

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Αριθμ. Πρωτοκ. 199
Ημερομηνία 12-10-2007

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Εφαρμογή διασταυρώσεων μεταξύ βαμβακιού (*Gossypium spp*) και ειδών του γένους *Malvaceae* και μελέτη των γενετικών σχέσεων με βάση κυτταρογενετικές και μοριακές μεθόδους.



Μονογιός Γρηγόρης

ΒΟΛΟΣ 2007



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

Αριθ. Εισ.: 3846/1
Ημερ. Εισ.: 24-01-2008
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΦΠΑΠ
2007
ΜΟΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Εφαρμογή διασταυρώσεων μεταξύ βαμβακιού (*Gossypium spp*) και ειδών του γένους *Malvaceae* και μελέτη των γενετικών σχέσεων με βάση κυτταρογενετικές και μοριακές μεθόδους.

ΜΟΝΟΓΙΟΣ ΓΡΗΓΟΡΗΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων
Μαυρομάτης Αθανάσιος (Λέκτορας)
Μέλος
Βαρδαβάκης Εμμανουήλ (Λέκτορας)
Μέλος
Γούναρης Ιωάννης (Καθηγητής)

ΒΟΛΟΣ 2007

Εγώ δεν μπορώ να κατευθύνω τον άνεμο, όμως
πάντα μπορώ, έτσι να τοποθετήσω τα πανιά,
ώστε να φτάσω στον στόχο μου.

Ουάιλντ Όσκαρ (1854 - 1900)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω θερμά τον Λέκτορα της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Αθανάσιο Μαυρομάτη, τόσο για την ανάθεση του θέματος μου, όσο και για την συμπαράσταση του κατά την διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ακόμα ευχαριστίες απευθύνω στους κ. κ. Βαρδαβάκη Εμμανουήλ, Λέκτορα της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Γούναρη Ιωάννη, Καθηγητή της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις πολύτιμες πληροφορίες και υποδείξεις που με βοήθησαν να φέρω εις πέρας την πτυχιακή μου διατριβή.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Κορκόβελο Αθανάσιο για την υπέροχη συνεργασία που είχαμε κατά την διάρκεια αυτής πτυχιακής διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χάχαλη Δημοσθένη του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας για την παραχώρηση του μικροσκοπίου φθορισμού, το οποίο ήταν απαραίτητο για την πορεία της πτυχιακής διατριβής μου.

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

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας ήταν εφαρμογή διειδικών διασταυρώσεων μεταξύ ποικιλιών βαμβακιού του γένους *Gossypium* και συγγενών ειδών που ανήκουν στην οικογένεια *Malvaceae* (*Abelmoschus esculentum*, *Hibiscus cannabinus* και *Malva sylvestris*) που χρησιμοποιήθηκαν ως επικονιαστές, με το *Malva sylvestris* να δείχνει μια πιο μεγάλη ικανότητα στη διασταύρωση του, από ότι οι δυο άλλοι επικονιαστές.

Παράλληλα έγινε μελέτη της πορείας επικονίασης με καταγραφή της αύξησης του γυρεοσωλήνα, την εναπόθεση καλλόζης και το σχηματισμό χοντρότερων σωλήνων μέσα στο στύλο με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού. Γύρη προερχόμενη από *Hibiscus cannabinus* έδειξε να βλαστάνει καλύτερα από ότι αυτή του *Abelmoschus esculentum* με την καλύτερη βλάστηση όταν διασταυρώθηκε με την οικογένεια 2-26-1 [(B403xCoker)xHib.cannabinus].

Τέλος έγινε η μελέτη των γενετικών μεταξύ τους σχέσεων των γονέων διασταύρωσης, επικονιαστών και απογόνων με βάση κυτταρογενετικές και μοριακές μεθόδους, η οποία επαλήθευσε τη διασταύρωση μεταξύ ποικιλιών CELIA και St474 μαζί με το *Malva sylvestris*. Η ίδια μελέτη έδειξε και μια διαφοροποίηση του *Abelmoschus esculentum* σε σχέση με τις υπόλοιπες οικογένειες.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	2
2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	2
2.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	9
2.3. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	9
2.3.1. Ρίζα	10
2.3.2. Βλαστοί	10
2.3.3. Φύλλα	11
2.3.4. Άνθη	11
2.3.5. Επικονίαση	12
2.3.6. Αυτεπικονίαση ή σταυροεπικονίαση	13
2.3.7. Γονιμοποίηση	13
2.3.8. Ανθόρροια και καρπόρροια	13
2.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΑ ΕΙΔΗ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	14
2.5. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	16
2.5.1. Εξέλιξη Βαμβακιών του Παλαιού Κόσμου	17
2.5.2. Εξέλιξη Βαμβακιών του Νέου Κόσμου	17
2.6. MALVACEAE	19
2.6.1 Γενικά	19
2.6.2 Μπάμια (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	19
2.6.3 Κενάφ (<i>Hibiscus cannabinus</i>)	20
2.6.4 <i>Malva sylvestris</i>	21
2.7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ	22
2.7.1.Γενικά	22

2.7.2. Μορφολογία γυρεοκόκκων Malvaceae	24
2.7.3. Οι αναπαραγωγικοί φραγμοί	35
2.7.4. Μέτρα για να ξεπεραστούν οι αναπαραγωγικοί φραγμοί	40
2.8. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΣΤΟ ΒΑΜΒΑΚΙ	44
2.8.1. Γενικά	44
2.8.2. Μέθοδοι βελτίωσης του βαμβακιού	44
2.9. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ	47
2.9.1. Γενικά	47
2.9.2. Ταξινόμηση με βάση των ειδών που συμμετέχουν στη διασταύρωση	47
2.9.2.1. Ενδοειδικά υβρίδια βαμβακιού	47
2.9.2.2. Διεϊδικά υβρίδια βαμβακιού	48
2.9.3. Ταξινόμηση με βάση το επίπεδο πλοειδίας	49
2.9.3.1. Τετραπλοειδή υβρίδια βαμβακιού	50
2.9.3.2. Διπλοειδή υβρίδια βαμβακιού	50
2.9.4. Ταξινόμηση με βάση τη μέθοδο παραγωγής σπόρου των υβριδίων	50
2.9.4.1. Συμβατικά υβρίδια βαμβακιού	50
2.9.4.2. Αρρενόστειρα υβρίδια βαμβακιού	51
2.10. ΑΠΛΟΕΙΔΗ	52
2.11. ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΗ	54
2.12. ΑΡΕΝΟΣΤΕΙΡΟΤΗΤΑ	55
2.13. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ	56
2.13.1. Γενικά	56
2.13.2. Μοριακοί δείκτες	57
2.13.2.1. RFLPs	58
2.13.2.2. PCR	60
2.14. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	67

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	68
3.1. Γενετικό υλικό	68
3.2. Εγκατάσταση του πειράματος	68
3.3. Μετρήσεις και παρατηρήσεις	71
3.4. Μελέτη της βλάστησης της γύρης και πορείας του γυρεοσωλήνα	71
3.5. Κυτταρογενετική ανάλυση	73
3.6. Μοριακή ανάλυση γενοτύπων με την χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPDs	74
3.6.1. Εξαγωγή του DNA	74
3.6.2. Ανάλυση με χρήση εκκινητών τύπου RAPD	75
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	77
4.1. Εκτίμηση ποσοστού φυτρώματος	77
4.2. Μορφολογικές ανωμαλίες στα άνθη	78
4.2.1. Διπλά καρύδια	78
4.2.2. Απουσία στύλου	78
4.2.3. Αρρενοστειρότητα	79
4.2.4. Παρατηρήσεις που αφορούσαν την άνθιση	79
4.2.5. Παρατηρήσεις στις εμπορικές ποικιλίες	80
4.2.6. In situ διασταυρώσεις	80
4.2.7. Μελέτη της πορείας του γυρεοσωλήνα	82
4.2.8. Ανάλυση με μοριακούς δείκτες τύπου RAPDs	86
4.2.9. Κυτταρογενετική ανάλυση	89
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	90
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	92

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

Η υψηλή ποιότητα της ίνας του *G. barbadense* και οι μεγάλες αποδόσεις του *G. hirsutum* ήταν αυτό που οδήγησε τους βελτιωτές στη δημιουργία διειδικών υβριδίων προσπαθώντας να συνδυάσουν και τα δυο αυτά χαρακτηριστικά.

Η ανάγκη όμως της αγοράς για παραγωγή και ανάπτυξη νέων ποικιλιών με υψηλή και σταθερή παραγωγή, όπως και με ανώτερη ποιότητα οδήγησε στη δημιουργία διειδικών υβριδίων *G.hirsutum* x *G.barbadense* τα οποία ήταν ανώτερα από τους γονείς από τους οποίους προήλθαν και συνδυάζαν χαρακτηριστικά και από τα δυο είδη, το υψηλό παραγωγικό δυναμικό του *G.hirsutum* και την ανώτερη ποιότητα του *G.barbadense*.

Η αναζήτηση όμως νέων αποθεμάτων γενετικού υλικού, δεν σταμάτησε ανάμεσα στα ίδια τα είδη του βαμβακιού αλλά, προχώρησε και στη διασταύρωση συγγενών ειδών με το βαμβάκι όπως τα *Abelmoschus esculentus*, *Hibiscus cannabinus* και το *Malva sylvestris* όπως και με άλλα είδη. Όμως οι διασταυρώσεις δεν είχαν πάντα επιτυχία με ένα μεγάλο ποσοστό των επικονιαζόμενων ανθέων να αποκόπτεται λίγες μέρες μετά την επικονίαση, ενώ σε άλλα να υπάρχει η δημιουργία καρυδιού αλλά ο γυρεοσωλήνας να μην φτάνει ποτέ στην ωοθήκη για να γίνει η γονιμοποίηση.

2.ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

2.1 Ιστορική αναδρομή του βαμβακιού

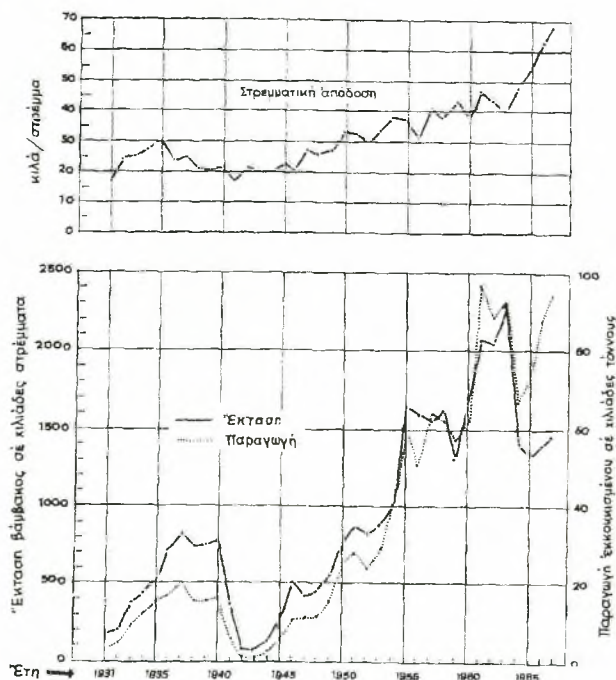
Υπάρχουν άμεσες και σίγουρες ενδείξεις που φαίνεται ότι το βαμβάκι ήταν γνωστό και καλλιεργούνταν από αρχαιοτάτων χρόνων, αλλά ο τόπος καταγωγής του παραμένει μέχρι σήμερα άγνωστος. Όμως σχετικές έρευνες αποκαλύπτουν, ότι το βαμβάκι πρωτοαναπτύχθηκε σε δυο ανεξάρτητες απομακρυσμένες περιοχές, η μια στο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

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

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

Στην Ελλάδα το βαμβάκι καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά τον 2^ο μ.Χ. αιώνα όπως αναφέρεται από τον Πausanias στην περιοχή της Ηλείας, το οποίο το έφεραν στρατιώτες του Μεγάλου Αλεξάνδρου από την Ινδία αλλά γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη μετά το 1500 μ.Χ. Με αποτέλεσμα τη μεγάλη διάδοση του και το 1592 κατά τον Prosper Alpinus να εξάγεται σε Αίγυπτο και Αγγλία. Η ακμή του βαμβακιού ήρθε στην Ελλάδα με την ανάπτυξη της βαμβακοβιομηχανίας στη Θεσσαλία το 18^ο αιώνα και κυρίως στην περιοχή του Τυρνάβου.

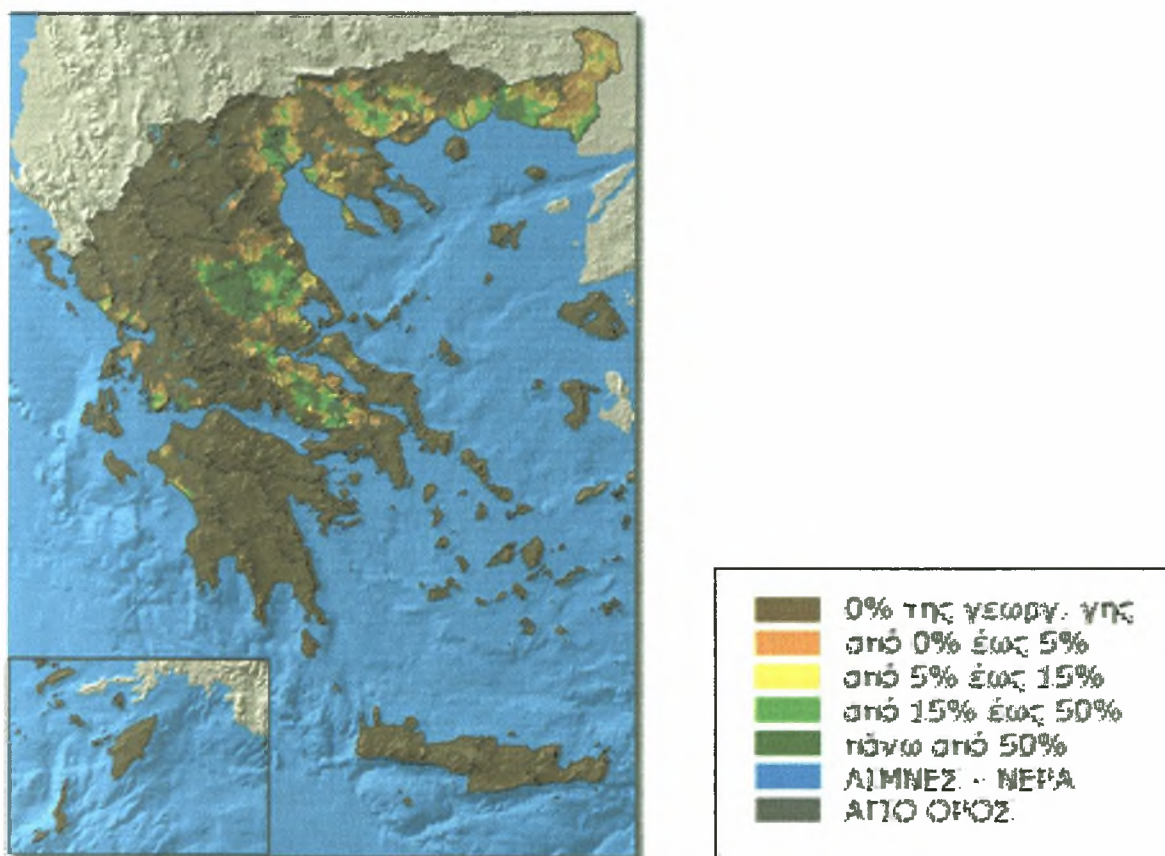
Μετά από απογραφή του 1911, η καλλιεργούμενη έκταση είχε ανέλθει στα 90500 στρέμματα με στρεμματική απόδοση 52 κιλά, ενώ το 1931 αυξήθηκε στα 201980 στρέμματα. Η καλλιεργούμενη έκταση με βαμβάκι ανεβαίνει σταδιακά και φθάνει τα 800.000 στρέμματα το 1940. Όμως κατά την περίοδο του πολέμου και της κατοχής (1940-1950) έχουμε μια δραστική μείωση της καλλιέργειας του βαμβακιού λόγω παραγωγής ειδών διατροφής του πληθυσμού. Το μεγάλο άλμα στην ανάπτυξη της βαμβακοκαλλιέργειας, ήταν η ίδρυση του Οργανισμού και του Ινστιτούτου Βάμβακος το 1932, με απόφαση Ελευθέριου Βενιζέλου και την καθοδήγηση του καθηγητή Χριστίδη, με αποτέλεσμα την αλματώδη αύξηση της καλλιεργούμενης έκτασης σε 2310000 στρέμματα το 1963 και η στρεμματική απόδοση από 2500 χιλιάδες τόνους τετραπλασιάστηκε και πλησίασε τους 100000 τόνους. Μετά το 1950 η αύξηση της παραγωγής είχε σαν αποτέλεσμα την κάλυψη της εγχώριας αγοράς αλλά και να δημιουργηθούν περιθώρια για εξαγωγές. Για μια 15ετία (1965-1980) η καλλιεργούμενη έκταση βαμβακιού διατηρείται περίπου στα 1.300.000-1.400.000 στρέμματα με χαμηλή στρεμματική απόδοση, τα 150-180 κιλά το στρέμμα. Την περίοδο 1981-1985 η καλλιεργούμενη έκταση πλησιάζει τα 2 εκατομμύρια στρέμματα με ελάχιστη αύξηση στην απόδοση. Από το



Εικόνα 1: Η εξέλιξη της βαμβακοκαλλιέργεια στην Ελλάδα από το 1931

1986 και μετά η βαμβακοκαλλιέργεια διατηρεί σταθερή ανοδική πορεία και το 1999 έφτασε τα 4.300.000 στρέμματα εκ των οποίων το 95% είναι σε αρδευόμενη έκταση, ενώ η παραγωγή φθάνει τους 101kg το στρέμμα εκκοκκισμένο βαμβάκι. (Κουρέντας, 2005)

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



Εικόνα 2: Χάρτης κλιμάκωσης της καλλιέργειας βαμβακιού

Οικονομική σημασία

Το βαμβάκι (*Gossypium* sp.) είναι η σημαντικότερη υφαντική ίνα παγκοσμίως. Υπάρχουν τέσσερα εξημερωμένα είδη βαμβακιού. Το *G. arboreum* και το *G. herbaceum* όπου είναι διπλοειδή ($2n=26$), και γνωστά στον παλαιό κόσμο, και καλλιεργούνταν αρχικά στην Ινδία. Το *G. barbadense* και το *G. hirsutum* είναι βαμβάκια του νέου κόσμου, και είναι αλλοτετραπλοειδή ($2n = 4x = 52$). Το *G.*

barbadense, αναφέρεται συνήθως σαν μακρόινο βαμβάκι και παρέχει περίπου το 8% της ίνας παγκοσμίως. Η μακριά ίνα του χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή νημάτων που χρησιμοποιούνται στο ράψιμο υφασμάτων πολυτέλειας. Το *G. hirsutum*, γνωστό ευρύτατα ως βαμβάκι υψιπέδων (upland), αποτελεί περίπου το 90% της παγκόσμιου παραγωγής ινών βαμβακιού. Η ίνα του χρησιμοποιείται κυρίως στα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα. Το λάδι που προέρχεται από το βαμβακόσπορο χρησιμοποιείται κυρίως για βιομηχανική χρήση, και η πίτα που προέρχεται μετά την εξαγωγή του λαδιού, χρησιμοποιείται ως λίπασμα και ως πηγή λευκώματος για το ζωικό κεφάλαιο.

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

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

Τα συνηθέστερα καλλιεργούμενα είδη βαμβακιού στον κόσμο περιλαμβάνουν τα *Gossypium hirsutum* και το *Gossypium barbadense* (επίσης αναφέρονται ως είδη "Νέου Κόσμου"). Το *Gossypium hirsutum* κατάγεται από Μεξικό και είναι το σημαντικότερο γεωργικό βαμβάκι, που αποτελεί περισσότερο από 97% της παγκόσμιας παραγωγής ινών. Το *Gossypium barbadense*, είναι περουβιανής

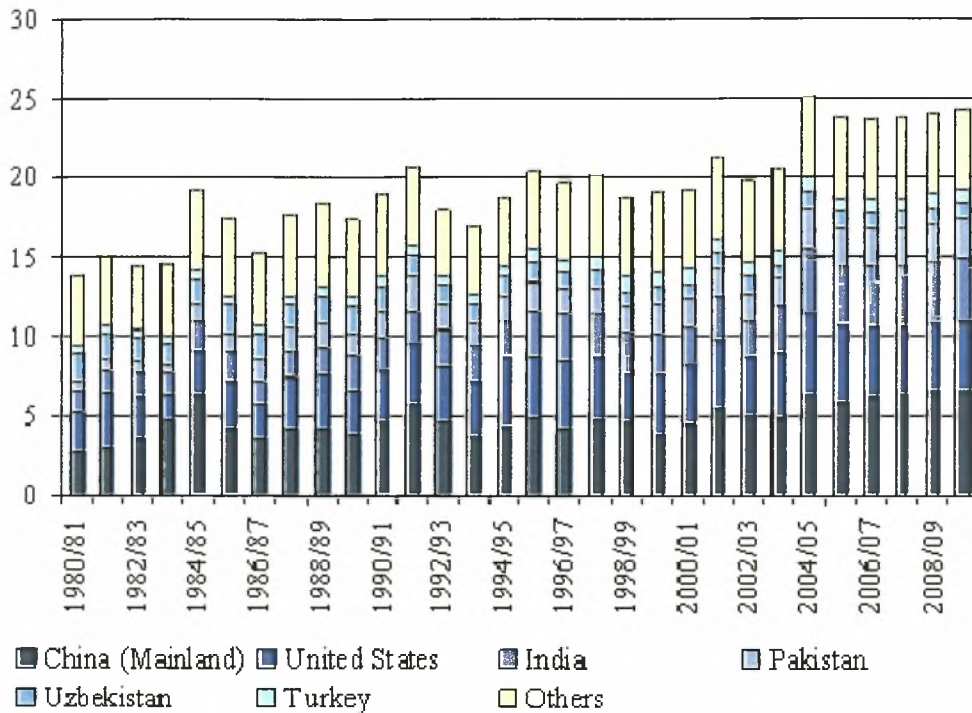
Πίνακας 1: Χώρες που καλλιεργούν βαμβάκι ανά γεωγραφική περιοχή, 2005 Πηγή:
UNCTAD secretariat

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

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

Σήμερα, το βαμβάκι καλλιεργείται σε μια έκταση πάνω από 280.000.000 στρέμματα σε όλο τον κόσμο, ενώ η παραγωγή με την κατανάλωση φθάνει περίπου 15.000-17.000 τόνους. Οι κυριότερες βαμβακοπαραγωγικές χώρες είναι:

Η.Π.Α, Κίνα, Ινδία, Πακιστάν, που είναι και οι πιο σημαντικές χώρες της κατανάλωσης και παράγουν σήμερα τα 2/3 της παγκόσμιας παραγωγής.



Εικόνα 3. Χώρες που καλλιεργούν βαμβάκι. [Πηγή: UNCTAD secretariat, based on: "Cotton: World Statistics - International Cotton Advisory Committee (ICAC)"]

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

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

2.2 Ταξινόμηση και καταγωγή του βαμβακιού

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

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

2.3 Μορφολογία και ανάπτυξη του βαμβακιού

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

2.3.1 Ρίζα

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

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

2.3.2 Βλαστοί

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

2.3.3 Φύλλα

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



είναι παχύ σαν περγαμνή. Το έλασμα παρουσιάζει συνήθως πέντε λοβούς. Στην άνω επιφάνεια, κατά τον Balls, φέρει 44-97 στομάτια ενώ στην κάτω επιφάνεια 116-176 στομάτια ανά τετραγωνικό χιλιοστό. Στο κάτω μέρος του φύλλου διακρίνονται άφθονες μικρές

διακλαδώσεις νεύρων που καλύπτουν όλη την επιφάνεια του φύλλου.

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

2.3.4 Άνθη

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

Το άνθος του βαμβακιού αποτελείται από τα παρακάτω μέρη:

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

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

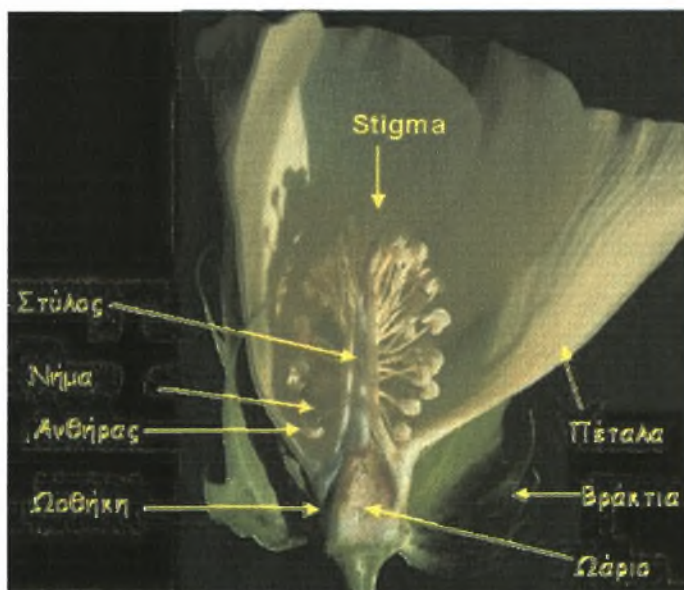
γ) Τη στεφάνη, που αποτελείται από πέντε πέταλα ενωμένα στη βάση τους με το χρώμα της να ποικίλει ανάλογα με το είδος. Στα αμερικάνικα έχει χρώμα

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

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

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

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



Εικόνα 4 : Μορφολογία του άνθους

2.3.5 Επικονίαση

Η αύξηση του λουλουδιού γίνεται με ταυτόχρονο σχηματισμό και ωρίμανση των γαμετών. Κάθε ωοθήκη περιέχει γύρω στα 40 ωοκύτταρα σε ισάριθμες, εντελώς ανάτροπες, σπερμοβλάστες. Ενώ μπορεί να παραχθούν έως και 10000 γυρεόκοκκοι από ένα λουλούδι. Την ημέρα που πρόκειται να ανοίξει το λουλούδι,

με την ανατολή του ηλίου, και μέχρι τις 9 – 10 το πρωί, τα πέταλα έχουν ανοίξει εντελώς και οι ανθήρες έχουν σπάσει με αποτέλεσμα να ξεχυθούν οι γυρεόκοκκοι.

2.3.6 Αυτεπικονίαση ή σταυροεπικονίαση

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

2.3.7 Γονιμοποίηση

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

2.3.8 Ανθόρροια και καρπόρροια

Ανθόρροια και καρπόρροια είναι το φαινόμενο κατα το οποίο το βαμβάκι παράγει πολύ περισσότερα άνθη και καρύδια από όσα τελικά ωριμάζουν, όποτε ένα ποσοστό ανθέων και καρυδιών πέφτει. Το ποσοστό της καρπόδεσης επηρεάζεται από συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως η υγρασία, η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, την άνοδο της θερμοκρασίας, τη προσβολή από έντομα και ασθένειες, τους ισχυρούς ανέμους ή από μηχανικό τραυματισμό. Η φωτοπερίοδος

φαίνεται επίσης να έχει αρκετή σπουδαιότητα. Επίσης, επηρεάζεται από τον γενότυπο του φυτού. Καρύδια συνήθως 3-10 ημερών είναι αυτά που πέφτουν ενώ καρύδια μεγαλύτερα από 10 ημέρες σπάνια πέφτουν εκτός εάν το φυτό υποστεί την επίδραση ισχυρών παραγόντων όπως χημικών ουσιών, παγωνιάς, κλπ.



Εικόνα 5: Κοινό φαινόμενο καρπόπτωσης βαμβακιού

2.4 Καλλιεργούμενα είδη βαμβακιού

1) *Gossypium herbaceum*

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

2) *Gossypium arboreum*

Το *Gossypium arboreum* (Βάμβαξ ο δενδρώδης) κατάγεται μάλλον από την Κεντρική Αφρική, καλλιεργήθηκε όμως σε μεγάλη έκταση και στην Ινδία. Έχει απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων $n=13$ και περιλαμβάνει μονοετείς και πολυετείς τύπους. Τα πολυετή μπορεί να φθάσουν σε ύψος 2 μέτρων ενώ τα μονοετή δεν ξεπερνούν το 1,5 μέτρο. Ο βλαστός του είναι ξυλώδης, τα φύλλα είναι σχεδόν λεία,

με 5 ως 7 λογχοειδείς λοβούς. Τα άνθη του είναι μικρά συνήθως ερυθρού χρώματος. Οι κάψες είναι συνήθως τρίχωρες με 6-8 σπόρους σε κάθε χώρο. Το χρώμα των ινών είναι λευκό ή σε χρώμα σκουριάς ενώ το μήκος τους φθάνει τα 25mm. Δεν παρουσιάζει μεγάλο γεωργικό ενδιαφέρον λόγω του μεγάλου ύψους του το οποίο δυσκολεύει τη συγκομιδή.

3) *Gossypium hirsutum*

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

4) *Gossypium barbadense*

Το *Gossypium barbadense* (Βάμβαξ ο βαρβαδινός) κατάγεται από τη Νότια Αμερική και έχει απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων $n=26$. Τα Αιγυπτιακά βαμβάκια ανήκουν στο *G.barbadense*, διακρίνονται για το μεγάλο μήκος, τη λεπτότητα και τη στιλπνότητα των ινών τους και καλλιεργούνται στην Αίγυπτο, στο Σουδάν, στις Η.Π.Α. και αλλού, αλλά η καλλιέργειά του τείνει να μειωθεί λόγω της οψιμότητάς του. Περιλαμβάνει μονοετή φυτά αλλά και πολυετής θάμνους που φθάνουν σε μεγάλο ύψος. Ο βλαστός είναι ευθυτενής και λείος και τα φύλλα έχουν 3-5 αιχμηρούς λοβούς. Τα άνθη του είναι μεγάλα συνήθως ωχροκίτρινου χρώματος. Οι κάψες είναι ογκώδεις, ωοειδείς με αιχμηρό άκρο συνήθως τρίχωρες, με 6-10 σπόρους σε κάθε χώρο. Οι ίνες του είναι λευκού χρώματος, έχουν συνήθως μήκος στα 38mm, αλλά μπορούν να φθάσουν και στα 64mm.



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

2.5 Γονιδίωμα Βαμβακιού

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

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

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

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

στ. Το D έχει μικρού μεγέθους χρωμοσώματα

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

2.5.1 Εξέλιξη Βαμβακιών του Παλαιού Κόσμου

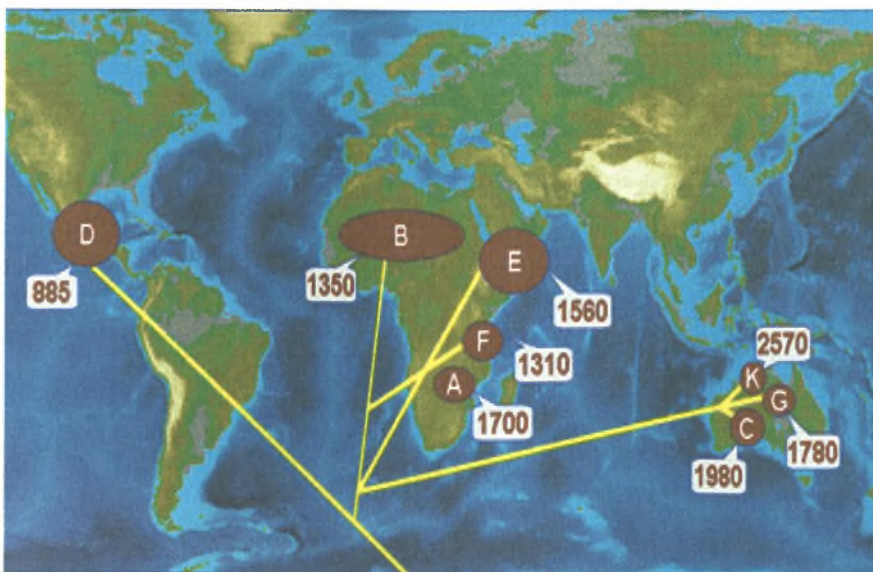
Το Α-γονιδίωμα των διπλοειδών βαμβακιών του Παλαιού Κόσμου τοποθετείται στους πρώτους αιώνες στη καταγωγή του γένους *Gossypium* και περιλαμβάνει τα είδη 14 Αφρικάνικα και Αραβικά είδη (τα γονιδιώματα A, B, E, F). Μέσα σ' αυτό το γκρουπ κάθε ένα από τα γενώματα αντιπροσωπεύεται από μια μονοφυλετική ομάδα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

2.5.2 Εξέλιξη Βαμβακιών του Νέου Κόσμου

Τα τετραπλοειδή Βαμβάκια του Νέου Κόσμου είναι αλλοτετραπλοειδή που συνδυάζουν ένα γονιδίωμα που αντλείται από ένα πρόγονο του Α-γενώματος και ένα δεύτερο γονιδίωμα από έναν πρόγονο του D-γονιδιώματος (Endrizzi et Al 1985 Galau και Wilkins 1989;1989 Brubaker et al 1999 al 2003 Liu et al 2001; Wendel and Cronn 2003). Και οι δυο καταγωγές απέκλιση περίπου 6,0-7,3 εκατομμύρια έτη πριν (Senchina et al 2003). Παραμένει μυστήριο το πώς αυτό εμφανίστηκε. Όλα τα γνωστά AD τετραπλοειδή είδη είναι αυτόχθονα στο νέο κόσμο, αλλά δεν υπάρχει καμία ένδειξη ειδών του Α-γονιδιώματος μέσα στο Νέο Κόσμο και κανένα είδους του D-γονιδιώματος έξω από το Νέο Κόσμο Παρ' όλα αυτά, 1,3-7 εκατομμύρια έτη πριν ένα φυτό του Α-γονιδιώματος επικοινωνήθηκε από ένα φυτό του D-γονιδιώματος και τότε παρήχθη ένα AD-διπλοειδές υβρίδιο, το

οποίο σε ένα πολυπλοειδές γεγονός, δημιουργήθηκε ένα AD αλλοτετραπλοειδές με κυτταρόπλασμα του α-γονιδιώματος (Wendel 1989 Cronn et al. 1996 Small et al 1998, Senchina et al 2003; Wendel, Cronn 2003). Μετά από την αρχική δημιουργία του AD τετραπλοειδούς, αυτό, απέκλισε στη συνέχεια σε τρεις γενεαλογίες (Seelanan et al το 1997 Small et al 2002). Μια αντιπροσωπεύεται με το *G. mustelinum*, το οποίο βρίσκεται μόνο σε ένα μικρή περιοχή Βορειοανατολικά της Βραζιλίας. Οι δύο εναπομείναντες αντιπροσωπεύονται από ένα εξημερωμένο και ένα άγριο ενδημικό είδος σε ένα νησί το *G. barbadense*/*G. darwinii* (Νησιά Galapagos) και το *G. hirsutum*/*G. tomentosum* (Hawaii).

Από τα υπάρχον Α- και D-γονιδιώματα, το *G. arboreum* και το *G. herbaceum* είναι τα καλύτερα διπλοειδές πρότυπα του τετραπλοειδές At υπογενώματος και το *G. raimondii* του Dt υπογενώματος (Wendel et al, 2003). Η ακαθάριστη δομική ρύθμιση του γονιδιώματος του *G. arboreum* διαφέρει από αυτό του At υπογενώματος από μόνο δυο translocation, ενώ το γονιδίωμα του *G. herbaceum* διαφέρει σε τρεις (Brown and Menzel 1950 Gerstel; Menzel and Brown 1954, Endrizzzi et al 1985; Brubaker et al. 1999), αλλά τα φυλογενετικά στοιχεία, εντούτοις, δείχνουν ότι τα δυο είδη διαχωρίστηκαν μετά το γεγονός της πολυπλοειδοποίησης τους και επομένως και τα δυο υπάρχοντα είδη του Α-γονιδιώματος είναι φυλογενετικά απέχουσα από το At υπογένωμα. Υπήρχε μια υπόθεση κατά τη διάρκεια των ετών για το ποιο από τα υπάρχων D-γονιδιώματα



Εικόνα 6: Προέλευση κυτολογικών ομάδων στο βαμβάκι

είναι το καλύτερο πρότυπο για το Dt υπογένωμα (Endrizzi et al 1985;Wendel 1989;et al 1995), αλλά τα πιο πρόσφατα και πειστικά στοιχεία δείχνουν ότι το *G.raimondii* είναι ο πλησιέστερος συγγενής του προγόνου του Dt υπογενώματος και γι' αυτό είναι το καλύτερο πρότυπο(reviewed by Wendel & Cronn 2003).

2.6 MALVACEAE

2.6.1. Γενικά

Η οικογένεια, Malvaceae περιέχει διάφορα γένη, γενικά, με πέντε ελκυστικά πέταλα, πέντε πράσινα σέπαλα και πολυάριθμους στήμονες που φύονται στη βάση και διαμορφώνουν έναν σωλήνα γύρω από το στύλο. Τα περισσότερα είδη είναι θάμνοι αλλά σε μερικά είδη μπορεί να είναι και δέντρα. Υπάρχουν πάνω από 100 γένη με κοντά στα 1.500 είδη στην οικογένεια ανάλογα με την ταξινόμηση που γίνεται ανάμεσα στα γένη. Τα κυριότερα γένη είναι τα *Malva*, *Abutilon*, *Althaea*, *Lavatera*, *Abelmoschus*, *Malope*, *Hibiscus*, με το Βαμβάκι (4 είδη *Gossypium*), το κενάφ (*Hibiscus cannabinus*) και τη μπάμια (*Abelmoschus esculentus*) να είναι σημαντικές γεωργικές καλλιέργειες.

2.6.2. Μπάμια (*Abelmoschus esculentus*)

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

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



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

(*Abelmoschus caillei*(A.Chev.) Stevels) είναι περιορισμένη μόνο στα υγρά κλίματα της Αφρικής. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Okra>)

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

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

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

2.6.3. Κενάφ (*Hibiscus cannabinus*)

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

Είναι ετήσιο ή διετή φυλλώδες φυτό που αυξάνει σε ύψος μέχρι 1,5-3,5 m με ξυλώδες βάση. Οι μίσχοι του αυξάνουν 1-2 cm σε διάμετρο και συχνά αλλά όχι πάντα διακλαδίζονται. Τα φύλλα του είναι 10-15 cm σε μήκος και ποικίλουν σε σχήμα, με αυτά της βάσης να είναι αρκετά λοβοειδή, με 3-7 λοβούς, ενώ αυτά της κορυφής να είναι λιγότερο λοβωτά έως καθόλου. Τα άνθη του είναι 8-15 cm σε διάμετρο, λευκά, κίτρινα ή μωβ. Ο καρπός του είναι περικάρπιο με πολλαπλούς σπόρους διαμέτρου 2 cm.

Αν και τα φυτά είναι αυτογονιμοποιούμενα και γενικά θεωρητικά



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

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

2.6.4. *Malva sylvestris*

Το *Malva sylvestris* είναι ένα ετήσιο (σε Αίγυπτο και Ανατολική Μεσόγειο), διετές (στη υπόλοιπη Μεσόγειο) ή πολυετές φυτό ευρέως διαδεδομένο σε όλο τον κόσμο. Είναι φυτό συγγενές με το βαμβάκι και ανήκει στην οικογένεια Malvaceae.



Φτάνει σε ύψος τα 3 m όταν δεν καλλιεργείται και τα 2 m ή παραπάνω όταν καλλιεργείται. Μπορεί να έχει μόνο ένα βλαστό ή πολλαπλούς βλαστούς οι οποίοι έχουν συνήθως τρίχες και είναι ελαφρά ή αρκετά διακλαδισμένοι στην βάση ή στη κορυφή ή και στα δυο. Τα φύλλα του είναι καρδιόσχημα και σφαιρικά. Τα φύλλα της βάσης είναι λοβοειδή σχηματίζοντας 5-7 λοβούς ενώ αυτά της κορυφής είναι ελαφρώς λοβοειδή. Τα άνθη αποτελούνται από 5 ιώδη

πέταλα με σκουρόχρωμες νευρώσεις. Ο καρπός είναι σχιζοκάρπιο που αποτελείται από 10 μονόσπερμα μερικάρπια.

2.7 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΥΡΗΣ

2.7.1 Γενικά

Οι γυρεόκοκκοι μόλις απελευθερωθούν από τους ανθήρες ενεργούν σαν ανεξάρτητες λειτουργικές μονάδες και είναι εκτεθειμένοι στις συνθήκες του περιβάλλοντος. Στο βαμβάκι το άνοιγμα των ανθέρων συμβαίνει κατά τις πρωινές ώρες από τις 7 π.μ. έως και τις 10 π.μ. εξαρτώμενο πάντα από τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες ενώ η βλάστηση του γυρεόκοκκου λαμβάνει χώρα σε χρονικό διάστημα 30 λεπτών πάνω στο επιδεκτικό στίγμα (Pundir, 1972). Παρόλα αυτά η πραγματική γονιμοποίηση μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε στιγμή μέσα στο διάστημα των 12 έως 24 ωρών από την ώρα που απελευθερώθηκε ο γυρεόκοκκος, λόγω της αργής ανάπτυξης του γυρεοσωλήνα (Pundir, 1972). Αυτό το χρονικό διάστημα, οι υψηλές θερμοκρασίες που ίσως επικρατούν κατά την άνθηση είναι πιθανόν να οδηγήσουν σε αποτυχία στην επικονίαση όπως και στην γονιμοποίηση.



Εικόνα 7: Γυρεόκοκκοι. Αρχίζοντας από αριστερά *Abelmoschus esculentus*, *Hibiscus sp.*, *Gossypium barbadence* x 500

Όταν οι γυρεόκοκκοι του βαμβακιού έρθουν σε επαφή με το στίγμα, βλαστάνουν οι γυρεοσωλήνες οι οποίοι προχωρούν κάτω μέσω του "αγωγού ιστού" στο κέντρο του στύλου (Agutinnova 1940). Όταν ο γυρεοσωλήνας φτάσει στην ωοθήκη το σπέρμα εισέρχεται και την γονιμοποιεί. Περίπου 50 ωοθήκες πρέπει να γονιμοποιηθούν για την παραγωγή όλων των σπόρων γι' αυτό τουλάχιστον 50 ζωντανοί γυρεόκοκκοι πρέπει να έρθουν σε επαφή με το στίγμα.

Η πλειοψηφία των άνθεων στο βαμβάκι είναι κατά ένα μεγάλο μέρος αυτογονιμοποιούμενα και κατά διαφορετικούς βαθμούς αυτοεπικονιαζόμενα (Ewing 1918, Kearney and Harrison 1932). Η μέθοδος, ο χρόνος, και ο τύπος της

επικονίασης στο στίγμα επηρεάζουν το βαθμό της αυτεπικονίασης. Άνθη που δέχονται γύρη σε ολόκληρη την επιφάνεια του στίγματος παράγουν περισσότερους σπόρους ανά καρύδι παρά αυτών που επικονιάζονται στη βάση του (Kearney 1926). Η βάση του στίγματος έχει λιγότερες ευνοϊκές συνθήκες για την βλάστηση της γύρης από ότι η κορυφή (Iyengar 1938, Kearney 1923). Οι καλύτεροι ανθήρες προέρχονται από το κατώτερο μέρος του (Trushkin 1956). Βοηθητική επίσης είναι και οι επαναλαμβανόμενες εφαρμογές της γύρης στο στίγμα (όπως με τις μέλισσες) (Finkner 1954).

Οι γεμάτοι με γύρη ανθήρες, οι οποίοι αγγίζουν το στίγμα και οδηγούν σε αυτογονιμοποίηση, συνήθως έρχονται σε επαφή μόνο με την βάση του στίγματος. Όταν συμβεί αυτό παρόλο που η αυτογονιμοποίηση είναι σίγουρη, ο μέγιστος βαθμός γονιμοποίησης μέσα στην ωοθήκη δεν δύναται να πραγματοποιηθεί. Οι Arutiunova και Gubanov (1950) υπόδειξαν ότι "η γύρη φαίνεται να διεγείρει τη γύρη" έτσι ώστε όταν βρίσκεται σε μεγάλα ποσοστά στο στίγμα να αυξάνεται το ποσοστό της βλάστησης των γυρεοσωλήνων αυξάνοντας έτσι το ποσοστό γονιμοποίησης.

Μερικοί γυρεόκοκκοι είναι πολύ αδύνατοι για να ανταγωνιστούν με τους γυρεόκοκκους του ίδιου φυτού. Οι McGregor *et al.* (1955) παρήγαγαν ίσους αριθμούς φυτών από 'A-44' και 'Red Acala' σε κλωβούς με μέλισσες και αναφέρουν ότι μόνο το 2.31% των απογόνων της 'A- 44' ήταν υβρίδια, ενώ το ποσοστό αυτό στη 'Red Acala' ήταν στο 44.0 %.

Καθώς ο γυρεοσωλήνας του βαμβακιού αυξάνεται, ο πυρήνας του προχωρά μερικά εκατομμυριοστά του μέτρου μπροστά από το σπέρμα (Jensen and Fisher 1968). Το σπέρμα και τα περιεχόμενα του εκκενώνονται μέσα στον εμβρυόσακκο της ωοθήκης μέσα σε 16 έως 32 ώρες (Gore 1932, Kearney 1923, Saakyan 1962). Οι επιπλέον γυρεόκοκκοι που διαπερνούν το στίγμα αφομοιώνονται (Linskens 1964), έτσι δεν υπάρχει ζημιά από πλεονάζοντες γυρεοκοκκούς στο στίγμα.

Σύμφωνα με τον Arutiunova (1940), οι γυρεοσωλήνες αρχίζουν να σχηματίζονται πιο γρήγορα εάν ο γυρεόκοκκος προέρχεται από διαφορετική γενετικά ποικιλία. Οι γυρεοσωλήνες αυξάνονται πιο γρήγορα εάν τοποθετηθούν στην κορυφή του στίγματος από ότι στη βάση του.

Ο Arutinova (1940) επίσης μελέτησε την επίδραση που έχει ο αριθμός των γυρεόκοκκων όπως και το είδος των ενδοποικιλιακών γυρεόκοκκων που έχουν

στην αύξηση του γυρεοσωλήνα και στα δυο βαμβάκια upland και στο *G.Barbadense*. Ανάφερε ότι στα *G.barbadense* έφτασαν οι διπλάσιοι γυρεοσωλήνες στην ωοθήκη σε σταυρογονιμοποιήσεις σε σχέση με αυτά που γονιμοποιήθηκαν με την γύρη του ίδιου φυτού. Εκτός μιας ποικιλίας, η γύρη των upland βλάστησε καλύτερα στο δικό της στίγμα παρά σε άλλα. Σε πολλά άνθη τα οποία επικονιάστηκαν με την δική τους γύρη δεν παρουσιάστηκε καθόλου αύξηση γυρεοσωλήνα, εν αντιθέσει με τα σταυροεπικονιαζόμενα άνθη όπου το φαινόμενο αυτό ήταν σπάνιο.

2.7.2 Μορφολογία γυρεόκοκκων *Malvaceae*

Η παραλλακτικότητα στο μέγεθος του γυρεόκοκκου, των πόρων και τα αγκάθια, είναι όλα ταξινομικά χαρακτηριστικά για το είδος. Το μέγεθος του γυρεόκοκκου είναι ένα χρήσιμο ταξινομικό χαρακτηριστικό ιδιαίτερα στο φυλετικό επίπεδο: παραδείγματος χάριν, όλα τα taxa του γένους *Hibiscieae* έχουν μεγάλο σε μέγεθος γυρεόκοκκο ενώ στο *Abutilieae* είναι μικρός. Ο Saad (1960) ανέφερε ότι υπάρχει σχέση μεταξύ του μεγέθους γύρης και τον αριθμό των χρωμοσώμων. Ο αριθμός των τρυπών είναι επίσης χρήσιμος ως ταξινομικό χαρακτηριστικό στο φυλετικό επίπεδο. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά του Saad (1960), Erdtman (1962) και Christensen (1986, a). Το άνοιγμα των πόρων στην εσωτερική επιφάνεια των ακετολυμένων γυρεόκοκκων είναι ακόμη ένα αξιόπιστο ταξινομικό χαρακτηριστικό. Στο *Abutilon*, *Hibiscus* και *Sida* υπάρχει ένα ευδιάκριτο δαχτυλίδι που περιβάλλει τον πόρο, το οποίο δεν υπάρχει στα *Malva*, *Lavatera* και στο *Alcea*. Οι πόροι στα *Malva aegyptia*, *M.nicaeensis*, *M.sylvestris*, *Lavatera cretica* και *Alcea rosea* είναι ομαλοί και κοινότοποι ενώ στα *M.neglecta*, *Abutilon theophrasti*, *Sida alba*, και το *A.pannosum* είναι εξογκωμένοι.

Το εσωτερικό ανάγλυφο των πόρων χρησιμοποιήθηκε σαν ταξινομικό χαρακτηριστικό για πρώτη φορά τον Salah M. EL NAGGAR.

Οι γυρεόκοκκοι στα *Malvaceae* χαρακτηρίζονται από ένα ακανθωτό tectum. Τα αγκάθια παρουσιάζουν παραλλαγές όσον αφορά το μέγεθος, τη μορφή και τη διανομή τους στην επιφάνεια. Οι παραλλαγές αυτές δεν είναι μόνο σημαντικές ανάμεσα στα γένη αλλά μπορεί να παρουσιάζονται και ανάμεσα στα είδη του ίδιου γένους. Τα πιο μεγάλα αγκάθια εμφανίζονται στο *Hibiscus micranthus* (16 μm) ενώ τα μικρότερα στο *Malva parviflora* (2,5-3 μm).

Η μορφή των αγκαθίων είναι επίσης ταξινομικό χαρακτηριστικό. Στα περισσότερα από τα ερευνημένα taxa τα αγκάθια είναι κωνικά με ευθύς πλευρές. Κυρτά ή καμπυλωτά αγκάθια εμφανίζονται μερικές φορές στα είδη *Abutilon* και *Sida alba*, *Malva aegyptia* και *Abelmoschus esculentus*. Τα αγκάθια είτε είναι κωνικά με οξύληκτα λυγισμένα άκρα όπως εκείνους στη γύρη των *Malva sylvestris*, του *Lavatera cretica* και του *Alcea rosea*, είτε είναι κωνικά με μυτερά άκρα όπως εκείνους στη γύρη του *Malva Parviflora*. Αγκάθια με αμβλύ ή στρογγυλευμένη κορυφή εμφανίζονται μόνο σε μερικά είδη *Hibiscieae*. Σφαιροειδή ή φιαλοειδή αγκάθια παρουσιάζονται μόνο στο *Alcea rosea*. Στα *Sida alba*, *Abutilon* και *Gossypium* τα αγκάθια αυξάνονται πάνω σε στρογγυλευμένες βάσεις και διαμορφώνονται με αύξηση σε μήκος της κολουμέλλας. Στα περισσότερα είδη *Hibiscus*, *Abelmoschus* και (*Abutilieae*), τα αγκάθια είναι κωνικά με αμβλεία και στρογγυλευμένα τα άκρα. Στο *Lavatera cretica* και στο *Hibiscus rosasinensis* τα αγκάθια μπορεί να διακλαδίζονται από τις βάσεις ή πιο πάνω. Η διανομή των αγκαθίων στην επιφάνεια του γυρεοκόκκου είναι σταθερή ανάμεσα στο ίδιο είδος αλλά διαφέρει ανάμεσα στα διαφορετικά είδη και τα γένη π.χ. η απόσταση ανάμεσα σε δύο γειτονικά αγκάθια, διαφέρει ανάμεσα στα είδη.

Ο Salah M. EL NAGGAR, 2002, προσπάθησε να μελετήσει και να περιγράψει την μορφολογία της γύρης σε διάφορα καλλιεργούμενα και άγρια είδη *Malvaceae*. Πήρε δείγματα γύρης από 21 είδη του γένους που ανήκαν σε 10 διαφορετικά γένη.

Για την μελέτη σε οπτικό μικροσκόπιο οι γυρεόκοκκοι ακετολίζονται σύμφωνα με τον Erdtman (1960). Πριν την ακετόλυση οι γυρεόκοκκοι βράζουν σε 10% KOH προκαλώντας έτσι τις τρύπες να ανοίξουν κάνοντας έτσι πιο εύκολη τη μελέτη τους (Reitsma, 1969). Οι ακετολυμένοι γυρεόκοκκοι τοποθετούνται μετά σε αντικειμενοφόρο πλάκα μαζί με γλυκερίνη.

Για την μελέτη σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο οι ακετολυμένοι γυρεόκοκκοι τοποθετούνταν σε καθαρή επιφάνεια και επικαλύπτονταν με χρυσό και μελετούνταν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Περιγραφή μορφολογίας γυρεόκοκκων στα είδη του γένους *Malvaceae*

1. *Abelmoschus*

Οι γυρεόκοκκοι είναι μήκους 128-130 μm , σφαιροειδή, με 22-45 πόρους μεγέθους 6-9 μm σε διάμετρο, *costate* (*annulate*). Το πάχος του *exine* είναι 3.2-4.3 μm , το *sexine* είναι το ίδιο χοντρό ή χοντρότερο από το *nexine*. Ραβδοειδές κολλουμέλλα και επιμηκύνεται κοντά ή κάτω από τη βάση των αγκαθιών. Τα αγκάθια είναι ευθύ, με αμβλύ κορυφή, βολβοειδή ή πάνω σε βασικά στηρίγματα, αραιά διασκορπισμένα. (Salah M. EL NAGGAR, 2002) (εικόνες 8.1, 14.1)

2. *Hibiscus L.*

Οι γυρεόκοκκοι είναι μήκους 88-130 μm , σφαιροειδή, με 22-45 πόρους σε σπειροειδή διάταξη μεγέθους 3-6 μm σε διάμετρο, *costate* (*H. trionum*) ή όχι. Το πάχος του *exine* είναι 1,5-5,7 μm , το *nexine* είναι το ίδιο χοντρό ή χοντρότερο από το *sexine* (περίπου διπλάσιο). Ραβδοειδές κολλουμέλλα και επιμηκύνεται κοντά ή κάτω από τη βάση των αγκαθιών. Τα αγκάθια είναι μακριά σε μήκος, ευθύ, λεπτά, που ελαττώνονται σταδιακά ή έχουν αμβλύ κορυφή, με πλατιά ή σφαιροειδή βάση, μερικές φορές μπορεί να είναι και διακλαδιζόμενοι και είναι αραιά διασκορπισμένα. (Salah M. EL NAGGAR, 2002) (εικόνες 8.2, 8.3, 8.4, 10.3, 10.4, 11.3, 11.4, 11.5, 12.1, 12.5)

3. *Gossypium L.*

Οι γυρεόκοκκοι είναι μήκους 68-88 μm , σφαιροειδή, με 22-45 πόρους, συνήθως σε ευδιάκριτη σπειροειδή διάταξη, μεγέθους 6,3-7 μm σε διάμετρο, *costate*. Το πάχος του *exine* είναι 3-4,5 μm , το *sexine* είναι το ίδιο χοντρό *nexine* ή λίγο χοντρότερο. Ραβδοειδές, μακριά κολλουμέλλα χοντρότερη στη κάτω μέρος και επιμηκύνεται κοντά ή κάτω από τη βάση των αγκαθιών. Τα αγκάθια είναι μακριά σε μήκος, ευθύ, με μυτερή κορυφή, με ημισφαιροειδή βάση, βολβοειδή ή πάνω σε βασικά στηρίγματα, αραιά διασκορπισμένα. (Salah M. EL NAGGAR, 2002) (εικόνες 8.5, 11.6, 13.4)

4. *Lagunaria L.*

Οι γυρεόκοκκοι είναι μήκους 45-50 μm , σφαιροειδή, με 22-45 πόρους, συνήθως σε ευδιάκριτη σπειροειδή διάταξη, μεγέθους 6-7,5 μm σε μήκος. Το

πάχος του exine είναι 3-4 μm , το sexine είναι το ίδιο χοντρό nexine ή λίγο χοντρότερο. Ραβδοειδές, μακριά κολλουμέλλα. Τα αγκάθια είναι μακριά σε μήκος, ευθύ ή καμπυλωτά με μυτερή ή αμβλεία κορυφή, με πλατιά βάση, , βολβοειδή ή πάνω σε βασικά στηρίγματα, αραιά διασκορπισμένα. (Salah M. EL NAGGAR, 2002) (εικόνες 8.6)

5. *Abutilon Mill.*

Οι γυρεόκοκκοι είναι μήκους 37-45 μm , σφαιροειδή με πεπλατυσμένους τους πόλους, με 8-15 πόρους, συνήθως σε ατρακτοειδή διάταξη με μυτερές κορυφές, μεγέθους 5,8-13 μm σε μήκος και 4,6-6,4 μm σε πλάτος, με εσωτερικό άνοιγμα του πόρου να είναι κυκλικό ή lalongate Το πάχος του exine είναι 1,6-2 μm , το sexine είναι συνήθως λίγο λεπτότερο από το nexine. Ραβδοειδές, ευδιάκριτη κολλουμέλλα. Τα αγκάθια είναι κοντά σε μήκος, ευθύ, που ελαττώνονται σταδιακά ή με μυτερή κορυφή, βολβοειδή ή πάνω σε βασικά στηρίγματα, αραιά διασκορπισμένα. (Salah M. EL NAGGAR, 2002) (εικόνες 9.1, 11.1, 13.6)

6. *Sida L.*

Οι γυρεόκοκκοι είναι μήκους 43-46 μm , σφαιροειδή, με 6-9 πόρους, που διαφέρουν σε θέση από τη ζώνωση, σε ευδιάκριτη σπειροειδή διάταξη, μεγέθους 6,7-7,5 μm σε διάμετρο. Το πάχος του exine είναι 2-2,6 μm , το nexine είναι συνήθως 1-2 φορές χοντρότερο από το sexine. Χοντρή, πυκνά συμπιεσμένη κολλουμέλλα και επιμηκύνεται κοντά ή κάτω από τη βάση των αγκαθίων. Τα αγκάθια είναι κοντά σε μήκος, με μυτερή κορυφή σε σχήμα σταγόνας, βολβοειδή ή πάνω σε βασικά στηρίγματα, αραιά διασκορπισμένα. (Salah M. EL NAGGAR, 2002) (εικόνες 12.3, 12.6, 13.2)

7. *Malva L.*

Οι γυρεόκοκκοι είναι μήκους 51-75 μm , σφαιροειδή, με πολυάριθμους πόρους, σε σπειροειδή διάταξη, μεγέθους 2-5 μm σε διάμετρο. Το πάχος του exine είναι 3-6 μm , το nexine είναι συνήθως 3-5 φορές χοντρότερο από το sexine. Στρογγυλή, ραβδοειδές κολλουμέλλα, χοντρότερη στη βάση και επιμηκύνεται κοντά ή κάτω από τη βάση των αγκαθίων. Τα αγκάθια είναι μονομορφικά αλλά διαφέρουν σε μήκος ή είναι καθαρά διμορφικά με μακριά, λεπτά και μυτερά

αγκάθια (3-8 μm) και/ή με μυτερή κορυφή (1-2 μm), κανονικά και πυκνά διασκορπισμένα. (Salah M. EL NAGGAR, 2002) (εικόνες 9.2, 9.3, 10.1, 12.4, 13.3, 13.5, 14.2)

8. *Lavatera L.*

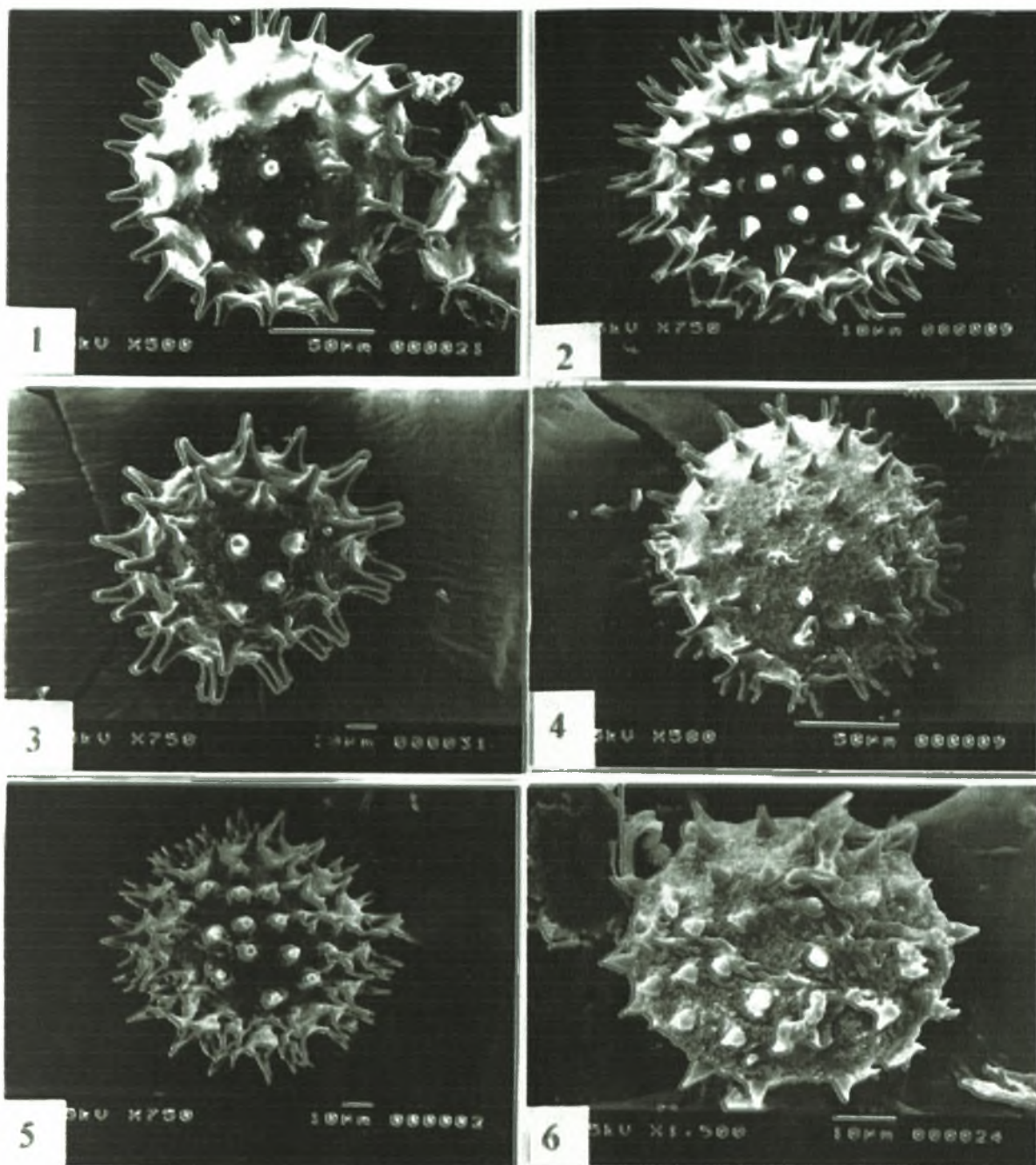
Οι γυρεόκοκκοι είναι μήκους 47-66 μm , σφαιροειδής, με πολυάριθμους πόρους, σε σπειροειδή διάταξη, μεγέθους 2-3 μm σε διάμετρο. Το πάχος του *exine* είναι 5-6 μm , το *nexine* είναι συνήθως το ίδιο ή το διπλάσιο χοντρότερο από το *sexine*. Στρογγυλή, ραβδοειδές κολλουμέλλα, χοντρότερη στη βάση και επιμηκύνεται κοντά ή κάτω από τη βάση των αγκαθιών. Τα αγκάθια είναι διμορφικά, μακριά ή κοντά σε μήκος, λεπτά με λίγο ή πιο πολύ μυτερή κορυφή, διακλαδιζόμενα μερικές φορές, κανονικά και πυκνά διασκορπισμένα. (Salah M. EL NAGGAR, 2002) (εικόνες 9.4, 11.2, 12.2)

9. *Alcea L.*

Οι γυρεόκοκκοι είναι μήκους 60-90 μm , σφαιροειδής, με πολυάριθμους πόρους, σε σπειροειδή διάταξη, μεγέθους 1,7-2 μm σε διάμετρο. Το πάχος του *exine* είναι 3-4,5 μm , το *sexine* είναι πολύ πιο λεπτό από το *nexine*. Κοντή, αγκιστροειδές κολλουμέλλα. Τα αγκάθια είναι διμορφικά με μέτριο μήκος, μυτερά και λεπτά ή κοντά και στρογγυλά ωοειδή ή φιαλοειδή, πυκνά διασκορπισμένα. (Salah M. EL NAGGAR, 2002) (εικόνες 9.5, 10.2, 10.6)

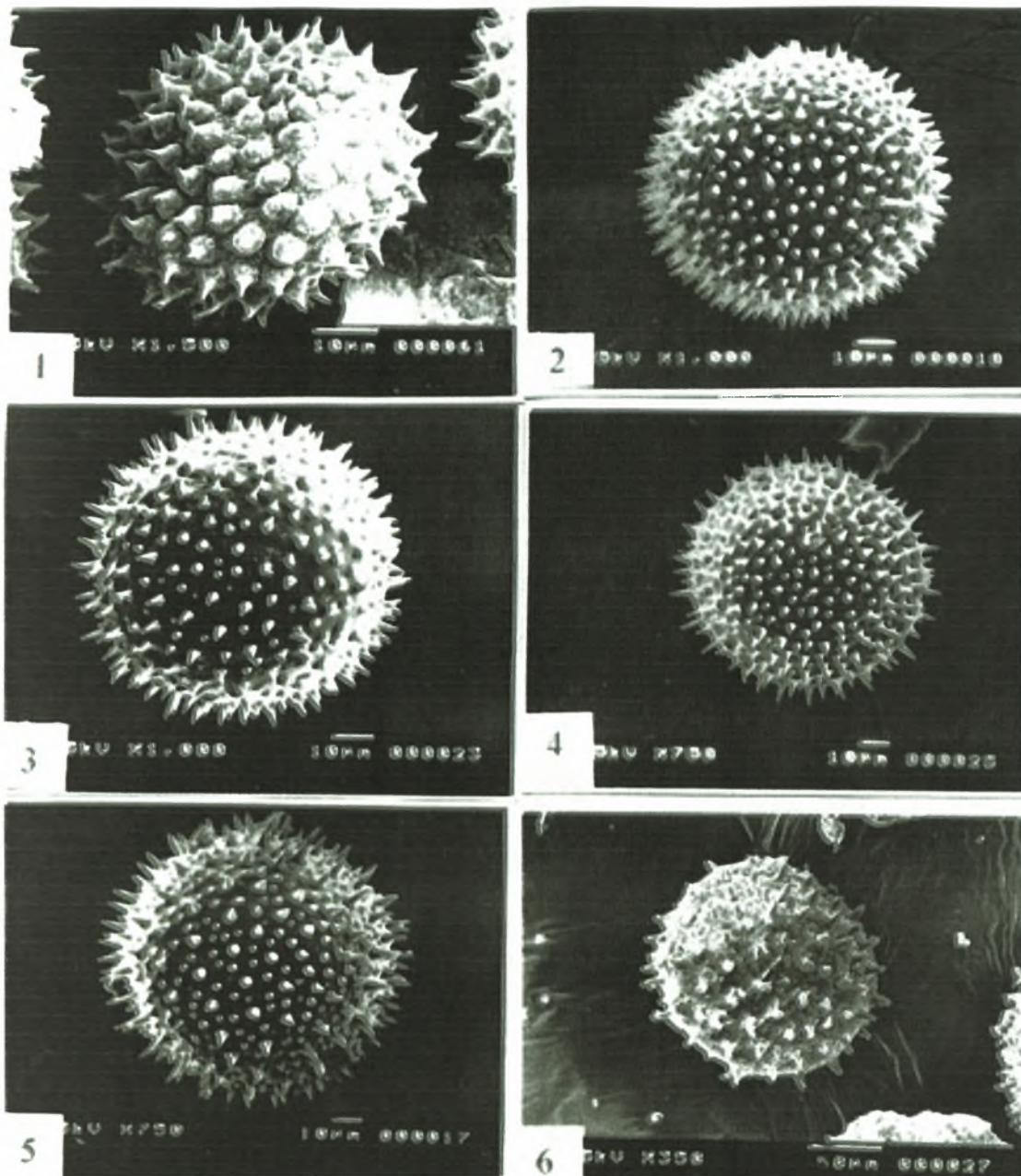
10. *Malvaviscus Cav.*

Οι γυρεόκοκκοι είναι μήκους 100-128 μm , σφαιροειδής, με πολυάριθμους πόρους, μεγέθους 5-6 μm σε διάμετρο. Το πάχος του *exine* είναι 5,7-6,5 μm , το *nexine* είναι διπλάσιο σε πάχος από το *sexine*. Ραβδοειδές κολλουμέλλα που επιμηκύνεται κοντά ή κάτω από τη βάση των αγκαθιών. Τα αγκάθια είναι μακριά σε μήκος, ευθύ, λεπτά, με αμβλεία ή στρογγυλευμένη κορυφή, αραιά διασκορπισμένα. (Salah M. EL NAGGAR, 2002) (εικόνες 9.6, 10.5)



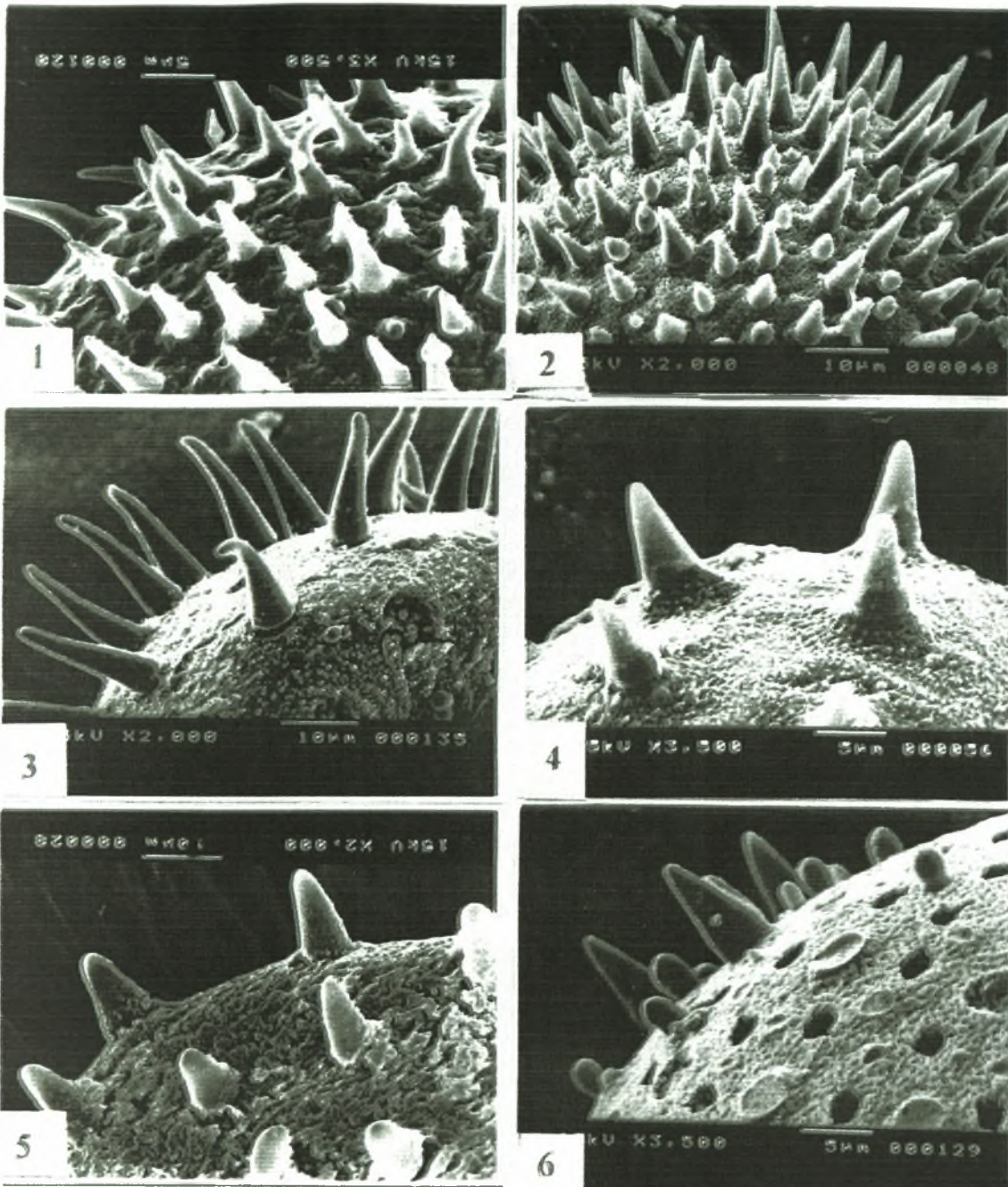
Εικόνα 8: Μορφολογία των γυρεόκοκκων

- 1- *Abelmoschus esculentus* x 500
- 2- *Hibiscus trionum* x 750
- 3- *Hibiscus rosa-sinensis* x 750
- 4- *Hibiscus* sp. x 500
- 5- *Gossypium barbadence* x 750
- 6- *Lagunaria patersonii* x 1500



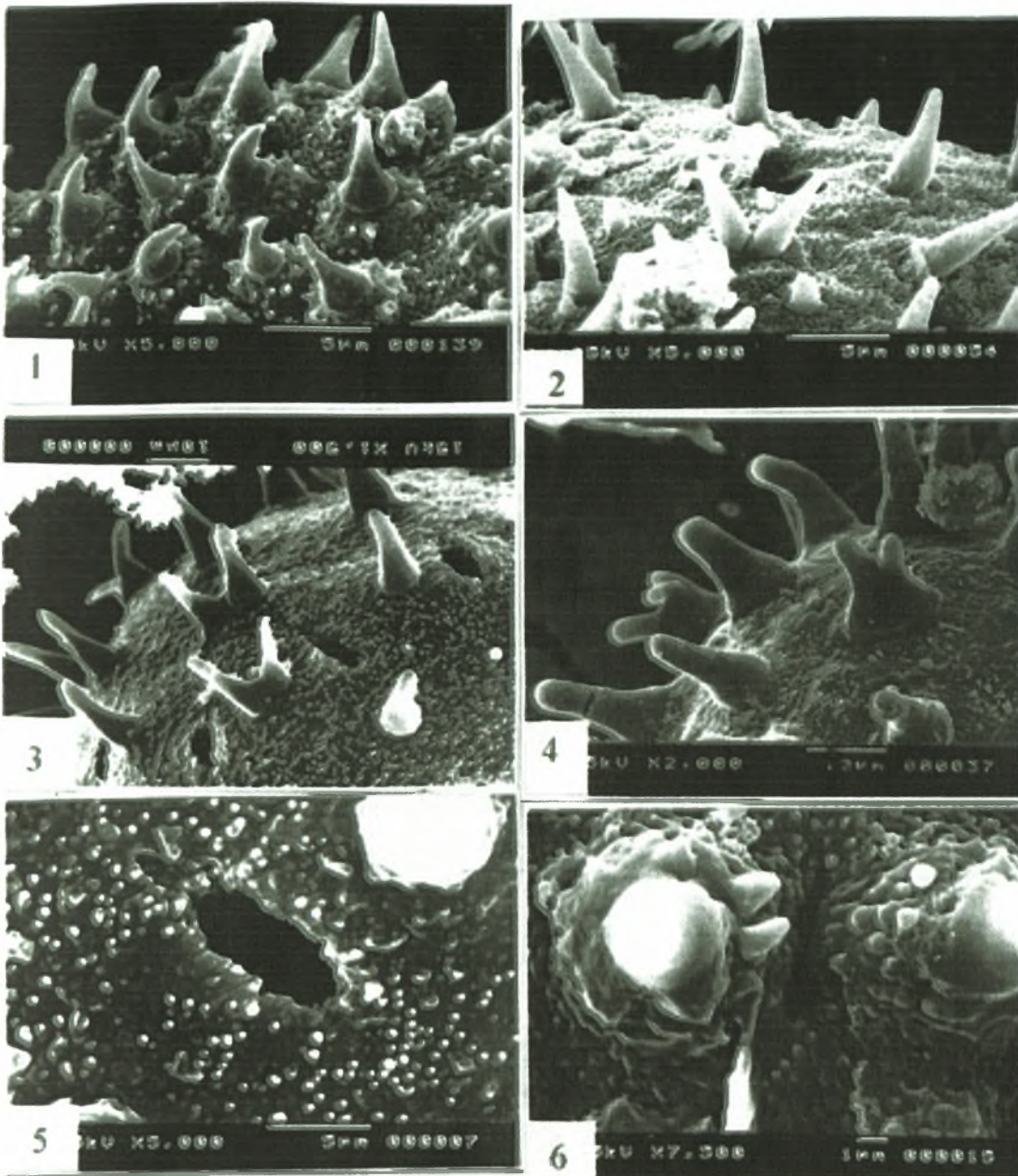
Εικόνα 9: Μορφολογία των γυρέοκοκκων

- 1- *Abutilon pannosum* x 1500
- 2- *Malva aegyptia* x 1000
- 3- *Malva neglecta* x 1000
- 4- *Lavatera cretica* x 750
- 5- *Alcea rosea* x 750
- 6- *Malva viscosa* x 350



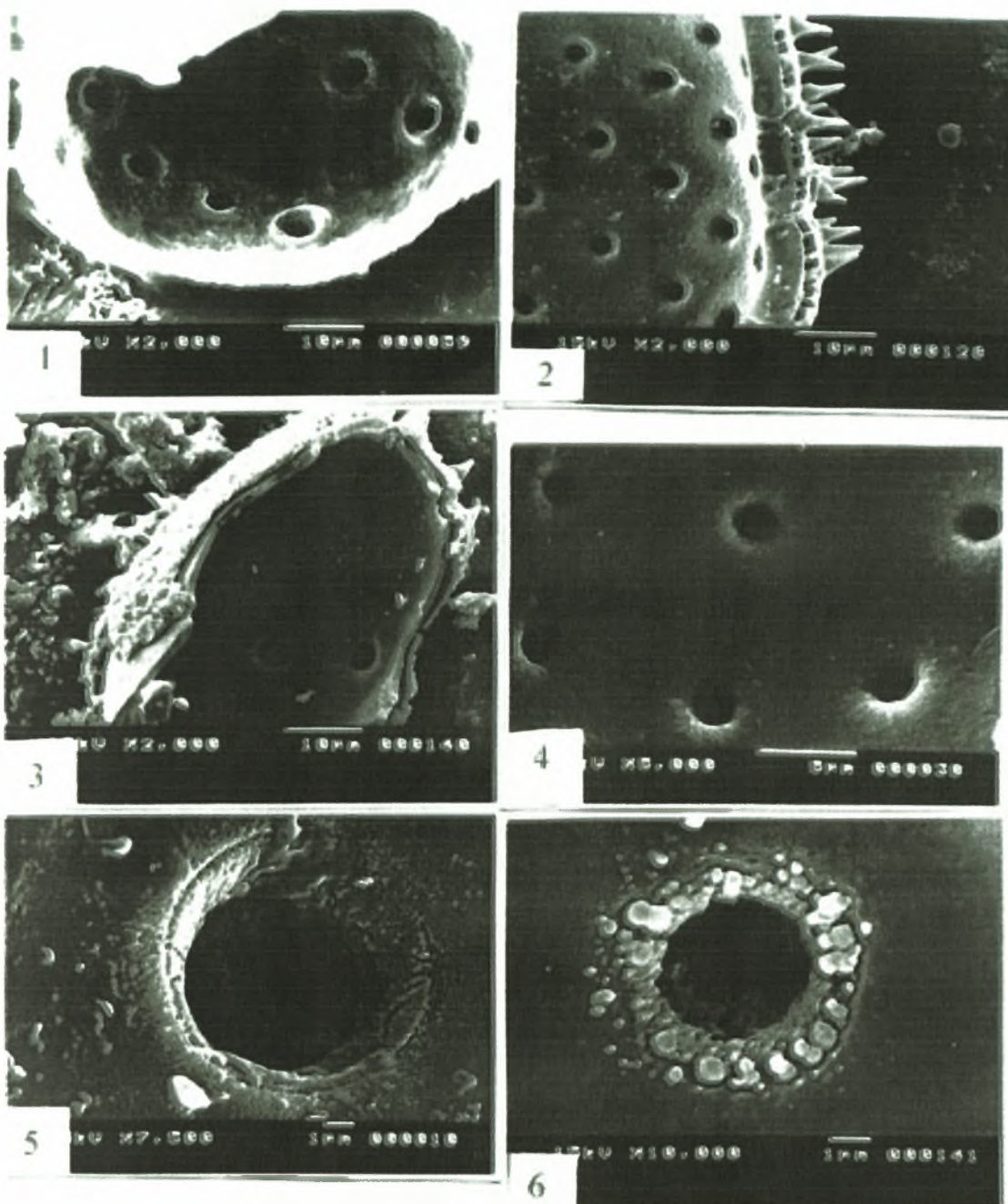
Εικόνα 10: Μορφολογία των αγκαθιών στην επιφάνεια του γυρεόκοκκου

- 1- *Malva aegyptia* x 3500
- 2- *Alcea rosea* x 2000
- 3- *Hibiscus sabdariffa* x 2000
- 4- *Hibiscus micranthus* x 3500
- 5- *Malvaviscus arboreus* x 2000
- 6- *Alcea rosea* x 3500



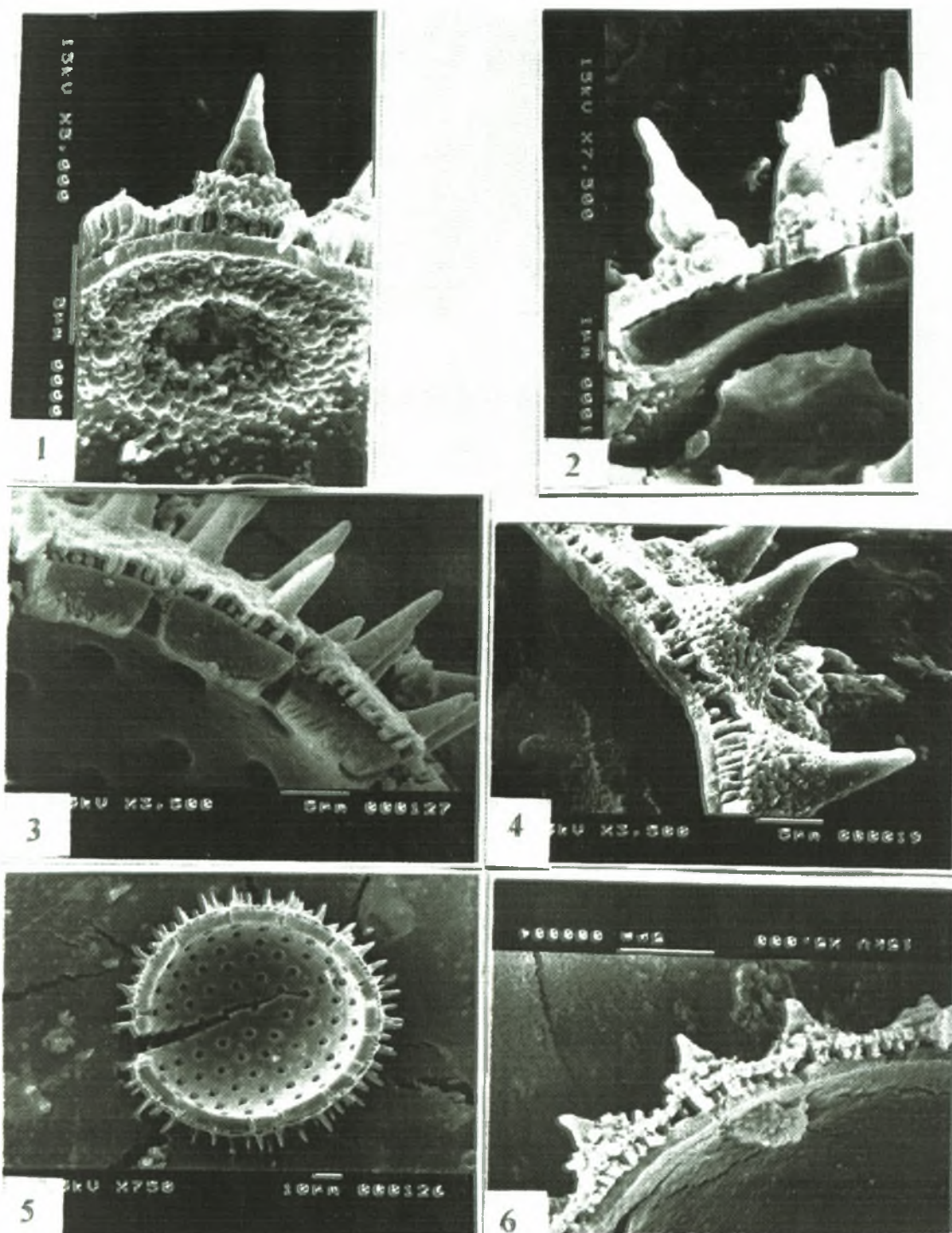
Εικόνα 11: Εξωτερική μορφολογία των αγκαθιών και των πόρων στους γυρεόκοκκους

- 1- *Abutilon pannosum* x 5000
- 2- *Lavatera cretica* x 5000
- 3- *Hibiscus* sp. x 1500
- 4- *Hibiscus rosa-sinesis* x 2000
- 5- *Hibiscus* sp. x 5000
- 6- *Gossypium hirsutum* x 7500



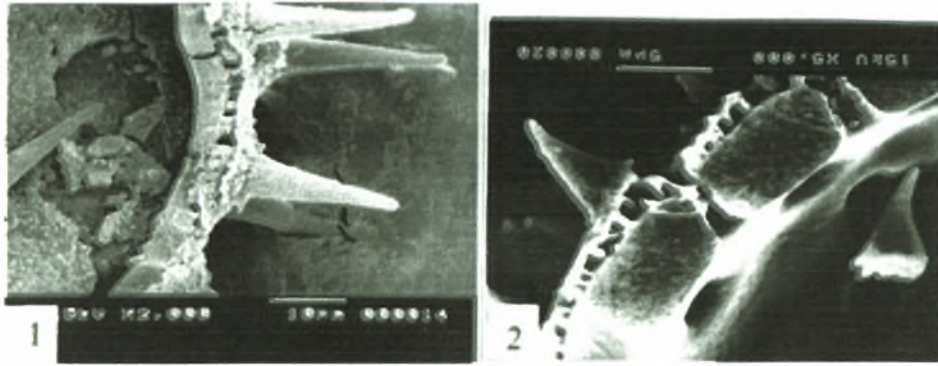
Εικόνα 12: Εσωτερικό ανάγλυφο των πόρων στους γυρεόκοκκους

- 1- *Hibiscus micranthus* x 2000
- 2- *Lavatera cretica* x 2000
- 3- *Sida alba* x 2000
- 4- *Malva nicaeensis* x 5000
- 5- *Hibiscus sabdariffa* x 7500
- 6- *Sida alba* x 10000



Εικόνα 13: Δομή και διαστρωμάτωση του exine

- 1- *Abutilon pannosum* x 5000
- 2- *Sida alba* x 75000
- 3- *Malva sylvestris* x 3500
- 4- *Gossypium barbadense* x 3500
- 5- *Malva sylvestris* x 750
- 6- *Abutilon theophrasti* x 5000



Εικόνα 14: Δομή και διαστρωμάτωση του exine

- 1- *Abelmoschus esculentus* x 2000
 2- *Malva nicaeensis* x 5000

[Salah M. EL NAGGAR Pollen Morphology of Egyptian Malvaceae: An Assessment of Taxonomic Value 2002 Turk J Bot 28 (2004) 227-240]

2.7.3 Οι αναπαραγωγικοί φραγμοί

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

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

Λεπτομερής περιγραφή των διεργασιών εξέλιξης και των φραγμών αναπαραγωγής ανάμεσα στα είδη έχει προταθεί από τον Stebbins το 1971. Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Stebbins οι φραγμοί αναπαραγωγικής

απομόνωσης διακρίνονται σε εξωτερικούς (ή εξωγενής) και σε εσωτερικούς (ή ενδογενής). Όμως ο K.R. Shivanna πρότεινε την ταξινόμηση σε 3 κύριες κατηγορίες από τις οποίες η πρώτη αφορά φυσικούς (I) και οι επόμενες δυο φυσιολογικούς φραγμούς (II και III).

I. Προσωρινή και μερική απομόνωση των ειδών

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

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

II. Φραγμοί πριν την γονιμοποίηση

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

Η πιο αποτελεσματική τεχνική για την παρακολούθηση της αύξησης της γύρης είναι η μέθοδος που αναπτύχθηκε κατά την δεκαετία του 1950, όπου η τεχνική χρησιμοποιεί το φθορισμό που προκαλεί το μπλε της ανιλίνης (aniline blue) (Linskens and Esser 1957; Martin 1959; Shivanna and Rangaswamy 1992). Η μέθοδος βασίζεται στην έλξη που προκαλείται στην καλλόζη από το Fluorochrome (υδατοδιαλυτή aniline blue). Επειδή οι γυρεοσωλήνες αποθέτουν καλλόζη κατά μήκος των τοιχωμάτων του στύλου, μπορούν να παρατηρηθούν κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού εάν ακολουθηθεί η συγκεκριμένη μέθοδος.

α. Μονομερής ασυμβατότητα (Unilateral Incompability)

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

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

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

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

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

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

Οι Shivanna και Johri 1985 απόδειξαν ότι σε διειδικές διασταυρώσεις μεταξύ συγγενικών ειδών που περιλάμβαναν ένα ή και δυο αυτοασυμβίβαστους

γονείς, η αναστολή της βλάστησης του γυρεοκόκκου, ήταν το αποτέλεσμα της ενεργούς αναγνώρισης του γυρεοκόκκου διαμέσου της δράσης του S γονιδίου.

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

γ. Αναστολή στην επιφάνεια του στίγματος

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

δ. Αναστολή στο στίγμα και στύλο

Η αναστολή του γυρεοσωλήνα και η αποτροπή του να φτάσει την ωοθήκη είναι ο πιο συχνός διειδικός αναπαραγωγικός φραγμός. Αυτό οφείλεται στην αναστολή του γυρεοσωλήνα μέσα στο στίγμα ή λίγο πιο κάτω από το στίγμα ή ακόμα και αρκετά κάτω από στο στύλο. Τέτοιοι γυρεοσωλήνες συχνά παρουσιάζουν ανωμαλίες με την μορφή χοντρότερων σωλήνων, αυξημένης απόθεσης καλλόζης, φουσκωμένα άκρα και ανάπτυξη διακλαδώσεων. (Lewis and Crowe 1958; Robbelen 1960; Hogenboom 1973; de Nettancourt 1977; Purdir and Singh 1985; Fritz and Hannenman 1989; Barone et al. 1992; Gundimeda et al. 1992)

Ο γυρεοσωλήνας κατά την πορεία αύξησης του αξιοποιεί τα θρεπτικά στοιχεία του σύλου. Ένας από τους λόγους αναστολής της βλάστησης του μπορεί να οφείλεται στην ανικανότητα του να προσλάβει αυτά τα θρεπτικά συστατικά ή

λόγω έλλειψης τους ή ακόμα και λόγω απουσίας κατάλληλων ένζυμων στο γυρεοσωλήνα.

ε. Αναστολή μέσα στην ωοθήκη

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

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

III. Φραγμοί μετά την γονιμοποίηση

Η περίπτωση αυτή οφείλεται κυρίως στην αποτυχία των γονιμοποιημένων ωοθηκών να αναπτυχθούν σε ώριμους σπόρους και σε διειδικές διασταυρώσεις είναι πιο διαδεδομένοι από τους φραγμούς πριν την γονιμοποίηση. Αυτοί οι φραγμοί μπορούν να συμβούν σε οποιοδήποτε στάδιο κατά την διάρκεια ανάπτυξης του εμβρύου ή κατά την διάρκεια της βλάστησης ή ανάπτυξης του F₁ υβριδίου.

2.7.4 Μέτρα για να ξεπεραστούν οι αναπαραγωγικοί φραγμοί

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

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

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

1) γενετική παραλλακτικότητα στην ικανότητα διασταύρωσης

Η ικανότητα διασταύρωσης σύμφωνα με Hermsen (1984a p. 468) καθορίζεται και από γενετικούς όπως και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, και γι αυτό είναι απαραίτητο να εξετάσουμε και τους δυο γονείς ως προς την ικανότητα διασταύρωσης μεταξύ τους σε ένα εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών και σε διαφόρους συνδυασμούς.

2) Χρήση μίγματος γύρης (mentor)

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

3) Επηρεασμός από τις περιβαλλοντικές συνθήκες

Η επιτυχία της γονιμοποίησης εξαρτάται από το αν η επικονίαση γίνει σε επιδεκτικό ή όχι, στίγμα. Η επιδεκτικότητα του στίγματος μπορεί να ποικίλει από μερικές ώρες έως και εβδομάδες σε μερικά είδη (Κρίνα). Και αυτό καθορίζει την κατάλληλη ώρα επικονίασης.

Επίσης θετικό αποτέλεσμα μπορεί να έχει στην άρση των αναπαραγωγικών φραγμών και η υψηλή θερμοκρασία, ζεσταίνοντας τον στύλο ή επικονιάζοντας σε

υψηλές θερμοκρασίες σε μερικά είδη. Μπορεί να έχει το αντίθετο αποτέλεσμα σε είδη ευαίσθητα στην θερμοκρασία.

4) Χειρισμοί του στύλου και της ωοθήκης

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

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

5) Χημικές μεταχειρίσεις

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

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

β. Τεχνικές που υπερνικούν τους φραγμούς μετά την γονιμοποίηση

1) Καλλιέργεια ωοθηκών

Η καλλιέργεια ωοθηκών έχει εφαρμοστεί σε πολλά είδη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν η αποβολή συμβαίνει παρά πολύ νωρίς και ο μητρικός ιστός δεν επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των σπόρων. Τότε οι νεαροί καρποί

μπορούν να αναπτυχθούν *in vitro* μέχρι το στάδιο όπου είναι εφικτή η ανατομία του εμβρύου.

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

2) Καλλιέργεια ωαρίων

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

3) Καλλιέργεια εμβρύων

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

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

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

Σε πολλές διειδικές και διαγενικές διασταυρώσεις έχουν εφαρμοστεί ολοκληρωμένες τεχνικές για την υπερνίκηση των φραγμών που παρατηρούνται τόσο πριν όσο και μετά την γονιμοποίηση. Μια τέτοια τεχνική είναι η *in vitro* επικονίαση και γονιμοποίηση. Σε σχέση με τις άλλες τεχνικές που διατηρούνται

μόνο στην ζώνη αναστολής βλάστησης και μεταχειρίζονται την βλάστηση του γυρεοκόκκου και την ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα για την υπερνίκηση των αναπαραγωγικών φραγμών, η *in vitro* επικονίαση φέρνει σε άμεση επαφή του γυρεοκόκκους και γι' αυτό θεωρείται πιο αποτελεσματική (Rasgaswamy 1977).

δ. Τεχνικές για την υπερνίκηση της στειρότητας των F_1 υβριδίων

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

1) Διπλασιασμός των χρωμοσώμων

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

2) Εφαρμογή 2n γαμετών

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

2.8 Γενετική Βελτίωση στο βαμβάκι

2.8.1 Γενικά

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

2.8.2 Μέθοδοι βελτίωσης βαμβακιού

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση του βαμβακιού διαφέρουν από μεθόδους που χρησιμοποιούνται σε άλλα αυτογονιμοποιούμενα φυτά όπως το σιτάρι ή τη σόγια λόγω της μερικής σταυρογονιμοποίησης και των αποτελεσμάτων που έχει στην ανακατανομή του γενετικού υλικού μέσα στους πληθυσμούς του βαμβακιού. Τα καλλιεργούμενα βαμβάκια σπάνια φτάνουν στο σημείο να είναι καθαρές σειρές όπως στα δημητριακά ή τη σόγια. Μια μετρίου βαθμού ετερογένεια και ετεροζυγωτία είναι επιθυμητή στο βαμβάκι έτσι ώστε να εξασφαλίζει μερική ετέρωση ώστε να διατηρηθεί το υψηλό παραγωγικό δυναμικό. Ο στόχος των βελτιωτών είναι να 'καθαρίσουν' τις σειρές σε τέτοιο βαθμό έτσι ώστε να επιτύχουν ομοιομορφία, αλλά και να διατηρήσουν επαρκή ετεροζυγωτία έτσι ώστε οι καλλιέργειες να είναι εύρωστες και παραγωγικές. Αυτό επιτυγχάνεται με την τελική επιλογή των σειρών στις πρώτες γενεές όπου η ετεροζυγωτία είναι ακόμα παρούσα, ή αναμειγνύοντας συγγενείς σειρές ή οικογένειες κατά την τελική παραγωγή της καλλιέργειας. Τελικά οι σειρές είναι ομοιόμορφες ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, την ανοχή σε ασθένειες και έντομα, την ποιότητα της ίνας αλλά παράλληλα διατηρούν επαρκή ποσοστό ετεροζυγωτίας έτσι ώστε να είναι εύρωστες και να έχουν εύρος οικολογικής προσαρμοστικότητας.

Καθορισμός της ποικιλιακής καθαρότητας (Deteriotation in cultivar purity)

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

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

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

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

Η επιλογή στα βελτιωτικά προγράμματα στο βαμβάκι

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

Ο υβριδισμός στα βελτιωτικά προγράμματα στο βαμβάκι

Ο υβριδισμός είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος βελτίωσης για την παραγωγή νέων ποικιλιών βαμβακιού. Ο υβριδισμός αξιοποιείται στο να συνδυάσει γονίδια για επιθυμητά χαρακτηριστικά, στο να προσθέσει ένα γονίδιο για ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό μέσω της επαναδιασταύρωσης, ή στο να ενισχύσει (intensify) γονίδια για ένα ποσοτικό χαρακτηριστικό σε ένα πρόγραμμα επαναλαμβανόμενης επιλογής. Κατά τη διάρκεια των απομονωμένων γενεών γενικά ακολουθείται η διαδικασία της γενεαλογικής επιλογής. Η επιλογή τερματίζεται σε πρόωρο στάδιο, έτσι ώστε να παραμένει μερικό ποσοστό ετεροζυγωτίας, ενώ σπάνια επιδιώκεται μέχρι να φτάσει σε ομοζυγωτία. Οι σειρές διαφέρουν γενετικά αλλά συγχωνεύονται στο να δημιουργήσουν τη νέα ποικιλία.

Υβρίδια βαμβακιού

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

γονιμότητας (Rf) προερχόμενο από το *G. harkessii* και ενός γονιδίου προερχόμενο από το βαμβάκι Pima το οποίο ενισχύει τη γονιμότητα.

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

2.9 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ

2.9.1 Γενικά

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

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

2.9.2 Ταξινόμηση με βάση των ειδών που συμμετέχουν στη διασταύρωση

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

2.9.2.1 Ενδοειδικά υβρίδια

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

Τα περισσότερα από τα ενδοειδικά υβρίδια έχουν αναπτυχθεί με τη συμβατική μέθοδο δηλαδή, με ευνουχισμό και γονιμοποίηση με το χέρι ενώ, πολύ λίγα έχουν παραχθεί μέσω της χρήσης της αρρενοστειρότητας. Μέχρι τώρα στο

είδος *G.hirsutum*, ένα υβρίδιο έχει αναπτυχθεί μέσω χρήσης της γενετικής αρρενοστεριότητας (υβρίδιο Suguna) και τρία υβρίδια μέσω της χρήσης της κυτταροπλασματικής γενετικής αρρενοστεριότητας (υβρίδια PKVHy 3, PKVHy 4 και MECH 4). (www.ikisan.com)

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

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

Στο *G.hirsutum*, το πρώτο ενδοειδικό υβρίδιο απελευθερώθηκε το 1970 με το κωδικό H4 από τον κύριο ερευνητικό σταθμό βαμβακιού, Σουράτ του γεωργικού πανεπιστημίου του Gujarat. Το H4 είναι το πρώτο υβρίδιο βαμβακιού που απελευθερώθηκε για εμπορική καλλιέργεια. Το πρώτο ενδοειδικό υβρίδιο *G.arboreum* απελευθερώθηκε το 1994 με τον κωδικό LDH 11 από τον ερευνητικό σταθμό βαμβακιού του γεωργικού πανεπιστημίου του Punjab, Ludhiana. (www.ikisan.com)

2.9.2.2 Διεϊδικά υβρίδια

Οι F_1 απόγονοι μεταξύ δύο διαφορετικών ειδών του ίδιου γένους αναφέρονται ως διεϊδικά υβρίδια. Η ανάπτυξη των πλήρως γόνιμων διεϊδικών υβριδίων είναι δυνατή μόνο μεταξύ εκείνων των ειδών που έχουν την πλήρη χρωμοσωμική ομολογία. Στο βαμβάκι, τα διεϊδικά υβρίδια είναι πλήρως γόνιμα μεταξύ *G.hirsutum* και *G.barbadense* και μεταξύ του *G.arboreum* και *G.herbaceum*. Τα διεϊδικά υβρίδια που έχουν απελευθερωθεί μεταξύ *G.hirsutum* και *G.barbadense* είναι σε τετραπλοειδές επίπεδο και μεταξύ του *G.arboreum* και *G.herbaceum* σε διπλοειδές επίπεδο, με όλα να έχουν αναπτυχθεί με τη συμβατική μέθοδο. Τα περισσότερα από τα διεϊδικά υβρίδια που έχουν απελευθερωθεί είναι σε τετραπλοειδές επίπεδο και πολύ λίγα είναι σε διπλοειδές επίπεδο.

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

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

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

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

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

2.9.3 Ταξινόμηση με βάση το επίπεδο πλοειδίας

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

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

2.9.3.1 Τετραπλοειδή υβρίδια

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

2.9.3.2 Διπλοειδή υβρίδια

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

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

2.9.4 Ταξινόμηση με βάση τη μέθοδο παραγωγής σπόρου των υβριδίων

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

2.9.4.1 Συμβατικά υβρίδια

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

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

2.9.4.2 Αρρενόστειρα υβρίδια

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

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

Το πρώτο υβρίδιο αναπτύχθηκε το 1978 με το όνομα Suguna μέσω της χρήσης της γενετικής αρρενοστεριότητας. Σήμερα υπάρχουν τρία υβρίδια, τα PKVHy 3, PKVHy 4 και MECH 4 τα οποία έχουν αναπτυχθεί μέσω της χρήσης της κυτταροπλασματικής γενετικής αρρενοστεριότητας. (<http://www.ikisan.com>)

Υπάρχουν δύο κύρια πλεονεκτήματα αυτών των υβριδίων. Αρχικά, ο σπόρος τέτοιων υβριδίων είναι φτηνότερος λόγω της απουσίας της διαδικασίας ευνουχισμού. Αφετέρου δε, η παραγωγή σπόρου σε τέτοια υβρίδια είναι υψηλότερη επειδή δεν υπάρχει κανένας τραυματισμός της ωοθήκης λόγω της απουσίας της διαδικασίας ευνουχισμού. Εντούτοις, η παραγωγή προς το παρόν των απελευθερωμένων αρρενόστειρων υβριδίων είναι 10-15% χαμηλότερη από των συμβατικών υβριδίων που περιλαμβάνει τους ίδιους γονείς. (www.ikisan.com)

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των υβριδίων

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

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

Άλλο μειονέκτημα είναι το υψηλό κόστος της καλλιέργειας. Η καλλιέργεια των υβριδίων είναι εντατική σε εισροές από την άποψη των λιπασμάτων και των

φυτοφαρμάκων από τις ποικιλίες. Το υψηλό κόστος του σπόρου και η περισσότερο απαιτητική καλλιέργεια ενεργούν ως εμπόδια στην επέκταση της καλλιεργούμενης περιοχής από το υβριδικό βαμβάκι.

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

Επίσης το πρόβλημα κόμπων και των άγονων ωαρίων είναι μεγαλύτερο στα διειδικά υβρίδια απ' ό τι στα ενδοειδικά. Η παρουσία τους έχει επιπτώσεις στην ποιότητα των νημάτων και οδηγεί στην άσχημη εμφάνιση του νήματος. (www.ikisan.com)

2.10 ΑΠΛΟΕΙΔΗ

Απλοειδή φυτά είναι τα σπορόφυτα τα οποία έχουν τον γαμετικό χρωμοσωμικό αριθμό στα σωματικά τους κύτταρα. Η δυνατότητα της χρήσης απλοειδών στη γενετική και στα βελτιωτικά προγράμματα του βαμβακιού έχει ήδη τονιστεί κατά το παρελθόν (Harland 1936; Roux 1958; De Garcia 1962; Endrizzi 1966). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των υπάρχοντων βελτιωτικών μεθόδων μέσω βελτιωμένης και πιο αξιόπιστης επιλογής. Αλλά ειδικότερα έχουν δυνατότητες που τα κάνουν ικανά να χρησιμοποιηθούν με ποικίλους τρόπους όπως:

- Με διπλασιασμό των χρωματοσωμάτων τους παράγουν πλήρως ομοζύγωτες διπλοειδές σειρές. Τα διπλο-απλοειδή φυτά τα οποία μπορούν να παραχθούν μέσα σε μια γενιά έχουν υψηλότερο επίπεδο ομοζυγωτίας από ότι οι παραγόμενες καθαρές σειρές με μικρό αριθμό γενεών διασταυρώσεων

- Τα απλοειδή φυτά είναι χρήσιμα για τη μελέτη των μεταλλάξεων. Μια μετάλλαξη χωρίς φαινοτυπική δράση θα παρατηρηθεί αμέσως μόλις τα γονίδια βρεθούν χωρίς το αλληλόμορφο τους. Σε ένα ομοζύγωτο διπλοειδές φυτό μια τέτοια τύπου μετάλλαξη ενός κυρίαρχου γονιδίου θα καλυφθεί από το αντίστοιχο κυρίαρχο αλληλόμορφο και η μετάλλαξη δεν θα παρατηρηθεί έως ότου τα δυο αλληλόμορφα διαχωριστούν σε μια από τις επόμενες γενεές

- Με τα απλοειδή φυτά είναι πιο εύκολη η επιλογή κυρίαρχων γονιδίων

- Ο γενετικός διαχωρισμός είναι λιγότερο πολύπλοκος στα πολυαπλοειδή.

- Είναι χρήσιμα στις κυτογενετικές μελέτες των πολυπλοειδών γιατί παρέχουν το γενετικό υλικό από το οποίο παράγονται οι μονοσωμικές σειρές. Η ανάλυση των μειωτικών χρωμοσωμικών σχέσεων στα πολυαπλοειδή μπορεί να διαφωτίσει για τις γενετικές σχέσεις των πολυαπλοειδών γονέων τους

- Πολυαπλοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μεταφορά γονιδίων από τα πολυπλοειδή στα συγγενή διπλοειδή είδη

- Σε είδη με γονίδια ασυμβατότητας, όπου η αυτεπικονίαση δεν επιτρέπεται, τα διπλοαπλοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν έτσι ώστε να παραχθούν πλήρως ομοζύγωτες σειρές. (Poehlman John Milton and David Allen Sleper, 1994, *Breeding field crops*, Iowa State university press)

Στη φύση έχουν αναφερθεί τυχαία περιστατικά παραγωγής απλοειδών σε διάφορα είδη π.χ. *G. barbadense* (Harland 1920), *G. davidsonii* (Skovsted 1935), *G. hirsutum* (Harland 1936), *G. arboretum* και *G. herbaceum* (Dergach 1971) και μπορούν να αναγνωρισθούν λόγω του ότι είναι μικρότερα και χλωρωτικά σε σχέση με τα διπλοειδή. Τα απλοειδή του βαμβακιού μπορούν να παραχθούν και με συμβατικές μεθόδους όπως η πολυεμβρυονία και η ημιγαμία. Η πολυεμβρυονία (Blank and Allison 1963; Lee 1970) κατά την οποία ένα ή και τα δυο μέλη ενός ζεύγους διπλού σπόρου μπορεί να είναι απλοειδή, είναι σπάνιο φαινόμενο. Η ημιγαμία (Turcotte and Feaster 1974; Chaudhari 1978) γίνεται αποκλειστικά στα δυο τετραπλοειδή είδη και δεν συμβαίνει στα υπόλοιπα διπλοειδή είδη. Σε αξιολόγηση των αγρονομικών χαρακτηριστικών ημιγαμετικών παραγόμενων διπλο-απλοειδών φυτών του *G. hirsutum* μέσα σε κυτόπλάσμα *G. barbadense* αποκάλυψαν την υπεροχή τους σε μερικά γνωρίσματα, αλλά και την κατωτερότητα τους σε κάποια άλλα συγκρινόμενα με τα φυτά από τα οποία προήλθαν. (Mahill et al. 1984). Μια άλλη μέθοδος παραγωγής απλοειδών είναι η παρθενογένεση (Zhou et al. 1991).

Επειδή η παραγωγή απλοειδών με συμβατικές μεθόδους γίνεται με χαμηλούς ρυθμούς και επειδή για την βελτίωση φυτών απαιτούνται μεγάλοι αριθμοί φυτών γι αυτό χρησιμοποιείται η *in vitro* καλλιέργεια ανθέρων για την παραγωγή τους.

2.11 ANEΥΠΛΟΕΙΔΗ

Ανευπλοειδή οργανισμοί είναι οι οργανισμοί οι οποίοι ο χρωμοσωμικός τους αριθμός τους δεν είναι το ακέραιο πολλαπλάσιο του βασικού χρωμοσωμικού τους αριθμού. Δηλαδή η απουσία ή παρουσία ενός ή περισσοτέρων χρωμοσώμων. Εξαρτώντας από τον αριθμό χρωμοσώμων που απουσιάζουν ή είναι σε περίσσια οι οργανισμοί μπορούν να χαρακτηριστούν σαν ασωμακοί, μονοσωμικοί, διπλά μονοσωμικοί, τρισωμικοί διπλά τρισωμικοί, τετρασωμικοί και μονοσωμικοί-τρिसωμικοί.

Τα μορφολογικά και φυσιολογικά αποτελέσματα της ανευπλοειδίας ποικίλουν. Γενικά η ανεπάρκεια ή η επανάληψη ενός συγκεκριμένου χρωμοσώματος έχει σαν αποτέλεσμα την αστάθεια του γενώματος. Το αποτέλεσμα αυτής της αστάθειας είναι τα διάφορα ανευπλοειδή να διαφέρουν μορφολογικά το ένα με το άλλο όπως και από την διπλοειδή τους μορφή. Οι ασωμακοί και μονοσωμικοί οργανισμοί είναι συνήθως βιώσιμοι σε είδη όπου στο παρελθόν προηγήθηκε ένας διπλασιασμός των χρωμοσωμάτων, ο οποίος κάλυψε την απουσία των χρωμοσωμάτων. Η τρισωμία δεν μπορεί να βρεθεί σε ορισμένα είδη πιθανώς λόγω του ότι η αστάθεια που δημιουργείται από ένα έξτρα χρωμόσωμα είναι θανατηφόρα. Σε είδη 'ανεκτικά' στην τρισωμία συνήθως υπάρχει μια πλήρης αλλαγή στη μορφολογία, ειδικά σε είδη όπου εμφανίζονται να είναι βασικά διπλοειδή τύποι.

Τα ανευπλοειδή είναι συνήθως λιγότερο εύρωστα από τους διπλοειδείς προγόνους τους λόγω των φυσιολογικών διαταραχών που συσχετίζονται με την αστάθεια στον αριθμό των χρωμοσώμων. Επίσης τείνουν να είναι μειωτικά ακανόνιστα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να είναι μερικώς ή ακόμα και σε υψηλά επίπεδα στειρά. Η στειρότητα, σε συνδυασμό με την γενετική αστάθεια, είναι σε αντίθεση με τη διαδικασία της γενετικής βελτίωσης, με αποτέλεσμα την μικρή εφαρμογή τους στις εμπορικές ποικιλίες.

Παρόλο που τα ανευπλοειδή σπάνια έχουν αγρονομικά πλεονεκτήματα έναντι των κανονικών φυτών, παρόλα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα βελτίωσης φυτών. Ιδιαίτερα τα ασωμακά, μονοσωμικά και τρισωμικά, λόγω της χρησιμότητας που έχουν στο να εντοπίζουν γονίδια πάνω σε συγκεκριμένα χρωμοσώματα. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ιδιαίτερα τα

ασωματικά, για την μεταφορά συγκεκριμένων χρωμοσώμων με επιθυμητά γονίδια από την μια ποικιλία στην άλλη ή από το ένα είδος στο άλλο.

2.12 ΑΡΡΕΝΟΣΤΕΙΡΟΤΗΤΑ

Σαν αρρενοστεριότητα ορίζεται η αδυναμία των φυτών να παράγουν γόνιμους ανθήρες, γύρη ή ανδρικούς γαμέτες. Η πρώτη αναφορά έγινε από τον Kölreuter το 1763 ο οποίος παρατήρησε αποβολή των ανθέρων μέσα στο ίδιο το είδος ή των υβριδίων τους. Η εκδήλωση της γίνεται με απουσία ή παραμόρφωση των αρσενικών αναπαραγωγικών οργάνων σε ερμαφρόδιτα φυτά ή με την απουσία των αρσενικών άνθων σε δίκλινα φυτά, με την αποτυχία δημιουργίας μικροσποριογενούς ιστού από τους ανθήρες, με αντικανονική σποριογένεση (παραμορφωμένη ή μη ζωντανή γύρη), αντικανονική ωρίμανση της γύρης (ανικανότητα να βλαστήσει πάνω στο στίγμα), με μη άνοιγμα των ανθέρων αλλά η γύρη είναι ζωντανή και με άλλα εμπόδια εκτός της ασυμβατότητας που εμποδίζουν την γύρη να φτάσει στο ωάριο.

Διακρίνεται σε φαινοτυπική αρρενοστεριότητα η οποία χωρίζεται σε (α). σε αρρενοστεριότητα λόγω δομικών ανωμαλιών στα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα (β). σε αρρενοστεριότητα οφειλόμενη στη σποριογένεση λόγω του σχηματισμού στημόνων αλλά απουσίας γύρης και (γ). σε λειτουργική αρρενοστεριότητα που η γύρη είναι ζωντανή αλλά υπάρχουν εμπόδια για την γονιμοποίηση. Επίσης διακρίνεται σε γενοτυπική αρρενοστεριότητα η οποία χωρίζεται σε, (α). γενετική αρρενοστεριότητα που οφείλεται σε μεντελικά κληρονομήσιμα πυρηνικά και όχι κυτοπλασματικά γονίδια, (β). σε κυτοπλασματική αρρενοστεριότητα που οφείλεται σε μη μεντελικά κληρονομήσιμα γονίδια άλλα στο κυτόπλασμα και (γ). σε γενετικο-κυτοπλασματική αρρενοστεριότητα που οφείλεται και σε πυρηνικά αλλά και σε κυτοπλασματικά γονίδια. (Kaul 1988)

Η γενετική όπως και η κυτοπλασματική αρρενοστεριότητα έχει βρεθεί στα τετραπλοειδή βαμβάκια. Πέντε κυρίαρχα και επτά γονίδια χωρίς φαινοτυπική δράση έχουν αναγνωρισθεί σε αυτά από το 1960 όπου ο Justus & Leinweber ανακάλυψαν μια κληρονομήσιμη μερικά αρρενόστερη σειρά στο *Gossypium*

hirsutum L (Endrizzi et al ., 1985 ;Turcotte & Feaster, 1985). [Euphytica 48 : 23 3-237, 1990 Zhang Tianzheng & Pan Jiaju]

Η γενετική αρρενοστεριότητα ελέγχεται από ένα γονίδιο χωρίς φαινοτυπική δράση, διπλασιασμένο υποτελές γονίδιο (duplicate recessive gened), ή από ένα κυρίαρχο γονίδιο. Το κυρίαρχο γονίδιο χωρίς φαινοτυπική δράση , Ms₄, έχει συνήθως ολοκληρωμένη αρρενοστεριότητα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί έτσι ώστε να αποφευχθεί το στάδιο του ευνουχισμού κατά τις τεχνητές διασταυρώσεις του βαμβακιού. Η κυτοπλασματική αρρενοστεριότητα είναι αποτέλεσμα της μεταφοράς των χρωμοσώμων από τα *G.hirsutum* ή *G.barbadense* σε κυτόπλασμα προερχόμενο από το *G.harknessii*. Η επαναφορά της γονιμότητας γίνεται με τη χρήση ενός ημικυρίαρχου γονιδίου προερχόμενο από το *G.harknessii*. Το γονίδιο δίνει καλή επαναφορά της γονιμότητας όταν βρίσκεται σε ομοζύγωτη κατάσταση αλλά όχι τόσο καλή όταν βρίσκεται σε ετεροζύγωτη κατάσταση όπως τα F1 υβρίδια, γι' αυτό περιορίζεται η χρήση του σε εμπορική κλίμακα. Βελτιωμένη επαναφορά της γονιμότητας έχει η χρήση του κυρίαρχου γονιδίου E προερχόμενο από το *G.barbadense*.

2.13 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ

2.13.1 Γενικά

Ο άνθρωπος έχει πραγματοποιήσει την επιλογή και την ανάπτυξη επιθυμητών γενότυπων φυτών από την αρχή της ανθρωπότητας. Ο άνθρωπος έχει εφαρμόσει τις βασικές αρχές της επιστήμης φυτών καθ' όλη τη διάρκεια της ιστορίας. Εντούτοις, οι δυνατότητες των φυτών βελτιώθηκαν μόνο στον τελευταίο αιώνα ως αποτέλεσμα των ερευνών του Mendel σχετικά με τα κληρονομικά γνωρίσματα στα μπιζέλια και τις επόμενες ανακαλύψεις της γενετικής βάσης της κληρονομικότητας. Μεταξύ τους η χρωμοσωμική θεωρία, η επεξήγηση των μεταλλάξεων και επίσης η ανακάλυψη της δομής και λειτουργίας του DNA διαδραμάτισαν έναν σημαντικό ρόλο.

Η προκληθείσα μεταλλαξιγένεση, δηλαδή οι αλλαγές στη γενετική βάση του φυτού χρησιμοποιώντας χημικές ενώσεις ή τη ραδιενέργεια, υιοθετήθηκε μετά από τον Β' παγκόσμιο πόλεμο. Η αποκαλούμενη "πράσινη επανάσταση" το 50

περιέλαβε την ταυτόχρονη ανάπτυξη από τις νέες ποικιλίες φυτών και αλλαγές στις γεωργικές πρακτικές που αύξησαν πολύ το παραγωγικό δυναμικό. Μόλις έγινε κατανοητή η γενετική βάση της κληρονομικότητας, φυτά με διαφορετικά επιθυμητά γνωρίσματα επιλέγονταν και διασταυρώνονταν προκειμένου να παραχθούν νέες ποικιλίες οι οποίες συνδύαζαν καλύτερα χαρακτηριστικά από αυτά του δότη του γενετικού υλικού. Η ποιότητα των τελικών προϊόντων ήταν επίσης βελτιωμένη όσον αφορά π.χ. το περιεχόμενο σε πρωτεΐνη ή λάδι.

Η ζήτηση όμως της αγοράς έχει απαιτήσει την επιτάχυνση επάνω στη βελτιωτική διαδικασία παραγωγής και ανάπτυξης των ποικιλιών με υψηλή και σταθερή παραγωγή, με ανώτερες ή αλλαγμένες ιδιότητες. Δύο μέθοδοι και οι συνδυασμοί τους εμφανίστηκαν στο τέλος του 20^{ου} αιώνα, η γενετική μετατροπή και η επιλογή με τη βοήθεια χρήσης μοριακών δεικτών. Δεδομένου ότι η πρώτη προσέγγιση προσφέρει μια γρήγορη μέθοδο που συνδυάζει τα γενετικά υλικά από διαφορετικό είδη, η άλλη σκοπεύει να χρησιμοποιήσει τις πληροφορίες για τη δομή και λειτουργία του γονιδιώματος των φυτών στο να ταξινομήσει αποτελεσματικά το γονικό υλικό και να επιταχύνει την επιλογή των καλύτερων απογόνων με τη χρησιμοποίηση των μοριακών δεικτών. [Czech J. Genet. Plant Breed., 38, 2002 (1): 29–40]

2.13.2 Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες είναι επισημασμένες αλληλουχίες DNA που χρησιμοποιούνται για να επισημάνουν ένα επιθυμητό γονίδιο ή γονίδια στους εξετασμένους γενοτύπους. Στην πραγματικότητα ένα κομμάτι του DNA ή μιας πρωτεΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης.

Προηγούμενες προσεγγίσεις για επιλογή συγκεκριμένων γνωρισμάτων βασίστηκαν στην αξιολόγηση μορφολογικών γνωρισμάτων (Staub et al. 1996), στα ισοένζυμα (Stuber & Khanna 1991), και στις αποθηκευτικές πρωτεΐνες όπως γλουτεΐνες, γλιαδίνες, hordeins, κ.λπ. (Vapa & Radovic 1998; Metakovsky 1991; Shariflou et al. 2001; Kraic et al. 1995; Černý & ŠAŠEK 1996a, b)

Εντούτοις, οι δείκτες DNA φαίνεται να είναι οι καλύτεροι υποψήφιοι για την αποδοτική αξιολόγηση και επιλογή του φυτικού υλικού. Αντίθετα από τους πρωτεϊνικούς δείκτες, οι DNA δείκτες διαχωρίζονται ως ενιαία γονίδια και δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον.



Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες μοριακών δεικτών: (1) Δείκτες που διαχωρίζουν και που καθορίζουν την παρουσία ενός κυρίαρχου ή υπολειπόμενου γονίδιου και (2) QTL (Quantitative Trait Loci) σχετικούς δείκτες. Είναι πολύ ευκολότερο και φτηνότερο να αναπτυχθούν δείκτες για ένα γονίδιο κληρονομήσιμου γνωρίσματος από ότι οι QTLs. [*Czech J. Genet. Plant Breed.*, 38, 2002 (1): 29–40]

Αν και ένας μεγάλος αριθμός μοριακών τεχνικών δεικτών είναι σε τρέχουσα χρήση (Karp et al., 1998; Henry, 2001) αυτοί είναι ουσιαστικά παραλλαγές και συνδυασμοί ουσιαστικά βασικών τεχνικών που βασίζονται ή όχι στην τεχνική της PCR:

1. Τεχνικές χωρίς χρήση PCR είναι οι RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)
2. Τεχνικές με χρήση PCR είναι οι RAPDs, SSRs, ISSRs, ESTs

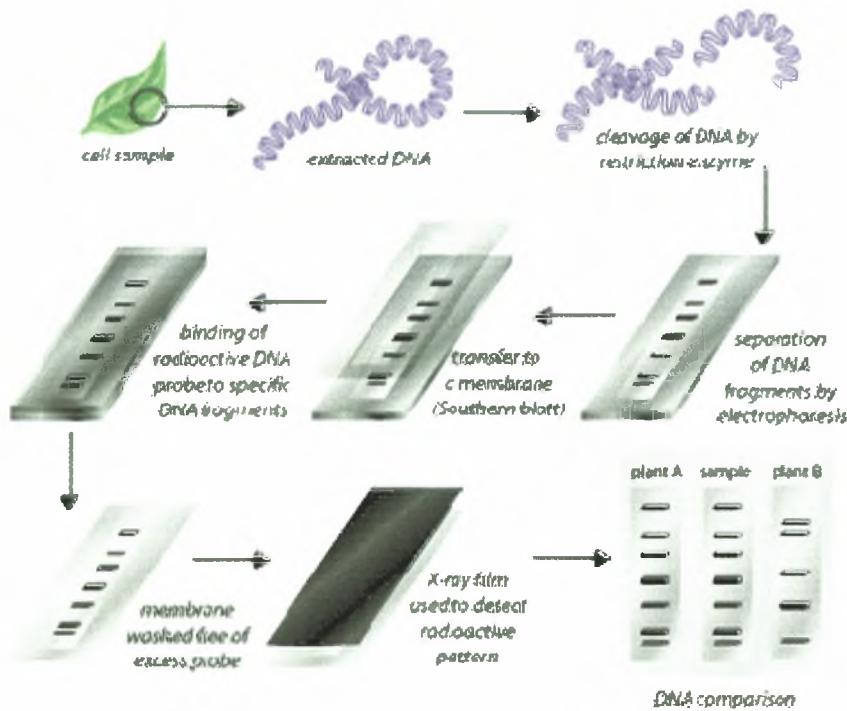
[J.L. Karihaloo Plant DNA Fingerprinting and its Applications]

2.13.2.1 RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Η μέθοδος είναι βασισμένη στην συγχώνευση ενδονουκλεάσεων περιορισμού του DNA και τη μεταφορά των τεμαχίων DNA σε ένα φίλτρο όπου μπορούν να υβριδοποιηθούν από ένα προσδιορισμένο τεμάχιο DNA (Southern 1975). Οι ενδονουκλεάσεις περιορισμού κόβουν τα συγκεκριμένα μοτίβα νουκλεοτιδίων σε μια ακολουθία DNA. Τα τεμάχια πρέπει να διαχωριστούν σύμφωνα με το μέγεθος τους σε ένα gel ηλεκτροφόρησης και τα τεμάχια που ενδιαφέρουν, προσδιορίζονται μετά από την υβριδοποίηση τους με γνωστούς ανιχνευτές (Neuhaus & Neuhaus 1993). [*Czech J. Genet. Plant Breed.*, 38, 2002 (1):29-40]

Συγκεκριμένοι συνδυασμοί ανιχνευτών-ένζυμων δίνουν τα ιδιαίτερα παραγωγικά δείγματα και δεδομένου ότι RFLPs είναι συγκυρίαρχοι δείκτες, η γενετική ανάλυση των σχεδιαγραμμάτων ζωνών είναι αρκετά απλή. Η ανάλυση RFLPs με χρήση microsatellites και minisatellite ανιχνευτές δίνει πολυθεσιακά δείγματα, τα οποία μπορούν να διακρίνουν ακόμη και ξεχωριστά άτομα. Οι παραλλαγές προκύπτουν συνήθως από τις αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων των βασικών επαναλήψεων, το τελευταίο συχνά αναφέρεται σαν Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTRs). Λόγω των πολύ υψηλών επιπέδων πολυμορφισμού

που ανιχνεύουν, οι VNTRs αναγνωρίζονται ως ισχυρά εργαλεία για τον χαρακτηρισμό ατομικών φυτών. [J.L. Karihaloo]



Εικόνα 15: Τα κυριότερα στάδια της RFLP.

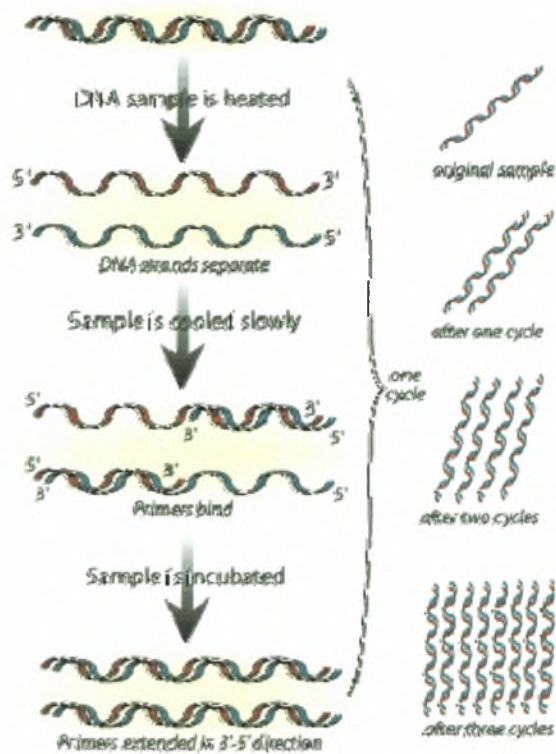
Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των RFLPs αναφέρονται στο γεγονός ότι δίνουν υψηλότερο επίπεδο πολυμορφισμού από ότι τα ισοένζυμα, μεγαλύτερο αριθμό θέσεων (loci), το ότι είναι συγκυρίαρχοι δείκτες επιτρέποντας έτσι τον καθορισμό της ομοζυγωτίας ή της ετεροζυγωτίας, δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον, είναι επιλεκτικά ουδέτεροι και είναι σταθεροί και αναπαραγωγίσιμοι δίνοντας σταθερά αποτελέσματα χωρίς να επηρεάζονται από το χρόνο ή την τοποθεσία. Από την άλλη όμως είναι μια χρονοβόρα και πολυδάπανη μεθοδολογία απαιτώντας πολύ χρόνο μέχρι να παρθούν τα αποτελέσματα, απαιτεί τη χρησιμοποίηση υψηλής ποιότητας και μεγάλη ποσότητα DNA, συνήθως χρησιμοποιούνται ραδιο-ισότοπα, πολλοί ανιχνευτές δεν είναι διαθέσιμοι σε μερικά είδη, μπορεί να παρατηρηθούν πολλοί πολυμορφισμοί εάν ο ανιχνευτής (probe) είναι πολύ μικρός, το κόστος ανάπτυξης τους είναι πολύ υψηλό λόγω του χρόνου και του εργατικού δυναμικού που απαιτείται και το ότι η συχνότητα των επιθυμητών πολυμορφισμών σε πολυπλοειδή φυτά είναι χαμηλή. [R. Magni]

Η RFLP ανάλυση είναι μια καλά αποδεκτή μέθοδος στη βελτίωση φυτών και χρησιμοποιείται για πολλούς διαφορετικούς λόγους (Backes et al. 1995; Burr et al. 1983; Helentjaris et al. 1985) όπως π.χ. η επιλογή των γνωρισμάτων με αγρονομική σημασία τα οποία είναι συνδεδεμένα με δείκτες RFLP, την ποιοτική δοκιμή των σπόρων και την ανάλυση διαχωρισμού των απογόνων, στην αξιολόγηση της ποικιλομορφίας σε μια συλλογή σπερμοβλάστων. Οι μοριακοί χάρτες βασισμένοι σε δείκτες RFLP αναπτύχθηκαν για σημαντικά είδη φυτών συμπεριλαμβανομένης της πατάτας (Bonierbale et al. 1988), αραβόσιπου (Helentjaris 1987) και κριθάρι (Graner et al. 1990). Οι δείκτες RFLP χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως εργαλείο για να περιγράψουν τη γενετική παραλλακτικότητα των ειδών (Beckmann & Soller 1983).

2.13.2.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η ανάπτυξη της τεχνικής PCR είναι ένα ορόσημο στην ανάλυση γονιδιώματος (Saiki et al. 1988; Schutzbank et al. 1993; White et al. 1992). Η βασική έννοια δοκιμάστηκε για πρώτη φορά με την πολυμεράση Klenow αλλά η πραγματική σημαντική ανακάλυψη ήρθε όταν μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, η Taq πολυμεράση (Mullis & Fallona 1987), απομονώθηκε και καθαρίστηκε.

Η PCR δημιουργήθηκε αρχικά ως μια τεχνική ανίχνευσης για τις αλλαγές των βάσεων στο γονιδίωμα, ως ένα εργαλείο για τη DNA διάγνωση γενετικών ασθενειών. Στα τελευταία έτη, διάφορες δοκιμές για να αποκαλύψουν τον DNA πολυμορφισμό στις multiallelic θέσεις έχουν αναπτυχθεί στον τομέα της PCR. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των PCR -βασισμένων μεθόδων είναι π.χ. απλότητα, ταχύτητα, και ιδιομορφία.



Εικόνα 16: Χρησιμοποίηση της PCR για τον πολλαπλασιασμό του DNA.

RAPDs

Η Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) είναι μια τεχνική βασισμένη PCR για τη αναγνώριση της γενετικής παραλλαγής. Περιλαμβάνει τη χρήση ενός ενιαίου αυθαίρετου εκκινήτη, συνήθως 10-mer ή 20-mer, σε μια PCR αντίδραση, με συνέπεια την ενίσχυση πολλών ξεχωριστών προϊόντων DNA. Η τεχνική αναπτύχθηκε ανεξάρτητα από δύο διαφορετικά εργαστήρια (Williams et. al., 1990; Welsh and McClelland, 1990) και ονομάστηκε σαν RAPD και AP-PCR (Arbitrary Primed PCR) αντίστοιχα. Αυτή η διαδικασία ανιχνεύει τους πολυμορφισμούς ακολουθίας των νουκλεοτιδίων σε μια μέθοδο βασισμένη στην ενίσχυση του DNA χρησιμοποιώντας μόνο έναν εκκινήτη μιας αυθαίρετης ακολουθίας νουκλεοτιδίων. Σε αυτήν την αντίδραση, ένα είδος εκκινήτη δεσμεύεται στο γενωμικό DNA, σε δύο διαφορετικές θέσεις, στα αντίθετα σκέλη του DNA. Εάν αυτές οι περιοχές είναι μέσα σε μια απόσταση ενίσχυσης ή μια την άλλη, ένα ξεχωριστό προϊόν DNA παράγεται μέσω της θερμοκυκλικής ενίσχυσης. Οι πολυμορφισμοί μεταξύ των ατόμων προκύπτουν από τις διαφορές της ακολουθίας στη μια ή και στις δυο από

τις περιοχές συνδέσεων των εκκινητών, και είναι ορατοί ως παρουσία ή απουσία μιας συγκεκριμένης RAPD ζώνης. Τέτοιοι πολυμορφισμοί συμπεριφέρονται ως κυρίαρχοι γενετικοί δείκτες.

Οι AP-PCR (arbitrary primed-PCR) και DAF (DNA amplification fingerprinting) είναι οι άλλες δυο τεχνικές βασισμένες στη PCR για την ανάλυση του DNA χρησιμοποιώντας αυθαίρετους εκκινητές. Δεδομένου ότι οι RAPD χρησιμοποιούν ένα αυθαίρετο εκκινητή αποτελούμενο από 9 ή 10 νουκλεοτίδια σε μήκος, σε συνθήκες χαμηλής ενίσχυσης, χωρισμός με πήκτωμα αγαρόζης και ανίχνευση με βοήθεια χρώσης με ethidium bromide, η DAF (Cateno-Anolles et al., 1991) χρησιμοποιεί ένα μονό/πολλαπλό αυθαίρετο εκκινητή μεγαλύτερο των 4 νουκλεοτιδίων σε μήκος, διαχωρισμό με πήκτη πολυακριλαμίδης, ακολουθούμενη από ηλεκτροφόρηση και ανίχνευση με χρώση αργύρου. Η AP-PCR χρησιμοποιεί ένα μονό αυθαίρετο εκκινητή 20 έως 34 νουκλεοτιδίων σε μήκος, σε συνθήκες χαμηλής ενίσχυσης ακολουθούμενη από συνθήκες υψηλής ενίσχυσης, ακολουθούμενη με διαχωρισμό με τη βοήθεια πήκτης πολυακριλαμίδης και ηλεκτροφόρηση και η ανίχνευση γίνεται με χρήση καταγραφικού ραδιενέργειας (autoradiography).

Η αναλυτικότητα που επιτυγχάνεται είναι χαμηλή (έως 10 προϊόντα), μέτρια (3-20) και υψηλή (έως 100 προϊόντα) χρησιμοποιώντας RAPD, AP-PCR and DAF αντίστοιχα.

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των RAPDs (merits and demerits)

Η τεχνολογία RAPD έχει παράσχει μια γρήγορη και αποδοτική μέθοδο για τους βασισμένους σε ακολουθίες πολυμορφισμούς του DNA για ένα μεγάλο αριθμό θέσεων. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα είναι ότι δεν απαιτείται καμία πληροφορία της ακολουθίας του DNA. Σύνολα μικρών εκκινητών (συνήθως 10mers) κατάλληλοι για RAPD είναι διαθέσιμοι εμπορικά ή μπορούν εύκολα να κατασκευαστούν και εκτός από το thermocycler και το μηχάνημα για πήκτη αγαρόζης δεν χρειάζεται κανένα άλλο ειδικό μηχανισμό. Συγκρινόμενη με την RFLP, η RAPD χρειάζεται μικρότερη ποσότητα DNA και απαιτεί συχνά μικροαλλαγές στη διαδικασία απομόνωσης του DNA για επαρκή ποσότητα και ποιότητα. Δεν απαιτεί ραδιενέργεια ή τις ειδικές διαδικασίες χρώσης για να απεικονιστούν οι πολυμορφισμοί. Η αυτοματοποίηση είναι δυνατή σε όλα τα

στάδια από την εξαγωγή DNA, στη συλλογή και την ανάλυση των δεδομένων. Το απέραντο εύρος των πιθανών εκκινητών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν δίνει στην τεχνική μεγάλη διαγνωστική δύναμη.

Εντούτοις, μια από τις αναπόφευκτες συνέπειες με την τεχνική είναι εκείνη η ενίσχυση εκτελείται κάτω από συνθήκες χαμηλής αυστηρότητας (stringency). Συνεπώς, μερικά από τα προϊόντα προκύπτουν από αδύνατα σύμπλοκα μεταξύ του εκκινητή και του προτύπου, και αυτό μπορεί να οδηγήσει στη φτωχή ικανότητα αναπαραγωγής για μερικούς εκκινητές και ζώνες. Εντούτοις οι αναπαραγωγικές ζώνες RAPD μπορούν να βρεθούν μετά από μια προσεκτική επιλογή των εκκινητών, τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR για τα συγκεκριμένα είδη που εξετάζονται, και την επαναληψιμότητα για να εξασφαλιστούν ότι μόνο οι αναπαραγωγικές ζώνες σημειώνονται. Ένα άλλο πρόβλημα που αναφέρεται για τις αναλύσεις RAPD είναι μια χαμηλή ύπαρξη των μη-κληρονομημένων ζωνών. Ενώ η μεγάλη πλειοψηφία των ζωνών RAPD είναι γνωστή για να κληρονομείται ως μεντελικοί δείκτες, απαιτείται προσοχή κατά τη εξαγωγή των συμπερασμάτων βασισμένων σε έναν μικρό αριθμό διαφορών ζωνών. Το πρόβλημα της ικανότητας αναπαραγωγής μεταξύ των εργαστηρίων είναι ένα άλλο ζήτημα σχετικό με τις αναλύσεις RAPD. Οι Penner et al. (1993) είχαν συγκρίνει πειραματικά τα αποτελέσματα RAPD μεταξύ των εργαστηρίων για 2 ποικιλίες βρωμών. Βρέθηκαν μερικές διαφορές όσον αφορά τα σχεδιαγράμματα DNA μεταξύ των εργαστηρίων, αλλά έβγαλαν το συμπέρασμα ότι εάν τα γενικά σχεδιαγράμματα θερμοκρασίας των PCR αντιδράσεων είναι τα ίδια, κατόπιν τα τεμάχια της RAPD είναι αναπαραγωγίσιμα για τους επιλεγμένους εκκινητές. Κατά συνέπεια μερικές διαφορές μπορούν να αναμένονται μεταξύ των εργαστηρίων χρησιμοποιώντας διαφορετικούς thermocyclers. Ένας περιορισμός της RAPD που δεν μπορεί να υπερνικηθεί είναι κυριαρχία των ζωνών. Αυτό σημαίνει ότι σπάνια ανιχνεύεται η ετεροζυγωτία και υπάρχουν συνήθως μόνο δύο μορφές για έναν πολυμορφισμό, η παρουσία του ή απουσία του. Συνεπώς, οι RAPDs και άλλα πολυθεσιακά σχεδιαγράμματα παρέχουν λιγότερα γενετικά στοιχεία από ότι τα σχεδιαγράμματα για τους μονοθεσιακούς συγκυρίαρχους δείκτες όπως οι STS. Επιπλέον δεδομένου ότι οι δείκτες RAPD είναι κυρίαρχοι δείκτες, κατά τη χαρτογράφηση των πληθυσμών, η φάση των διαγνωστικών δεικτών πρέπει να επιλεγεί έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί η χρησιμότητα των πληροφοριών.

VNTR (Variable Number of Tandem RepeatLoci)

Η ύπαρξη των μικροδορυφορικών θέσεων στα ευκαριωτικά γονιδιώματα ήταν γνωστή από τη δεκαετία του '70. Οι TAUTZ et al. (1986) έδειξαν ότι πολλές από τις απλές ακολουθίες που εμφανίζονται στα ευκαριωτικά ήταν 5 έως 10 φορές συχνότερες από τα ισοδύναμα-ταξινομημένα τυχαία μοτίβα, και ότι εμφανίστηκαν επίσης υψηλοί αριθμοί 'κρυμμένων' επαναλήψεων ή ανακατωμένες διατάξεις των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών (TAUTZ et al. 1986). Οι JEFFREYS et al. (1985) ανακάλυψαν υπερμεταβαλλόμενες (hypervariable) διαδοχικές επαναλήψεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα που έχουν μια μεγαλύτερη μονάδα επανάληψης (minisatellites). Οι Minisatellites όπως και οι microsatellites ποικίλουν στον αριθμό επαναλαμβανόμενων διαδοχικών στοιχείων, ως εκ τούτου ο γενικός προσδιορισμός και για τους δύο είναι ένας μεταβλητός αριθμός διαδοχικών θέσεων επαναλήψεων (VNTRs). Η VNTR ανάλυση αξιοποιεί τη PCR, εντούτοις μόνο ένα περιορισμένο υποσύνολο των παραλλαγών θα μπορούσε να αναλυθεί από τη PCR λόγω των γενικά μεγάλων μεγεθών των αλληλομόρφων γονιδίων στους minisatellite (CHENG et al. 1994). Οι SSRs έχουν το πλεονέκτημα έναντι των minisatellites επειδή τα μεγέθη αλληλομόρφων γονιδίων είναι μικρότερα από 500 ζεύγη βάσεων και η παραλλαγές είναι πάνω σε ένα στενό εύρος μεγέθους. Οι SSRs έχει γίνει η σημαντικότερη κατηγορία δεικτών για τη χαρτογράφηση των σχέσεων των διαφορετικών οργανισμών.

SSRs (Simple Sequence Repeat) ή STR (Short Tandem Repeat)

Οι μικροδορυφόροι SSRs αποτελούνται από τις διαδοχικά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, κάθε μια μεταξύ ενός και 10 ζεύγη βάσεων στο μήκος, όπως (TG)*n* ή (AAT)*n* (Bruford & Wayne 1993). Είναι ευρέως διασκορπισμένοι μέσα στα ευκαριωτικά γονιδιώματα, είναι συχνά ιδιαίτερα πολυμορφικοί και είναι μενδελικά κληρονομήσιμοι. Αυτοί οι δείκτες είναι ένα από τα μοριακά εργαλεία της επιλογής για τις μελέτες βιοποικιλότητας λόγω του υψηλού περιεχομένου πληροφοριών τους (Morin & Woodruff 1996).

Τα πρωτόκολλα PCR που χρησιμοποιούνται για τους microsatellites χρησιμοποιούν είτε μη προσδιορισμένα ζεύγη εκκινήτων ή ζεύγη όπου ο ένας εκκινήτης αναγνωρίζεται μέσω ραδιενέργειας ή μέσω φθορισμού. Η

ηλεκτροφόρηση μη προσδιορισμένων προϊόντων της PCR μπορεί να γίνει σε ένα κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ή σε ένα οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης. Εντούτοις, αυτή η προσέγγιση δεν είναι αρκετά ακριβής (Francisco et al. 1996). Υπάρχουν επίσης αυτοματοποιημένα συστήματα με σημαντικό πλεονέκτημα τη διαθεσιμότητα της χρώσης με τα διαφορετικά μήκη κύματος (π.χ. 6-FAM, HEX και TET, Applied Biosystems), έτσι είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί η ταυτόχρονη τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (χρησιμοποιώντας ABI PRISM system, Applied Biosystems) από διάφορες θέσεις με επικαλυπτόμενο μέγεθος αλληλόμορφων γονιδίων (Ziegle et al. 1992; POLÁKOVÁ et al. 2001).

Οι SSRs είναι συγκυρίαρχοι δείκτες και τα στοιχεία που παράγονται είναι παρόμοια με εκείνους των αλλοζύμων, εκτός από το ότι ο αριθμός αλληλόμορφων γονιδίων και η αποκαλυφθέντα ετεροζυγωτία είναι σχεδόν πάντα υψηλότερη. Παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο πολυμορφισμών, όπως και σε ακρίβεια θέσεων (loci), η χρήση τους είναι εύκολη και δεν είναι χρονοβόρα διαδικασία. Από την άλλη όμως οι SSRs μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο για ενδοειδικές και ενδογενωμικές αναλύσεις και είναι περιορισμένοι στη χρήση τους λόγω του χρόνου όπως και το κόστος που απαιτείται για την ανάπτυξη τους.

AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Η αρχή των AFLPs είναι βασισμένη στην επιλεγμένη ενίσχυση ενός υποσυνόλου περιοριστικών τεμαχίων από ένα σύνολο μίγματος τεμαχίων DNA το οποίο πάρθηκε μετά από συγχώνευση του γενωμικού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Οι πολυμορφισμοί προέρχονται από τις διαφορές στο μέγεθος των ενισχυμένων τεμαχίων μετά από ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (PAGE) (Matthes et al. 1998) ή με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.

Η διαδικασία περιλαμβάνει την απομόνωση του DNA και τη συγχώνευση του αργότερα με ένα ζεύγος περιοριστικών ενζύμων συνήθως 4 και 6 αλληλουχιών νουκλεοτιδίων και ένωση του με ειδικούς προσαρμογείς για τις επιλεγμένες περιοριστικές θέσεις. Μετά ακολουθεί η ενίσχυση των περιοριστικών προϊόντων. Η επιλεγμένη ενίσχυση επιτυγχάνεται με τη χρήση εκκινητών που επεκτείνονται μέσα στα περιοριστικά τεμάχια, ενισχύοντας μόνο τα τεμάχια εκείνα όπου οι επεκτάσεις του εκκινητή ταιριάζουν με τα νουκλεοτίδια που υπάρχουν στις περιοριστικές θέσεις.

Η τεχνολογία AFLP είναι ένα πανίσχυρο εργαλείο για τον εντοπισμό και την αξιολόγηση της γενετικής ποικιλότητας σε συλλογές σπερμοβλαστών (germplasm collections) όπως και στη διαλογή της βιοποικιλότητας όπως και για fingerprinting studies (Werner et al. 2000).

Τα κύρια πλεονεκτήματα τους είναι ότι δεν απαιτείται καμιά πληροφορία όσον αφορά την αλληλουχία, είναι απλή και αξιόπιστη μέθοδος και παράγει μεγάλο αριθμό πολυμορφισμών ανά αντίδραση, έχει υψηλή επαναληψιμότητα και είναι εκλεκτικά ουδέτερη. Τα κυριότερα μειονεκτήματα είναι ότι τα ασήμαντα αλληλόμορφα γονίδια δεν εντοπίζονται, απαιτούν καθαρό, υψηλού μοριακού βάρους DNA και το ότι είναι κυρίαρχοι δείκτες. Επίσης, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού και της διαφορετικής συχνότητας των ζωνών, είναι αναγκαίο να δημιουργηθούν ακριβή αλλά υποκειμενικά κριτήρια για την αποδοχή ζωνών κατά την ανάλυση. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στο γεγονός ότι οι ζώνες δεν είναι πάντα ανεξάρτητες. Αυτό είναι σημαντικό στη μελέτη γενετικών σχέσεων, γιατί έτσι αυξάνεται το βάρος των μη ανεξάρτητων ζωνών (Spooner *et al.*, 2005). Επίσης, είναι τεχνικά απαιτητικές, είναι πολυδάπανη τεχνολογία και το γεγονός το ότι είναι ιδιόκτητη τεχνολογία δυσχεραίνεται η χρήση της.

2.14 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας ήταν εφαρμογή διειδικών διασταυρώσεων μεταξύ ποικιλιών βαμβακιού του γένους *Gossypium* και συγγενών ειδών που ανήκουν στην οικογένεια *Malvaceae* (*Abelmoschus esculentum*, *Hibiscus cannabinus* και *Malva sylvestris*) που χρησιμοποιήθηκαν ως επικονιαστές. Παράλληλα έγινε μελέτη της πορείας επικονίασης με καταγραφή της αύξησης του γυρεοσωλήνα, την εναπόθεση καλλόζης και το σχηματισμό χοντρότερων σωλήνων μέσα στο στύλο με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού. Τέλος έγινε η μελέτη των γενετικών μεταξύ τους σχέσεων των γονέων διασταύρωσης, επικονιαστών και απογόνων με βάση κυτταρογενετικές και μοριακές μεθόδους.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Γενετικό υλικό

Το γενετικό υλικό της εργασίας αποτέλεσαν 5 μερικώς διειδικά υβρίδια βαμβακιού τα οποία προήλθαν από αμοιβαίες διασταυρώσεις μεταξύ ποικιλιών του *G.hirsutum* (4S, Acala, Coker) και του *G.barbadense* (B403, Carnak) και στην συνέχεια τα F1 υβρίδια τους επικονιάστηκαν με γύρη προερχόμενη από το *Hibiscus cannabinus* (Πίνακας 3). Επίσης φυτεύτηκαν και δυο εμπορικές ποικιλίες η CELIA και η St474. Ως επικονιαστές φυτεύτηκαν το *Hibiscus cannabinus* ποικιλία IRAN και το *Abelmoschus esculentum*. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και γενετικό υλικό από *Malva sylvestris* προερχόμενο από αυτοφυές φυτά στην περιοχή του Βελεσίνου του αγροκτήματος Θεσσαλίας.

3.2. Εγκατάσταση του πειράματος

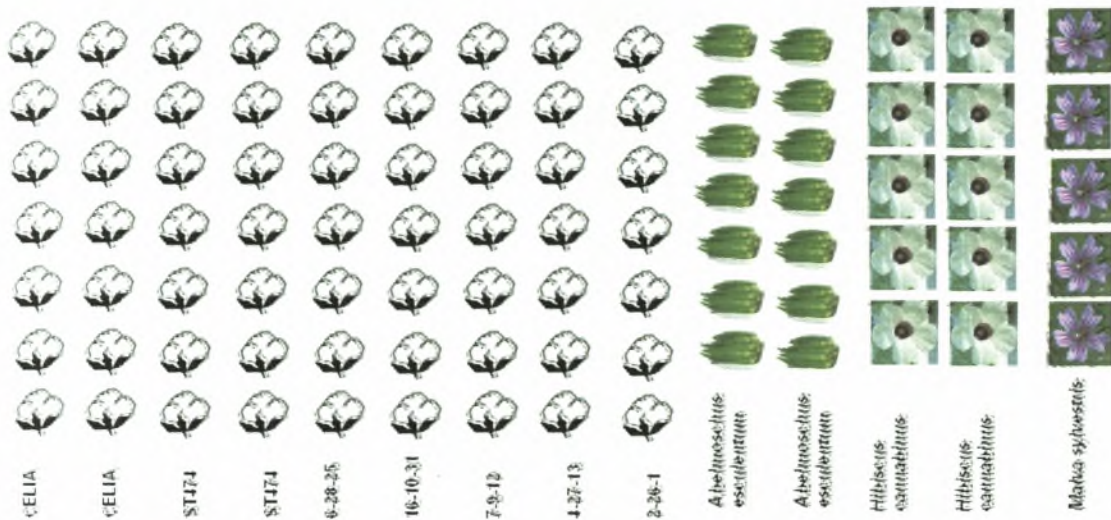
Το πείραμα εγκαταστάθηκε στο Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στη περιοχή Βελεσίνου, κατά την καλλιεργητική περίοδο 2006.

Η σπορά για τα μερικώς διειδικά υβρίδια και τις εμπορικές ποικιλίες πραγματοποιήθηκε στις 18 Μαΐου, ενώ η σπορά των επικονιαστών στις 19 και 21 Μαΐου του 2006. Επαναληπτική σπορά πραγματοποιήθηκε ξανά στις 18 Ιουνίου του 2006.

Οι σπόροι σπάρθηκαν σε μονές γραμμές, πλην των εμπορικών ποικιλιών και των επικονιαστών που σπάρθηκαν σε διπλές, μήκους 7 περίπου μέτρων και με αποστάσεις μεταξύ των γραμμών 1 m. Οι αποστάσεις μεταξύ των φυτών ήταν 15 cm και οι σπόροι φυτεύτηκαν σε βάθος 5 cm. Σε κάθε γραμμή σπάρθηκαν 46 σπόροι.

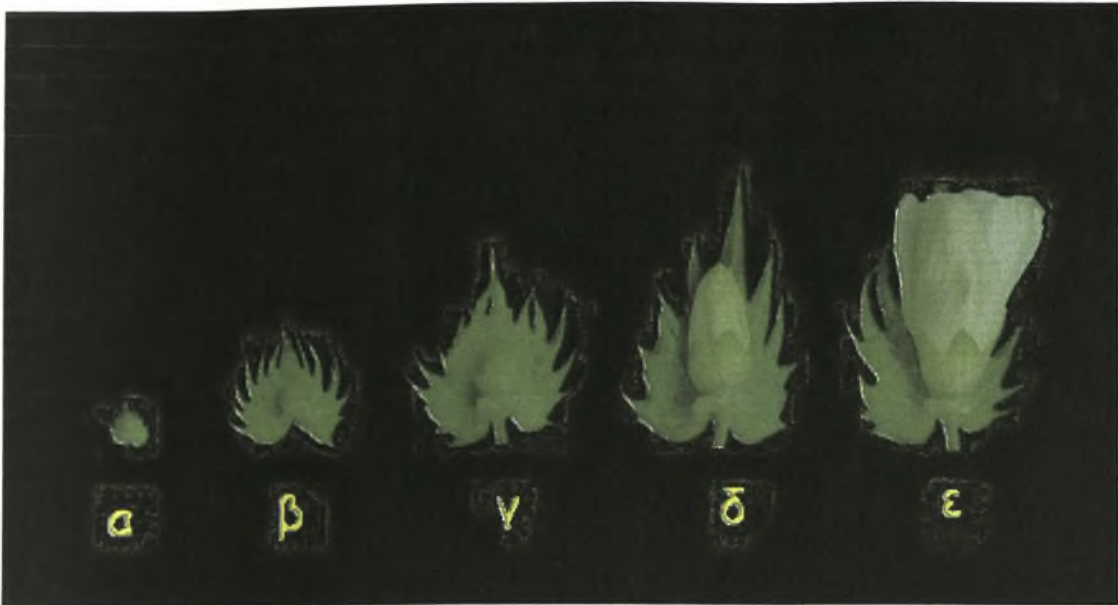
Κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου εφαρμόστηκαν όλες οι απαραίτητες καλλιεργητικές φροντίδες για τη ανάπτυξη των φυτών.

Στις 28 Ιουλίου έγινε καταγραφή της πυκνότητας του πληθυσμού και ελήφθησαν παρατηρήσεις που αφορούσαν την ανθοφορία των φυτών.



Εικόνα 17: Σχεδιάγραμμα του πειράματος

Στα μερικώς διειδικά υβρίδια, καθώς και οι εμπορικές ποικιλίες CELIA και St474 πραγματοποιήθηκαν επικονιάσεις με γύρη προερχόμενη από τα είδη *Hibiscus cannabinus*, *Abelmoschus esculentum* και *Malva sylvestris*. Οι διαδικασίες επικονίασης λάμβαναν χώρα στο κατάλληλο στάδιο άνθισης (στάδιο της κορόλας, εικόνα 18, στάδιο δ) και αφορούσαν διαδικασίες αποστημόνωσης και επικονίασης. Οι αποστημονώσεις των βαμβακιών πραγματοποιούνταν νωρίς το πρωί και μετά πραγματοποιούνταν οι επικονιάσεις. (Εικόνα 19). Η όλη διαδικασία λάμβανε τέλος πριν τις 11 π.μ. Το σύνολο των διασταυρώσεων πραγματοποιήθηκε κατά το διάστημα από 28 Ιουλίου έως 17 Σεπτεμβρίου με το κύριο όγκο των διασταυρώσεων να γίνεται στο διάστημα λίγο πριν και μετά τις 15 Αυγούστου. Επίσης σε όλα τα μητρικά φυτά πραγματοποιήθηκαν αυτογονιμοποιήσεις ενώ παράλληλα αφέθηκαν άνθη αγονιμοποίητα (Unfertilized) που αξιοποιήθηκαν σαν μάρτυρες.



Εικόνα 18: Στάδια ανάπτυξης των ανθέων βαμβακιού

Πραγματοποιήθηκαν και οι αντίστροφες επικονιάσεις με χρησιμοποίηση ως δότες γύρης το διειδικό υβρίδιο 16-10-31 και σαν μητρικά φυτά, τα προηγούμενα χρησιμοποιούμενα σαν επικονιαστές *Hibiscus cannabinus*, το *Abelmoschus esculentum* και από *Malva sylvestris*.

Πίνακας 3: Γενεαλογία των ημιγονίμων φυτών και των άγονων οικογενειών και κωδικοποίηση κατά τα έτη 2002-2005

2005	2004	2003	2002	
A	7-9-12	8	A3-9	<i>[(B403xCoker)xHib.cannabinus]</i>
B	4-27-13	9	A3-10	<i>[(B403xCoker)xHib.cannabinus]</i>
Γ	16-10-31	22	B4-7	<i>[(Camakx4S)xHib.cannabinus]</i>
Δ	6-28-25	18	B5-6	<i>[(Camakx4S)xHib.cannabinus]</i>
E	2-26-1	9	A3-10	<i>[(B403xCoker)xHib.cannabinus]</i>



Εικόνα 19: Στάδια αποστημόνωσης, επικονίασης και κάλυψης του στύλου

3.3 Μετρήσεις και παρατηρήσεις

Κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου ελήφθησαν παρατηρήσεις που αφορούσαν το ποσοστό φυτρώματος των φυτών και την ημερομηνία άνθησης των φυτών. Επίσης ελήφθησαν παρατηρήσεις που αφορούσαν μορφολογικές ανωμαλίες στο άνθος (παρουσία, απουσία στημόνων, κ.τ.λ.)

3.4 Μελέτη της βλάστησης της γύρης και πορείας του γυρεοσωλήνα

Η συμπεριφορά της ανάπτυξης των γυρεοσωλήνων ανιχνεύθηκε μετά από επικονιάσεις μεταξύ διειδικών υβριδίων και εμπορικών ποικιλιών (CELIA και St474) που χρησιμοποιήθηκαν ως μητρικά φυτά με επικονιαστές τα είδη *Hibiscus cannabinus*, το *Abelmoschus esculentum* που χρησιμοποιήθηκαν ως δότες γύρης.

Τα φυτά επικονιάστηκαν νωρίς το πρωί και αφέθηκαν πάνω στο φυτό για 8 έως και 24 ώρες έτσι ώστε να γίνουν παρατηρήσεις που αφορούσαν το μέγεθος και την πορεία του γυρεοσωλήνα στις αντίστοιχες ώρες.

Οι στύλοι αφαιρούνταν μαζί με την ωοθήκη στις 8 και 24 ώρες και σταθεροποιούνταν σε διάλυμα 5:5:90 v/v/v φορμαλδεΐδης: οξικού οξέως: 70% αιθανόλης και διατηρούνταν στο ψυγείο στους 4 °C. Στη συνέχεια οι στύλοι

ξεπλένονταν με απεσταγμένο νερό και τοποθετούνταν σε διάλυμα 1N NaOH έτσι ώστε οι ιστοί να μαλακώσουν ενώ αφήνονταν κατά τη διάρκεια της νύκτας για διάστημα τουλάχιστον 12 έως 16 ωρών. Οι μαλακοί πλέον στύλοι χρωματίζονταν σύμφωνα με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε κατά την δεκαετία του 1950, όπου η τεχνική χρησιμοποιεί το φθορισμό που προκαλεί το μπλε της ανιλίνης (aniline blue) (Linskens and Esser 1957; Martin 1959; Shivanna and Rangaswamy 1992). Η μέθοδος βασίζεται στην έλξη που προκαλείται στην καλλόζη από το Fluorochrome (υδατοδιαλυτή aniline blue) και επειδή οι γυρεοσωλήνες αποθέτουν καλλόζη κατά μήκος των τοιχωμάτων του στύλου, μπορούν να παρατηρηθούν κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού εάν ακολουθηθεί η συγκεκριμένη μέθοδος. Το διάλυμα aniline blue (0,005%) διαλυόταν σε διάλυμα 0.05M Na_2HPO_4 , αφού το pH είχε ρυθμιστεί γύρω στο 11, το οποίο βρισκόταν φυλαγμένο σε σκοτεινή φιάλη στο ψυγείο για διάστημα 12-16 ωρών. Οι χρωματισμένοι στύλοι μεταφέρονταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω σε σταγόνα γλυκερόλης και καλύπτονταν με καλυπτρίδα. Τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (εικόνα 20) και φωτογραφήθηκαν η ποσότητα της γύρης στο στίγμα, η βλάστηση της και αντίδραση της καλλόζης.



Εικόνα 20: Μικροσκόπιο φθορισμού

3.5 Κυτταρογενετική ανάλυση

Για την κυτταρογενετική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι παραγόμενοι σπόροι από τις διασταυρώσεις, καθώς και τα μητρικά τους φυτά, όπως και τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ως επικονιαστές από τα είδη *Hibiscus cannabinus*, *Abelmoschus esculentum* και *Malva sylvestris*.

Για την μελέτη του αριθμού των χρωματοσωμάτων ελήφθησαν ριζίδια από σπόρους οι οποίοι είχαν τοποθετηθεί μέσα σε jiffy pots® και αφέθηκαν να βλαστήσουν σε συνθήκες εργαστηρίου. Οι σπόροι επιλέγονταν σύμφωνα με το μέγεθος τους και το σχήμα τους. Επιλέγονταν κατά προτίμηση μικροί ή παραμορφωμένοι σπόροι, οι οποίοι διάφεραν από τους υπόλοιπους σπόρους. Τα ίδια φυτά χρησιμοποιήθηκαν και για την μοριακή γενετική ανάλυση.

Τα ριζίδια αυτά τοποθετούνταν σε διάλυμα 1 mM 1-βρωμοναφθαλυνίου για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια σταθεροποιούνταν σε διάλυμα αιθανόλης 70% και οξικού οξέως (3:1) στο οποίο φυλάχθηκαν για διάστημα τουλάχιστον μιας εβδομάδας στους 4°C. Πριν την παρατήρηση οι ρίζες ξεπλένονταν 2 φορές με απεσταγμένο νερό για 5 min και ακολούθως υδρολύονταν σε διάλυμα 5 M HCl για 20 min και ξεπλένονταν με απεσταγμένο νερό για τουλάχιστον 3 φορές για χρονικό διάστημα 10 min. Η υδρόλυση με HCl μαλακώνει τα κυτταρικά τοιχώματα (Fox, 1969), επιτρέποντας έτσι καλύτερη διασπορά των κυττάρων και των χρωμοσώμων, με αποτέλεσμα το κυτόπλασμα να γίνεται αρκετά διαφανές. Όμως σύμφωνα με τον Wittman (1965) τα υπολύματα του HCl μπορούν να επηρεάσουν τη χρώση και για αυτό θεωρείται απαραίτητο το ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό μετά την υδρόλυση. Η χρώση τους έγινε με διάλυμα 4% αιματοξυλίνης για τουλάχιστον 30 min και η παρατήρηση τους γινόταν σε οπτικό μικροσκόπιο. Τα ριζίδια μεταχειρίζονταν έτσι ώστε να παρθούν μόνο τα ακρορίζια και ακολούθως γινόταν η τοποθέτησή τους πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Για επιπρόσθετο χρωματισμό τοποθετούνταν μικρή επιπρόσθετη ποσότητα 4% αιματοξυλίνης και καλύπτονταν με την καλυπτρίδα. (Marcelo Guerra, 1999, Hematoxylin: a simple, multiple-use dye for chromosome analysis, Genet. Mol. Biol. vol.22 n.1 São Paulo Mar. 1999)

3.6 Μοριακή ανάλυση γενοτύπων με την χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPDs

Για την ανάλυση (DNA) των γενοτύπων χρησιμοποιήθηκαν οι μοριακοί δείκτες τύπου RAPDs. Το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν, τα μερικώς διειδικά υβρίδια 6-28-25 (*[(Camakx4S)xHib.cannabinus]*) και η διασταύρωση του με *Abelmoschus esculentum* (F), το μερικώς διειδικό υβρίδιο 16-10-31 (*[(Camakx4S)xHib.cannabinus]*) και οι διασταυρώσεις του με *Abelmoschus esculentum* (G) και *Malva sylvestris* (I), οι ποικιλίες CELIA και οι διασταυρώσεις της με *Abelmoschus esculentum* (A), *Malva sylvestris* (C), η ποικιλία St474 και οι διασταυρώσεις της με *Abelmoschus esculentum* (D), *Malva sylvestris* (E), όπως και γενετικό υλικό από *Abelmoschus esculentum*, *Hibiscus cannabinus* και *Malva sylvestris*.

3.6.1 Εξαγωγή του DNA

Η εξαγωγή του DNA έγινε με την μικρομέθοδο CTAB (Doyle and Doyle, 1990) από δείγμα 4-5 φύλλων για κάθε γενότυπο. Για κάθε γενότυπο ζυγίζονται 0,4 g φυτικού ιστού τα οποία ψιλοκόβονταν και τοποθετούνταν σε tube 1mL και προστίθονταν σε αυτά 800μL CTAB (hexadltrimethylammonium bromide – βρωμίδιο του εξατριμεθυλαμμωνίου) το οποίο είχε παρασκευαστεί και περιείχε στα 100 mL, 0,02 g/mL CTAB, 0,1M Tris-HCl (pH 8,0), 0,02M Na₂-EDTA και 1,12M NaCl συμπληρωμένο έως τα 100 mL. Στο CTAB είχε προστεθεί και PVP 1% w/v (Polyvinylpyrrolidone) για την απομάκρυνση του υψηλού βαθμού των πολυφαινολών που περιέχουν τα φύλλα βαμβακιού. Στη συνέχεια προστίθονταν 10 μL β-mercaptoethanol (0,01g/mL) και 2 μL R-Nase σε συγκέντρωση 0,01 g/100 μL (0,1g/mL) και τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο στους 60 °C για 20 λεπτά για καταστροφή του RNA. Στη συνέχεια προστίθονταν 700 μL χλωροφόρμιο:ισοαμυλική σε αναλογία 24:1 και φυγοκεντρείτο στις 10000 στροφές/μιν για 20 λεπτά, έτσι ώστε το DNA να διαχωριστεί σε μια ενιαία φάση. Αφαιρείτο το υπερκείμενο και προστείθετο σε αυτό τα 2/3 του όγκου του σε ισοπροπανόλη και στο 1/10 αυτού 3M NH₄-acetate και τοποθετείτο στην κατάψυξη για 30 λεπτά. Κατά τον χρόνο αυτό τα μόρια του DNA συσσωματώνονται σε αδιάλυτα σύμπλοκα. Η συσσωμάτωση αυτή υποβοηθάτε

από την οξινοποίηση του διαλύματος λόγω αφαίρεσης του αρνητικού ηλεκτρικού φορτίου του DNA που αυτή συνεπάγεται. Το προστίθεν άλας επίσης βοηθά την συσσωμάτωση λόγω του φαινομένου της εξαλάτωσης του DNA.

Μετά ακολουθούσε τοποθέτηση του στη φυγόκεντρο στις 10000 στροφές/min για 15 λεπτά κατά την οποία το DNA καθιζάνει υπό την μορφή ιζήματος. Το διάλυμα αδειάζοταν και προστίθετο στο ίζημα 900 μL αιθανόλης 70% και 100 μL k-acetate-aceter buffer και γίνεται φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 5 λεπτά, γίνεται επανάληψη του προηγούμενου σταδίου ξανά. Στο τέλος έγινε ξανά επανάληψη του προηγούμενου σταδίου αλλά με διαφορά την προσθήκη μόνο 900 μL καθαρής αιθανόλης. Αδειάζετε το υγρό και το τελικό ίζημα τοποθετείται για αποξηράνση σε ξηραντήρα κενού με περιστροφή για 20 λεπτά στους 60 °C. Στο αποξηραμένο πλέον DNA προστίθεται 200 μL TE buffer (10 mM Tris και ρύθμιση του pH στο 7,5 με HCl, 1 mM EDTA) αναδεύεται και τοποθετείται στο ψυγείο.

3.6.2 Ανάλυση με χρήση εκκινητών τύπου RAPD

Για την ανάλυση με χρήση εκκινητών τύπου RAPD χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε κάθε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν:

- 2 μl γενωμικού DNA σαν μήτρα,
- 2,5 μl 10x PCR buffer (Minotech),
- 4 μl από 0,625 uM 10-νουκλεοτιδικό RAPD εκκινητή (Operon Tech),
- 1,7 μl από 25 mM MgCl₂, 2,4 μl από 2,5 μM dNTPs και
- 0,25 μl από 1U Taq DNA πολυμεράσης (Minotech),

ενώ η αντίδραση ρυθμίστηκε στο τελικό όγκο 25 μl με αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό (ddH₂O).

Οι συνθήκες αντίδρασης της PCR ήταν :

1. Προ-αποδιάταξη στους 95°C για 8 λεπτά.
2. Αποδιάταξη στους 94 °C για 1 λεπτό, επικόλληση των εκκινητών στους 35 °C για 1 λεπτό και επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72 °C για 1,30 λεπτό, επαναλαμβανόμενο σε 35 κύκλους.
3. Και τελική επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72 °C για 7 λεπτά.

Για κάθε γενότυπο, τα προϊόντα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης αναμίχθηκαν με 3 μl διαλύματος φόρτωσης (50% γλυκερόλη, 0,05% w/v μπλε βρωμοφαινόλη, 0,1M EDTA pH 8,0). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 1% w/v, στην οποία είχε προστεθεί και 5 μl βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/mL), για μία ώρα σε εφαρμοζόμενη τάση 80 Volt. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτική εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία και έγινε καταγραφή των πολυμορφισμών των δειγμάτων.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Εκτίμηση ποσοστού φυτρώματος

Το ποσοστό φυτρώματος ανάμεσα στις οικογένειες κυμαινόταν από 24 έως 49 %. Γεγονός που το κάνει πολύ χαμηλό για να χρησιμοποιηθούν σαν εμπορικές ποικιλίες λόγω του ότι το ποσοστό φυτρώματος πρέπει να κυμαίνεται από 90-95% για μια αξιόλογη εμπορική ποικιλία. Παρόλα αυτά οι εμπορικές ποικιλίες CELIA και St474 δεν είχαν ούτε αυτές αρκετά υψηλά ποσοστά φυτρωτικής ικανότητας, ήταν 39 και 54% αντίστοιχα, πράγμα που εάν θεωρήσουμε ότι το ποσοστό 54%, κάτω από ιδανικές συνθήκες έπρεπε να ήταν στο 95%, και το ανάγουμε σε αυτό, τότε παρατηρούμε ότι το ποσοστό φυτρωτικής ικανότητας είναι αρκετά ικανοποιητικό στις οικογένειες 2-26-1 και 16-10-31 με ποσοστά 86 και 71% αντίστοιχα.

Πίνακας 4: Εκτίμηση της φυτρωτικής ικανότητας γενοτύπων βαμβακιού, μπάμιας και κενάφ με βάση την πυκνότητα του πληθυσμού των φυτών

Πυκνότητα πληθυσμού 28/7				ποσοστό φυτρώματος	εκτίμηση πραγματικής φυτρωτικής ικανότητας
A.e.	1η γραμμή	23		0,54	95
	2η γραμμή	27			
H.c.	1η γραμμή	13		0,24	42,22
	2η γραμμή	10			
CELIA	1η γραμμή	19		0,39	68,61
	2η γραμμή	17			
St474	1η γραμμή	30		0,54	95
	2η γραμμή	20			
6-28-25		14	όχι άνθη	0,3	52,77
16-10-31		19	1 άνθος	0,41	72,12
7-9-12		11	όχι άνθη	0,24	42,22
4-27-13		14	όχι άνθη, 3-4 μεγάλα φυτά	0,3	52,77
2-26-1		22		0,49	86,20

4.2 Μορφολογικές ανωμαλίες στα άνθη

4.2.1. Διπλά καρύδια

Κατά τη διάρκεια της περιόδου των διασταυρώσεων παρατηρήθηκαν μορφολογικές ανωμαλίες στα άνθη στις οικογένειες 7-9-12 και 4-27-13 που αφορούσαν κυρίως την παρουσία μικρού ποσοστού διπλών άνθων (εικόνα 21) τα οποία γονιμοποιούνταν και τα δυο αλλά στο τέλος μόνο το ένα κατάληγε σε κανονικό καρύδι ενώ το άλλο παράμενε ατροφικό. Στην οικογένεια 6-28-25 παρατηρήθηκαν άνθη και άνθη με μεγάλο ποδίσκο αλλά και άνθη κολλημένα πάνω στο κυρίως στέλεχος.



Εικόνα 21: Διπλό καρύδι στην οικογένεια 7-9-12

4.2.2. Απουσία στύλου

Κατά την διάρκεια της διαδικασίας της αποστημόνωσης παρατηρήθηκαν μορφολογικές ανωμαλίες σε άνθη σε μικρό ποσοστό 4-27-13, που αφορούσαν την απουσία στύλου από τα άνθη ενώ το υπόλοιπο αρσενικό αναπαραγωγικό μέρος ήταν εντάξει. Το γεγονός αυτό χρίζει ενδιαφέροντος για περαιτέρω μελέτη και έρευνα, λόγω των πολλών δυνατοτήτων που μπορεί να έχει σε ένα πρόγραμμα διασταυρώσεων μια τέτοια ιδιότητα. Μαζί με το γεγονός ότι οι αυτογονιμοποιήσεις σε κανονικά άνθη ήταν επιτυχείς, πράγμα που μας δείχνει ότι η γύρη είναι ζωντανή, θα ήταν ένας ιδανικός συνδυασμός για την χρήση της οικογένειας σε βελτιωτικά προγράμματα.

4.2.3. Αρρενοστεριότητα

Παρόλο που όλες οι οικογένειες που εξετάστηκαν προήλθαν από αρρενόστειρες σειρές, κατά την διάρκεια των διασταυρώσεων πραγματοποιήθηκαν και αυτογονιμοποιήσεις για να ελεγχθεί η υπόθεση αυτή. Κατά τις αυτογονιμοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι στις οικογένειες 6-28-25, 16-10-31 και 7-9-12 σε όσες αυτογονιμοποιήσεις έγιναν κανένα καρύδι δεν έπεσε, γεγονός που μας δείχνει ότι δεν είναι αρρενόστειρες, εν αντίθεση με τις οικογένειες 4-27-13 και 2-26-1, από τις οποίες καμιά από τις αυτογονιμοποιήσεις δεν ήταν επιτυχής. Αυτό δίνει την ικανότητα στις τελευταίες οικογένειες να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βελτιωτικά προγράμματα διασταυρώσεων σαν αρρενόστειρες σειρές.

4.2.4. Παρατηρήσεις που αφορούσαν την άνθιση

Από τις πέντε οικογένειες που μελετήθηκαν μόνο η 16-10-31 της οποίας η περίοδος άνθισης άρχισε στις 18 Ιουλίου και ολοκληρώθηκε στις 17 Σεπτεμβρίου. Την ίδια περίοδο δηλαδή μαζί με τις εμπορικές ποικιλίες CELIA και St474. Οι οικογένειες 7-9-12 και 2-26-1 ακολούθησαν 3 ημέρες μετά, στις 31 Ιουλίου, και ακολουθούμενες από τις οικογένειες 6-28-25 και 4-27-13 στις 10 Αυγούστου. Η περίοδος της άνθησης ολοκληρώθηκε στις 17 Σεπτεμβρίου.

Ο κύριος όγκος παραγωγής ανθέων για τις εμπορικές ποικιλίες CELIA και St474, ήταν στο διάστημα 8-17 Αυγούστου (51-60 μέρες μετά την σπορά) με αποκορύφωμα στις 13 Αυγούστου (56 μέρες μετά την σπορά) για την ποικιλία CELIA και 17-22 Αυγούστου με αποκορύφωμα τις 19 Αυγούστου για ποικιλία ST474. Η οικογένεια 6-28-25 παρόλο που το ποσοστό φυτρώματος ήταν μικρό παρατηρήθηκε ένας αξιόλογος αριθμός παραγωγής ανθέων, με τον κύριο όγκο να ήταν στις 17-19 Αυγούστου, ενώ για την οικογένεια 16-10-31 το μέγιστο παρατηρήθηκε στις 22 Αυγούστου με επίσης παραγωγή ενός αξιόλογου αριθμού ανθέων, σε βαθμό που φτάνει τις εμπορικές ποικιλίες. Οι οικογένειες 7-9-12 και 4-27-13 παρουσίασε μικρό ποσοστό παραγωγής άνθεων γεγονός που οφείλεται ίσως στο μικρό ποσοστό φυτρώματος που είχε. Η οικογένεια 2-26-1 δεν παρουσίασε κανένα μέγιστο άνθισης αλλά παρουσίασε μια σταθερή παραγωγή άνθεων καθ' όλη την περίοδο των διασταυρώσεων.

Από τα πιο πάνω μπορούμε να άρουμε το συμπέρασμα ότι από τις 5 οικογένειες που χρησιμοποιήθηκαν, συγκρινόμενες με τις εμπορικές ποικιλίες,

μόνο η 16-10-31 μπορεί να φτάσει τα επίπεδα των εμπορικών ποικιλιών ακολουθούμενη από την 2-26-1 με όμως μικρότερη παραγωγή άνθρων. Η οικογένεια 6-28-25 παρόλο του μεγάλου αριθμού παραγωγής ανθέων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σαν όψιμη λόγω της όψιμης έναρξης της άνθισης.

4.2.5. Παρατηρήσεις στις εμπορικές ποικιλίες

Κατά την διάρκεια των διασταυρώσεων πραγματοποιήθηκαν αυτογονιμοποιήσεις σε όλες τις οικογένειες όπως και στις εμπορικές ποικιλίες. Στις αυτογονιμοποιήσεις που αφορούσαν την εμπορική ποικιλία CELIA παρατηρήθηκε το παράδοξο ότι από τις 9 αυτογονιμοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν μόνο οι 3 έδωσαν στην τελική καρύδι άρα και επιτυχή γονιμοποίηση. Πρέπει να γίνει περαιτέρω έρευνα και μελέτη που αφορά αυτό το θέμα λόγω του ότι το βαμβάκι είναι κατά κύριο λόγο αυτογονιμοποιούμενο φυτό και μόνο το 5-10% γονιμοποιείται με ξένη γύρη. (Webber; 1903)

4.2.6. In situ διασταυρώσεις

Από το σύνολο των διασταυρώσεων που έγιναν μεταξύ του *Abelmoschus esculentum* και των εμπορικών ποικιλιών και άλλων οικογενειών υπήρχε μόνο ένα μικρό ποσοστό επιτυχίας από το οποίο συγκομίστηκε στο τέλος καρύδι, ενώ τα υπόλοιπα είχαν πέσει. Συγκεκριμένα όσον αφορά τις εμπορικές ποικιλίες CELIA και St474 το ποσοστό επιτυχίας ήταν 11,36 και 13,73 % αντίστοιχα. Όσον αφορά τις υπόλοιπες οικογένειες παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό επιτυχούς γονιμοποίησης στις οικογένειες 6-28-25 και 16-10-31 από ότι στις εμπορικές ποικιλίες και αφορούσε ποσοστά που έφτασαν στο 25,72% στην οικογένεια 16-10-31. Από τις υπόλοιπες ποικιλίες το ποσοστό ήταν αρκετά μικρό και δεν ξεπέρασε το 8,33%.

Από τις διασταυρώσεις με επικονιαστή το *Hibiscus cannabinus* υπήρχε χαμηλότερο ποσοστό επιτυχίας από ότι σε αυτές με το *Abelmoschus esculentum* . Παρόλα αυτά το υψηλότερο ποσοστό επιτυχίας παρατηρήθηκε στην οικογένεια 16-10-31 ακολουθούμενη από 4-27-13 και 2-26-1 με ποσοστά 20, 11,11 και 3,13 % αντίστοιχα.

Πίνακας 5: Σύνολο διασταυρώσεων. Επιτυχής διασταυρώσεις

Διασταυρώσεις		Σύνολο	Συγκομιζόμενα Καρύδια	Ποσοστό (%)
CELIA	A.e.	44	5	11,36
	H.c.	42	5	11,9
	M.s	25	4	16
	(X)	9	3	33,33
	UNF	3	0	0
St474	A.e.	51	7	13,73
	H.c.	38	0	0
	M.s	15	5	33,33
	(X)	5	1	20
	UNF	5	0	0
6-28-25	A.e.	27	4	14,82
	H.c.	18	0	0
	M.s	2	0	0
	(X)	2	2	100
	UNF	2	0	0
16-10-31	A.e.	35	9	25,72
	H.c.	40	8	20
	M.s	4	2	50
	(X)	5	5	100
	UNF	5	0	0
7-9-12	A.e.	12	1	8,33
	H.c.	2	0	0
	M.s	2	0	0
	(X)	1	1	100
	UNF	1	0	0
4-27-13	A.e.	14	1	7,14
	H.c.	9	1	11,11
	M.s	1	0	0
	(X)	1	0	0
	UNF	0	0	0
2-26-1	A.e.	24	1	4,16
	H.c.	32	1	3,13
	M.s	10	3	30
	(X)	4	0	0
	UNF	2	0	0

Μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας παρατηρήθηκε σε διασταυρώσεις που αφορούσαν το *Malva sylvestris*. Συγκεκριμένα μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας παρατηρήθηκαν στις εμπορικές ποικιλίες με ποσοστά 16% για την ποικιλία CELIA και 33,33% για την ποικιλία St474. Από τις υπόλοιπες οικογένειες μόνο μία, η 2-26-1, παρουσίασε ποσοστό επιτυχίας που έφτανε στο 30% ενώ οι υπόλοιπες δεν είχαν καθόλου επιτυχής διασταύρωση. Από την περίοδο που έγιναν οι διασταυρώσεις φαίνεται ότι, όσο πιο νωρίς γίνονταν οι διασταυρώσεις πριν από τις 10 Αυγούστου τόσο μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας είχαμε.

Παρατηρήθηκε ότι από τα άνθη αφέθηκαν να αυτογονιμοποιηθούν ότι τα ποσοστά ιδιαίτερα χαμηλά στις εμπορικές ποικιλίες (33,33% για CELIA και 20% για St474) ενώ στις οικογένειες 6-28-25, 16-10-31 και 7-9-12 το ποσοστό άγγιζε το 100% ενώ στις υπόλοιπες 4-27-13 και 2-26-1 δεν υπήρχε καθόλου επιτυχία στις αυτογονιμοποιήσεις πράγμα που ενισχύει την θεωρία ότι πρόκειται για αρρενόστειρες οικογένειες.

Τα άνθη που αφέθηκαν σαν αγονιμοποιητά με σκοπό να αξιοποιηθούν σαν μάρτυρες όπως ήταν αναμενόμενο δεν πραγματοποιήθηκε γονιμοποίηση με αποτέλεσμα την αποκοπή της ωοθήκης και στύλου.

4.2.7. Μελέτη της πορείας του γυρεοσωλήνα

Η μελέτη της πορείας και το μέγεθος του γυρεοσωλήνα έγινε για δυο χρονικές περιόδους, σε 8 ώρες μετά την επικονίαση και στις 24 ώρες.

Για τις διασταυρώσεις που χρησιμοποιήθηκε σαν επικονιαστής το *Abelmoschus esculentum* παρατηρήθηκε ότι στις 8 ώρες ο γυρεόκοκκος δεν είχε βλαστήσει καθόλου στα περισσότερα από τα δείγματα με εξαίρεση όταν διασταυρώθηκε με την ποικιλία St474.

Όταν χρησιμοποιήθηκε σαν επικονιαστής το *Hibiscus cannabinus* παρατηρήθηκε μια μερική βλάστηση της γύρης, σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι με το *Abelmoschus esculentum* αλλά η οποία περιοριζόταν στην απόσταση μερικών μm (Εικόνα 22).

Στις 24 ώρες παρατηρήθηκε ότι η γύρη προερχόμενη από *Abelmoschus esculentum* ακόμη δεν είχε βλαστήσει με εξαίρεση πάλι στην ποικιλία St474 στην οποία είχε διπλασιαστεί ή και περισσότερο το μήκος του γυρεοσωλήνα από ότι

στις 8 ώρες και σε μια περίπτωση στην οικογένεια 2-26-1 όπου ο γυρεοσωλήνας είχε προχωρήσει αρκετά κάτω στο στύλο αλλά ποτέ δεν έφτασε στην μικροπύλη.

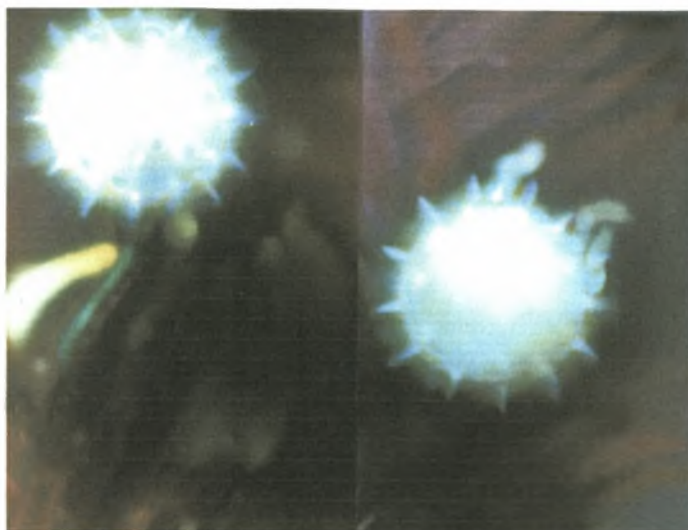
Με γύρη προερχόμενη από *Hibiscus cannabinus* και 24 ώρες μετά την επικονίαση παρατηρήθηκε ότι ο γυρεοσωλήνας αυξήθηκε σε μέγεθος σε σχέση με τις 8 ώρες αλλά όχι ικανοποιητικά έτσι ώστε να προκληθεί η γονιμοποίηση. Στην περίπτωση της οικογένειας 2-26-1 παρατηρήθηκε ότι υπήρχε καλύτερη ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα σε σχέση με τις υπόλοιπες οικογένειες. (εικόνα 23)

Πίνακας 6: Μελέτη γύρης 8 ώρες μετά την επικονίαση

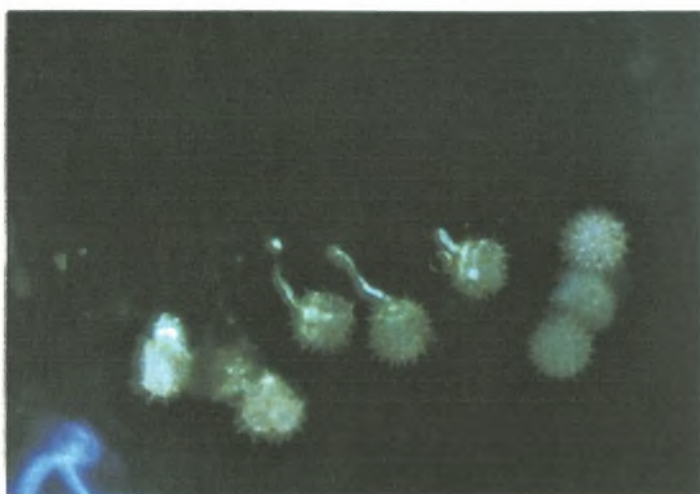
Διασταυρώσεις		Δείγματα	Παρατηρήσεις
CELIA	A.e.	5	Η γύρη δεν βλάστησε
	H.c.	5	Η γύρη μόλις αρχίζει να βλαστάνει
St474	A.e.	5	Η γύρη μόλις αρχίζει να βλαστάνει
	H.c.	5	Η γύρη μόλις αρχίζει να βλαστάνει
16-10-31	A.e.	5	Η γύρη δεν βλάστησε
	H.c.	5	Η γύρη μόλις αρχίζει να βλαστάνει
4-27-13	A.e.	4	Η γύρη δεν βλάστησε
	H.c.	4	
2-26-1	A.e.	5	Η γύρη δεν βλάστησε
	H.c.	5	Η γύρη μόλις αρχίζει να βλαστάνει

Πίνακας 7: Μελέτη γύρης 24 ώρες μετά την επικονίαση

Διασταυρώσεις		Δείγματα	Παρατηρήσεις
CELIA	A.e.	2	Η γύρη δεν βλάστησε
	H.c.	2	Η γύρη μόλις αρχίζει να βλαστάνει
St474	A.e.	3	Η γύρη μόλις αρχίζει να βλαστάνει
	H.c.	4	Η γύρη μόλις αρχίζει να βλαστάνει
16-10-31	A.e.	5	Η γύρη δεν βλάστησε
	H.c.	5	Καλή βλάστηση
4-27-13	A.e.	3	Η γύρη δεν βλάστησε
	H.c.	3	Η γύρη μόλις αρχίζει να βλαστάνει
2-26-1	A.e.	5	Η γύρη δεν βλάστησε
	H.c.	5	Καλή βλάστηση



Εικόνα 22 : Γυρεόκοκκος *Hibiscus cannabinus* στην οικογένεια 2-26-1.
8 ώρες μετά την επικονίαση



Εικόνα 23: Γυρεόκοκκος *Hibiscus cannabinus* στην οικογένεια 2-26-1.
24 ώρες μετά την επικονίαση

Κατά την μελέτη της γύρης παρατηρήθηκε, όσο και στη χρήση γύρης προερχόμενης από *Abelmoschus esculentum* όσο και από *Hibiscus cannabinus*, αυξημένη εναπόθεση καλλόζης από τους γυρεοσωλήνες (Εικόνα 24). Επίσης σε μια περίπτωση της οικογένεια 2-26-1 σε διασταύρωση με *Abelmoschus esculentum* παρατηρήθηκε μια ανωμαλία στο γυρεοσωλήνα υπό τη μορφή χοντρότερων σωλήνων (εικόνα 25). Τα πιο πάνω ίσως είναι και οι λόγοι αναστολής της βλάστησης του γυρεόκοκκου στο στίγμα, όσον αφορά την

εναπόθεση καλλόζη, και λίγο πιο κάτω από το στίγμα ή μέσα στο στύλο, όσον αφορά τους χοντρότερους σωλήνες.

Δεδομένου ότι για την γονιμοποίηση του βαμβακιού απαιτούνται 10-24 ώρες (Pundir, 1972), παρατηρήθηκε ότι η χρησιμοποίηση ξένης γύρης για τη γονιμοποίηση του βαμβακιού έχει σαν αποτέλεσμα την πιο αργή ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα, αφού και μέχρι 24 ώρες μετά την επικονίαση ο γυρεοσωλήνας δεν είχε αυξηθεί παρά μόνο μερικά μm.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι το βαμβάκι είναι πιο επιδεκτικό σε γύρη προερχόμενη από *Hibiscus cannabinus* παρά προερχόμενη από *Abelmoschus esculentum*. Όταν χρησιμοποιήθηκε γύρη από *Abelmoschus esculentum* στα περισσότερα δείγματα η γύρη δεν είχε βλαστήσει ούτε και μετά από 24 ώρες ενώ σε αυτά από *Hibiscus cannabinus* υπήρχε μια πιο εμφανής αύξηση του γυρεοσωλήνα η οποία ήταν ακόμη πιο προφανής μετά από 24 ώρες.

Από ότι φαίνεται πιο επιδεκτική σε διειδικές διασταυρώσεις με *Hibiscus cannabinus* ήταν η οικογένεια 2-26-1 αφού ο γυρεοσωλήνας είχε αναπτυχθεί επαρκώς μέχρι και τη μικροπύλη. Το πιο πάνω όμως έρχεται σε αντίθεση διασταυρώσεις που έγιναν *in situ* και το αριθμό των συγκομιζόμενων καρυδιών, άρα και επιτυχών γονιμοποιήσεων η οποία δεν ξεπερνούσε το 3,13%.

Πιο επιδεκτική σε διειδικές διασταυρώσεις με *Abelmoschus esculentum* ήταν η ποικιλία St474 η οποία είχε και το υψηλότερο ποσοστό επιτυχούς γονιμοποίησης 13,73% σε σχέση με την ποικιλία CELIA και τις οικογένειες που μελετήθηκαν κατά την μελέτη της γύρης.

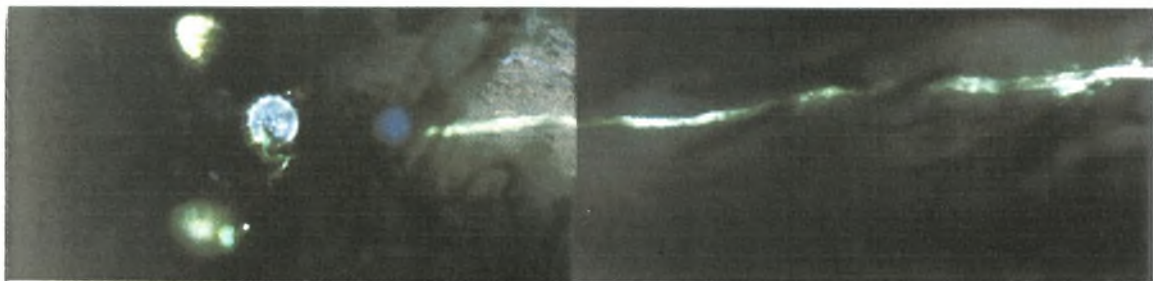


Εικόνα 24: Εναπόθεση καλλόζης



Εικόνα 25: Γυρεόκοκκος *Abelmoschus esculentum*. Φαίνονται η δημιουργία χοντρότερων σωλήνων

Στην εικόνα 26 έγινε επικοινωνία με μίγμα γύρης βαμβακιού και γύρης προερχόμενης από *Hibiscus cannabinus* και φαίνεται καθαρά η υπεροχή του γυρεόκοκκου του βαμβακιού εάν συγκρίνουμε την πορεία αύξησης και των γυρεοσωλήνων μετά από 24 ώρες μετά την επικοινωνία. Στην εικόνα φαίνεται η πορεία του γυρεοσωλήνα μέσα από τις αποθέσεις καλλόζης και η μειωμένη βλάστηση ή καθόλου βλάστηση των γυρεόκοκκων του *Hibiscus cannabinus*.



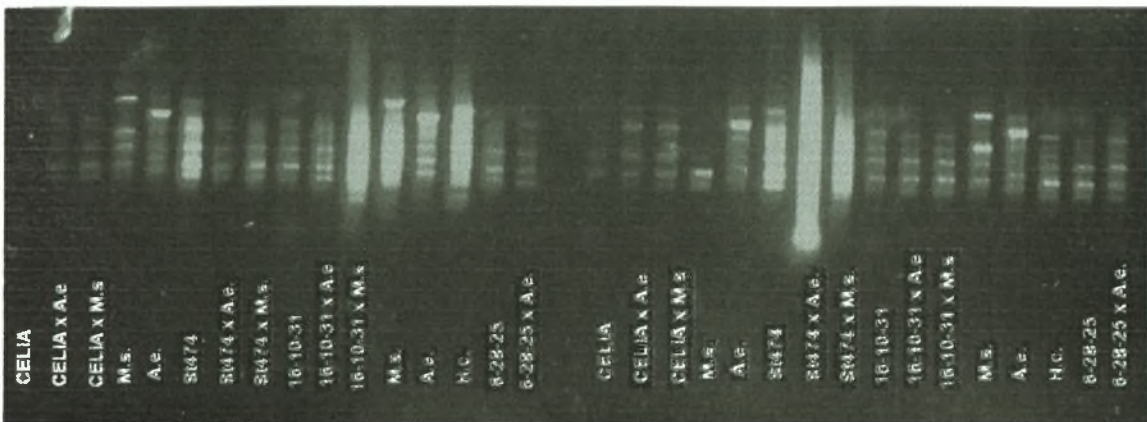
Εικόνα 26: Πορεία αύξησης γυρεόκοκκου προερχόμενου από βαμβάκι

4.2.8. Ανάλυση με μοριακούς δείκτες τύπου RAPDs

Στα πλαίσια της μοριακής γενετικής ανάλυσης, χρησιμοποιήθηκαν 10 μοριακοί δείκτες τύπου RAPDs, της σειράς OPC. Λόγω προηγούμενης εργασίας που αφορούσε το ίδιο γενετικό υλικό ήταν γνωστό ποιοι δείκτες θα είχαν τους περισσότερους πολυμορφισμούς γι' αυτό περιορίστηκε και ο αριθμός τους. Οι εκκινητές που παρουσίασαν αξιόλογους πολυμορφισμούς παρουσιάζονται στο πίνακα 8.

Πίνακας 8: RAPD εκκινητές και η ακολουθία των βάσεων

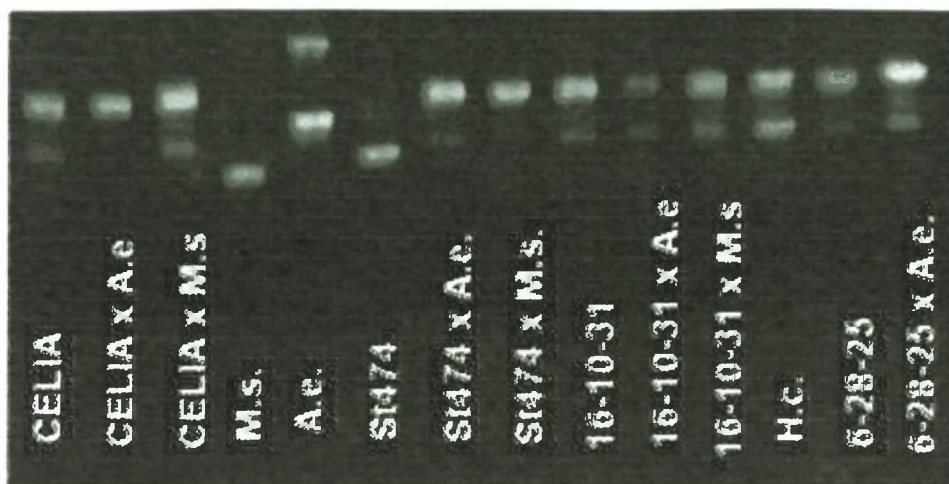
RAPD εκκινητής	Αλληλουχία
OPC1	5'ΤΤCGAGCCAG3'
OPC10	5'ΤGTCTGGGTG3'



Εικόνα 27: Προφίλ ζωνών από τον εκκινητή OPC1 αριστερά και η επανάληψη του στα δεξιά.

Πίνακας 9: Καταγραφή πολυμορφισμών με την χρήση RAPD εκκινητή OPC1

ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ	Παρουσία-Απουσία ζωνών							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CELIA	-	-	+	-	+	-	-	-
CELIA x A.e	+	-	+	-	+	-	+	+
CELIA x M.s	+	-	+	-	+	-	+	+
M.s.	+	-	+	-	+	+	-	+
A.e.	-	+	-	+	-	-	+	+
St474	+	-	+	-	+	-	-	+
St474 x A.e.	+	-	+	-	+	-	-	-
St474 x M.s.	+	-	+	-	+	+	-	-
16-10-31	+	-	+	-	+	+	+	-
16-10-31 x A.e.	+	-	+	-	+	+	+	-
16-10-31 x M.s.	-	-	+	-	+	+	+	-
H.c.	+	-	+	-	+	-	+	-
6-28-25	+	-	+	-	+	-	-	-
6-28-25 x A.e.	+	-	+	-	+	+	+	-



Εικόνα 28: Προφίλ ζωνών από τον εκκινητή OPC10

Πίνακας 10: Καταγραφή πολυμορφισμών με την χρήση RAPD εκκινητή OPC10

ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ	Παρουσία-Απουσία ζωνών						
	1	2	3	4	5	6	7
CELIA	-	-	+	-	+	-	-
CELIA x A.e	-	-	-	-	+	-	-
CELIA x M.s	-	-	+	-	+	-	-
M.s.	+	-	-	-	+	-	-
A.e.	-	-	-	+	-	+	+
St474	-	+	-	-	-	-	-
St474 x A.e.	-	-	+	-	+	-	-
St474 x M.s.	-	-	-	-	+	-	-
16-10-31	-	-	+	-	+	-	-
16-10-31 x A.e.	-	-	+	-	+	-	-
16-10-31 x M.s.	-	-	+	-	+	-	-
H.c.	-	-	+	-	+	-	-
6-28-25	-	-	+	-	+	-	-
6-28-25 x A.e.	-	-	+	-	+	-	-

Από τους πιο πάνω πίνακες προκύπτει ότι η *Abelmoschus esculentum* διαφοροποιείται πάρα πολύ σε σχέση με τους υπόλοιπους γενοτύπους αφού παρουσιάζονται ζώνες που εμφανίζονται μόνο στο *Abelmoschus esculentum*. Στον πίνακα 9 φαίνεται καθαρά η παρουσία ζωνών στις ζώνες 2 και 4 καθώς και απουσία ζωνών στις ζώνες 3 και 5 που εμφανίζονται ή απουσιάζουν μόνο στην *Abelmoschus esculentum*. Στον πίνακα 10 η παρουσία τους εμφανίζεται στις ζώνες 4, 6 και 7.

Στον πίνακα 9 και στη ζώνη 6 φαίνεται η *Malva sylvestris* να εμφανίζει ζώνες μαζί με τους γενοτύπους St474 x M.s, 16-10-31, 16-10-31 x A.e., 16-10-31 x M.s. και 6-28-25 x A.e. Στο πίνακα 10 φαίνεται να διαφοροποιείται μόνο στη ζώνη 1 ενώ στη ζώνη 5 φαίνεται να εμφανίζει ζώνες μαζί με τους υπόλοιπους γενοτύπους εκτός των *Abelmoschus esculentum* και St474.

Σε σύγκριση της CELIA σε σχέση με τους υπόλοιπους απογόνους της CELIA x A.e και CELIA x M.s. με χρήση του εκκινητή OPC1, φαίνεται καθαρά μια διαφοροποίηση του απογόνου CELIA x M.s από τη CELIA και αν λάβουμε υπόψη και τη ζώνωση του επικονιαστή *Malva sylvestris* παρατηρούμε ότι στο CELIA x M.s υπάρχει μια ζώνωση που υπάρχει στο *Malva sylvestris* η οποία δεν υπάρχει στη CELIA. Το ίδιο παρατηρείται με τον ίδιο εκκινητή και με το St474 σε σύγκριση με το St474 x M.s. όπως και με σύγκριση του 6-28-25 με το 6-28-25 x A.e.

Με χρήση του εκκινητή OPC10 φαίνεται να διαφοροποιείται και η St474 από τις υπόλοιπες αφού υπάρχει εμφάνιση μιας ζώνης η οποία δεν υπάρχει στους υπόλοιπους γενοτύπους.

4.2.9 Κυτταρογενετική ανάλυση

Η κυτταρολογική μελέτη που έγινε αφορούσε τους απογόνους των εμπορικών ποικιλιών CELIA και St474 καθώς και των οικογενειών 16-10-31 και 6-28-25 όπως αυτοί προέκυψαν μετά από επικονίαση τους με γύρη προερχόμενη από *Abelmoschus esculentum* και *Malva sylvestris* καθώς και των οικογενειών 16-10-31 και 6-28-25. Οι απόγονοι σε σχέση με τους τετραπλοειδής γονείς από τους οποίους προήλθαν, βρέθηκε να έχουν μια απόκλιση στον αριθμό των χρωμοσώμων. Παρατηρήθηκε ότι ο συνολικός αριθμός των χρωμοσώμων να είναι μικρότερος του 52

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από το ποσοστό φυτρώματος φαίνεται ότι μόνο δυο οικογένειες, οι 2-26-1 και 16-10-31 μπορούν να ανταγωνιστούν τις εμπορικές ποικιλίες (CELIA και St474), με ποσοστά τα οποία με αναγωγή ανήλθαν σε 86% και 71% αντίστοιχα. Αυτό ενισχύεται και με το γεγονός ότι, σύμφωνα με παρατηρήσεις που έγιναν οι πιο πάνω οικογένειες παρήγαγαν ισάριθμο αριθμό ανθέων με τις εμπορικές ποικιλίες με πρώτη την οικογένεια 16-10-31 και ακολουθούμενη από την οικογένεια 2-26-1. Όμως όταν πραγματοποιήθηκαν αυτογονιμοποιήσεις στις οικογένειες, η 2-26-1 δεν κράτησε ούτε ένα καρύδι.

Για να λεχθεί η υπόθεση ότι οι οικογένειες που φυτεύτηκαν ότι πρόκειται περί αρρενόστειρων οικογενειών τα άνθη αφέθηκαν να αυτογονιμοποιηθούν. Από τις πέντε οικογένειες στις τρεις το ποσοστό αυτογονιμοποίησης άγγιζε το 100%, ενώ στις υπόλοιπες δυο, 2-26-1 και 4-27-13, δεν υπήρχε καθόλου επιτυχία στις αυτογονιμοποιήσεις, γεγονός που ενισχύει την θεωρία ότι πρόκειται περί αρρενόστειρες σειρές.

Από την μελέτη της πορείας του γυρεοσωλήνα φαίνεται ότι όταν χρησιμοποιείται σαν επικονιαστής ξένη γύρη από συγγενικά είδη της οικογένειας Malvaceae, έχει σαν αποτέλεσμα την πιο αργή ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα σε σχέση με τον χρόνο που απαιτείται από τη γύρη προερχόμενη από το βαμβάκι. Επίσης παρατηρούνται και αυξημένες εναποθέσεις καλλόζης κατά μήκος του στύλου, όπως και η ανάπτυξη χοντρότερων γυρεοσωλήνων, τα οποία δυσχεραίνουν την πορεία του γυρεοσωλήνα που αρκετές φορές δεν φτάνει ούτε στην μικροπύλη. Η επικονίαση με γύρη προερχόμενη από το *Abelmoschus esculentum* δεν φαίνεται να βλαστάνει (εκτός στη St474 και στη 2-26-1) ενώ γύρη προερχόμενη από το *Hibiscus cannabinus* είχε καλύτερα ποσοστά βλάστησης. Το πιο πάνω έρχεται σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις που έγιναν στις *in situ* διασταυρώσεις στις οποίες παρουσιάζεται το *Abelmoschus esculentum* να έχει πιο χαμηλά ποσοστά επιτυχών διασταυρώσεων από ότι με το *Hibiscus cannabinus*. Για αυτό ίσως ευθύνεται κάποιος λόγος που ίσως προκαλεί κάποιου είδους ερεθισμό στην ωοθήκη, διεγείροντας τη να αναπτυχθεί χωρίς όμως να είναι ανάγκη να φτάσει ο γυρεοσωλήνας σε αυτή και να τη γονιμοποιήσει. Η

χρησιμοποίηση του *Malva sylvestris* σαν επικονιαστή φαίνεται να έχει υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας από τη χρήση των δυο προηγούμενων επικονιαστών.

Από την μοριακή ανάλυση που έγινε με την χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPDs φαίνεται ότι οι απόγονοι των διασταυρώσεων CELIA και St474 με επικονιαστή το *Malva sylvestris* ήταν πράγματι διειδικά υβρίδια αφού παρατηρούνται όμοιες ζωνώσεις στους απογόνους που παρατηρούνται μόνο στο *Malva sylvestris*.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdalla, M.M.F.; Hermsen, J.G.Th.: Unilateral incompatibility: hypotheses, debate and its implications for plant breeding. *Euphytica* 21. 32–47 (1972)
- Adiwilaga K D, Brown C R. 1991. Use of 2n pollen-producing triploid hybrids to introduce tetraploid Mexican wild species germ plasm to cultivated tetraploid potato gene pool. *Theoretical and Applied Genetics* 81:645–652.
- A. G. Mavromatis, S. K. Kantartzi, D. N. Vlachostergios, I. N. Xynias, G. N. Skarakis and D. G. Roupakias Induction of embryo development and fixation of partial interspecific lines after pollination of F₁ cotton interspecific hybrids (*Gossypium barbadense* × *Gossypium hirsutum*) with pollen from *Hibiscus cannabinus* *Australian Journal of Agricultural Research* 56(10) 1101 – 1109
- Akdemir, H., Gurel, A., Emiroglu, S. H. et al. 2001. Investigations: adaptation of long staple cotton varieties. – J. Aegean Agric. Res. Inst., J. of Anatolia, Izmir (2).
- Al-Yasiri, A. and D.P. Coyne. 1964. Effects of growth regulators in delaying pod abscission and embryo abortion in the interspecific cross *Phaseolus vulgaris* × *P. acutifolius*. *Crop Science* 4: 433–435.
- Arutiunova and GUBANOV, G. IA. ,1950. [IN REGARD TO THE BIOLOGY OF COTTON FERTILIZATION.] *Agrobiologiya* 6: 94-99. [In Russian.] *Biol. Abs.* 25(4): 31994, 1951.
- Γαλανοπούλου –Σενδούκα Στέλλα, Βιομηχανικά Φυτά - Βαμβάκι και υπόλοιπα, εκδόσεις Σταμούλης
- Backes G., Graner A., Foroughi-Wehr B., Fischbeck G., Wenzel G., Jahoor A. (1995): Localization of quantitative trait loci (QTL) for agronomic important characters by the use of a RFLP map in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 902: 294–302.
- Bajaj Y.P.S ,1998,*Biotechnology in Agriculture and Forestry* 42, Cotton, Springer.

- Beckmann J.S., Soller M. (1983): Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.*, 67: 35–43.
- Bonnierbal M.W., Plaisted R.L., Tanksley S.D. (1988): RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics*, 120: 1095–1103.
- Brown MS, Menzel MY (1950) New trispecies hybrids in cotton. *J Hered* 41:291–295
- Brubaker CL, Paterson AH, Wendel JF (1999) Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. *Genome* 42:184–203
- Bruford M.W., Wayne R.K. (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr. Opin. Genet. Develop.*, 3: 939–943.
- Burr B., Evola S.V., Burr F.A., Beckmann J.S. (1983): The application of restriction fragment length polymorphisms to plant breeding. In: SETLOW J.K., HOLLAENDER A. (eds): *Genetic Engineering Principles and Methods*. Vol. 5. Plenum, New York: 45–59.
- Carlos R. Magni D. Dr. Cs. Forestales Comparing techniques Review: AFLP Data Interpretation and Analysis. Sequence-tagged sitemarkers, RFLPs, RAPDs/Arbitrary techniques, SNPs, Diversity Arrays, Microsatellites
- ČERNÝ J., ŠAŠEK A. (1996a): *Bílkovinné signální geny pšenice obecné*. ÚZPI, Praha.
- ČERNÝ J., ŠAŠEK A. (1996b): Analysis of genetic structure of regional common wheat varieties using signal gliadin and glutenin genes. *Scientia Agric. Bohemoslov.*, 27: 161–182
- Chaudhari, H.K. 1978. Use of semigamy in the production of cotton haploids. *Bull. Torrey Bot. Club* 105:98–103.
- Cheng S., Fockler C., Barnes W.M., Higuchi R. (1994): Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 5695–5699.

- Christensen PB (1986 a). Pollen morphological studies in the Malvaceae. *Grana*, 25: 95-117.
- Clark, L. J., Carpenter, E. W., Hart, G. L. et al. 1998. Pima cotton regional variety trial, Safford Agric. Center, 1997. Cotton. A College of Agric. Rep., The Univ. of Arizona, Tucson, AZ. Series P-112:204–208.
- Cronn RC, Zhao X, Paterson AH, Wendel JF (1996) Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. *J Mol Evol* 42:685–705
- Davis D. D. , (1978). Hybrid cotton cpecific problems and potentials. *Adv. Agron.* 30: 129– 153.
- De Nettancourt, D. 1977. *Incompatibility in angiosperms*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag
- Dionne, L. A., 1958: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid as an aid to seed production when widely separated *Solanum* species are crossed. *nature* 181, 361.
- Dong H. Z., Li W. J., Tang W. *et al.* , (2004). Development of hybrid Bt cotton in China-a successful integration of transgenic technology and conventional techniques. *Curr. Sci.* 86: 778– 782.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Emsweller, S.L. and N.W. Stuart. 1948. Use of growth regulating substances to overcome incompatibilities in *Lilium*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 51: 581–589
- Endrizzi, J. E., 1966. Additional information on chromosomal structural changes and differentiation in *Gossypium*. *Journal of the Arizona Academy of Science* 4: 28–34
- Endrizzi, J. E., Turcotte, E. L., and Kohel, R. J. 1984. Qualitative Genetics, Cytology, and Cytogenetics. pp. 82-129. In Kohel, R. J. and Lewis, C. F., Editors. Cotton. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin. 605 pp.

- Endrizzi JE, Turcotte EL, Kohel RJ (1985) Genetics, cytology, and evolution of *Gossypium*. *Adv Genet* 23:271–375
- Erdtman G (1952). Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms. 539 pp. Stockholm: Almqvist and Wiksell.
- Ewing, E. C., 1918. A study of certain environmental factors and varietal differences influencing the fruiting of cotton. *Miss. Agr. Expt. Sta. Tech. Bul.* 8, 93 pp.
- Finker, M. D. ,1954. The effect of dual pollination in upland cotton stocks differing in genotype. *Agron. Jour.* 46(3): 124 - 128.
- Fox, D.P. (1969). Some characteristics of the cold hydrolysis technique for staining plant tissues by the Feulgen reaction. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 266-272.
- Fritz FK and RE Hanneman, Jr. 1989. Interspecific incompatibility due to stylar barriers in tuber-bearing and closely related non-tuber-bearing *Solanums*. *Sex Plant Reprod* 2:184-192
- Francisco L.V., Langston A.A., Mellersh C.S., Neal C.L., Ostrander E.A. (1996): A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome*, 7: 359–362.
- Fryxell PA, 1992, A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). *Rheedea* 2:108-165
- Galau GA, Wilkins TA (1989) Alloplasmic male sterility in AD allotetraploid *Gossypium hirsutum* upon replacement of its resident A cytoplasm with that of D species *G. harknessii*. *Theor Appl Genet* 78:23–30
- Gore, U. R. ,1932. Development of the female gametophyte and embryo in cotton. *Amer. Jour. Bot.* 19: 795 - 807.
- Graner A., Siedler H, Jahoor A., Herrmann R.G., Wenzel G. (1990): Assessment of the degree and the type of restriction fragment length polymorphism in barley (*Hordeum vulgare*). *Theor. Appl. Genet.*, 80: 826–832.
- Grun, P.; Aubertin, M.: The inheritance and expression of unilateral incompatibility in *Solanum*. *Heredity* 21, 131–138 (1966)

- Gundimeda HR, Prakash S, Shivanna KR (1992) Intergeneric hybridization between *Enarthrocarpus lyratus*, a wild species and crop brassicas. *Theor Appl Genet* 83:655–662
- Harland, S. L., 1936. Haploids in polyembryonic seeds of Sea Island cotton. *Jour. Hered.*, 27 (6): 229–231.
- Harland, S.C. (1936) The genetical conception of the species. *Biol. Rev.* 11:83-112.
- Helentjaris T., King G., Slocum M., Siedestrang C., Wegman S. (1985): Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. Biol.*, 5: 109–118.
- Helentjaris T. (1987): A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *Trends Genet.*, 3: 217–221.
- Hermsen, J. G. Th., 1984a. Mechanisms and genetic implications of 2n-gamete formation. *Iowa State J. Res.* 58: 421–434.
- Hermsen, J.G. 1984b. The potential of meiotic polyploidization in breeding allogamous crops. *Iowa State J. Res.*, vol. 58, No. 4, 421-435.
- Hutchinson et al., 1947 J.B. Hutchinson, R.A. Silow and S.G. Stephens, *The Evolution of Gossypium and the Differentiation of the Cultivated Cottons*, Oxford University Press, London (1947).
- Hutchinson JB (1959) *The application of genetics to cotton improvement*. Cambridge Univ Press, UK
- Hogenboom, N.G.: A model for incongruity in intimate partner relationships. *Euphytica* 22, 219–233 (1973)
- Hogenboom NG (1984) Incongruity: non-functioning of intercellular and intracellular partner relationships through nonmatching of information. In: Linskens HF, Heslop-Harrison J (eds) *Cellular interactions*. (Encyclopedia of plant physiology, NS, vol 17) Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 641–654
- Iyengar, N.K. 1938. Pollen-tube studies in *Gossypium*. *J. Genet.* 37:69-106.

- Jaroslava Ovesna, Katerina Polakova and Leona Leisova, DNA Analyses and their Applications in Plant Breeding, *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 38, 2002 (1): 29–40
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314: 67–73.
- Jensen W. A., and Fisher, D. B. 1968. Cotton embryogenesis The entrance and discharge of the pollen tube in the embryo sac. *Planta* 78(2): 158 - 183.
- J.L. Karihaloo, *Plant DNA Fingerprinting and its Applications*
- Jones, M.D, C. Puentes, and R. Suarez. 1955. Isolation of kenaf for seed increase. *Agron. J.* 47:256–257.
- Justus, N.J. & C.V., Leinweber, 1960. A heritable partial male-sterile character in cotton. *J. Hered.* 51: 191–192.
- Karp A., Isaac P.G., Ingram G.S. (1998): *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Chapman & Hall, Thompson Sci., London.
- Κατέβα Γεωργία, 2006, μεταπτυχιακή διατριβή, Αξιολόγηση ανευπλοειδών και διαπλοειδών σειρών βαμβακιού στον αγρό και γενετική ανάλυση με χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPD's, Βόλος.
- Kaul MLH (1988) *Male sterility in higher plants*. Springer, Berlin Heidelberg New York (Monographs genetics 10)
- Kearney 1923. Self-fertilization and cross-fertilization in Pima cotton. U.S. Dept. Agr. Dept. Bul. 1134, 68 pp.
- Kearney 1926. Bagging cotton flowers to prevent accidental cross-pollination *N. Jour. Hered.* 17: 273 - 279.
- Kearney and Harrison, G. J. 1932. Pollen antagonism in cotton. *Jour. Agr. Res.* 44: 191 - 226
- Kohel, R.J. and C.F. Lewis (1984) *Cotton*, Winsconsin, USA
- Kolreuter, J.G., 1763 *Vorläufige Nachricht von einigen das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachten*,

Fortsetzungen 1. (Ostwald Klassiker der exacten Wissenschaften, 41, Leipzig, 1893)

- Κουρέντας Κ. Ευθύμιος, 2005, Καλλιέργεια βαμβακιού με φυτοκάλυψη του εδάφους το χειμώνα, μεταπτυχιακή διατριβή ειδίκευσης. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Kraic J., Horvath L., Gregova E., Zak I. (1995): Standard methods for electrophoretic separation of wheat glutenins and gliadins by SDS-PAGE and A-PAGE. *Rostl. Vým.*, 41: 219–223.
- Lewis D, Crowe LK. 1958. Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants. *Heredity* 12: 233–256
- Linskens, H. F., 1964. Pollen physiology and fertilization. 257 pp. Symposium at University of Nijmegen, The Netherlands. Aug. 1963. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Linskens HF, Esser K (1957) über eine spezifische Anfärbung der Pollenschläuche in Griffel und die Zahl der Kallosepfropfen nach Selbstung und Fremdung. *Naturwissenschaften* 44:16
- Liu, B., C. L. Brubaker, G. Mergeai, R. C. Cronn, and J. F. Wendel. 2001. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome* 44: 321-330
- Liu Q, Brubaker CL, Green AG, Marshall DR, Sharp PJ, Singh SP (2001) Evolution of the FAD2-1 fatty acid desaturase 5' UTR intron and the molecular systematics of *Gossypium* (Malvaceae). *Am J Bot* 88:92–102
- Marcelo Guerra, 1999, Hematoxylin: a simple, multiple-use dye for chromosome analysis, *Genet. Mol. Biol.* vol.22 n.1 São Paulo Mar. 1999
- Martin FW (1959) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol* 34:125–128
- Matthes M.C., Daly A., Edwards K.J. (1998): Amplified fragment length polymorphism (AFLP). In: Karp A., Isaac P.G., Ingram D.S. (eds): *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, Cambridge, Vol. 1, 99: 183–190.

- Menzel MY, Brown MS (1954) The significance of multivalent formation in three-species *Gossypium* hybrids. *Genetics* 39:546–557
- Metakovsky E.V. (1991): Gliadin allele identification in common wheat II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *J. Genet. Breed.*, 45: 325–344.
- Morin P.A. Woodruff D.S. (1996): Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. In: Wayne R.K., Smith T.B. (eds): *Molecular Genetic Approaches in Conservation*, Oxford University Press, New York: 298–313.
- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, 155: 335–350.
- Neuhaus U.G., Neuhaus G. (1993): The use of the nonradioactive digoxigenin chemiluminescent technology for plant genomic Southern blot hybridization: a comparison with radioactivity. *Transgenic Res.*, 2: 115–120.
- Pandey KK (1968) Compatibility relationships in flowering plants: role of the S-gene complex. *Am Nat* 102:475–489
- Pandey, K.K.: Elements of the S-gene complex V. Interspecific cross-compatibility relationships and theory of the evolution of the S-complex. *Genetica* 40, 447–474 (1969)
- Pittarelli, G.W. and J.R. Staveley. 1975. Direct hybridisation of *Nicotiana rependa* × *N. tabacum*. *Journal of Heredity* 66: 281–284.
- Poehlman John Milton and David Allen Sleper, 1994, *Breeding field crops*, Iowa State university press
- Polakova K., Ovasna J., Leisova L. (2001): Identification of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars using microsatellite analyses. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 46: 23–28
- Price H. J. and R.H. Smith, 1984, *Fiber and wood, Cotton*, Handbook of plant culture, Vol 3, Macmillant publishing co, New York, pp. 487-510.

- Pundir NS. 1972. Experimental embryology of *Gossypium arboreum* L. and *G. hirsutum*. and their reciprocal crosses. *Botanical Gazette* 133: 7–26
- Reitsma T (1969). Size modification of recent pollen grains under different treatments. *Rev. Palaeobot Palynol*9:175-202.
- Robbelen, G., 1960 Über die Kreuzungsunverträglichkeit verschiedener Brassica-Arten als Folge eines gehemmten Pollenschlauchwachstums. *Züchter* 30 : 300-312.
- Saad SI (1960). The sporoderm stratification in the Malvaceae. *Pollen et Spores*2: 11-40
- Saakyan, T. A. ,1962. [An embryological study of the process of fertilization of cotton with different methods of pollination.] *Biol. Nauki (AN Arm. SSR)*, 15(7): 59 - 65. [In Russian.] *Biol. Abs.* 45(6): 52655, p. 4273. 1964.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S. (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–491.
- Salah M. EL NAGGAR, 2002 , Pollen Morphology of Egyptian Malvaceae: An Assessment of Taxonomic Value
- Sampson DR (1962) Intergeneric pollen-stigma incompatibility in Cruciferae. *Can J Genet Cytol* 4:38–49
- Schutzbank, T. E., Stern H.J. (1993): Principles and applications of the polymerase chain reaction. *JIFCC*, 5: 96–104.
- Seelanan, T., A. Schnabel and J.F. Wendel. 1997. Congruence and consensus in the cotton tribe. *Systematic Botany* 22:259-290
- Senchina DS, Alvarez I, Cronn RC, Liu B, Rong JK, Noyes RD, Paterson AH, Wing RA, Wilkins TA, Wendel JF (2003) Rate variation among nuclear genes and the age of polyploidy in *Gossypium*. *Mol Biol Evol* 20:633–643
- Shariflou M.R., Hassani M.E., Sharp P. J. (2001): A PCRbased DNA marker for detection of mutant and normal alleles of the *Wx-D1* gene of wheat. *Plant Breed.*, 120: 121–124.

- Shivanna K. R., Rangaswamy N. S. (1992) Pollen biology — a laboratory manual. Springer, Berlin.
- Skovsted, A. (1935). "Chromosome numbers in the Malvaceae. I". J. Genetics 31: 263–296
- Small RL, Ryburn JA, Cronn RC, Seelanan T, Wendel JF (1998) The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. Am J Bot 85:1301–1315
- Smith, C. Wayne. Crop Production, Evolution, History and Technology. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995
- Southern E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Molecular Biology, 98: 503.
- Staub J.E., Serque N F.C., Gupta M (1996): Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. Hort. Sci., 31: 729–741;
- Stebbins, G. L., 1971, *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold Ltd.
- Stuber C.W., Khanna K.R (1991): Isozyme markers and heir significance in crop improvement. Biochemical aspects of crop improvement. CRC Press; Boca Raton; USA 59–77
- Sybenga J., 1992, Cytogenetics in Plant Breeding, Springer-Verlag
- Tamargo, M.A. and M.D. Jones. 1954. Agents concerned with natural crossing in kenaf in Cuba. Agron. J. 46:456–459.
- Tautz D., Trick M., Dover G. (1986): Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. Nature, 322: 652–656.
- Trushkin, A. V. 1956. [Ways of improving the hereditary characteristics of cotton seed with a new system of kolkhoz seed raising.] Nauchn. Tr. Uzb. Sel'khoz. Inst. 9(1): 75-85. [In Russian.] Biol. Abs. 35(3): 27822, p. 2454, 1960.
- Turcotte, E.L., and C.V. Feaster. 1974. Methods of producing haploids: Semigametic production of cotton haploids. p. 53–64. In K.J.

Kasha (ed.) Haploids in higher plants: Advances and potential.
Ontario Agric. College, Univ. of Guelph, ON, Canada.

- Turcotte, E.L. & C.V., Feaster, 1985. Inheritance of male-sterile mutant Ms₁₂ in American Pima cotton. *Crop Sci.* 25: 688–690.
- Vapa L., Radovic D. (1998): Genetics and molecular biology of barley hordeins. *Cereal Res. Comm.*, 26: 31–38.
- Venkateswarlu D. and Da Corta L. , (2001). Transformations in age and gender of unfree workers on hybrid cottonseed farms in Andhra Pradesh. *J. Peasant Stud.* 28: 1– 36.
- V. G. Kakani, K. R. Reddy, S. Koti, T. P. Wallace, P. V. V. Prasad, V. R. Reddy, and D. Zhao, Differences in *in vitro* Pollen Germination and Pollen Tube Growth of Cotton Cultivars in Response to High Temperature, *Annals of Botany* Volume 96, Number 1 Pp. 59-67
- Vlachostergios D. N., Mavromatis A. G., Kantartzi S. K., Roupakias D. G. In-vitro development of ovules obtained after pollination of cotton (*Gossypium* spp) flowers with pollen from okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 2007 88(1). p.109
- Webber, H. J. ,1903. Improvement of cotton by seed selection. U.S. Dept. Agr. Yearbook 1902, pp. 365-386.
- Wendel, J.F. 1989. New World tetraploid cottons contain Old World cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86: 4132-4136.
- Wendel, J. F. and V. A. Albert. 1992. Phylogenetics of the cotton genus (*Gossypium* L.): Character-state weighted parsimony analysis of chloroplast DNA restriction site data and its systematic and biogeographic implications. *Systematic Botany* 17: 115-143.
- Wendel JF, Cronn RC (2003) Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Adv Agron* 78:139–186
- Werner K., Pellio B., Ordon F., Friedt W. (2000): Development of an STS marker and SSRs suitable for marker-assisted selection for the

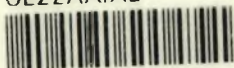
BaMMV resistance gene *rym9* in barley. *Plant Breed.*, 119: 517–519.

- White T.J., Madej T., Persing D.H. (1992): The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv. Clin. Chem.*, 29: 161–196.
- Wittmann, W. (1965). Aceto-iron-haematoxylin-chloral hydrate for chromosome staining. *Stain Technol.* 40: 161-164.
- Χρησιτίδης, Β., 1965 : Το βαμβάκι. Θεσσαλονίκη.
- Ziegler J.S., Su Y., Corcoran K.P., Nie L., Mayrand E., Hoff L.B., McBride L.J., Kronick M.N., Diehl S.R (1992): Application of automated sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics*, 14: 1026–1031.

Internet

- <http://www.genome.clemson.edu/projects/cotton/> Clemson University Genomics Institute
- <http://r0.unctad.org/infocomm/anglais/cotton/characteristics.htm>
- <http://www.siu.edu/~ebl/leaflets/cotton.htm>
- <http://www.aphis.usda.gov/brs/cotton.html>
- <http://www.springer.com/978-3-540-34537-4>
- <http://cottonrevolution.info/>
- <http://www.eeob.iastate.edu/faculty/WendelJ/genomeevolution.htm>
- <http://en.wikipedia.org>
- <http://gears.tucson.ars.ag.gov/book/chap9/cotton.html>
- <http://www.ikisan.com>
- <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/v5-327.html>

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000091141

