 1	
		1	0
Γενότυπος 2	1	A (1,1)	B (0,1)
	2	C (1,0)	D (0,0)

Η παρουσία ενός RAPD δείκτη και στους δύο γενοτύπους (περίπτωση A) υποδηλώνει ένα υψηλό επίπεδο ομολογίας των αλληλουχιών στη γονιδιακή αυτή θέση (Williams *et al.*, 1992). Στην περίπτωση που ο ένας μόνο γενότυπος εμφανίζει το δείκτη ενώ ο άλλος όχι (περιπτώσεις B, C), υπάρχει κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των αλληλουχιών των δύο γενοτύπων. Η τρίτη πιθανότητα (περίπτωση D) είναι η αποτυχία ενίσχυσης προϊόντων και στους δύο γενοτύπους, ένα γεγονός που δεν μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για την ομολογία των αλληλουχιών, γιατί η αιτία της ταυτόχρονης απουσίας μιας RAPD ζώνης σε δύο γενοτύπους μπορεί να υφίσταται λόγω αλλαγής σε μία και μόνο βάση, που όμως είναι κοινή και στους δύο γενοτύπους (ή οι δύο ακολουθίες μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικές).

Για την εκτίμηση της γενετικής απόστασης ή ομοιότητας ανάμεσα σε δύο γενοτύπους χρησιμοποιούνται οι εκτιμητές γενετικής απόστασης (estimators) οι οποίοι διαφέρουν στον τρόπο που συνδυάζουν τα A, B, C, D στη σχέση που αντιπροσωπεύουν. Η βασική υπόθεση στην οποία στηρίζεται η εκτίμηση της γενετικής συγγένειας είναι ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από RAPD θέσεις δεικτών που είναι διανεμημένες σε όλο το γένωμα με τέτοιο τρόπο ώστε η αναλογία των διαφορών που ανακαλύπτονται σε ένα τυχαίο δείγμα των θέσεων αυτών να είναι μια σχετικά καλή μέτρηση των διαφορών ακολουθίας ανάμεσα στα γενώματα. Έτσι η γενετική απόσταση (GD) μπορεί να εκτιμηθεί ως ο αριθμός των διαφορών διηρημένος από τον ολικό αριθμό των συγκρίσεων: $GD=(A+D)/(A+B+C+D)$.

Μέθοδοι εκτίμησης των γενετικών αποστάσεων που χρησιμοποιούνται στις συγκρίσεις αυτές είναι η απόσταση του Jaccard ή το συμπληρωματικό αυτής (Debner *et al.*, 1990) και η ομαλοποιημένη (normalized) ταυτότητα του Nei (Nei, 1972).

Ο εκτιμητής του Jaccard ή δείκτης κατά Jaccard δίνεται από τον τύπο:

$$S_{ij}=a/(a+b+c) \text{ (Sneath and Sokal 1973)}$$

Ενώ ο εκτιμητής των Nei-Li:

$$S_{ij}=2a/(2a+b+c) \text{ (Nei \& Li 1979)}$$

Οπού S_{ij} : η γενετική ομοιότητα των δειγμάτων i και j

a: το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα (i) και (j)

b: το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα (i) αλλά απουσιάζουν από το δείγμα (j)

c: το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα (j) αλλά απουσιάζουν από το δείγμα (i).

Για υπολογισμούς γενετικής ομοιότητας, χρησιμοποιούνται ευρέως η γενετική απόσταση των Nei-Li (1979) ή το συμπληρωματικό αυτής όπως παρουσιάστηκε από τους Borrenmaier *et al.* (1992). Τελευταία στη λίστα είναι η τροποποιημένη απόσταση του Rogers (MRD) (Rogers, 1972). Ο εκτιμητής αυτός εφαρμόστηκε σε δυαδικά δεδομένα από τους Lee *et al.* (1989). Ο MRD απαιτεί πληροφορίες για τα αλληλόμορφα και γι' αυτό είναι ασυμβίβαστος με τα δεδομένα από δείκτες RAPD. Η καλύτερη επιλογή εκτιμητή γενετικής απόστασης για χρήση σε RAPD δεδομένα εξαρτάται από τη σχετική ποσότητα και ποιότητα των πληροφοριών που παρέχει η κάθε σύγκριση για την εκτίμηση του πολυμορφισμού των αλληλουχιών (Smith *et al.*, 1990).

4.7 Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα των RAPDs

Το κύριο πλεονέκτημα των RAPD είναι ότι δεν απαιτούνται ανιχνευτές DNA (DNA probes), ούτε γνώση των αλληλουχιών προκειμένου να σχεδιαστούν συγκεκριμένοι εκκινητές. Η διαδικασία δεν περιλαμβάνει μεταφορά σε μεμβράνη ή στάδια υβριδισμού. Γι' αυτό η τεχνική είναι γρήγορη, απλή και αποτελεσματική ενώ απαιτεί μόνο την αγορά του μηχανήματος των θερμικών κύκλων (PCR) και συσκευές πηκτής αγαρόζης. Χρειάζεται μικρές μόνο ποσότητες DNA (10 ng ανά αντίδραση) κάτι που σε μερικές περιπτώσεις κρίνεται απαραίτητο. Στην περίπτωση, για παράδειγμα, που χαρτογραφούμε τα γονίδια των κωνοφόρων μέσω ιστού μεγαγαμετόφυτου, το μειονέκτημα των ελάχιστων ποσοτήτων DNA υπερνικάται ενώ ταυτόχρονα δίνεται χρήση των πλεονεκτημάτων της 1:1 αναλογίας διάσπασης και των πλήρων πληροφοριών παρόλο που οι RAPDs είναι κυριαρχικοί δείκτες (Grattapaglia *et al.*, 1992). Εξάλλου, τα δείγματα μπορούν να αναλύονται γρήγορα και η διαδικασία μπορεί να αυτοματοποιηθεί.

Οι RAPDs έχει αποδειχθεί ότι ανιχνεύουν υψηλότερα επίπεδα πολυμορφισμών σε σχέση με τους RFLPs στις περιπτώσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί και οι δύο τεχνικές στο ίδιο γενετικό υλικό (Karp & Edwards, 1995).

Στις μελέτες με ισογονιδιακές σειρές οι RAPD δείκτες αποδείχθηκαν πιο αποτελεσματικοί από τους RFLPs όσον αφορά την ανίχνευση των πολυμορφισμών, το χρόνο και την εργασία που απαιτήθηκε. Ένα, επιπλέον, πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι δεν απαιτείται ο γενετικός χάρτης όλου του γενώματος για να αναγνωριστούν δείκτες που συνδέονται με τα χαρακτηριστικά που κάθε φορά ενδιαφέρουν. Αντί αυτού,

μπορούμε να επικεντρωθούμε σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος (Tingey *et al.*, 1992).

Οι Kesseli *et al.* (1994) που συνέκριναν τα επίπεδα πολυμορφισμού που ανιχνεύονται από τους RFLPs και τους RAPDs σε δύο ποικιλίες μαρουλιού διαπίστωσαν ότι το σφάλμα στην επιλογή ήταν παρόμοιο στις δύο τεχνικές, οι οποίες έδειξαν παρόμοιες κατανομές σε όλο το γένωμα και αναγνώρισαν παρόμοια επίπεδα πολυμορφισμού αλλά η διαδικασία των RAPDs ήταν πολύ πιο γρήγορη από την RFLP αφού ο ένας στους δύο εκκινητές αναγνώρισε έναν πολυμορφισμό (Kesseli *et al.*, 1994).

Οι Kesseli *et al.* (1992) σε μια συγκριτική μελέτη χαρτογράφησης μεταξύ RAPDs και RFLPs στο φυτικό είδος *Lactuca sativa* (L.) κατέληξαν ότι τα επίπεδα πολυμορφισμού μεταξύ τους ήταν παρόμοια. Οι RAPDs παρουσίασαν τυχαία κατανομή στις ομάδες σύνδεσης, ενώ η χαρτογραφική τους αποτελεσματικότητα είναι πιο υψηλή σε σχέση με τους RFLPs.

Σχετικά με τα μειονεκτήματα αναφέρονται τα ακόλουθα:

Επειδή οι RAPD πολυμορφισμοί είναι το αποτέλεσμα είτε αλλαγής βάσης νουκλεοτιδίου που αλλάζει το σημείο σύνδεσης του εκκινητή, είτε μια εισαγωγή ή μια διαγραφή μέσα στην ενισχυμένη περιοχή (Parks *et al.*, 1991, Williams *et al.*, 1990), οι πολυμορφισμοί συνήθως σημειώνονται από την παρουσία ή απουσία ενός ενισχυμένου προϊόντος μιας περιοχής. Αυτό σημαίνει ότι η RAPD τεχνική τείνει να παρέχει μόνο δείκτες κυριαρχίας. Άτομα που περιέχουν δύο αντίγραφα ενός αλληλομόρφου δεν ξεχωρίζουν ποσοτικά από εκείνα που περιέχουν ένα μόνο αντίγραφο του αλληλομόρφου. Το μειονέκτημα της χαρτογράφησης με δείκτες κυριαρχίας είναι ότι οι δείκτες που συνδέονται σε ετερόπλευρη διάταξη, για παράδειγμα δείκτες που τοποθετούνται σε ξεχωριστές χρωματίδες (όπως θα μπορούσαν να βρεθούν σε έναν F_2 πληθυσμό) παρέχουν λίγες μόνο πληροφορίες για την εκτίμηση της γενετικής απόστασης (Allard, 1956). Έτσι, κατά τη χαρτογράφηση με δείκτες κυριαρχίας, είναι απαραίτητη η εργασία με δείκτες που είναι μόνο συνδεδεμένοι ομόπλευρα, π.χ. δείκτες τοποθετημένοι σε μια μόνο χρωματίδα, όπως μπορεί να συμβεί σε έναν πληθυσμό καθαρής σειράς από ανασυνδυασμό, σε απλοειδή ή γαμετοφυτικό ιστό ή εναλλακτικά σε έναν F_2 πληθυσμό όπου χαρτογραφούνται RAPD δείκτες που ενισχύθηκαν από έναν μόνο γονέα (Williams *et al.* 1992).

Γενετικές προσομοιώσεις δείχνουν ότι οι δείκτες κυριαρχίας που είναι συνδεδεμένοι ομόπλευρα είναι τόσο αποτελεσματικοί για χαρτογράφηση όσο και οι συγκυριαρχικοί δείκτες σε μια βάση ανά γαμέτη. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν RAPD προϊόντα ως

ανιχνευτές υβριδισμού για να ανιχνευθούν συγκυριαρχικοί RFLPs πολυμορφισμοί. Παρόλα αυτά, η χρησιμότητα της προσέγγισης αυτής εξαρτάται από το αν το προϊόν της RAPD ενίσχυσης είναι ομόλογο σε μια αλληλουχία που έχει ένα μόνο αντίγραφο στο γένωμα (Tingey *et al.*, 1992).

Οι RAPDs έχουν εκτενώς χρησιμοποιηθεί για μελέτη ποικιλότητας, ειδικά σε ενδοειδικό επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων της μελέτης πολλών πληθυσμών. Υπάρχουν όμως και περιορισμοί. Ο πρώτος περιορισμός αφορά τη φύση των δεδομένων που παράγονται. Οι RAPDs είναι κυριαρχικοί δείκτες με αποτέλεσμα μόνο οι ομοζυγωτικές περιπτώσεις να είναι ξεκάθαρες ως παρουσία ή απουσία της ζώνης. Επιπλέον η παρουσία μιας ζώνης που φαίνεται να έχει ακριβώς το ίδιο μοριακό βάρος στην πηκτή RAPD διαφορετικών ατόμων δεν μπορεί να ληφθεί ως απόδειξη ότι τα δύο άτομα έχουν την ίδια ζώνη, αν και συνήθως γίνεται αυτή η παραδοχή. Άλλες επιπλοκές είναι ότι μία RAPD ζώνη μπορεί να περιλαμβάνει αρκετά προϊόντα που «μεταναστεύουν με τον ίδιο τρόπο στην πηκτή» και, όπως στην περίπτωση της DNA αποτύπωσης, μπορεί να υπάρχει αβεβαιότητα στην τοποθέτηση δεικτών σε συγκεκριμένες θέσεις λόγω απουσίας προκαταρκτικής γενεαλογικής ανάλυσης. Οι Lynch και Milligan (1994) αναφέρουν ότι αν θεωρήσουμε ότι υπάρχει μόνο ένα αλληλόμορφο ανά γονιδιακή θέση που μπορεί να ενισχυθεί, αυτό δεν εμποδίζει την εκτίμηση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων που είναι απαραίτητα για τη γενετική ανάλυση πληθυσμών αλλά μειώνει την ακρίβεια μιας τέτοιας εκτίμησης σε σχέση με την ανάλυση με συγκυριαρχικούς δείκτες. Αν και δεν φαίνεται ότι είναι δυνατόν να υπάρχουν εντελώς αμερόληπτοι εκτιμητές (estimators) για τους RAPDs, αυτοί που υπάρχουν μπορούν να εξασφαλίσουν ότι η μεροληψία θα είναι αμελητέα. Από τα δεδομένα προκύπτουν εκτιμητές για γονιδιακές και γενοτυπικές συχνότητες, ετεροζυγωτίες εντός και μεταξύ πληθυσμών, βαθμός ομοζυγωτίας, υποδιαίρεση πληθυσμού και βαθμός ατομικής συγγένειας. Ένα σημαντικό συμπέρασμα από την έρευνά τους, είναι ότι για να αποκτηθεί ο ίδιος βαθμός στατιστικής αξιοπιστίας χρησιμοποιώντας RAPDs (ή οποιοδήποτε άλλο σύστημα κυριαρχικών δεικτών), σε σχέση με τους συγκυριαρχικούς δείκτες, χρειάζεται το δείγμα ατόμων ανά γονιδιακή θέση να είναι από δύο ως δέκα φορές μεγαλύτερο και επιπλέον, για να αποφευχθεί η μεροληψία στην εκτίμηση των παραμέτρων, τα αλληλόμορφα-δείκτες για τις περισσότερες από τις θέσεις αυτές, θα πρέπει να βρίσκονται σε σχετικά μικρή συχνότητα (Karp & Edwards, 1995).

Ένα σημαντικό ερώτημα είναι αν οι ζώνες RAPD του αυτού μοριακού βάρους, που μοιράζονται μεταξύ ατόμων, είναι ομόλογα χαρακτηριστικά, δηλαδή χαρακτηριστικά

που κληρονομήθηκαν από ένα κοινό πρόγονο, ή ομοπλαστικά χαρακτηριστικά, που προκύπτουν ανεξάρτητα μέσα σε ένα πληθυσμό. Φαίνεται πιθανό ότι τα στενά συσχετιζόμενα άτομα θα συγκληρονομούσαν έναν χαρακτηριστικό που μοιράζονται από κάποιο κοινό πρόγονο παρά να απέκτησαν το ίδιο χαρακτηριστικό ανεξάρτητα. Οι Williams *et al.* (1992) απέδειξαν ότι έτσι συμβαίνει χρησιμοποιώντας απλές ζώνες RAPD ως ανιχνευτές υβριδισμού για να ανιχνεύσουν ομόλογα χαρακτηριστικά πάνω σε ένα DNA που βρίσκεται σε μεμβράνη από RAPD προϊόντα. Μέσα στα όρια της ανάλυσης που παρέχει μια πηκτή αгарόζης, οι RAPD ζώνες που είχαν ενισχυθεί από διαφορετικά είδη του γένους *Glycine*, και εμφανίζονταν ως ομόλογες μέσω της σχετικής κινητικότητας, φάνηκαν επίσης να είναι ομόλογες μέσω υβριδισμού (Tingey *et al.*, 1992). Η δυσκολία ταυτοποίησης των ενισχυμένων προϊόντων σε μια RAPD ανάλυση με συγκεκριμένα τμήματα DNA εμποδίζει δύο πιθανές χρήσεις των RAPDs ως γενετικούς δείκτες: τη συγκριτική χαρτογράφηση σε συγγενή είδη, και στρατηγικές κλωνοποίησης. Βέβαια η έλλειψη ομολογίας μεταξύ γενωμάτων παρέχει ένα εμφανές πλεονέκτημα στους RAPDs κατά την κατασκευή χαρτών σε πολυπλοειδή είδη. Στα πολυπλοειδή οι RFLP ανιχνευτές ενός αντιγράφου υβριδίζονται σε πολλαπλές ακολουθίες παράγοντας πολύπλοκα σχέδια ζωνών με εναλλακτικά αλληλόμορφα που είναι δύσκολο να αναγνωριστούν.

Πίνακας 2. Συγκεντρωτικός πίνακας τεχνικών μοριακής ανάλυσης

	RFLP	RAPD	SSR	AFLP
Προσδιορισμός (definition)	Στύπωμα southern από περιορισμένα τεμάχια	PCR από τυχαίους εκκινητές	PCR από μικροδορυφόρους	Ανίχνευση περιοριστικού θραύσματος από PCR
Αφθονία (Abundance)	Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή	Μέτρια-υψηλή
Επίπεδο πολυμορφισμού	Μέτριο	Μέτριο	Υψηλό	Μέτριο
Συγκυριαρχία αλληλομόρφων	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι
Αριθμός τόπων (loci)	1-2	3-15	1	40-120
Εξειδίκευση τόπων-θέσεων	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι
Αναπαραγωγικότητα	Υψηλή	Χαμηλή	Υψηλή	Υψηλή
Ένταση εργασίας	Υψηλή	Χαμηλή	Χαμηλή	Μέτρια
Προγενέστερες πληροφορίες ακολουθιών	Απαιτούνται	Δεν απαιτούνται	Απαιτούνται	Δεν απαιτούνται
Ποσότητα DNA που απαιτείται	2-10 μg	10-20 ng	20-50 ng	20-500 ng 10-
Κόστος ανάπτυξης	Υψηλό	Χαμηλό	Υψηλό	Μέτριο
Κόστος ανάλυσης	Μέτριο	Χαμηλό	Μέτριο	Μέτριο
Τεχνικές απαιτήσεις	Υψηλές	Χαμηλές	Χαμηλές – μέτριες	Μέτριες

Πηγή: Muhanad Walid Akash,(2003).

5 Η σημασία των γενετικών χαρτών

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των μοριακών δεικτών και συνεπώς η αναγνώριση πολλών θέσεων δεικτών έχει προκαλέσει ένα νέο ενδιαφέρον στη γενετική χαρτογράφηση.

Η κατασκευή γενετικών χαρτών προϋποθέτει ότι ο ερευνητής :

- 1) επιλέγει τους πιο κατάλληλους πληθυσμούς για χαρτογράφηση
- 2) υπολογίζει την συχνότητα των ανασυνδιασμένων ανά ζεύγη πληθυσμών
- 3) καθιστά ομάδες συνδέσεως και να υπολογίζει αποστάσεις στον χάρτη
- 4) να προσδιορίζει τη σειρά των γονιδίων στο χάρτη.

Επειδή μεγάλοι πληθυσμοί πάνω στον χάρτη συχνά χαρακτηρίζονται από διαφορετικά συστήματα δεικτών η κατασκευή χαρτών γίνεται με την χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών.

Υπολογιστικά πακέτα όπως το Linkage 1 (Suiter *et al.*, 1983), GMendel (Echt *et al.*, 1992), Mapmaker (Lander and Botstein, 1986; Lander *et al.*, 1987), Mapmanager (Manly and Elliot, 1991), and JoinMap (Stam, 1993) έχουν αναπτυχθεί με σκοπό να βοηθήσουν την ανάλυση γενετικών δεδομένων για την κατασκευή χαρτών. Αυτά τα προγράμματα χρησιμοποιούν δεδομένα που αποκτήθηκαν από διαχωρισμένους πληθυσμούς για να υπολογίσουν τις συχνότητες ανασυνδιασμού. Έπειτα αυτά τα δεδομένα χρησιμοποιούνται για να προσδιορίσουν τον γραμμικό διακανονισμό των γενετικών δεικτών, ελαχιστοποιώντας τα γεγονότα ανασυνδιασμού. Η φαινοτυπική επιλογή που βασίζεται σε χαρακτηριστικά που εξαρτώνται από προσθετικά αλληλόμορφα μπορεί να παράγει σημαντικές αλλαγές στην βελτίωση των πληθυσμών.

Γενετικοί μοριακοί δείκτες – κληρονομικές οντότητες που σχετίζονται με οικονομικώς σημαντικά γνωρίσματα – μπορούν να χρησιμοποιηθούν από βελτιωτές φυτών ως εργαλεία επιλογής (Beckman και Soller, 1983; Darvasi και Soiler, 1994). Η επιλογή βοηθούμενη από μοριακούς δείκτες (MAS), παρέχει τη δυνατότητα για αύξηση της αποδοτικότητας της επιλογής με το να επιτρέπει την πρόωμη επιλογή και να μειώνει το μέγεθος του πληθυσμού των φυτών που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της επιλογής. Παρόλο αυτά, η φαινοτυπική παραλλακτικότητα που η θέση του δείκτη ορίζει, συχνά είναι μη προσθετική και είναι συνάρτηση της γενετικής σύνδεσης, του πλειοτροπισμού και του περιβάλλοντος (Lark *et al.*, 1995). Συνεπώς η αποδοτικότητα της εφαρμογής μοριακών δεικτών ως εργαλείο πρόβλεψης της φαινοτυπικής παραλλακτικότητας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και η πρόβλεψη της αντίδρασης στην επιλογή (R) ή του γενετικού κέρδους (ΔG) είναι συχνά δύσκολη.

Η αξία της πρόβλεψης με χρήση μοριακών δεικτών που χρησιμοποιούνται στη MAS εξαρτάται από την έμφυτη επαναληπτικότητα τους (Weeden *et al.*, 1992), από τη θέση τους στον χάρτη και τη σύνδεση τους με οικονομικώς σημαντικά γνωρίσματα (ποσοτικά ή ποιοτικά). Η παρουσία στενής σχέσης (<10cM) μεταξύ ποιοτικών γνωρισμάτων και ενός γενετικού δείκτη μπορεί να φανεί χρήσιμη στην MAS για την αύξηση του κέρδους μετά από επιλογή (Kennard *et al.*, 1994; Paran *et al.*, 1991; Timmerman *et al.*, 1994).

Παρομοίως, η επιλογή για πολλαπλές θέσεις ή θέσεις ποσοτικών γνωρισμάτων (QTL) χρησιμοποιώντας γενετικούς μοριακούς δείκτες, μπορεί να είναι αποδοτική αν βρεθεί μια σημαντική σχέση μεταξύ ενός ποσοτικού γνωρίσματος και μοριακών δεικτών (Edwards and Page, 1994; Edwards *et al.*, 1987; Lande and Thompson, 1990).

Συχνά βιοτεχνολογικές πληροφορίες που παρουσιάζονται στις ερευνητικές εργασίες δεν είναι συνδεδεμένες απευθείας με τις κλασσικές γενετικές μεθόδους και η καινούργια σύνθετη τεχνολογία που παρουσιάζεται οδηγεί σε μια σειρά από περίπλοκους καινούργιους όρους. Για τους ερευνητές που έχουν ένα γενικό ενδιαφέρον στο να δημιουργήσουν γενετικούς χάρτες, αλλά που θα ήθελαν να μάθουν τον πιθανό ρόλο της MAS στην βελτίωση φυτών, ο τρέχον πλούτος των πληροφοριών που παράγονται σε αυτό το πεδίο μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλη σύγχυση.

5.1 Χαρτογράφηση πληθυσμών

Η επιλογή για χαρτογράφηση είναι σημαντική για την επιτυχή κατασκευή χαρτών. Επειδή η οικονομική σημασία ενός χάρτη θα εξαρτηθεί από τη σχέση σύνδεσης μεταξύ δεικτών και γνωρισμάτων, θα πρέπει να συμπεριληφθούν στα γενετικά αποθέματα όσο το δυνατόν περισσότερα που ελέγχονται από ποιοτικά μορφολογικά γνωρίσματα, που επιλέγονται ως γονείς για την κατασκευή χαρτών.

Προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην πηγή γονέων (προσαρμοσμένοι vs εξωτικοί) που χρησιμοποιούνται στον πληθυσμό για χαρτογράφηση. Το ζευγάρι των χρωμοσωμάτων και ο ρυθμός των ανασυνδιασμών μπορούν να διαταραχθούν πολύ σε ευρείες διασταυρώσεις (προσαρμοσμένο x εξωτικό) και γενικότερα αποδίδουν πολύ μειωμένες αποστάσεις συνδέσεως (Albini and Jones, 1987; Zamir and Tadmor, 1986).

Ευρείες διασταυρώσεις συνήθως παρέχουν διασπώμενους πληθυσμούς με μια σχετικά μεγάλη παράταξη πολυμορφισμών όταν συγκρίνονται με απόγονους που προέρχονται μετά από στενή διασταύρωση (προσαρμοσμένοι x προσαρμοσμένοι). Για να υπάρξει σημαντική αξία στα προγράμματα βελτίωσης φυτών, ένας χάρτης φτιαγμένος από διασταυρώσεις μεταξύ ατόμων με ευρεία γενετική βάση πρέπει να είναι συγγραμικός (η

σειρά των θέσεων να είναι παρόμοια) με τους χάρτες που κατασκευάζονται χρησιμοποιώντας προσαρμοσμένους γονείς. Η επιλογή ενός κατάλληλου πληθυσμού για χαρτογράφηση εξαρτάται από τον τύπο τους συστήματος δεικτών που θα χρησιμοποιηθούν (Tanskey *et al.*, 1988). Η μέγιστη γενετική πληροφορία αποκτάται από έναν τελείως ταξινομημένο F_2 πληθυσμό αν οι έλεγχοι απόγονων (π.χ F_3 ή F_2BC) χρησιμοποιούνται για να αναγνωριστούν ετεροζύγωτα F_2 άτομα. Αυτή η διαδικασία είναι συνήθως απαγορευτική λόγω του κόστους και του χρόνου που απαιτείται στους έλεγχους απογόνων.

Οι κυρίαρχοι δείκτες προσφέρουν τέτοιο πλήθος πληροφοριών όσο και οι συγκυρίαρχοι δείκτες στις ανασυνδιασμένες ομομεικτικές σειρές (RI) (π.χ μια παράταξη από γενετικά σχετιζόμενες σειρές : συνήθως $> F_8$), διπλά απλοειδή

(DH), ή *se* αναδιασταυρούμενους πληθυσμούς κατά την φάση της σύζευξης (Burr *et al.*, 1988). Οι πληροφορίες που παίρνουμε από τους κυρίαρχους δείκτες, μπορούν να μεγιστοποιηθούν χρησιμοποιώντας την R1 ή διπλά σιασμένα απλοειδή διότι όλες οι θέσεις είναι ομόζυγες ή περίπου ομόζυγες. Κάτω από όρους στενής σύνδεσης (π.χ περίπου $<10\%$ των ανασυνδιασμένων), οι κυρίαρχοι και συγκυρίαρχοι δείκτες που εκτιμούνται σε (RI) ανασυνδιασμένους ομομεικτικούς πληθυσμούς παρέχουν περισσότερες πληροφορίες για κάθε άτομο ξεχωριστά σε σχέση με τους τύπους δεικτών στους αναδιασταυρούμενους πληθυσμούς (Reiter *et al.*, 1992).

Παρόλο αυτά, καθώς η απόσταση μεταξύ δεικτών μεγαλώνει (π.χ η θέση γίνεται πιο ανεξάρτητη), οι πληροφορίες που αποκτώνται ανά μονάδα ατόμου στους αναδιασταυρούμενους πληθυσμούς μειώνονται δραματικά συγκρινόμενες με τους συγκυρίαρχους δείκτες. Οι αναδιασταυρώμενοι πληθυσμοί μπορούν να είναι χρήσιμοι για τους κυρίαρχους δείκτες που χρησιμοποιούνται στη χαρτογράφηση αν όλες οι θέσεις στον επανεμφανιζόμενο γονέα είναι ομόζυγες και ο δοτής και ο επανεμφανιζόμενος γονέας έχουν αντίθετους πολυμορφικούς αλληλόμορφους δείκτες (Reiter *et al.*, 1992).

Οι πληροφορίες που αποκτώνται από τους αναδιασταυρώμενους πληθυσμούς, που χρησιμοποιούν είτε συγκυρίαρχους είτε κυρίαρχους δείκτες, είναι λιγότερες από αυτές που αποκτώνται από F_2 πληθυσμούς διότι στους πρώτους σε αντίθεση με τους δεύτερους οι ανασυνδιασμένοι γαμέτες λαμβάνονται με δειγματοληψία ανά φυτό.

Οι αναδιασταυρούμενοι πληθυσμοί παρόλο αυτά, παρέχουν περισσότερες πληροφορίες (*se* λίγο κορεσμένους δείκτες) συγκρινόμενοι με τους RI γιατί η απόσταση μεταξύ των συνδεδεμένων θέσεων αυξάνεται στους RI πληθυσμούς (π.χ περίπου 15% του ανασυνδιασμού). Ο αυξημένος ανασυνδιασμός μπορεί να είναι επωφελής για

πληροφορίες περί στενών συνδέσμων αλλά μπορεί να είναι ανεπιθύμητος στην κατασκευή χαρτών με μικρό κορεσμό δεικτών.

Προγενετικοί έλεγχοι F_2 ατόμων συχνά χρησιμοποιούνται στην κατασκευή χαρτών όπου οι φαινότυποι δεν αντικατοπτρίζουν με συνέπεια τους γενότυπους (π.χ αντίδραση σε ασθένεια και πολλά χρήσιμα γνωρίσματα) ή όπου η έκφραση των γνωρισμάτων ελέγχεται από QTL.

Πρόσφατα, έχει αναπτυχθεί μια μέθοδος για την ραγδαία ταυτοποίηση των σχέσεων χρησιμοποιώντας την BSA (ανάλυση διαχωρισμού μεγέθους) (Michelmore *et al.*, 1991). Στην BSA δυο ανάμεικτα (bulked) δείγματα DNA λαμβάνονται από έναν διασπώμενο πληθυσμό που προέρχεται από απλή διασταύρωση. Αυτά τα bulks περιέχουν άτομα που είναι όμοια για κάποιο γνώρισμα (π.χ αντίσταση σε μια ασθένεια). Τα bulks εξετάζονται για πολυμορφισμούς DNA και αυτές οι διαφορές συγκρίνονται με ένα τυχαίο γενετικό υπόβαθρο από ασύνδετες θέσεις (loci). Συνεπώς, οι όποιες διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των δυο δειγμάτων bulks αποτελούν ένδειξη δεικτών που συνδέονται με κάποιο συγκεκριμένο χαρακτηριστικό. Η BSA ξεπερνά διάφορα προβλήματα που σχετίζονται με τη χρήση των NIL (NEARLY ISOGENIC LINES), η οποία απαιτεί πολλές αναδιασταυρώσεις για να αναπτυχθεί. Εκεί όπου μόνο ένα μέρος της πολυμορφικής θέσης αναμένεται να χαρτογραφηθεί σε μια επιλεγμένη περιοχή χρησιμοποιώντας τις NIL (π.χ το BC₅ μόνο 50%), περιοχές να είναι ασύνδετες με την περιοχή στόχο, δε θα διαφέρουν μεταξύ των δυο bulks δειγμάτων πολλών ατόμων στην BSA. Επιπλέον, όλες οι θέσεις που εντοπίζονται κατά τη διάρκεια της BSA θα διαχωριστούν και μπορούν να χαρτογραφηθούν, ελαχιστοποιώντας έτσι τα προβλήματα σύνδεσης με σύρσιμο (linkage drag problems) (Young και Tanksley, 1989).

5.2. Υπολογισμός των χιασμάτων και του ανασυνδιασμού γονιδίων.

Τα γεγονότα ανασυνδιασμού μπορούν να περιγραφούν ως το ποσοστό ανασυνδιασμού στους απογόνους. Μόνο κατά το ήμισυ τα μειωτικά προϊόντα θα είναι ανασυνδιασμένα όταν ένα χίασμα σχηματίζεται μεταξύ δυο θέσεων. Πολλαπλοί ανασυνδιασμοί μπορούν επίσης να εντοπιστούν μέσω επανάληψης των προγενετικών φαινοτύπων. Τα απλά ανασυνδιασμένα γεγονότα δεν είναι ανεξάρτητα και ο αριθμός των διπλών ανασυνδιασμένων γεγονότων είναι συνήθως μικρότερος από ότι προβλέφθηκε. Αυτή η θετική παρεμβολή ποικίλλει και εξαρτάται από τον οργανισμό, την ανασυνδιασμένη τοποθεσία, καθώς και περιβαλλοντικούς παράγοντες ή ποικίλλους άλλους παράγοντες. Γι' αυτό ακριβείς υπολογισμοί διπλών ανασυνδιασμών (crossing over) μπορούν να εξαχθούν

μόνο όταν η παρεμβολή λαμβάνεται υπόψη. Η παρεμβολή μετράται με τον συντελεστή σύμπτωσης, ο οποίος είναι μια έκφραση του λόγου των παρατηρούμενων διπλών ανασυνδιασμών προς εκείνες που προβλέφθηκαν (αναμενόμενες), από έναν χάρτη. Η αναμενόμενη συχνότητα διπλών ανασυνδιασμών είναι προβλέψιμη όταν δυο ανασυνδιασμοί είναι ανεξάρτητα γεγονότα ή αν η παρεμβολή μπορεί να μετρηθεί.

Η αναλογία του μέσου αριθμού των γεγονότων ανασυνδιασμού ορίζει την απόσταση δυο θέσεων στον χάρτη. Η σχέση μεταξύ απόστασης στον χάρτη και τιμής ανασυνδιασμών χαρακτηρίζεται από μια γενετική συνάρτηση χαρτογράφησης (mf). Η mf είναι μια σχέση που εκφράζει ποσοτικές σχέσεις μεταξύ των αποστάσεων στον χάρτη συνδέσεων χρησιμοποιώντας τις συχνότητες των ανασυνδιασμών. Υπάρχουν διάφοροι τύποι συναρτήσεων χαρτογράφησης που μπορούν να εφαρμοσθούν, και εξαρτώνται από τον υποτιθέμενο βαθμό παρεμβολής των ανασυνδιασμών που αντιπροσωπεύει καλύτερα τον πληθυσμό προς χαρτογράφηση. Οι πιο συνήθεις συναρτήσεις χαρτογραφίσεις αναπτύχθηκαν από τους Haldane (1919) και Kosambi (1944). Η mf του Haldane υποθέτει απουσία παρεμβολής ενώ του Kosambi λαμβάνει υπόψη υποθετική παρεμβολή.

Η συχνότητα των ανασυνδυασμένων γαμετών που παράγονται μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένας δείκτης της απόστασης μεταξύ δυο θέσεων σε ένα χρωμόσωμα. (1 μονάδα χάρτη= περίπου 1CM). Η απόσταση στον χάρτη, παρόλο αυτά δεν είναι τελείως προσθετική. Η προσθετικότητα βασίζεται στην υπόθεση ότι ο μέσος αριθμός των ανασυνδιασμών ανά χρωματίδιο που συμβαίνουν μεταξύ δυο θέσεων είναι απευθείας ανάλογος με την απόσταση μεταξύ δυο θέσεων. Η συχνότητα ανασυνδυασμών (ποσοστό) και η απόσταση στον χάρτη παρόλο αυτά δεν είναι απευθείας ανάλογα. Οι υπολογισμοί της συχνότητας των ανασυνδυασμών θα είναι πιο αξιόπιστοι όταν τα γονίδια είναι στενά συνδεδεμένα (από 1 ως 10 μονάδες χάρτη). Το ποσοστό ανασυνδυασμού είναι ισοδύναμο με την απόσταση στον χάρτη μόνο στο εύρος της ελάχιστης απόστασης για ανασυνδυασμό (έλλειψη προσθετικότητας), διότι οι διπλοί ανασυνδυασμοί συμβαίνουν με σημαντική συχνότητα. Η πραγματική απόσταση στον χάρτη μεταξύ δυο γονιδίων τείνει να υποεκτιμάται εξαιτίας του κλάσματος ανασυνδιασμού (r) (π.χ $r=0.10=10cMs$, $r=0.30=45.8cMs$, $r=0.35=60.2cMs$), όπως και στην περίπτωση των μεγάλων αποστάσεων (περίπου 40-50 μονάδες χάρτη) που τα δυο γονίδια θα είναι αυστηρώς ανεξάρτητα μεταξύ τους (Kosambi, 1944).

Μοριακοί γενετικοί δείκτες σήμερα είναι διαθέσιμοι για μια ποικιλία φυτικών ειδών, συμπεριλαμβανομένου και του βαμβακιού. Η χρησιμότητά τους έχει ξεπεράσει τις ανάγκες χαρτογράφησης και γενετικής αποτύπωσης στα πλαίσια της γενετικής

πληθυσμών, όπου η προσοχή επικεντρώνεται περισσότερο στις συχνότητες των αλληλομόρφων παρά στα άτομα καθ'αυτά. Η ποικιλομορφία στις συχνότητες των αλληλομόρφων ενδιαφέρει τους βελτιωτές επειδή η τροποποίησή τους με την επιλογή είναι σκοπός τους. Έτσι θεωρείται ότι μια ομάδα τυχαίων μοριακών δεικτών (δηλαδή τεμάχια DNA), θα είναι αντιπροσωπευτική του όλου γενώματος και λογικά θα συμπεριλαμβάνει και γονιδιακές θέσεις που κωδικοποιούν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που είναι αντικείμενο επιλογής. Η μελέτη της παραλλακτικότητας τέτοιων δεικτών επιτρέπει την γενετική κατάταξη των πληθυσμών ενδεικτικών της συγγένειάς τους και μπορεί ακόμη να οδηγήσει στην κατανόηση της φυλογενετικής ιστορίας τους και των αλλαγών που υπέστησαν κατά τη βελτίωσή τους.

Οι μοριακοί γενετικοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη ατόμων ή πληθυσμών προκειμένου να εκτιμηθούν διάφορες παράμετροι γενετικής παραλλακτικότητας, και/ή γενετική συγγένεια, γεγονότα που επιτρέπουν να εξαχθούν συμπεράσματα για τη δομή των πληθυσμών, για την ομαδοποίησή τους (clustering), για να γίνουν έλεγχοι ισοροπίας Hardy-Weinberg για αριθμό γονιδιακών θέσεων (multilocus equilibrium), καθώς και για μελετηθούν πολυμορφικές γονιδιακές θέσεις για ενδεχόμενη επιλεκτική ουδετερότητα (Neutrality) (Σχήμα 2).

Η ανάπτυξη των δεικτών DNA παρέχει νέα και ισχυρότερα εργαλεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στη διάκριση μεταξύ των genebank accessions.

5.3. Γενετικοί χάρτες στο βαμβάκι

Ένας γενετικός χάρτης θα μπορούσε να παρομοιασθεί με έναν οδικό χάρτη, που απεικονίζει τις σχετικές αποστάσεις μεταξύ γονιδιακών περιοχών. Αναλύοντας τον καρύοτυπο ενός οργανισμού, είναι ιδιαίτερα ωφέλιμο να εντοπισθούν και να περιγραφτούν όσο το δυνατόν περισσότερες γονιδιακές θέσεις και η σύνδεση τους ως ομάδες καθώς και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. (Paterson, 1996).

Τα τελευταία χρόνια με τη βοήθεια των μοριακών δεικτών (RAPD, RFLP, AFLP, SSR) οι γενετικοί χάρτες έχουν εμπλουτιστεί σημαντικά με γονιδιακές θέσεις που συνδέονται με σπουδαία αγρονομικά χαρακτηριστικά και δίκαια ονομάζονται μοριακοί γενετικοί χάρτες.

Οι γενετικοί χάρτες σύνδεσης είναι χρήσιμα εργαλεία για την μελέτη του γενώματος, των ομάδων σύνδεσης που προσδιορίζουν και τις θέσεις ανταλλαγής (χιάσματα).

Στην περίπτωση του βαμβακιού βρέθηκε ότι τα είδη *G.hirsutum* και *G. barbadense* παρουσιάζουν σημαντική παραλλακτικότητα για σημαντικά γνωρίσματα όπως η

παραγωγή ινών, η ανθεκτικότητα σε παράσιτα, και η ανοχή στις περιβαλλοντικές αντιξοότητες όπως η υψηλή και χαμηλή θερμοκρασία και η ξηρασία (EL- Zik and Thaxton, 1989).

Επιπλέον, άγρια είδη *Gossypium* περιέχουν πολλά πολύτιμα γνωρίσματα όπως η ανθεκτικότητα σε ασθένειες και έντομα, στο στρες και υψηλή ποιότητα ινών. Εντούτοις, η μεταφορά γονιδίων από τα άγρια είδη είναι μια χρονοβόρος διαδικασία χρόνος και όχι πάντα επιτυχής. DNA δείκτες και γενετικοί χάρτες που αξιολογούν την εισδοχή των ξένων γονιδίων μέσα σε καλλιεργούμενες ποικιλίες βαμβακιού θα επιταχύνει πολύ τις προσπάθειες βελτίωσης.

Η ανάπτυξη των γενετικών χαρτών βασίστηκε σε δείκτες που παραπέμπουν σε συγκεκριμένες θέσεις πάνω στα χρωμοσώματα. Οι δείκτες αυτοί μπορεί να είναι μορφολογικοί, βιοχημικοί (ισοένζυμα, πρωτεΐνες) ή μοριακοί (DNA).

Τα μορφολογικά γνωρίσματα είναι ενδεικτικά του φαινοτύπου αλλά αντιπροσωπεύονται μόνο από μερικές γονιδιακές θέσεις και αυτοί μπορούν επίσης να επηρεαστούν από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τις πρακτικές καλλιέργειας. Η βελτίωση της απόδοσης και της ποιότητας του βαμβακιού έχει κυρίως συνδεθεί για να βελτιώσει τη γενετική δυναμική. Σήμερα, έχουν προσδιορισθεί περίπου 145 μορφολογικοί δείκτες στο καλλιεργημένο βαμβάκι αλλά η χρησιμότητά τους στα προγράμματα βελτίωσης παραμένει περιορισμένη εξαιτίας του συνδυασμού πολλαπλών δεικτών σε έναν ενιαίο γενότυπο (Percy και Kohel, 1999).

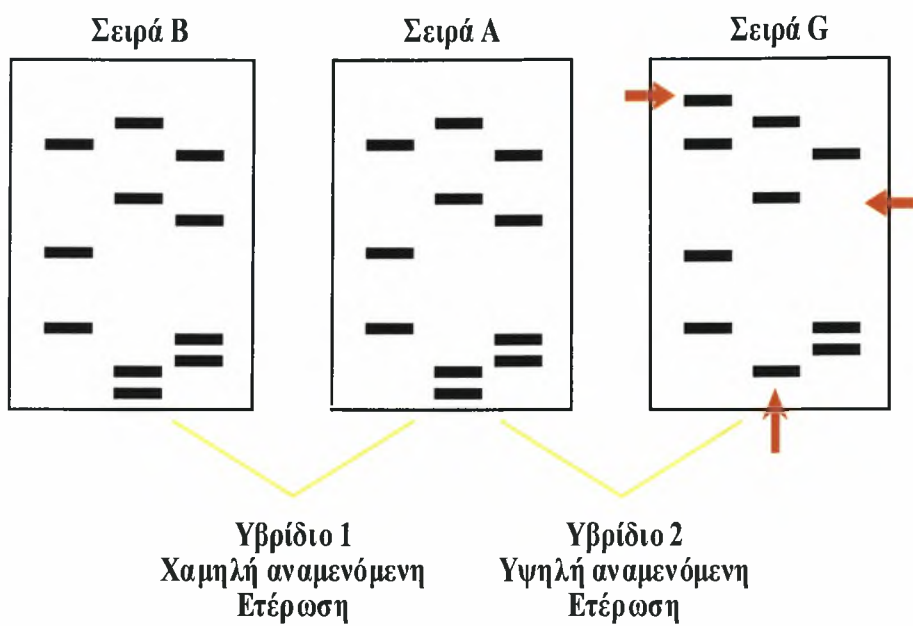
Για να υπάρξει μια ακριβής και αξιόπιστη εκτίμηση της γενετικής σχέσης και της γενετικής ποικιλομορφίας, απαιτείται ένας μεγάλος αριθμός πολυμορφικών δεικτών. Μεταξύ μιας μεγάλης συλλογής ποικιλιών βαμβακιού θα απαιτηθούν πολλοί γενετικοί δείκτες οι οποίοι είναι πολυμορφικοί. Ο Shanti *et al.*, (2001) έδειξε ότι οι μοριακοί δείκτες είναι οι πιο αξιόπιστοι δείκτες για την αποκατάσταση της γονιμότητας σε σχέση με τους μορφολογικούς δείκτες σε διάφορες σειρές βαμβακιού, κατά συνέπεια η χρήση γενετικών χαρτών που είναι κατασκευασμένοι από μοριακούς δείκτες θα είναι μια πολύ ισχυρή προσέγγιση στη βελτίωση των καλλιεργούμενων ειδών. Γενετικοί χάρτες σύνδεσης βασισμένοι στη χρήση δεικτών DNA προσφέρουν νέες ευκαιρίες στην αξιολόγηση και το χαρακτηρισμό του γενετικού υλικού για την καλύτερη χρησιμοποίησή του (Tanksley and McCouch, 1997). Μια νέα προσέγγιση είναι να ψάξει κανείς απ' ευθείας για τα ενδιαφέροντα γονίδια, αφού αφαιρέσει τους παράγοντες σφάλματος από άλλα μέρη του γονιδιώματος (Xiao *et al.*, 1995). Στο βαμβάκι, άρχισε ένα πρόγραμμα ανάλυσης του γονιδιώματος που θα παρέχει δείκτες για το χαρακτηρισμό του γενετικού

υλικού. Προηγούμενες έρευνες με ισοένζυμα και προκαταρκτική χρήση δεικτών DNA καθιέρωσαν το χαμηλό επίπεδο πολυμορφισμού στο ενδοειδικό *G. hirsutum*. Το πρόγραμμα γονιδιώματος που πραγματοποιήθηκε στο *Crop Germplasm Research Unit, College Station, Texas, USA* έχει αναπτύξει ένα γενετικό χάρτη στο βαμβάκι που περιλαμβάνει 868 δείκτες, από τους οποίους 256 δείκτες τύπου RFLPs, 152 δείκτες τύπου RAPDs, 198 δείκτες τύπου SSRs, 267 δείκτες τύπου AFLPs, και πέντε μορφολογικούς δείκτες που συγκεντρώνονται σε 50 ομάδες σύνδεσης και καλύπτουν 5000 cM του γονιδιώματος βαμβακιού (Kohel, 2000 Reddy *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1997; Yu).

Ο γενετικός χάρτης βαμβακιού είναι βασισμένος σε ενδοειδικές διασταυρώσεις του *G. hirsutum* (TM-1) και του *G. barbadense* (3-79) (Yu and Kohel, 2000), τα οποία είναι τα γενετικά πρότυπα για τα αντίστοιχα είδη τους (Kohel *et al.*, 1970 Kohel, 1973). Τα δύο τρίτα των ομάδων σύνδεσης έχουν προσδιοριστεί από την αντίστοιχη γονιδιακή προέλευση (A vs D) ή την χρωμοσωμική ταυτότητα τους (1-26) με την χρήση διπλοειδών και ανευπλοειδών φυτών βαμβακιού.

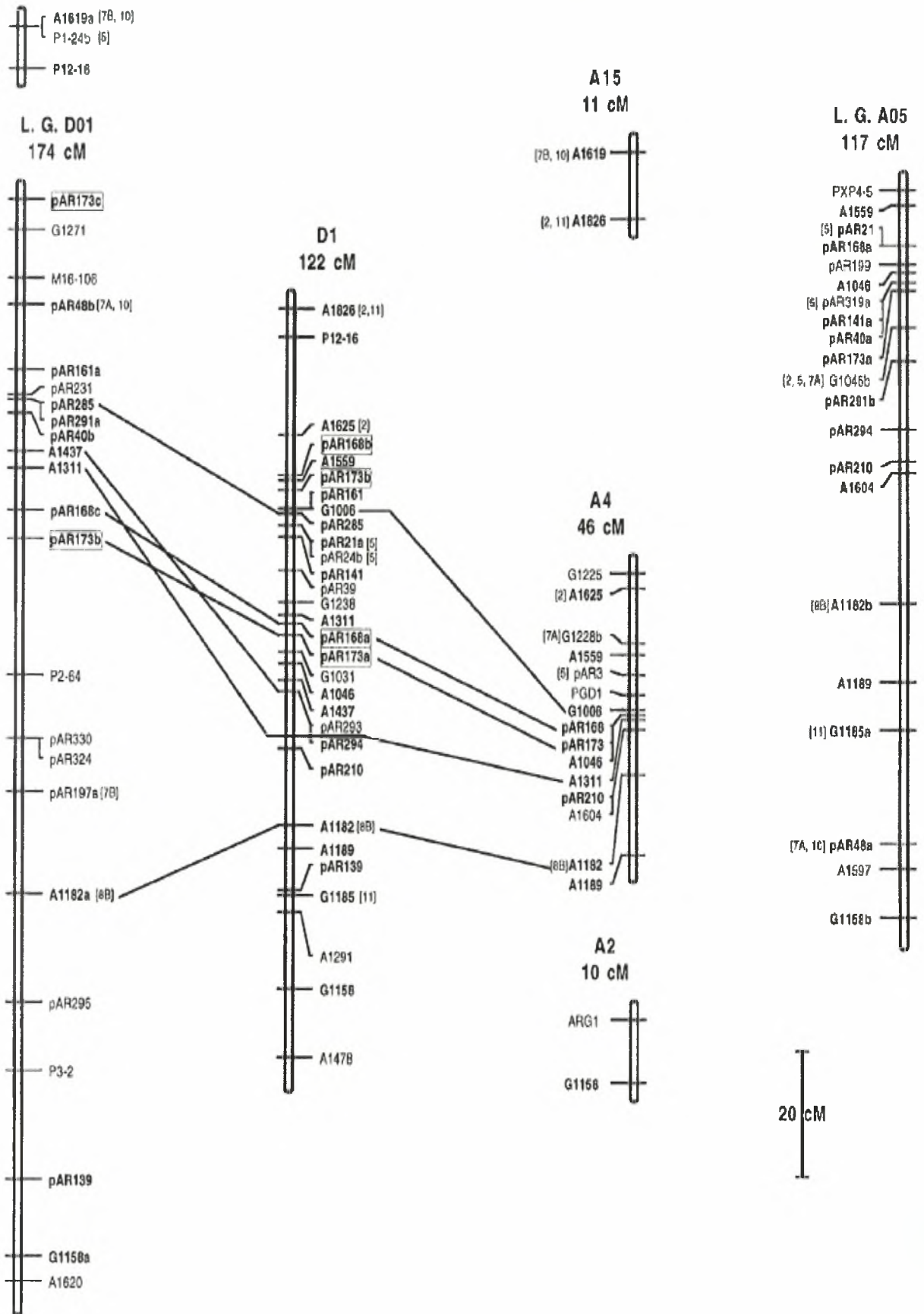
Δέκα τρεις γονιδιακοί τόποι ποσοτικών γνωρισμάτων (QTLs), για τις ιδιότητες που αφορούν την ποιότητα ινών (αντοχή, μήκος και λεπτότητα), έχουν προσδιοριστεί σε 3-79, μια εξαιρετικά μακρόνη ποικιλία βαμβακιού (Kohel *et al.*, 2000). Αυτά τα QTLs εξήγησαν το 35% -50% της συνολικής γενετικής παραλλακτικότητας για τα χαρακτηριστικά της ίνας στον πληθυσμό F2 (Yu *et al.*, 1998).

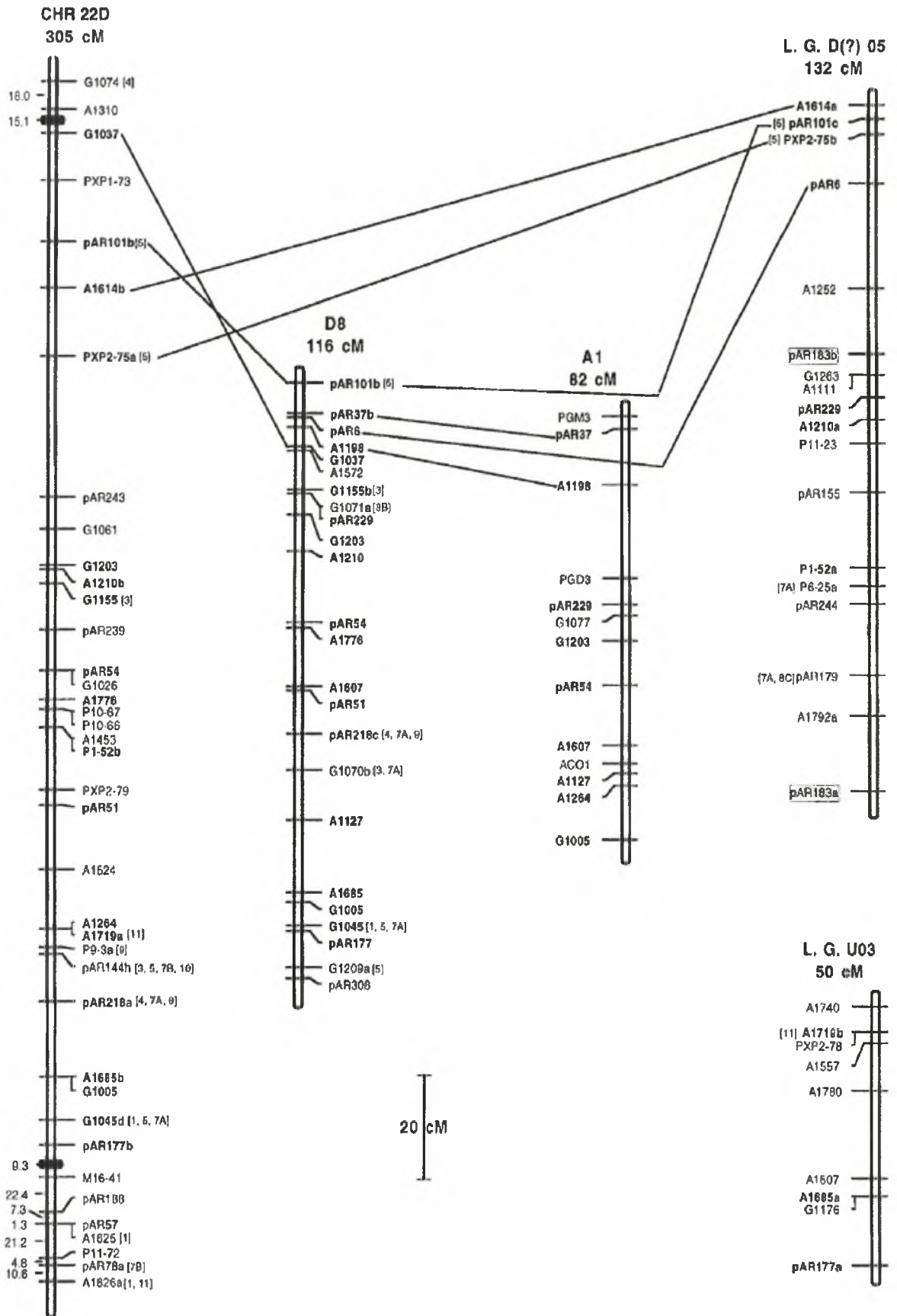
Οι μοριακοί χάρτες σύνδεσης που βασίζονται στους δείκτες DNA αναγνωρίζονται ευρέως σαν απαραίτητα εργαλεία για τη γενετική έρευνα σε πολλά είδη (Dudley, 1993). Ένας λεπτομερής μοριακός χάρτης γονιδιώματος του βαμβακιού έχει δημοσιευθεί από τους Reinisch *et al* (1994) οι οποίοι χρησιμοποίησαν διειδικές διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών *G. hirsutum* και *G. barbadense* για να εντοπίσουν με τη βοήθεια 705 RFLP δεικτών, γονιδιακές θέσεις (loci) που συγκεντρώνονται σε 41 ομάδες σύνδεσης και καλύπτουν 4675 cM του γονιδιώματος του βαμβακιού και απόσταση 7 cM μεταξύ των δεικτών (εικ. 5).

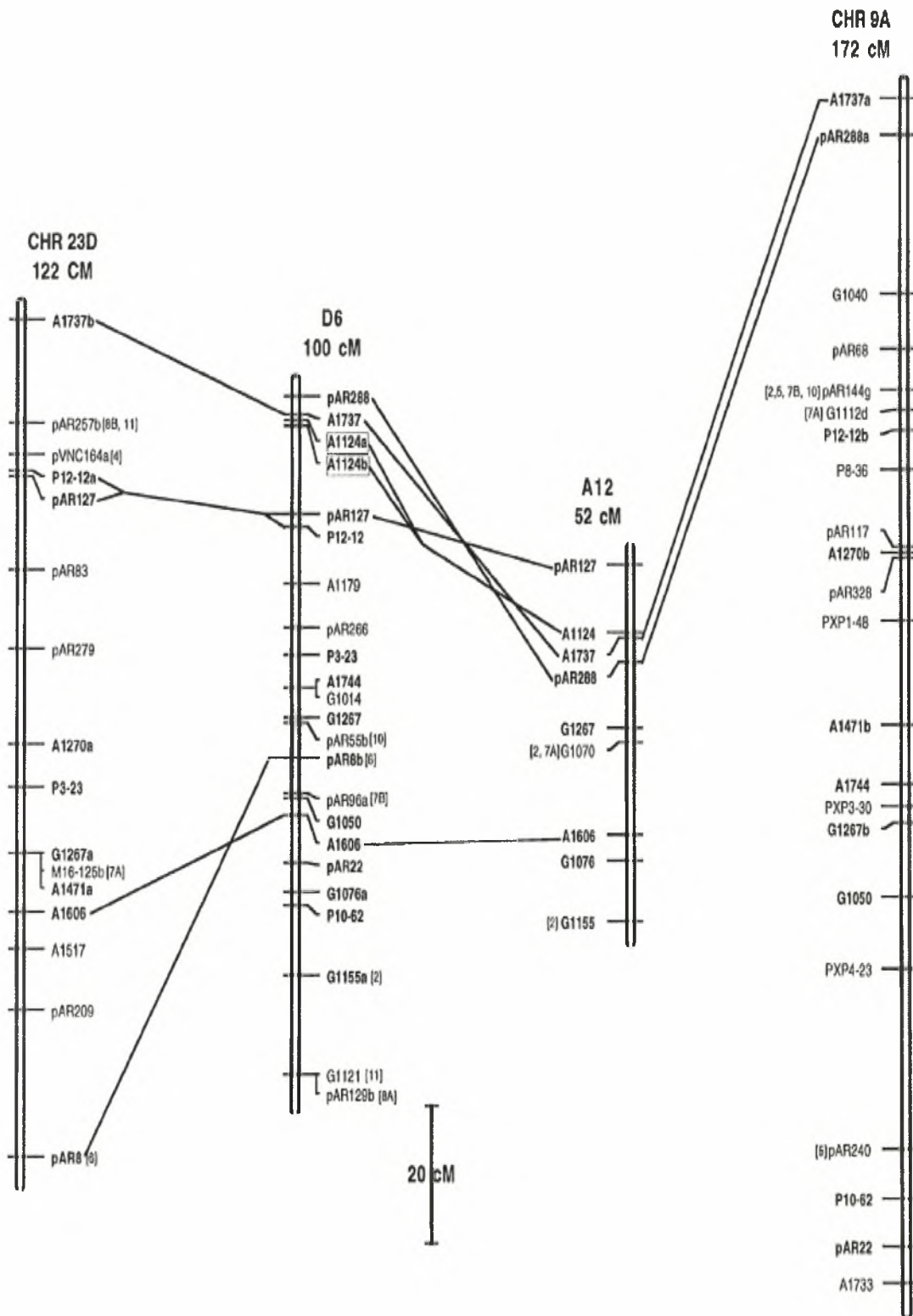


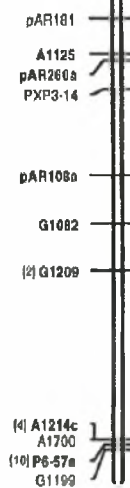
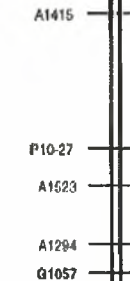
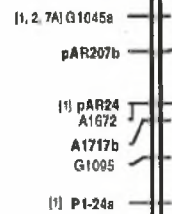
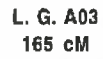
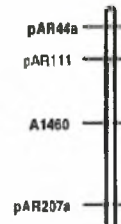
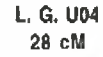
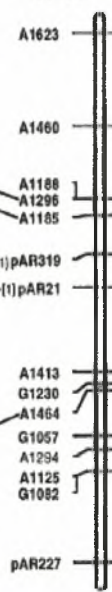
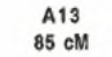
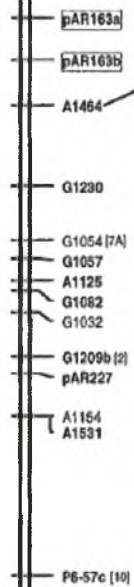
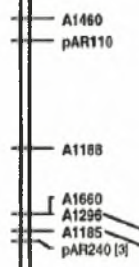
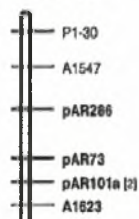
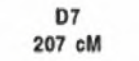
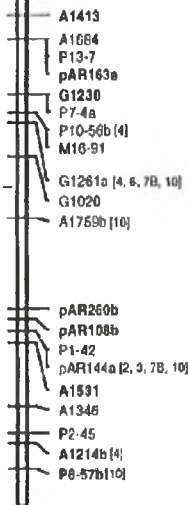
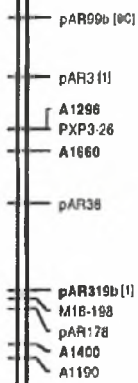
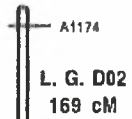
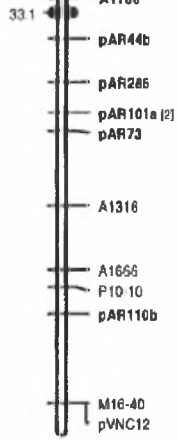
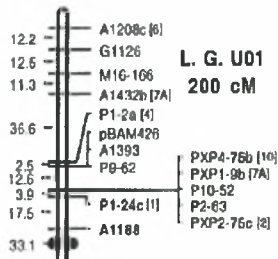
Σχήμα 3. Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων και επιλογή γονικών σειρών υβριδίων

Εικόνα 5. Γενετικός χάρτης στο βαμβάκι.









L. G. U06
19 cM



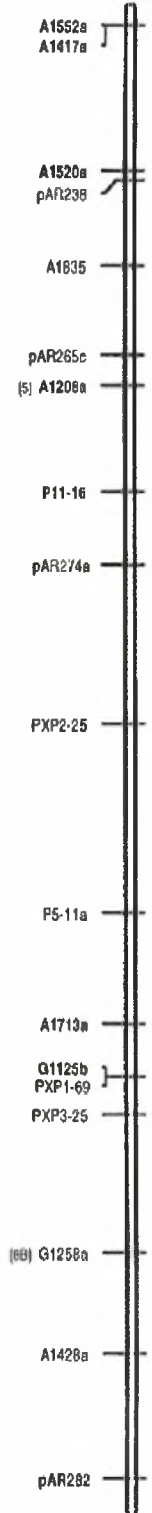
D18
5 cM



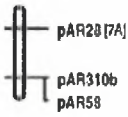
A17
27 cM



L. G. A01
206 cM



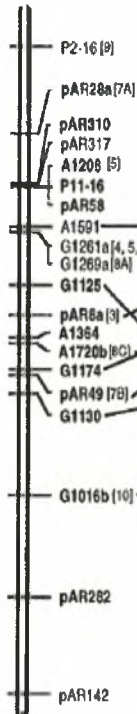
L. G. D09
7 cM



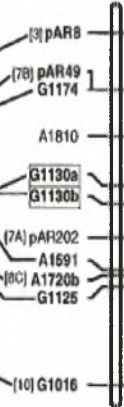
CHR 18D
21 cM



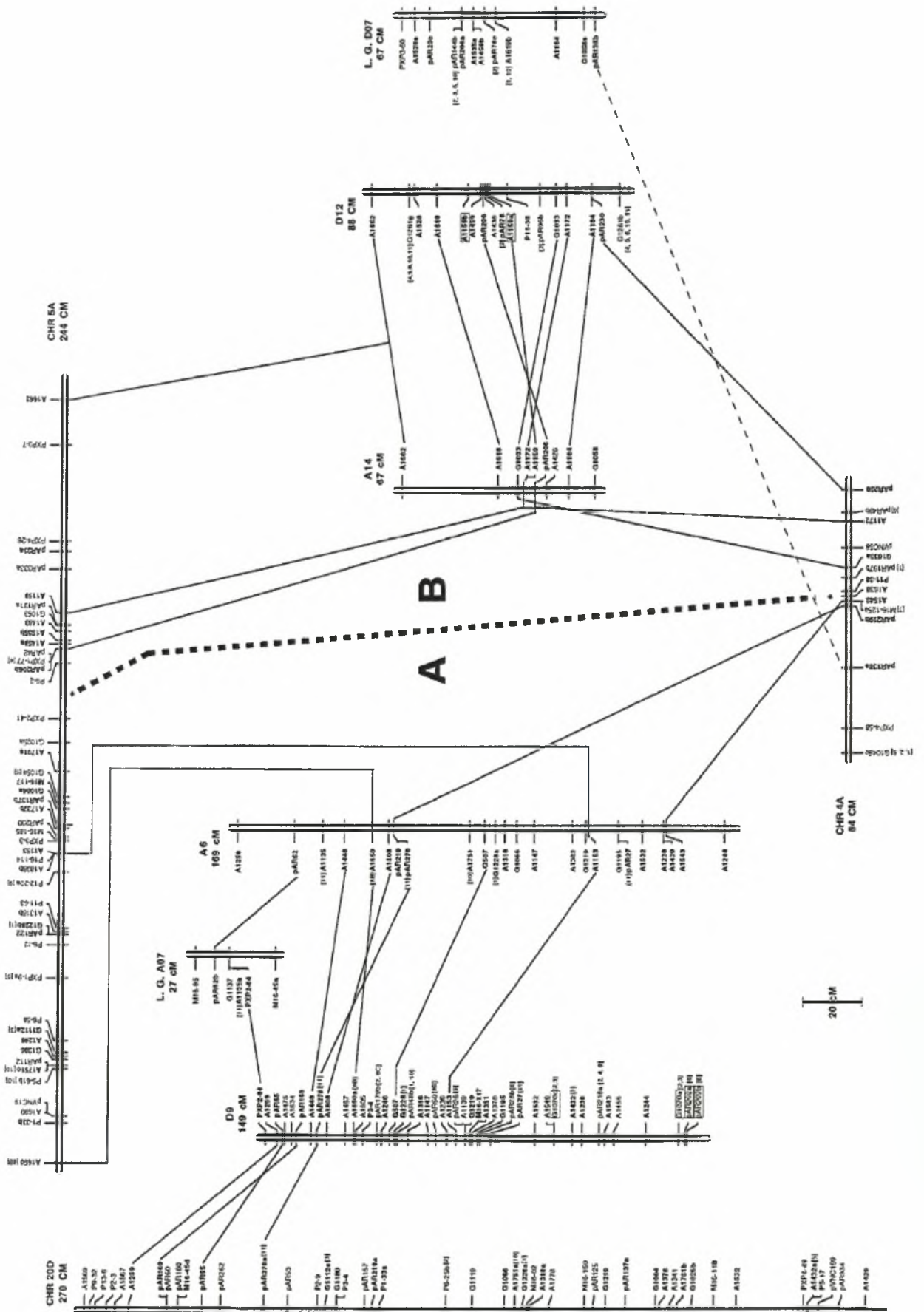
D13
93 cM



A10
51 cM



20 cM



6 Υλικά και Μέθοδοι

6.1 Γενετικό υλικό

Το γενετικό υλικό της εργασίας αποτέλεσαν συνολικά είκοσι επτά F₆ γενιάς μερικώς διειδικά υβρίδια βαμβακιού που προήλθαν από αμοιβαίες διασταυρώσεις μεταξύ γενοτύπων του ανήκουν στο είδος *G. hirsutum* (4S, Acala, Coker) και το είδος *G. barbadense* (B403, Carnak). Η έννοια των μερικώς διειδικών υβριδίων εκφράζεται εξαιτίας των ανακατατάξεων στο γενετικό υλικό λόγω της επικονίασης των F₁ υβριδίων με το συγγενές είδος *Hibiscus cannabinus*. (Πίνακας 4).

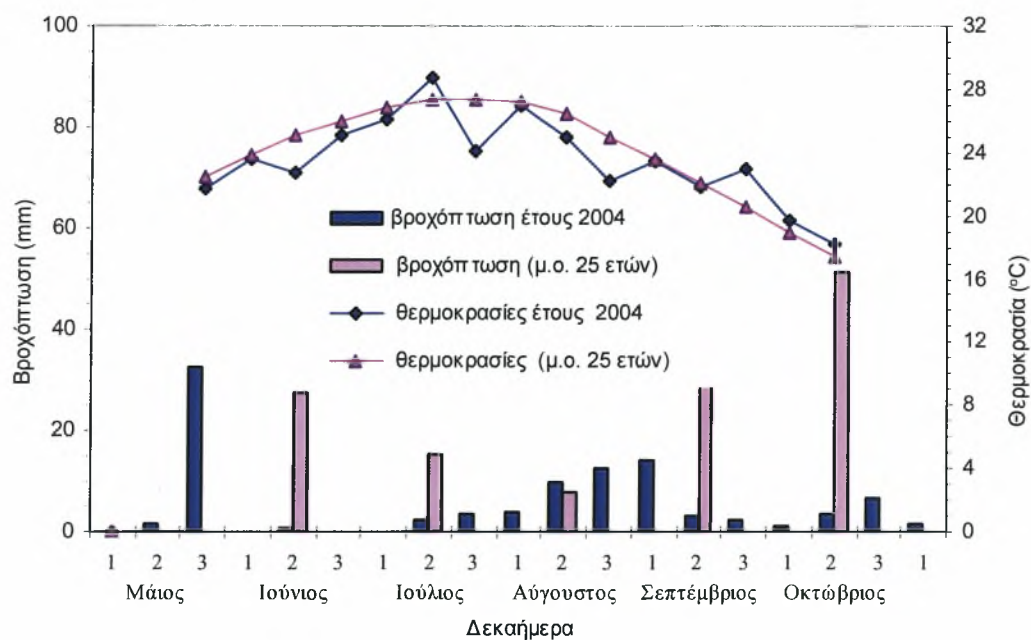
Πίνακας 4. Γενεολογία φυτικού υλικού που αξιολογήθηκε και κωδικοποίηση κατά τα έτη 2003, 2004.

	1998	2003	2004
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		27	1
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		1	2
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		22	3
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		14	4
[(B403xCoker)xHib.cannabinus]		14	5
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		14	6
[(B403xCoker)xHib.cannabinus]		8	7
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		12	8
[(B403xCoker)xHib.cannabinus]		8	9
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		22	10
[(B403xCoker)xHib.cannabinus]		4	11
[(B403xCoker)xHib.cannabinus]		8	12
[(B403xCoker)xHib.cannabinus]		4	13
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		25	14
[(B403xCoker)xHib.cannabinus]		6	15
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		28	16
[(B403xAcala)xHib.cannabinus]		17	17
[(B403xCoker)xHib.cannabinus]		8	18
[(B403xCoker)xHib.cannabinus]		5	19
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		14	20
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		24	21
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		15	22
[(B403xAcala)xHib.cannabinus]		10	23
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		2	24
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		2	25
[(B403xCoker)xHib.cannabinus]		9	26
[(B403xCoker)xHib.cannabinus]		9	27
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		18	28
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		12	29
[(B403xCoker)xHib.cannabinus]		7	30
[(Carnakx4S)xHib.cannabinus]		29	31

6.2 Εγκατάσταση του πειράματος

Η αξιολόγηση έγινε σε συνθήκες αγρού κατά την θερινή περίοδο 2004. Το πείραμα εγκαταστάθηκε, στον πειραματικό αγρό του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο, που βρίσκεται σε γεωγραφικό πλάτος 39°23' και γεωγραφικό μήκος 22°45' κατά την καλλιεργητική περίοδο του έτους 2004. Ο αγρός την προηγούμενη χρονιά είχε καλλιεργηθεί με σιτάρι. Το έδαφος ανήκει στην υποομάδα Typic Xerochrept, με μηχανική σύσταση αργιλοπηλώδες, pH=7.9-8, οργανική ουσία 1.44%, P₂O₅ (κατά Olsen) 15-17 ppm και ολικό CaCO₃ 2.8-5.3% (Μήτσιος, 2000).

Τα μετεωρολογικά δεδομένα (θερμοκρασία αέρα και βροχόπτωση) καταγράφηκαν σε ωριαία βάση σε πλήρως αυτοματοποιημένο μετεωρολογικό σταθμό που υπήρχε σε απόσταση 50 μέτρων από τον πειραματικό αγρό. Στο σχήμα 2 παρουσιάζονται τα μετεωρολογικά δεδομένα θερμοκρασίας και βροχόπτωσης κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάπτυξης των βαμβακιών το 2004, και συγκρίνονται με τους αντίστοιχους μέσους όρους 25 ετών για την υπό μελέτη περιοχή.



Σχήμα 1. Μέση ημερήσια θερμοκρασία (°C, μ.ο. δεκαήμερου) και βροχόπτωση (mm ανά δεκαήμερο) στο Βελεστίνο κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου του έτους 2004.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2, το θέρους του 2004 δεν ήταν αρκετά υγρό με υποδιπλάσια περίπου βροχόπτωση (περίπου 250mm από τον Ιούνιο έως τον Σεπτέμβριο) από ένα μέσο θέρους. Ιδιαίτερα βροχεροί ήταν οι μήνες Μάιος, το 3^ο δεκαήμερο του Αυγούστου με βροχόπτωση 34 και 12.4 mm, αντίστοιχα.

Η σπορά η οποία πραγματοποιήθηκε στις 04/05/2004, έγινε με το χέρι, σε γραμμές των 8 m, που απείχαν μεταξύ τους 90 cm. Σε κάθε σειρά τοποθετήθηκε σπόρος από μια διασταύρωση ή ένα φυτικό είδος. Οι αποστάσεις μεταξύ των φυτών βαμβακιού επάνω στη γραμμή ήταν 15 cm, ενώ σε κάθε θέση τοποθετήθηκε ένας σπόρος σε βάθος 5 cm.

Καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου εφαρμόζονταν επισταμένα όλες οι απαραίτητες φροντίδες (ποτίσματα, λιπάνσεις, ψεκασμοί, σκαλίσματα κ.λπ.) για τη σωστή ανάπτυξη των φυτών και τη διατήρηση της ευρωστίας τους, σε όλη τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου. Το αραίωμα έγινε με το χέρι στις 12/7/2004 και η κάθε σειρά αποτελούνταν από 14 φυτά βαμβακιού. Η συγκομιδή του σύσπορου βαμβακιού, που έγινε με το χέρι, ολοκληρώθηκε σε δυο σταδία, κατά τις χρονικές περιόδους από 15 έως 17/11 και από 3 έως 4/12.

6.3 Μετρήσεις και παρατηρήσεις

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

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

6.4 Αξιολόγηση γενοτύπων με την βοήθεια μοριακών δεικτών

Για την αξιολόγηση του γενετικού υλικού με μοριακούς δείκτες RAPD'S ελήφθησαν δείγματα φύλλων από το σύνολο των φυτών για κάθε γενότυπο στις 10/7/04. Έτσι δημιουργήθηκε ένα μίγμα DNA (bulk) που εκφράζει συγκεκριμένη σειρά. Επίσης ελήφθησαν δείγματα από τις ποικιλίες Carnak και 4S οι οποίοι είναι μητρικοί γενότυποι με σκοπό τη σύγκριση και τη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας σε σειρές που περιέχουν τους δύο γονείς καθώς και σε ανεξάρτητες σειρές.

6.4.1 Απομόνωση DNA

Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από ιστό νεαρών, υγιών φύλλων, βάρους 0,3 γρ. για κάθε δείγμα, σύμφωνα με την CTAB μέθοδο για απομόνωση ολικού DNA όπως προτάθηκε από τους Edwards et al. (1991). Το απομονωμένο DNA διαλύθηκε σε 200 μl TE διαλύματος (10 mM TRIS-HCl, 1 mM Na₂ EDTA, pH 8.0).

6.4.1.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός DNA

Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους/ορατού με απορρόφηση των δειγμάτων στα 260 nm. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των δειγμάτων έγινε με απορρόφηση στα 280 nm για να εκτιμηθεί το επίπεδο παρουσίας πρωτεϊνών στο δείγμα από το λόγο 260/280nm. Ο μέσος όρος της συγκέντρωσης του DNA των δειγμάτων, υπολογίστηκε στα 100 ng/μl. Οι παραπάνω εκτιμήσεις, επιβεβαιώθηκαν και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% με πρότυπο δείγμα DNA σαν μάρτυρα.

6.4.1.2 Ανάλυση κατά RAPD

Σε κάθε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιήθηκαν 150 ng γενωμικού DNA σαν μήτρα, 2.5 μl 10x PCR buffer (Minotech), 0.625uM από 10-νουκλεοτιδικό RAPD εκκινητή (Operon Tech.), 2 mM MgCl₂, 150 μM dNTPs και 1.5U Taq DNA πολυμεράσης (Minotech), ενώ η αντίδραση ρυθμίστηκε σε 25 μl τελικό όγκο με αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό (ddH₂O).

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν:

1. Προ-αποδιάταξη στους 95 °C για 8 λεπτά.
2. 35 κύκλοι που αποτελούνταν από: Αποδιάταξη στους 94 °C για 1 λεπτό. Επικόλληση των εκκινητών στους 35 °C για 1 λεπτό. Επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72 °C για 1.30 λεπτό
3. Τελική επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72 °C για 10 λεπτά.

Τα προϊόντα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για κάθε γενότυπο, αναμίχθηκαν με 2μl διαλύματος φόρτωσης και ηλεκτροφορήθηκαν για 1 ώρα σε πηκτή αγαρόζης 1% στην οποία είχε προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφήθηκε μετά την καταγραφή των πολυμορφισμών των δειγμάτων.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την χρήση του προγράμματος *NTSYS*, μετά την κωδικοποίηση των μοριακών δεδομένων. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία ζώνης αντιπροσωπεύτηκε με (1) και η απουσία με (0). Στη συνέχεια ο υπολογισμός της γενετικής ομοιότητας των δειγμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο του *JACARD* $S_{ij}=a/(a+b+c)$ (Sneath and Sokal, 1973) και *DICE* $S_{ij}=2a/(2a+b+c)$ (Nei and Li, 1979) όπου:

1. S_{ij} : η γενετική ομοιότητα των δειγμάτων *i* και *j*.
2. *a*: το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα *i* και στο δείγμα *j*.
3. *b*: το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα *i* και στο δείγμα *j*.
4. *c*: το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα *j* και στο δείγμα *i*.

Με βάση τις μήτρες γενετικής ομοιότητας, κατασκευάστηκαν δενδρογράμματα φυλογενετικής ανάλυσης με την μέθοδο *NEIBORJOIN* και με την μέθοδο *UPGMA*. Τελικά επιλέχθηκε η μέθοδος *NEIBORJOIN* ως καταλληλότερη και περισσότερο αντιπροσωπευτική για τα δεδομένα.

6.5 Στατιστική ανάλυση

Οι μετρήσεις κάθε χαρακτηριστικού έγιναν για κάθε φυτό χωριστά. Τελικά, για κάθε πληθυσμό και για το μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των φυταρίων που επιβίωσαν ως το τέλος κάθε πειράματος. Τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το MSTATC για MS-DOS και τα EXCEL και JMP για WINDOWS. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με την ανάλυση διακύμανσης ANOVA1 και η εκτίμηση της εντός και μεταξύ των πληθυσμών διακύμανσης, επέτρεψε τον υπολογισμό των γενετικών παραμέτρων.

Σύμφωνα με το σχεδιασμό, η στατιστική ανάλυση ακολούθησε το τυχαίο πρότυπο των Steel and Tomie (1980):

Πίνακας 2. Συνδυασμένη ανάλυση που αφορά πείραμα

ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	ΒΕ	ΜΕΣΑ ΤΕΤΡΑΓΩΓΑ	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΜΕΣΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΑ
Μεταξύ γενοτύπων	$P-1$	M_1	$s^2_w + rs^2_g$
Εντός γενοτύπων	$N-P$	M_2	s^2_w
Σύνολο	$N-1$		

s^2_g =γενετική διακύμανση

$s^2_p = s^2_e + s^2_g$ =φαινοτυπική διακύμανση

r =αριθμός μετρήσεων γενοτύπου

s^2_w =η παραλλακτικότητα εντός των σειρών

Η φαινοτυπική παραλλακτικότητα του υβριδίου αποτελεί το σφάλμα του πειράματος (s^2_e) και στα χαρακτηριστικά που είναι μικρότερο του σ_w^2 το υπόλοιπο τμήμα του σ_w^2 αποτελεί το γενετικό κομμάτι εντός των γενοτύπων.

Η στατιστική ανάλυση που ακολούθησε έκανε δυνατή την εκτίμηση πολλών παραμέτρων για κάθε γενότυπο χωριστά αλλά και συνολικά σε σχέση με το μάρτυρα: εκτιμήθηκαν οι μέσοι όροι, οι συντελεστές παραλλακτικότητας και οι γενετικές παράμετροι σ_g^2 , s^2_p , ο γενετικός συντελεστής παραλλακτικότητας για κάθε πληθυσμό χωριστά και ο συνδυασμένος $GCV = \{(vs^2_g/MO_{\text{πληθυσμού}})*100\}$. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος του υβριδίου και ο συντελεστής κληρονόμησης $H = \{s^2_g / s^2_p\}$ με την ευρεία έννοια.

Επίσης, μέσω σύγκρισης των τιμών κάθε γενότυπου με την τυπική απόκλιση του μάρτυρα υπολογίστηκε έμμεσα αν υπάρχουν διαφορές εντός του γενότυπου. Για να

εκτιμηθεί η γενετική παραλλακτικότητα εντός κάθε σειράς, από τη φαινοτυπική του παραλλακτικότητα αφαιρέθηκε η διακύμανση εντός του υβριδίου. Αυτή η εκτίμηση μπορεί να γίνει διότι η παραλλακτικότητα που εμφανίζει ο μάρτυρας αποτελεί την παραλλακτικότητα λόγω περιβάλλοντος, λόγω του ότι είναι υβρίδιο και άρα όλα τα φυτά του έχουν τον ίδιο γενότυπο.

Για κάθε χαρακτηριστικό όσον αφορά κάθε πληθυσμό χωριστά αλλά και συνολικά έχουν δημιουργηθεί ιστογράμματα συχνοτήτων και συγκρίθηκαν με το μάρτυρα.

Τέλος, υπολογίστηκαν οι φαινοτυπικές συσχετίσεις όλων των χαρακτηριστικών μεταξύ τους για όλους τους γενοτύπους συνολικά.

6.6 Μοριακή στατιστική ανάλυση

Κατά την μοριακή εξέταση των υπό εξέταση δειγμάτων και οι 10 εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίασαν πολυμορφικά προϊόντα ενίσχυσης γι' αυτό και χρησιμοποιήθηκαν όλοι της για την περαιτέρω ανάλυση. Τα προϊόντα ενίσχυσης που εμφανίστηκαν στην πηκτή αγαρόζης αποτυπώθηκαν σε πίνακες όπου σημειώθηκαν η παρουσία (1) ή η απουσία (0) των αντίστοιχων ζωνών (ζεύγη βάσεων) για κάθε εκκινητή και δείγμα. Υπολογίστηκε το ποσοστό (%) παρουσίας της κάθε ζώνης εντός και μεταξύ κάθε πληθυσμού αλλά και εντός του γενοτύπου.

Με το πρόγραμμα Popgene32 (Yeh and Boyle, 1997) εκτιμήθηκε η γονιδιακή παραλλακτικότητα σύμφωνα με το Nei (1979) καθώς και το ποσό των πολυμορφικών θέσεων σε κάθε έναν από τους μελετώμενους γενοτύπους.

Το πρόγραμμα NTSYS-pc2 (Rohlf, 2000) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθούν τα μοριακά δεδομένα του πειράματος με σκοπό να σχηματισθεί δενδρόγραμμα γενετικής ομοιότητας των πληθυσμών. Για την εξαγωγή του δενδρογράμματος δοκιμάστηκαν ο συντελεστής ομοιότητας του Jaccard και ο συντελεστής ομοιότητας των Nei-Li με δύο διαφορετικές προσεγγίσεις: την προσέγγιση UPGMA (Unweighted pair-group method of arithmetic average) και την προσέγγιση του Neighbourjoining. Σύμφωνα με της Smith *et al.* (1990) η καλύτερη επιλογή εκτιμητή γενετικής απόστασης για χρήση σε RAPD δεδομένα εξαρτάται από τη σχετική ποσότητα και ποιότητα των πληροφοριών που παρέχει η κάθε σύγκριση για την εκτίμηση του πολυμορφισμού των αλληλουχιών. Ο συνδυασμός δείκτη-προσέγγισης που απέφερε το δενδρόγραμμα με τη μεγαλύτερη συσχέτιση με τον αρχικό πίνακα των δεδομένων ήταν που υπολογίστηκε με τον αλγόριθμο του Jaccard και το μοντέλο UPGMA ($r=0.87$). Συνδυασμός της χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Επίσης έγινε ανάλυση της μοριακής διακύμανσης μεταξύ και ανάμεσα της γενοτύπους υπολογίστηκε με την τεχνική της AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) στο πρόγραμμα Arlequin (Schneider *et al.*, 2001).

Το πρότυπο ανάλυσης ήταν:

Πίνακας 3

ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	ΒΕ	ΜΕΣΑ ΤΕΤΡΑΓΩΓΑ	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΜΕΣΑ ΤΕΤΡΑΓΩΓΑ
Μεταξύ πληθυσμών	$P-1$	SSD(AP)	$ns^2_a+s^2_b$
Εντός πληθυσμών	$N-P$	SSD(WP)	s^2_b
Σύνολο	$N-1$	SSD(T)	s^2_T

Όπου

SSD(AP): Το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων μεταξύ πληθυσμών

SSD(WP): Το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων εντός πληθυσμών

SSD(T): Συνολικό άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων

P : Συνολικός αριθμός πληθυσμών

N : Συνολικός αριθμός των ατόμων για γενοτυπικά δεδομένα ή συνολικός αριθμός αντιγράφων γονιδίων για απλοειδικά δεδομένα.

$$n = \frac{N - \sum_p N_p^2 / N}{P - 1}$$

$$F_{ST} = \frac{s^2_a}{s^2_T}$$

Οι επιδράσεις της υποδιαίρεσης ενός πληθυσμού μπορούν να ποσοτικοποιηθούν μέσω ενός δείκτη, του F_{ST} ο οποίος ορίζεται ως η μείωση στην ετερωζυγωτία σε έναν υποπληθυσμό λόγω μη τυχαίας διασταύρωσης σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό

(González-Candelas F., & C. Palacios, 1995).

Η s^2_T , η συνολική μοριακή διακύμανση είναι το άθροισμα του συστατικού της συνδυακόμενης που οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των απλοτύπων εντός πληθυσμού (s^2_b) και του συστατικού της συνδυακόμενης μεταξύ απλοτύπων σε διαφορετικούς πληθυσμούς μέσα σε μια ομάδα ($ns^2_a+s^2_b$)

Κατά την επιλογή δεικτών με τυχαία δειγματοληψία, υπάρχει σφάλμα δείγματος όταν η αναλογία των διαφορών στις θέσεις των δεικτών σε ένα τυχαίο υποδείγμα δεν αντιστοιχεί στην τιμή που λαμβάνεται αν εξεταστούν όλες οι θέσεις. Διάφορες μελέτες (Smith *et al.*, 1990, Tivang *et al.*, 1992) κατέληξαν στο συμπέρασμα πως όσο αυξάνονται οι RAPD ζώνες, τόσο μειώνεται ο συντελεστής παραλλακτικότητας του σφάλματος. Για μια γενετική απόσταση d που βασίστηκε σε RAPD ζώνες, η διακύμανση και το τυπικό σφάλμα δίνονται από τους δύο παρακάτω τύπους:

$$\text{Variance (d)} = nd(1-d)/(n-1)$$

$$\text{Estimated standard error} = [\text{var}(d)/n]^{1/2}$$

Μία από τις μεγαλύτερες ανησυχίες των ερευνητών είναι η επαναληψιμότητα του αποτελέσματος. Η επαναληψιμότητα του τρόπου που ένα συγκεκριμένο σετ RAPD δεδομένων οργανώνει το γενετικό υλικό μπορεί να μετρηθεί με έλεγχο της επαναληψιμότητας των διαφορών μεταξύ των γενετικών αποστάσεων. Το τυπικό σφάλμα της διαφοράς μεταξύ αποστάσεων θα είναι μία σχέση μεταξύ των διακυμάνσεων και της συνδιακύμανσης των αποστάσεων.

Για την αποφυγή μεγάλων σφαλμάτων θα πρέπει να λαμβάνονται μεγάλα δείγματα. Όμως τα μεγάλα δείγματα παρουσιάζουν και μεγαλύτερο κόστος. Έτσι, το σφάλμα δειγματοληψίας θα μπορούσε να μειωθεί αν μπορούσαν να επιλεγούν δείκτες που θα έδιναν πληροφορίες για ένα συγκεκριμένο πληθυσμό και δεν θα υπερεκτιμούσε ούτε θα υποβίβαζε τον αριθμό των δεικτών σε κάποια περιοχή του γενώματος (Skroch *et al.*, 1992).

Επίσης λόγω της κυριαρχικής συμπεριφοράς των RAPD δεικτών, δεν μπορεί να ξέρει κάποιος τη γενωμική τοποθεσία των ενισχυμένων τμημάτων εκτός αν κάθε τμήμα έχει χαρτογραφηθεί από μια ξεχωριστή ανάλυση διάσπασης (segregation analysis) (Thormann & Osborn, 1992).

Τυπικά, οι RAPD φαινότυποι (ή προφίλ) για πολλά είδη φυτών δείχνουν περισσότερα από ένα ενισχυμένα τμήματα (ζώνες) και η ένταση των τμημάτων αυτών συχνά διαφέρει αξιοσημείωτα. Σε διασπώμενους πληθυσμούς, όλοι οι τύποι των ενισχυμένων τμημάτων, από τα πιο έντονα ως τα πιο αμυδρά, μπορούν να δείξουν την παρουσία ή την απουσία πολυμορφισμού. Η segregation analysis προσφέρει ένα τέλειο μέσο εκτίμησης της επαναληψιμότητας των αντιδράσεων ενίσχυσης. Συγκρίσεις σε προφίλ διάσπασης ανάμεσα σε γενεές ή joint segregation analysis, αν είναι διαθέσιμος αρκετός αριθμός

δεικτών, παρέχουν ένα πολύ ισχυρό τεστ της αξιοπιστίας των RAPD δεικτών (Weeden *et al.*, 1992).

7 Μετρήσεις ποιοτικών χαρακτηριστικών της ίνας του βαμβακιού

7.1 Προετοιμασία δειγμάτων.

Από τα δείγματα του σύσπορου βαμβακιού που ελήφθησαν από τις γραμμές απόδοσης των πειραματικών τεμαχίων αποσπάστηκε ποσότητα 100 gr από το καθένα, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών της ίνας του κάθε τεμαχίου. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω.

Πίνακας 10. Τυπικά ποιοτικά χαρακτηριστικά ποιότητας *G.hirsutum* και *G. barbadense*

Χαρακτήρας ποιότητας	<i>G.hirsutum</i>	<i>G. barbadense</i>
Micronaire	4- 4.5	3.5
Μήκος (mm)	<32	>33
Pressley	<10	>10
Pn (µm)	>50	<50
MR	1	1

7.2 Εκκοκισμός σύσπορου βαμβακιού.

Η εργασία αυτή έγινε με εκκοκκιστική μηχανή βάμβακος SDL 010 (ΜΑΚΙΝΕΤΟ) με την οποία το σύσπορο βαμβάκι διαχωρίζεται σε ίνα και σπόρο καθώς περνάει από άξονα με πριόνια με δόντια που περιστρέφονται.

7.3 Μήκος και ομοιομορφία της ίνας.

Το μήκος και η ομοιομορφία προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του ειδικού οργάνου HVI (High Volume Instrument). Σύμφωνα με τη μέθοδο, ίνες από αντιπροσωπευτικά δείγματα βαμβακιού «πιάνονται» με ένα χτένι τυχαία σε κάποιο σημείο του μήκους τους, παραλληλίζονται και μετρώνται φωτοηλεκτρικά, σε διαφορά ποσοστά ινών, οι αποστάσεις

που εξεχουν οι ινες από το σημείο που έχουν πιαστεί. Συγκεκριμένα παίρνουμε τις τιμές του μήκους του 2.5% (2.5% Span Length) που αποτελεί το ελάχιστο μήκος σε χιλιοστά που μπορεί να έχει το 2.5% των μακρύτερων ινών του δείγματος. Ακόμα, υπολογίζεται το μήκος 50% (50% Span Length) που αποτελεί το ελάχιστο μήκος σε χιλιοστά που μπορεί να έχει το 50% των ινών του δείγματος, και τέλος ο λόγος του μήκους του 50% των ινών προς το μήκος του 2.5% που αποτελεί την ομοιομορφία του μήκους των ινών (Uniformity Ratio). Η τιμή του 2.5% των ινών αποτελεί και το μήκος που μετράμε ουσιαστικά και που μας ενδιαφέρει για τις μετρήσεις. Πρέπει όμως να συμπληρωθεί ότι πριν αρχίσουν οι μετρήσεις, είναι απαραίτητη η διαδικασία της βαθμονόμησης (calibration) της συσκευής με τη μέτρηση πρότυπων δειγμάτων με γνωστό μήκος ινών για την σωστή λειτουργία της συσκευής.

Πίνακας 13: Γενική περιγραφή για την ομοιομορφία του μήκους ίνας.

Περιγραφή	Ομοιομορφία % UR (Span Length 50% / 2.5%)	Δείκτης ομοιομορφίας UI (ML/UHML)
Πολύ χαμηλή	41 και κάτω	77 και κάτω
Χαμηλή	41 – 43	77-79
Μέση	44- 46	80-82
Υψηλή	47-48	83-85
Πολύ υψηλή	48 και πάνω	85 και πάνω

(Πηγή: Βουλγαράκη, 1996).

7.4 Micronaire

Στον τεχνολογικό όρο «λεπτότητα» συμμετέχουν βασικά δυο παράμετροι της ίνας: η περίμετρος και η πάχυνση του δευτερογενούς τοιχώματος. Ωριμότητα ινών στην τεχνολογία είναι ο βαθμός σχετικής ράχυνσης των κυτταρικών τοιχωμάτων τους. Η πιο γνωστή μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της λεπτότητας σε συνδυασμό με την ωριμότητα είναι ο δείκτης Micronaire ο οποίος για τις ανάγκες της εργασίας προσδιορίστηκε με το όργανο MICRONAIRE SDL 019.

Η έναρξη των μετρήσεων πάντοτε αρχίζει με την μέτρηση γνωστών δειγμάτων-μαρτύρων, ώστε να διασφαλιστεί η πιστότητα της μεθόδου. Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίσταση μιας ορισμένης μάζας βαμβακιού (5g) στην διέλευση του αέρα. Τοποθετούμε 5g βαμβακιού μέσα στον μεταλλικό σωλήνα και τον κλείνουμε προσεκτικά και αεροστεγώς. Στη συνέχεια ρυθμίζουμε κατάλληλα το υγρό που υπάρχει μέσα στους

γυάλινους συγκοινωνούντες σωλήνες οι οποίοι ρυθμίζουν την πίεση αέρα, ώστε η στάθμη του ενός σωλήνα να μη ξεπερνάει ένα προκαθορισμένο όριο και μετρώντας τη στάθμη του δεύτερου αριθμημένου σωλήνα, και παίρνουμε την τιμή του οργάνου. Από κάθε πειραματικό τεμάχιο χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα βαμβακιού των 5g και έγιναν αντίστοιχα τρεις μετρήσεις για κάθε τεμάχιο. Από τις τρεις αυτές τιμές υπολογίστηκε ο μέσος όρος, ο οποίος μας έδωσε τελικά την τιμή του Micronaire του κάθε δείγματος.

Πίνακας 12 : Γενική περιγραφή για το micronaire

Κλίμακα micronaire	Πολύ λεπτό	Μέχρι 2.9
	Λεπτό	2.9 – 3.7
	Μέσο	3.8 – 4.6
	Ελαφρά αδρή	4.7 – 5.5
	“αδρή” (χονδρό)	5.6 και πάνω

(Πηγή: Spinlab, 1999).

7.5 Αντοχή της ίνας

Η εκτίμηση της αντοχής δέσμης ινών βαμβακιού στον εφελκυσμό έγινε με την συσκευή PRESSLEY SDL 019, ο οποίος υπολογίζει τον δείκτη Pressley. Το όργανο αποτελείται από τη συσκευή PRESSLEY (σπαστήρας), το σφιγκτήρα, δυο ζευγάρια σιαγώνες (κλιπς), ένα μαχαίρι, μια χτένα ενσωματωμένη στον σφιγκτήρα, μια λαβίδα, ένα στροφέα (κατσαβίδι) και ένα έλασμα ρύθμισης. Καταρχήν, πριν την έναρξη της μέτρησης της αντοχής των υπό εξέταση δειγμάτων, πρέπει να προηγηθεί η διαδικασία εξακρίβωσης της σωστής λειτουργίας του οργάνου. Αυτό γίνεται με τη χρήση πρότυπου δείγματος βαμβακιού γνωστών τιμών των ποιοτικών χαρακτηριστικών. Από το δείγμα αυτό αποσπάται μικρή ποσότητα ινών. Την ποσότητα αυτή των ινών την περνάμε κατ’ επανάληψη από την χτένα ώστε να προκύψει τελικά μια πολύ μικρότερη ποσότητα ινών, παράλληλων μεταξύ τους και ίσου περίπου μήκους, δηλαδή μια δέσμη ινών, η οποία στη συνέχεια τοποθετείται στις δυο εφαπτόμενες σιαγώνες, φροντίζοντας οι ίνες να είναι

τεντωμένες. Αφού σφιχτούν οι σιαγώνες με τον στροφέα ώστε να πιάνουν σταθερά τη δέσμη των ινών, κόβεται με το μαχαίρι ότι περισσεύει από την δέσμη έξω από τις σιαγώνες. Έτσι η δέσμη τώρα κρατάει ενωμένες τις σιαγώνες οι οποίες στη συνέχεια τοποθετούνται στη συσκευή Pressley. Ρυθμίζουμε τη συσκευή ώστε να βρίσκεται σε οριζόντια θέση και απελευθερώνουμε την ασφάλεια. Ένα βάρος κυλάει πάνω στο βαθμονομημένο στέλεχος της συσκευής μέχρι να σπάσει η δέσμη των ινών. Τότε το βάρος σταματάει να κυλάει και μας δίνει μια ένδειξη πάνω στο βαθμονομημένο στέλεχος. Κατόπιν ανοίγουμε τις σιαγώνες, συλλέγουμε τις σπασμένες πλέον ίνες με την τσιμπίδα και τις ζυγίζουμε σε ζυγό ακρίβειας. Διαιρώντας την ένδειξη του Pressley για το δείγμα δια του βάρους του, λαμβάνουμε μια τιμή. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται έξι φορές. Ο μέσος όρος των έξι αυτών τιμών διαιρείται με την τιμή του Pressley του δείγματος (αναγράφεται στη συσκευασία του πρότυπου αυτού δείγματος). Έτσι προκύπτει ο συντελεστής διόρθωσης που θα πρέπει να κυμαίνεται από 0,950 – 1,050. Από το κάθε δείγμα που θέλουμε στη συνέχεια να μετρήσουμε κάνουμε τρεις μετρήσεις ακολουθώντας την διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω. Τροποποιημένο όργανο είναι το Στελόμετρο (stelometer) που μετρά αμέσως την αντοχή και ελαστικότητα των ινών αλλά το Pressley δίνει πιο ομοιόμορφα αποτελέσματα (Γαλανοπούλου, 1995).

Βρίσκοντας τον μέσο όρο των δειγμάτων αυτών, τον πολλαπλασιάζουμε με τον συντελεστή διόρθωσης, και έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε την τιμή Pressley από τον πίνακα. Τιμές αποδεκτές στην κλίμακα της συσκευής Pressley – σπαστήρας για τον μάρτυρα είναι από 15,0 – 20,0 και για τα δείγματα από 14,5 – 20,9.

Πίνακας 11: Γενική περιγραφή για την αντοχή των ινών.

Περιγραφή	Pressley (χιλιάδες λίμπρες ανά τετρ. ίντσα)	Stelometer 1/8" (g / tex)
Πολύ χαμηλή	70 – 76	17 και κάτω
Χαμηλή	77 – 83	17 – 19
Μέση	84 – 90	20 – 22
Υψηλή	91 -97	23 – 25
Πολύ υψηλή	98 – 104	26 και πάνω

(Πηγή: Spinlab, 1999)

8 Αποτελέσματα και συζήτηση

8.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά F₆ φυτών

Μεταξύ των 27 μερικώς διειδικών υβριδίων που αξιολογήθηκαν, παρατηρήθηκε μεγάλη ομοιομορφία μεταξύ των φυτών σε ορισμένες σειρές, κάτι που αναμενόταν, στην περίπτωση των ομόζυγων σειρών ενώ βρέθηκαν και σειρές που εμφάνισαν μεγάλη ανομοιομορφία και αστάθεια στα μορφολογικά τους γνωρίσματα. Είναι γεγονός ότι παρουσιάστηκαν ορισμένες σειρές φυτών με γνωρίσματα τυπικά του είδους *G. hirsutum* (χρώμα άνθους κρεμ / λευκό, σχήμα φύλλου του είδους, μη ύπαρξη κηλίδας) και άλλες σειρές με χαρακτηριστικά του είδους *G. barbadense* (κίτρινο άνθος με κόκκινες κηλίδες, σχήμα φύλλου του είδους). Επίσης, υπήρξαν σειρές των οποίων τα φυτά εμφάνιζαν χαρακτηριστικά που δεν είναι δυνατό να αποδοθούν αμιγώς σε κάποιο από τα δυο είδη. Τα φυτά αυτά χαρακτηρίστηκαν ως φυτά "γέφυρες" μεταξύ των δυο ειδών.

Συγκεκριμένα, τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στο 7.4% των σειρών, πλησίαζαν με αυτά του είδους *G. hirsutum*, ενώ το 66.6% των σειρών είχαν γνωρίσματα που πλησίαζαν με τα αντίστοιχα του είδους *G. barbadense*. Τέλος, οι υπόλοιπες σειρές (25.9%), παρουσίαζαν μικτούς χαρακτήρες (λόγου χάριν τα φυτά των σειρών με τους γενοτύπους 21 και 30 και έντονη παραλλακτικότητα (πίνακας 4). Οι τελευταίες παρατηρήσεις είναι δυνατό να ληφθούν ως ενδείξεις ότι είναι εφικτή η δημιουργία μερικώς διειδικών υβριδίων που συνδιάζουν γνωρίσματα και από τα δυο είδη, αρκεί να γίνει σταθεροποίηση του γενετικού τους υλικού, κάτι που δύσκολα επιτυγχάνεται με τη συμβατική μεθοδολογία (Galanopoulou – Sendouca & Roupakias, 1995) ενώ παράλληλα μπορεί να συνεχιστεί η επιλογή για επιπλέον βελτίωση των σειρών.

Πίνακας 4 : Αξιολόγηση των μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού ως προς τη φαινοτυπική σταθερότητα με βάση μορφολογικούς δείκτες.

Γενότυπος	Τύπος φύλλου	Αριθμός φυτών εκτός τύπου (off type)	Σταθερότητα*
1	GB	3	B
2	GB / GH	3	B
3	GB	0	A
4	GB	0	A
5	GB / OKRA	0	A
6	GB / GH	2	B
7	GB	3	B
8	GB	3	B
9	GB	5	C
10	GB	2	A
11	GB	2	A
12	GB	2	A
13	GH	4	C
14	GB / OKRA	0	A
15	GB / GH	3	B
16	GH	0	A
17	GB	0	A
18	GB	7	C
19	GB	0	A
21	GB / GH	3	B
22	GB / GH	4	C
23	GB	0	A
25	GB	0	A
27	GB	0	A
28	GB / GH	4	C
29	GB / OKRA	1	A
30	GB / GH	4	C

* A= σταθερή 0-1 off type, B= μέσης σταθερότητας 2-3 off type, C= ασταθής >4 off.

8.2 Μελέτη μορφολογικών γνωρισμάτων

Η οπτική επιλογή των φυτών στις σειρές πραγματοποιήθηκε βάσει ορισμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών τους. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν αφορούσαν τον τύπο του φύλλου, το χρώμα του άνθους, την ύπαρξη κηλίδων στο εσωτερικό των πετάλων και το ύψος του φυτού. Συγκεκριμένα ως κριτήριο που τέθηκε ήταν η ομοιότητα των φυτών με το είδος *G. hirsutum* ή αντίστοιχα με το είδος *G. barbadense*. Μεταξύ του συνόλου των 14 φυτών ανά γραμμή οι θέσεις επιλογής πάνω στη γραμμή σποράς και ο χαρακτηρισμός παρουσιάζονται στον πίνακα 5. Συνολικά από τα 378 φυτά των 27 σειρών μελετήθηκαν τα 50, αριθμός που αντιστοιχεί σε ποσοστό επιλογής της τάξης του 13.22% .

Πίνακας 5 : Επιλεγμένα φυτά με μορφολογικούς δείκτες.

ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΘΕΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΧΡΩΜΑ ΑΝΘΟΥΣ	ΥΠΑΡΞΗ ΚΗΛΙΔΩΝ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ*
ΣΕΙΡΑ 1	ΘΕΣΗ 2	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 4	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 5	GB	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 7	GB	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 9	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ

ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΘΕΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΧΡΩΜΑ ΑΝΘΟΥΣ	ΥΠΑΡΞΗ ΚΗΛΙΔΩΝ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ*
ΣΕΙΡΑ 3	ΘΕΣΗ 1	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΟΧΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 2	GB	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 4	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 6	GB	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 7	GB	ΚΡΕΜ	ΟΧΙ	ΜΕΣΟ

ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΘΕΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΧΡΩΜΑ ΑΝΘΟΥΣ	ΥΠΑΡΞΗ ΚΗΛΙΔΩΝ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ*
ΣΕΙΡΑ 4	ΘΕΣΗ 2	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΟΧΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 3	GB	ΚΡΕΜ	ΟΧΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 8	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΟΧΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 9	GB	ΚΡΕΜ	ΟΧΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 10	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΟΧΙ	ΜΕΣΟ

ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΘΕΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΧΡΩΜΑ ΑΝΘΟΥΣ	ΥΠΑΡΞΗ ΚΗΛΙΔΩΝ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ*
ΣΕΙΡΑ 5	ΘΕΣΗ 8	GB/OKRA	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 9	GB/OKRA	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 10	GB/OKRA	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 11	GB/OKRA	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 12	GB/OKRA	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ

ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΘΕΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΧΡΩΜΑ ΑΝΘΟΥΣ	ΥΠΑΡΞΗ ΚΗΛΙΔΩΝ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ*
ΣΕΙΡΑ 7	ΘΕΣΗ 3	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 8	GB	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 9	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 11	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 14	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΟΧΙ	ΜΕΣΟ

ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΘΕΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΧΡΩΜΑ ΑΝΘΟΥΣ	ΥΠΑΡΞΗ ΚΗΛΙΔΩΝ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ*
ΣΕΙΡΑ 10		GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
		GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
		GB	ΚΡΕΜ	ΟΧΙ	ΜΕΣΟ
		GB	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
		GB	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ

ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΘΕΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΧΡΩΜΑ ΑΝΘΟΥΣ	ΥΠΑΡΞΗ ΚΗΛΙΔΩΝ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ*
ΣΕΙΡΑ 14	ΘΕΣΗ 2	GB/OKRA	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 3	GB/OKRA	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 5	GB/OKRA	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 6	GB/OKRA	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 7	GB/OKRA	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ

ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΘΕΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΧΡΩΜΑ ΑΝΘΟΥΣ	ΥΠΑΡΞΗ ΚΗΛΙΔΩΝ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ*
ΣΕΙΡΑ 16	ΘΕΣΗ 9	GH	ΛΕΥΚΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 10	GH	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 12	GH	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 14	GH	ΛΕΥΚΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 15	GH	ΛΕΥΚΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ

ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΘΕΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΧΡΩΜΑ ΑΝΘΟΥΣ	ΥΠΑΡΞΗ ΚΗΛΙΔΩΝ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ*
ΣΕΙΡΑ 19	ΘΕΣΗ 7	GB	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 8	GB	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 9	GB	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 12	GB	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 13	GB	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ

ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΘΕΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	ΧΡΩΜΑ ΑΝΘΟΥΣ	ΥΠΑΡΞΗ ΚΗΛΙΔΩΝ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ*
ΣΕΙΡΑ 29	ΘΕΣΗ 2	GB/OKRA	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 3	GB/OKRA	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 4	GB/OKRA	ΚΡΕΜ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 5	GB/OKRA	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ
	ΘΕΣΗ 6	GB/OKRA	ΚΙΤΡΙΝΟ	ΝΑΙ	ΜΕΣΟ

*110 cm και πάνω: υψηλό
90- 110 cm: μέσο
70 – 90 cm:χαμηλό

8.3 Εκτίμηση της πρωιμότητας άνθησης με βάση την απόδοση στο πρώτο χέρι

Η πρωιμότητα εκτιμήθηκε με βάση το ποσοστό πρώτης συγκομιδής. Βρέθηκαν σειρές μερικώς διειδικών υβριδίων που είχαν μεγάλο ποσοστό πρώτης συγκομιδής σε σχέση με τη συνολική απόδοση. Οι σειρές στις οποίες το προϊόν που συγκομίστηκε ξεπερνούς e το 70% χαρακτηρίστηκαν ως πρώιμες, ενώ οι σειρές με αντίστοιχο ποσοστό κάτω του 70%, ως όψιμες. Με βάση αυτό το κριτήριο ξεχώρισαν οι σειρές 3, 6, 7, 8 με ποσοστά πρώτης συγκομιδής 91.92, 83.7, 87.2 και 86.3 αντίστοιχα (πίνακας 6). Αντίθετα, οι σειρές με τους γενότυπους 10 και 18 χαρακτηρίστηκαν ως όψιμες. Αναλυτικότερα, βρέθηκαν σειρές που συνδύαζαν υψηλή συνολική απόδοση και είχαν μεγάλο ποσοστό πρώτης συγκομιδής αλλά και σειρές με χαμηλή συνολική απόδοση και μικρό ποσοστό πρώτης συγκομιδής. Εξαίρεση δείχνει να αποτελεί ο γενότυπος 12 που αν και έχει χαμηλό ποσοστό πρώτης συγκομιδής, έχει υψηλή συνολική απόδοση (Πίνακας 6).

8.4 Απόδοση των φυτών

Η απόδοση του βαμβακιού μπορεί να εκφραστεί ως ο μ.ο. της απόδοσης / φυτό σε κάθε σειρά, κυμάνθηκε από 89.62 g έως 203.00 g ανά φυτό. Από την ανάλυση παραλλακτικότητας, βρέθηκε ότι υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές για επίπεδο σημαντικότητας 95%. Οι περισσότερο αποδοτικοί γενότυποι ήταν οι 6, 7, 12, 22

και 25 με μέσο όρο απόδοσης 192.6g, 185.56g, 203.0g, 185.37g και 190.35g ανά φυτό, αντίστοιχα (Πίνακας 6).

Αναλυτικότερα, με βάση την απόδοση και την σταθερότητα, όπως αυτή εκφράστηκε με την τυπική απόκλιση που αποτελεί μέτρο της παραλλακτικότητας οι σειρές διακρίθηκαν σε τέσσερις κατηγορίες. Συγκεκριμένα υπήρχαν γενότυποι με υψηλή απόδοση και χαμηλή ή υψηλή παραλλακτικότητα (2 κατηγορίες) και γενότυποι με χαμηλή απόδοση και αντίστοιχες εκφράσεις παραλλακτικότητας (2 κατηγορίες). Οι σειρές που συνδύαζαν υψηλή συνολική απόδοση και χαμηλή τυπική απόκλιση ήταν οι 12 και 25. Οι περισσότερες από τις σειρές που μελετήθηκαν είχαν χαμηλή απόδοση και υψηλή τυπική απόκλιση γεγονός που αποδίδει αστάθεια αλλά και δυνατότητες επιπλέον επιλογής. Η κατάταξη των γενοτύπων ως προς την συνολική απόδοση με βάση το κριτήριο Duncan φαίνεται στον Πίνακα 8. Από τον πίνακα αυτό προκύπτει ότι επτά σειρές είναι υψηλοαποδοτικές (12, 6, 25, 7, 22, 16, 15) και διαφοροποιούνται σημαντικά από τους γενότυπους 1, 2, 3, 4, 8, 10, 28 και 29 που προκύπτει ότι είναι χαμηλοαποδοτικές.

Από τα δεδομένα του Πίνακα 7, προκύπτει ότι το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε, παρουσιάζει υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας με τιμή 0.78 για το χαρακτηριστικό της συνολικής απόδοσης. Η τιμή αυτή οφείλεται στην ανομοιομορφία του γενετικού υλικού που έχει ευρεία γενετική βάση και συδιάζει γονίδια από διάφορα γενώματα. Το γεγονός αυτό σε συνδιασμό με τον υψηλό συντελεστή γενετικής παραλλακτικότητας μας βοηθά να ασκήσουμε επιπλέον επιλογή στο αξιολογούμενο γενετικό υλικό. Η τιμή του GCV είναι 42.45% για το σύνολο της απόδοσης (g / φυτό). Επίσης, οι τιμές των σ^2g και GCV αφήνουν σημαντικά περιθώρια για γενετική πρόοδο (Πίνακας 7)..

Πίνακας 6. Πρωιμότητα σειρών με βάση το ποσοστό απόδοσης της πρώτης συγκομιδής

Γενότυπος	Απόδοση 1 ^ο χέρι (gr/φυτό)	Ποσοστό πρώτης συγκομιδής (%)	Συνολική απόδοση (gr/φυτό)	Χαρακτηρισμός πρωιμότητας*
1	71,28	74,31	95,91	1
2	102,72	76,74	133,84	1
3	109,40	91,92	119,01	1
4	90,06	70,6	127,46	2
5	111,52	81,9	136,09	1
6	161,25	83,7	192,65	1
7	161,87	87,2	185,57	1
8	77,38	86,3	89,62	1
9	82,32	60,1	136,78	2
10	61,07	54,1	112,86	2
11	89,88	64,7	138,88	2
12	121,40	59,8	203,00	2
13	119,19	70,4	169,10	2
14	96,72	62,8	153,85	2
15	125,86	70,85	177,64	1
16	136,67	74,3	183,87	2
17	107,16	67,9	157,69	2
18	88,19	59,3	148,51	2
19	98,51	63,2	155,75	2
21	90,34	61,4	147,10	2
22	122,38	66,00	185,38	2
23	101,16	68,6	147,42	2
25	138,04	72,5	190,36	2
27	101,22	63,7	158,73	2
28	57,72	61,8	93,06	2
29	50,71	55,5	91,25	2
30	109,13	71,3	153,02	2

* όπου 1 = πρώιμες >70% στο 1^ο χέρι, 2 = όψιμες ποικιλίες <70%.

Πίνακας 7. Γενετικές παράμετροι που αφορούν την απόδοση

	<i>Απόδοση 1^ο χέρι (gr/φυτό)</i>	<i>Απόδοση σύνολο (gr/φυτό)</i>
Γ.Μ.Ο.	103,08	147,57
H	0,76	0,78
GCV	50,92	42,45
S_p^2	3644,533	5019,5
S_e^2	889,1667	1094,5
S_g^2	2755,367	3925
S_x^-	13,80	15.31
C.V.(%)	50,1	38,83
F	***	***

*Επίπεδο σημαντικότητας 0.05

**Επίπεδο σημαντικότητας 0.01

***Επίπεδο σημαντικότητας 0.001

Πίνακας 8: Η κατάταξη των γενοτύπων με κριτήριο τη συνολική απόδοση (gr / φυτό) και σύμφωνα με το κριτήριο Duncan

Γενότυπος- Σειρά	Μέσος όρος
12	203,00
6	192,64
25	190,35
7	185,56
22	185,37
16	183,87
15	177,64
13	169,10
27	158,73
17	157,68
19	155,75
14	153,85
30	153,01
18	148,50
23	147,42
21	147,10
11	138,88
9	136,78
5	136,09
2	133,84
4	127,46
3	119,01
10	112,85
1	95,90
28	93,05
29	91,25
8	89,62

Πίνακας 9: Συνολική απόδοση (g / φυτό)

Γενότυπος	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Χαρακτηρισμός σειράς*
1	95,907	±36,49	Χα Χπ
2	133,841	±56,47	Χα Χπ
3	119,010	±55,08	Χα Χπ
4	127,461	±44,11	Χα Χπ
5	136,093	±54,11	Χα Χπ
6	192,646	±105,71	Υα Υπ
7	185,567	±91,16	Υα Υπ
8	89,624	±22,13	Χα Χπ
9	136,780	±67,94	Χα Υπ
10	112,855	±17,07	Χα Χπ
11	138,884	±52,77	Χα Χπ
12	203,000	±64,95	Υα Χρ
13	169,100	±64,21	Υα Υπ
14	153,850	±32,10	Χα Χπ
15	177,643	±74,77	Υα Υπ
16	183,871	±50,15	Υα Χπ
17	157,686	±68,80	Χα Υπ
18	148,507	±44,47	Χα Χπ
19	155,750	±32,47	Χα Χπ
21	147,100	±46,58	Χα Χπ
22	185,379	±49,63	Υα Χπ
23	147,421	±60,62	Χα Υπ
25	190,357	±67,48	Υα Χρ
27	158,732	±58,39	Υα Χρ
28	93,057	±27,25	Χα Χπ
29	91,250	±27,91	Χα Χπ
30	153,019	±47,19	Χα Χπ

* Χα = Χαμηλή συνολική απόδοση

Υα = Υψηλή συνολική απόδοση

Χπ = Χαμηλή τυπική απόκλιση

Υπ = Υψηλή τυπική απόκλιση

8.5 Ποιοτικά χαρακτηριστικά σειρών μερικώς διειδικών υβριδίων

Με βάση τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από το διαχωρισμό της ποιότητας της ίνας στα κύρια συστατικά της (lint index, λεπτότητα, μήκος, αντοχή, περίμετρος, ωριμότητα), διαφάνηκε ότι υπήρχαν φυτά με χαρακτηριστικά αντίστοιχα εκείνων του *G. hirsutum* καθώς επίσης και φυτά με χαρακτηριστικά του είδους *G. barbadense*. (Πίνακας 14).

Αναλυτικότερα:

- **Απόδοση σε ίνα (Lint index):** η τιμή της απόδοσης σε ίνα κυμάνθηκε από 27% έως 43%. Με αυτό το κριτήριο ξεχώρισαν οι γενότυποι 21 και 30 με αναλογία ίνας προς σπόρο, 43 και 42.7%, αντίστοιχα. Χαμηλότερη τιμή είχαν οι σειρές με τους γενότυπους 18 και 27 με ποσοστά ίνας 29 και 27% αντίστοιχα.
- **Μήκος (ίντσες):** οι τιμές όσον αφορά το μήκος της ίνας κυμάνθηκαν από 0.87 έως 1.2 ίντσες με την σειρά 12 να ξεχωρίζει. Οι περισσότερες σειρές σύμφωνα και με τον πίνακα 10 φαίνεται ότι έχουν μήκος αντίστοιχο με τις ποικιλίες του είδους *G. hirsutum* με εξαίρεση τους γενότυπους 12, 14 και 27 που έχουν μήκος ίνας που τείνει στο είδος *G. barbadense*.
- **Αντοχή (g / tex):** οι τιμές όσον αφορά την αντοχή της ίνας κυμάνθηκαν από 27 έως 34.97 g / tex. Φαίνεται να ξεχωρίζει ο γενότυπος 1 με τιμή 34.97g /tex. Αξιόλογες τιμές έδειξαν ακόμα και οι σειρές 16 και 30 με τιμές 33.9 και 30 αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα 11, όλες οι σειρές που αξιολογήθηκαν χαρακτηρίζονται ως "πολύ υψηλής αντοχής" της ίνας.
- **Micronaire:** οι τιμές ως προς αυτό το χαρακτηριστικό, κυμαίνονται από 2.83 έως 4.1. Με βάση την κλίμακα που παρουσιάζεται στον πίνακα 12, οι σειρές που αξιολογήθηκαν χαρακτηρίζονται από "λεπτό" έως "μέσο" micronaire. Οι γενότυποι 4 και 30 φαίνονται να ξεχωρίζουν με τιμές micronaire 4.1 και 4 αντίστοιχα (Πίνακας 14) . Με βάση το micronaire, ακόμη, και σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 10 οι σειρές των μερικώς διειδικών υβριδίων που αξιολογήθηκαν πλησιάζουν στα χαρακτηριστικά του είδους *G. barbadense* με εξαίρεση τις σειρές 4 και 30 που τείνουν προς το είδος *G. hirsutum*.

- **Ομοιομορφία (pct):** οι τιμές ως προς την ομοιομορφία κυμάνθηκαν από 79.7 έως 84.5 με τους γενότυπους 1 και 30 να δίνουν τις μεγαλύτερες τιμές, (Πίνακας 13). Σύμφωνα με την κλίκαμα που παρουσιάζεται στον πίνακα 17 οι σειρές που αξιολογήθηκαν χαρακτηρίζονται από “χαμηλή”, “μέση” και “υψηλή” ομοιομορφία της ίνας χωρίς να αγγίζουν ακραίες προς τα άνω ή προς τα κάτω τιμές.

Συμπερασματικά και σύμφωνα με τη συνολική αξιολόγηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών που αναλύθηκαν, φαίνεται ότι οι γενότυποι 1 και 30 συνδυάζουν υψηλές τιμές σε περισσότερα του ενός ποιοτικά χαρακτηριστικά (Πίνακας 14).

Πίνακας 14: Ποιοτικά χαρακτηριστικά μερικών διεδικών υβριδίων.

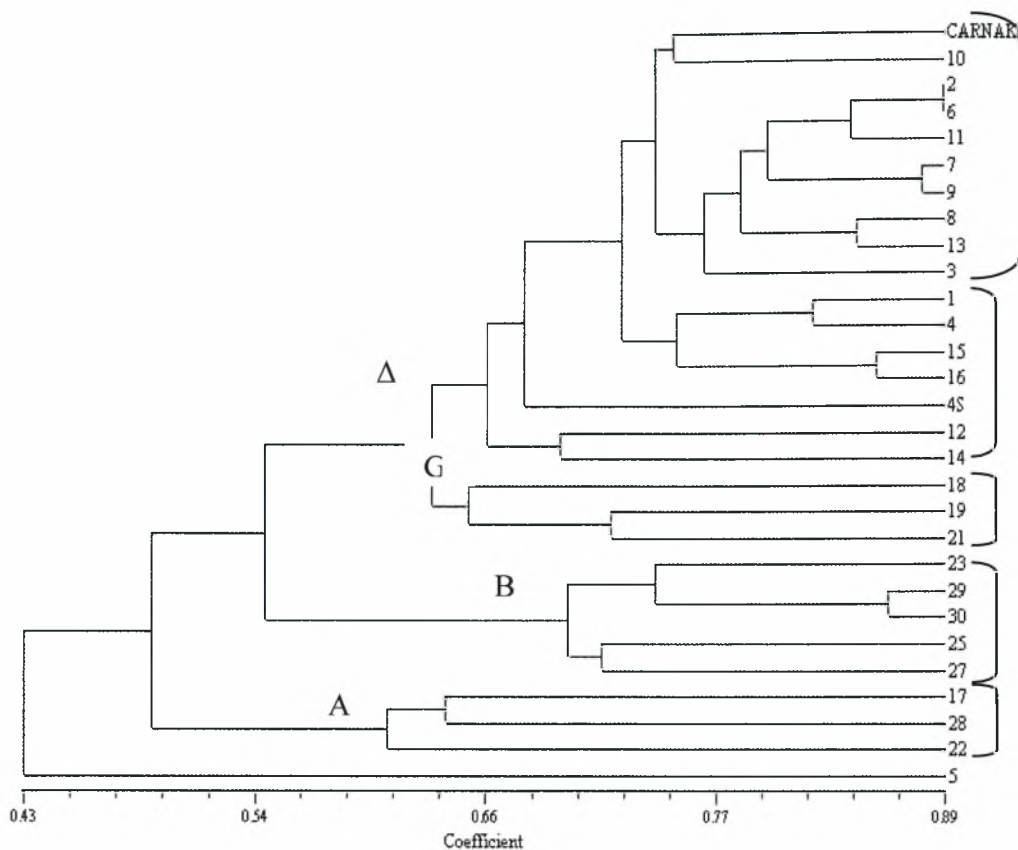
Γενότυπος	Ποσοστό ίνας (%)	Μήκος (inches)	Αντοχή (g/tex)	Micronaire	Ομοιομορφία (pct)
1	34.3	0.94	34.97	3.32	84.1
2	31.3	0.952	33.52	2.92	81.8
3	-	-	-	-	-
4	34.6	0.98	31.3	4.1	82.8
5	-	-	-	-	-
6	33.8	0.98	33.5	2.93	81.4
7	32.2	0.94	29.6	2.83	79.7
8	-	-	-	-	-
9	37.4	0.87	28.7	3.5	82.6
10	31.1	0.93	27	3.1	83.2
11	-	-	-	-	-
12	29.3	1.2	33.1	2.8	81.7
13	36.7	0.925	30.1	3.6	82.2
14	39.5	0.99	34	3.3	83.8
15	34.2	0.965	28.65	3.15	81.05
16	36.3	0.94	33.9	2.7	82.07
17	37.8	0.98	32.8	3	83
18	29.0	0.94	30.95	3	82.3
19	-	-	-	-	-
21	43.0	0.95	31.3	3.2	80.8
22	29.2	0.95	33.2	3.1	83
23	-	-	-	-	-
25	36.1	0.91	30.43	3.2	80.16
27	27.7	0.99	32.3	3.2	82.2
28	35.4	0.96	31	2.8	82.4
29	29.9	0.98	33.35	3.2	81.05
30	42.7	0.89	33.95	4	84.5

8.6 Αποτελέσματα μοριακών αναλύσεων

Η απομόνωση του γενωμικού DNA έγινε με τη βοήθεια της μεθόδου CTAB (Edwards *et al.* 1991). Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός που πραγματοποιήθηκε μετά την εξαγωγή του γενωμικού DNA από τους γενοτύπους που συγκροτούν τις 27 σειρές μερικώς διειδικών υβριδίων του γένους *Gossypium* και δύο μητρικές ποικιλίες, 4S και Carnak οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, έγινε ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωση του DNA στα δείγματα. Όλα τα δείγματα φωτομετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο σε απορρόφηση A_{260} nm με σκοπό να εκτιμηθεί η συγκέντρωση του DNA και στα A_{280} nm με σκοπό να εκτιμηθεί η παρουσία πρωτεϊνών στο δείγμα από τον λόγο A_{260}/A_{280} .

Για την μοριακή ανάλυση του γενώματος των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν (10) δεκαμερείς, μονόκλωνες αλληλουχίες τύπου RAPD εκκινητές οι οποίοι στο σύνολο τους επέδειξαν πολυμορφισμούς που ανιχνεύτηκαν στους 10 από αυτούς. Το μοριακό πρότυπο κάθε εκκινητή καταγράφηκε και στη συνέχεια κωδικοποιήθηκε για το σύνολο των γενοτύπων. Η κωδικοποίηση μετέτρεψε τη παρουσία ή απουσία ζωνών από τις πηκτες σε ηλεκτρονική μορφή (μονάδες "1" και μηδέν "0" αντίστοιχα), σύμφωνα με το δυαδικό σύστημα. Με βάση τις μήτρες γενετικής ομοιότητας, κατασκευάστηκαν δένδρογράμματα φυλογενετικής ανάλυσης τόσο με την μέθοδο NEIBORJOIN όσο και με την μέθοδο UPGMA. Η τελική επιλογή της μεθόδου, έγινε με βάση τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων κάθε φυλογενετικής ανάλυσης με την αρχική μήτρα από την οποία προέκυψε αυτή. Το μέτρο εκτίμησης του παραπάνω βαθμού συσχέτισης προέκυψε από τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης MxComp.

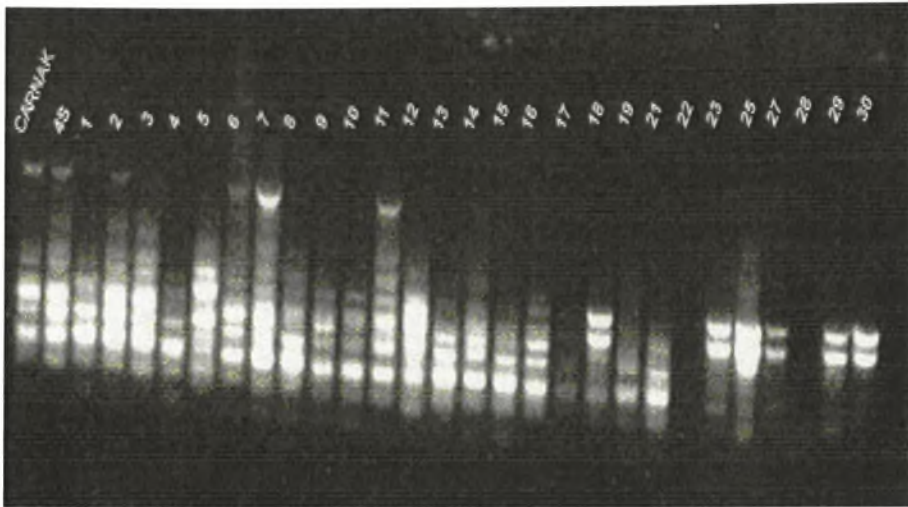
Οι συσχετίσεις που βρέθηκαν όσον αφορά τον συντελεστή ομοιότητας κατά Jackard με ομαδοποίηση κατά UPGMA ήταν ($r=0.87$), για συντελεστή ομοιότητας κατά Jackard και ομαδοποίηση κατά NEIBORJOIN ήταν ($r=0.36$), για συντελεστή ομοιότητας κατά Nei και ομαδοποίηση κατά NEIBORJOIN ήταν ($r=0.26$) και τέλος για συντελεστή ομοιότητας Nei και ομαδοποίηση κατά UPGMA ήταν ($r=0.86$). Τελικά επιλέχθηκε η μέθοδος ομαδοποίησης κατά UPGMA με δείκτη Jackard ως καταλληλότερη και περισσότερο αντιπροσωπευτική για τα δεδομένα με συντελεστή συσχέτισεως $r=0.87$. Η εκτίμηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των είκοσι επτά γενοτύπων και των δύο εμπορικών ποικιλιών βαμβακιού του πειράματος έγινε σύμφωνα με τον αλγόριθμο JACCARD/UPGMA (Εικόνα 6).



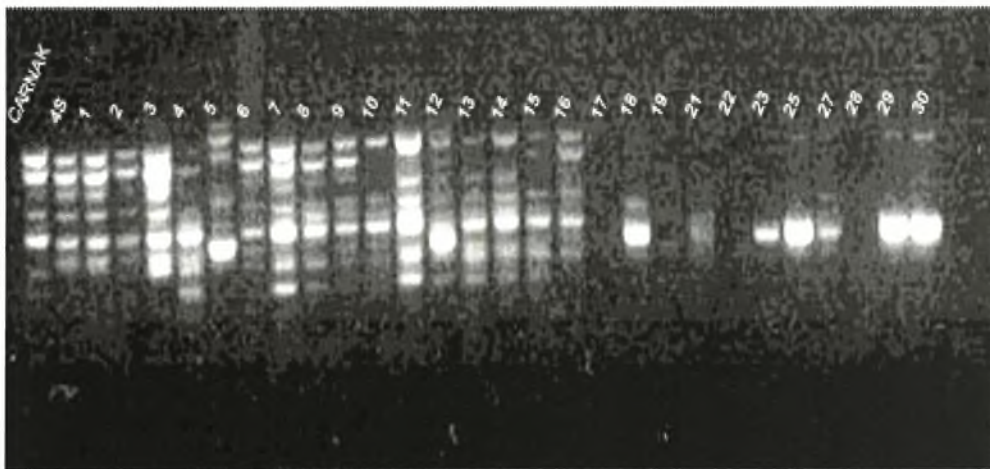
Εικόνα 6: Δενδρόγραμμα φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των 27 εξεταζόμενων μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού και διάκριση σε ομοειδή υποσύνολα όπως προέκυψαν από την ανάλυση με μοριακούς δείκτες τύπου RAPD.

Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται το δενδρόγραμμα γενετικής συγγένειας των εξεταζόμενων γενότυπων. Γενικά μπορούμε να διακρίνουμε την κατηγοριοποίηση των γενότυπων σε τέσσερις ομάδες (A, B, Γ και Δ). Στην ομάδα A υπάρχει κοινή ομαδοποίηση του γενότυπου 22 με τους γενότυπους 28 και 17. Στην ομάδα B, φαίνεται ότι υπάρχει κοινή ομαδοποίηση των γενότυπων 27 με τον 25 καθώς και με τους γενότυπους 29, 30 και 23. Οι δύο πρώτες ομάδες είναι αρκετά συγγενείς μεταξύ τους γεγονός που επιβεβαιώνεται από την κοινή τους προέλευση (Πίνακας 1). Στην ομάδα Γ υπάρχει γενετική συγγένεια των γενότυπων 19 και 21 με τον γενότυπο 18. Η ομάδα Δ χωρίζεται σε δυο υποομάδες. Στην πρώτη υποομάδα ομαδοποιείται ο γενότυπος 12 με τον 14 καθώς και με τους γενότυπους 15 και 16 αλλά και με τους γενότυπους 1 και 4. Η υποομάδα αυτή φαίνεται ότι έχει γενετική συγγένεια με την ποικιλία – μάρτυρα, την 4S γεγονός που επιβεβαιώνεται από την γενεολογία (Πίνακας 1). Στην δεύτερη υποομάδα υπάρχουν ομαδοποιήσεις των γενότυπων 3, 13 και 8 με τους γενότυπους 7 και 9 και 11,

2, 6 και 10 γεγονός που δείχνει ότι δεν κατάφερε να γίνει διαχωρισμός, άρα χρειάζονται περισσότεροι εκκινητές. Η υποομάδα αυτή φαίνεται ότι έχει γενετική συγγένεια με την άλλη ποικιλία – μάρτυρα, την CARNAK. Τέλος φαίνεται ότι ο γενότυπος 5 ομαδοποιήθηκε ξεχωριστά από τους υπόλοιπους και αυτό γιατί προέρχεται από διασταύρωση των ποικιλιών B403 X COKER.



Εικόνα 7 . Προφίλ ζωνών που προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό των ομαδοποιημένων δειγμάτων μερικώς διειδικών υβριδίων με τον εκκινητή OPB-17



Εικόνα 8. Προφίλ ζωνών που προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό των ομαδοποιημένων δειγμάτων μερικώς διειδικών υβριδίων με τον εκκινητή OPB-20.

Πίνακας 15. Περιγραφή του προφίλ των RAPD ζωνών που παρουσιάζουν πολυμορφισμό στο γενετικό υλικό των μερικώς διειδικών υβριδίων βαμβακιού.

Εκκινητής	Αριθμός ζωνών DNA	Πολυμορφικές ζώνες	Μέγεθος ζωνών (bp)
OPB-01 5'-GTTTCGCTCC-3'	6	6	200 - 2000
OPB-03 5'-CATCCCCCTG-3'	5	5	200 - 2000
OPB-04 5'-GGACTGGAGT-3'	6	5	200 - 2000
OPB-05 5'-TGCGCCCTTC-3'	5	3	200 - 2000
OPB-10 5'-CTGCTGGGAC-3'	6	3	200 - 2000
OPB-16 5'-TTTGCCCGGA-3'	6	4	200 - 2000
OPB-17 5'-AGGGAACGAG-3'	10	7	200 - 2000
OPB-20 5'-GGACCCTTAC-3'	9	6	200 - 2000
OPC-01 5'-TTCGAGCCAG-3'	5	4	200 - 2000
OPC-12 5'-TGTCATCCCC-3'	4	4	200 - 2000
M. O	6.2	4.7	200 - 2000

9 Συμπεράσματα

- Μεταξύ των εξεταζόμενων γενοτύπων βρέθηκαν υψηλοαποδοτικές σειρές οι οποίες συνδύαζαν χαρακτηριστικά πρωιμότητας όπως αυτή εξετάστηκε με κριτήριο το ποσοστό συγκομιδής στο πρώτο χέρι. Επιπλέον, βρέθηκαν ορισμένες σειρές που εμφάνισαν σταθερότητα στα μορφολογικά τους γνωρίσματα και άλλες που συνδύαζαν τα μορφολογικά γνωρίσματα και των δύο ειδών επιβεβαιώνοντας την διειδική τους διάσταση.
- Η εμφάνιση υψηλής παραλλακτικότητας, μεταξύ των σειρών αλλά και σε αρκετές περιπτώσεις εντός των σειρών διατήρησε την ποικιλομορφία αυξάνοντας έτσι τις δυνατότητες επιλογής ενώ περιορίζει την άμεση αξιοποίηση τους ως τελικές διαλογές.
- Ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο αποτελεί η δημιουργία και ο εντοπισμός σειρών με εξαιρετικά χαρακτηριστικά ποιότητας της ίνας, οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελέσουν γενετικό υλικό για περαιτέρω αξιοποίηση είτε μέσω διασταυρώσεων σε επίπεδο ατομικών φυτών είτε σειρών μετά από ελεγχόμενη αυτογονιμοποίηση και επιλογή.
- Ο συνεχόμενος γενετικός εκφυλισμός (hybrid break down) που παρατηρήθηκε ακόμη και στην προωθημένη F_6 γενιά, επιβεβαίωσε το γεγονός για ύπαρξη φυτών που ομοιάζουν με τους αρχικούς γονείς ή και φυτών που δεν είναι δυνατόν να αποδοθούν σε κάποιο από τα δύο είδη
- Με βάση το συνδυασμό μορφολογικών γνωρισμάτων και απόδοσης, προέκυψαν τρεις σειρές (22, 25 και 27) που μπορεί να αποτελέσουν γενετικό υλικό για άμεση αξιοποίηση.
- Η μοριακή γενετική ανάλυση με τη χρήση δεικτών τύπου RAPD'S, εμφάνισε αποτελεσματικότητα όσον αφορά τη διακριτική ικανότητα και την εμφάνιση πολυμορφισμών σε επίπεδο DNA για τους εξεταζόμενους γενότυπους βαμβακιού.
- Αδυναμία παρουσιάστηκε στην ακριβή ομαδοποίηση των γενοτύπων που οδηγεί στην ανάγκη για χρησιμοποίηση μεγαλύτερου αριθμού εκκινητών ή παράλληλη χρήση εκκινητών τύπου SSR'S.

10 Βιβλιογραφία

- Altaf, M.K., J.M. Stewart, M.K. Wajahatullah, J-F. Zhang, R.G. Cantrell. 1997. Molecular and Morphological Genetics of a Trispecies F2 Population of Cotton. In: Proc. of Beltwide Cotton Conferences (Ed. D.J. Herber and D.A. Richter), January 6-10, New Orleans, LA. pp. 448-452.
- Arumuganathan, K., E.D. Earle. 1991. Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. *Pl.Mol.Biol.Rep.*, 9:208-218.
- Beasley, J.O. 1940. The Origin of American Tetraploid Gossypium Species. *Am. Nat.*, 74:285-286.
- Beasley, J.O. 1942. Meiotic Chromosome Behavior in Species, Species Hybrids, Haploids and Induced Polyploids of Gossypium. *Genetics*, 27:25-54.
- Bolek, Y. 2002. Mapping of Verticillium Wilt Resistance Genes in Cotton. PhD. Dissertation, Texas A&M University Library, 113p.
- Brubaker, C.L., A.H. Paterson, J.F. Wendel. 1999. Comparative Genetic Mapping of Allotetraploid Cotton and its Diploid Progenitors. *Genome*, 42:184-203.
- Γαλανοπούλου – Σενδουκά, S. 2002. Βιομηχανικά φυτά σελ. 21-168.
- Culp, T.W., D.C. Harrel, T. Kerr. 1979. Some Genetic Implications in the Transfer of High-Fiber Strength Genes to Upland Cotton. *Crop Sci.*, 19:481-484.
- Dudley, J.W. 1993. Molecular Markers in Plant Improvement: Manipulation of Genes Affecting Quantitative Traits. *Crop Sci.*, 33:660-668.
- El-Zik, K.M., P.M. Thaxton 1989. Genetic Improvement for Resistance to Pests and Stresses in Cotton. In: *Integrated Pest Management System and Cotton Production* (Ed. R. E. Frisbie, K. M. El-Zik, and L. T. Wilson), John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 191-224.
- Endrizzi, J.E., E.L. Turcotte, R.J. Kohel. 1985. Genetics, Cytology and Evolution of Gossypium. *Adv. Genetics*, 23:271-375.
- Fryxell, P.A. 1992. A Revised Taxonomic Interpretation of Gossypium L. *Rheede* 2:108-165.
- Giovannoni, J.J., R.A. Wing, M.W. Ganai, and S.D. Tanksley. 1991. "Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations". *Nucleic Acids Res.* 19:6553-6558.

- Guo, W., T. Zhan, J. Pan, R.J. Kohel. 1998. Identification of RAPD Markers Linked with Fertility-Restoring Gene of Cytoplasmic Male Sterile Lines in Upland Cotton. *Chinese Sci.*, 43(1):52-54.
- He, L., A. Bridges, F. Robinson, C.C. Cook, H-B. Zhang. 1999. Toward Map-Based Cloning of Root-Knot Nematode Resistant Genes in Cotton. *Proc. Plant & Animal Genome VII*, January 17-21, San Diego, CA.
- Iqbal, M.J., N. Aziz, N.A. Saeed, Y. Zafar. 1997. Genetic Diversity Evaluation of Some Elite Cotton Varieties by RAPD Analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 94:139-144.
- Jiang, C-X., R.J. Wright, K.M. El-Zik, A.H. Paterson. 1998. Polyploid Formation Created Unique Avenues for Response to Selection in *Gossypium* (cotton). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95:4419-4424.
- Jiang, C-X, R.J. Wright, S.S. Woo, T.A. Delmonte, A.H. Paterson. 2000. QTL Analysis of Leaf Morphology in Tetraploid *Gossypium* (cotton). *Theor. Appl. Genet.*, 100:409-418.
- Karp A., and K.J. Edwards. 1995. "Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity". (Report of an IPGRI Workshop -11 October 1995, Rome, Italy).
- Kesseli, R.V., I. Paran and R.W. Michelmore. 1992. "Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and the tagging of these regions with reliable PCR-based genetic markers". *Applications of RAPD technology to plant breeding*, Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992 Minneapolis, Minnesota.
- Khan, M. A., J. Zhang, J. McD. Stewart. 1998. Integrated Molecular Map Based on a Trispecific F2 Population on Cotton. In: *Proc. Beltwide Cotton Improvement Conference* (Ed. D.J. Herber and D.A. Richter), San Diego, CA, pp.491-492.
- Kohel, R.J., J. Yu, Y-H, Park, G.R. Lazo. 2001. Molecular Mapping and Characterization of Genes Controlling Fiber Quality in Cotton. *Euphytica*, 121(2):163-172.
- Lan, T.H., C. Cook, A.H. Paterson. 1992. Molecular Mapping of a Gene for Restoration of Cytoplasmic Male-Sterility in Cotton. *Proc. Plant Genome II*, San Diego, CA.
- Liu, S., R.G. Cantrell, J.C. McCarty, J.M. Stewart. 2000. Simple Sequence Repeat-Based Assessment of Genetic Diversity in Cotton Race Stock Accessions. *Crop Sci.*, 40(5): 1459-1469.

- Meredith (Jr), W.R. 1994. Use of Molecular Markers in Cotton Breeding. In: Challenging the Future: Proc. World Cotton Res. Conf. (Ed: G.A. Constable and N.W. Forrester), Feb 14-17. Brisbane, Australia, pp. 303-308.
- Meredith (Jr), W.R., J.S. Brown. 1998. Heterosis and Combining Ability of Cottons Originating from Different Regions of the United States. *J. Cotton Sci.*, 2(2):77-84.
- Meyer, K.G., G. Benning, E. Grill. 1996. Cloning of Plant Genes Based on Genetic Map Location. In: *Genome Mapping in Plants* (Ed. A.H. Paterson), pp. 137-154.
- Multani, D.S, B.R. Lyon. 1995. Genetic Fingerprinting of Australian Cotton Cultivars with RAPD Markers. *Genome*, 38(5):1005-1008.
- Paterson, A.H. 1996. Making Genetic Maps. In: *Genome Mapping in Plants* (Ed. A.H. Paterson), R.G. Landes Com.. and Academic Press, Inc., pp.23-39.
- Pendse, R., S. Malhotra, S.E. Pawar, T.G. Krishna. 2001. Use of DNA Markers for Identifying Inbreds and Hybrid Seeds in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Seed Science & Technology*, 29(2):503-508.
- Percy, R.G., R.G. Kohel. 1999. Cotton Qualitative Genetics. In: *Cotton* (Ed. C.W. Smith and J.T.Cothren), John Wiley & Sons NY, pp. 319-360.
- Pillay, M., G.O. Myers. 1999. Genetic Diversity in Cotton Assessed by Variation in Ribosomal RNA Genes and AFLP Markers. *Crop Sci.*, 39(6):1881-1886.
- Racoczy- Trojanowska Monika. 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite- based markers and their application in plants. *Cellular and Molecular Biology letters*, 9: 221-238.
- Reddy, A.S., R.M. Haisler, Z-H. Yu, R.J. Kohel. 1997. AFLP Mapping in Cotton. *Proc. Plant & Animal Genome V*, January 12-16, San Diego, CA.
- Reinisch, A.J., C. Brubaker, D. Stelly, J. Wendel, A.H. Paterson. 1994. A Detailed RFLP Map of Cotton (*Gossypium hirsutum* x *G. barbadense*): Chromosome Organization and Evolution in a Disomic Polyploid Genome. *Genetics*, 138: 829-847.
- Shappley, Z.W., J.N. Jenkins, J. Zhu, J.C. McCarty. 1998. Quantitative Trait Loci Associated with Agronomic and Fiber Traits of Upland Cotton. *J. Cotton Sci.*,2:153-163.
- Staten, G. 1971. Breeding Acala 1517 cottons, 1926-1970. New Mexico State University. College of Agric. and Home Econ., Memoir Series No:4, 48pp.

- Staub E. Jack. 1996. Genetic Markers, Map Construction, and their Application in Plant Breeding. Hortscience. Vol 31(5)
- Stuber, C.W. 1992. Biochemical and Molecular Markers in Plant Breeding. In: Plant Breeding Reviews (Ed. J. Jonick), John Wiley & Sons NY, pp. 37-61.
- Tanksley, S.D, N-D. Young, A.H. Paterson, M.W. Bonierbale. 1989. RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for an Old Science. Biotechnology, 7:257-264.
- Tingey, S.V., A.J. Rafalski, J.G.K Williams.1992. "Genetic analysis with RAPD markers" Applications of RAPD technology to plant breeding, Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992 Minneapolis, Minnesota.
- Ulloa, M., W.R. Meredith (Jr). 1999. A Partial RFLP Genetic Linkage Map from an Intraspecific Cross (*G. hirsutum* x *G. hirsutum* L.), Proc. Plant & Animal Genome VII., January 17-21, San Diego, CA.
- Ulloa, M., R.G. Cantrell. 1998. QTL Analysis in Cotton. Proc. Plant & Animal Genome VI, January 18-22, San Diego, CA.
- Ulloa, M., W.R. Meredith (Jr). 2000. Genetic Linkage Map and QTL Analysis of Agronomic and Fiber Quality Traits in an Intraspecific Population. J. Cotton Sci., 4:161-170.
- Wang, G., J. Dong, A.H. Paterson. 1995. The Distribution of *Gossypium hirsutum* in *Gossypium barbadense* germplasm: Molecular Analysis of Introgressive Plant Breeding. Theor. Appl. Genet., 91(6/7):1153-1161.
- Weaver, D.B., J.B. Weaver. 1977. Inheritance of Pollen Fertility Restoration in Cytoplasmic Male-Sterile Upland Cotton. Crop Sci., 17:497-499.
- Wendel, J.F., C.L. Brubaker, A.E. Percival. 1992. Genetic Diversity in *Gossypium hirsutum* and the Origin of Upland Cotton. Am. J. Bot., 79:1291-1310.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey.1990. "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers". Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
- Yu, Z-H, Y-H. Park, G.R. Lazo, R.J. Kohel. 1997. Molecular Mapping of the Cotton Genome. Prof of 5th International Congress of Plant Molecular Biology, Sept. 21-27, Singapore.
- Yu, Z-H, Y-H. Park, G.R. Lazo, R.J. Kohel. 1998. Molecular Mapping of the Cotton Genome: QTL analysis of fiber quality characteristics. Proc. Plant & Animal Genome VI, January 18-22, San Diego, CA.

- Yu, Z-H., R.J. Kohel. 1999. Cotton Genome Mapping and Applications. Proc. Plant & Animal Genome VII. San Diego, CA. January 17-21.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000074919