

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**Διατριβή
Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης**

Χρησιμοποίηση εμβρυακών αξόνων και μεριστωμάτων βαμβακιού (*Gossypium hirsutum* L.) για αναγέννηση γενετικά τροποποιημένων φυτών και ανάπτυξη μεθόδου παροδικής γονιδιακής έκφρασης.

ΧΡΗΣΤΟΣ ΜΠΑΡΤΖΟΣ

Υπεύθυνος Καθηγητής: Νίκος Πανόπουλος.

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ
Φεβρουάριος 2003**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 2001-2002.

Θα ήθελα σ'αυτές τις λίγες γραμμές, που προβλέπονται απο τον κανονισμό μεταπτυχιακών σπουδών για κάθε διατριβή, να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Νίκο Πανόπουλο για την ανάθεση του θέματος και την βοήθειά του καθ'όλη τη διάρκεια εκτέλεσης των πειραμάτων.

Να ευχαριστήσω επίσης, προκαταβολικά την Καθηγήτρια Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, που θα διαβάσει την μελέτη και θα αξιολογήσει την προσπάθειά μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	5
1.1. Το βαμβάκι στην Ελλάδα, στο σύγχρονο οικονομικό περιβάλλον – Οικονομικά στοιχεία – Δημογραφικό ενδιαφέρον	5
1.2. Ταξινόμηση των ειδών βαμβακιού	7
1.3. Οι τρέχουσες εξελίξεις στον τομέα της βιοτεχνολογίας του βαμβακιού	9
1.3.1. Γενωμική ανάλυση και γενετική βελτίωση βαμβακιού	9
1.3.2. <i>In vitro</i> αναγέννηση βαμβακιού	11
1.3.3. Γενετική τροποποίηση βαμβακιού	15
1.3.4. Διαγονιδιακό βαμβάκι σε εμπορική χρήση	19
1.4. Ανάπτυξη της ίνας στο βαμβάκι	23
1.5. Επεξεργασία ίνας βαμβακιού	26
1.6. Φυσικά χρώματα	26
1.6.1. Φλαβονοειδή	27
1.6.2. Ανθοκυανίνες	29
1.6.3. Καροτενοειδή-μπεταλαΐνες	30
1.7. Βαμβάκια με φυσικό χρώμα ίνας	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	33
2.1 Καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών, φορείς, παρασκευαστικές και βακτηριολογικές μέθοδοι	33
2.1.1 Παρασκευή στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας βακτηριακών στελεχών ...	33
2.1.2 Γονίδια και φορείς για γενετικό μετασχηματισμό	35
2.1.3 Μεταφορά ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε αγροβακτήρια με «υποβοηθούμενη (τριών γονέων) βακτηριακή σύζευξη»	37
2.1.4 Μετασχηματισμός αγροβακτηρίων (<i>A.tumefaciens</i> LBA 4404 & <i>A.rhizogenes</i>) με πλασμιδιακό DNA με ηλεκτοπόρωση	38
2.1.5 Θερμοκρασιακή δοκιμή για την πιστοποίηση επιλεκτικής καλλιέργειας βακτηρίων του γένους <i>Agrobacterium</i>	40
2.1.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (δυσδικών φορέων και <i>Ti</i> πλασμιδίων) απο μετασχηματισμένα κύτταρα <i>A.tumefaciens</i> LBA 4404 και <i>A.rhizogenes</i>	40
2.1.7 Εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας μετά απο ένεση βακτηριακών αιωρημάτων σε κοτυληδονόφυλλα ποικιλιών βαμβακιού	41
2.2 Μέθοδοι ιστοκαλλιέργειας βαμβακιού	43
2.2.1 Φυτικό Υλικό	43

2.2.1.1 Επιφανειακή απολύμανση σπερμάτων βαμβακιού	44
2.2.1.2 Βλάστηση σπερμάτων βαμβακιού υπο ασηπτικές συνθήκες	45
2.2.1.3 Ανάπτυξη νεαρών φυτών βαμβακιού <i>in vitro</i>	45
2.2.2 Τεχνικές ασηπτικής απομόνωσης εκφύτων	46
2.2.2.1 Απομόνωση κορυφαίου και μασχαλιαίων μεριστωμάτων από <i>in vitro</i> νεαρά φυτά βαμβακιού	47
2.2.2.2 Ασηπτική απομόνωση εμβρυακού άξονα και αρχέφυτρου του βλαστιδίου ώριμου εμβρύου απο εμποτισμένους σε νερό σπόρους βαμβακιού.....	49
2.2.3 Σύσταση και προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων. Συνθήκες ιστοκαλλιέργειας.....	50
2.2.4 Καλλιέργεια εκφύτων με στόχο την αναγέννηση φυτών βαμβακιού	53
2.2.4.1 Έναρξη καλλιέργειας κορυφαίων και άλλων μεριστωμάτων με στόχο τη βλαστογένεση	53
2.2.4.2 Επιμήκυνση- ανάπτυξη των νεαρών βλαστών.....	54
2.2.4.3 Ριζοβόληση βλαστών.....	54
2.2.4.4 Αναγέννηση ολόκληρων φυτών και μεταφορά τους στο θερμοκήπιο.....	55
2.2.4.5 Καλλιέργεια εμβρυακών ιστών	56
2.2.4.6 Επαγωγή πολλαπλής οργανογένεσης.....	58
2.2.5 Έλεγχος ευαισθησίας στην καναμυκίνη.....	59
2.3 Μέθοδοι μοριακής ανάλυσης	59
2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA- Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού- Ανάλυση μορίων DNA σε πηκτική αραρόζης	60
2.3.2 Απομόνωση γενωμικού DNA απο νεαρά και αποξηραμένα φύλλα βαμβακιού.....	60
2.3.3 Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για την ταυτοποίηση του γονιδίου της ακτίνης του βαμβακιού	62
2.3.4 Ανάλυση ενζυμικής δραστικότητας και ιστοχημικός εντοπισμός της β-γλυκουρονιδάσης. 63	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	66
3.1 Καλλιέργειες βακτηριακών στελεχών	66
3.2 Γονίδια για τον γενετικό μετασχηματισμό ποικιλιών βαμβακιού, φορείς	68
3.3 Εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας μετά απο ένεση βακτηριακών αιωρημάτων σε κοτυληδονόφυλλα ποικιλιών βαμβακιού.....	72
3.4 Απομόνωση γενωμικού DNA απο νεαρά και αποξηραμένα φύλλα βαμβακιού – Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για την ταυτοποίηση του γονιδίου της ακτίνης του βαμβακιού	74
3.5 Ιστοχημικός εντοπισμός της β-γλυκουρονιδάσης - Έλεγχος ευαισθησίας στην καναμυκίνη. 77	
3.6. Αναγέννηση φυτών βαμβακιού	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	85
ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	85

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη διατριβή αυτή παρουσιάζεται μια πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιεί τα επιδεκτικά-γενετικού μετασχηματισμού μεριστωματικά κύτταρα του κορυφαίου μεριστώματος *in vitro* νεαρών φυτών και των εμβρυακών αξόνων ώριμων σπερμάτων βαμβακιού με σκοπό την αναγέννηση φυτών Ελληνικών ποικιλιών χωρίς την μεσολάβηση φάσης κάλλου. Επαγωγή βλαστογένεσης επιτεύχθηκε σε MS-θρεπτικό υπόστρωμα με 0,1 mg/l Κινετίνη (Kin) για τα κορυφαία μεριστώματα και με 3 mg/l BAP για τους εμβρυακούς άξονες.

Για την «φυσιολογική» (χωρίς παραμορφώσεις ή ανωμαλίες) επιμήκυνση των εκπυσσόμενων βλαστών σε τελικό μέγεθος 5-10 cm προτείνεται η χρήση μέσου ίδιας σύστασης (MS) με χαμηλότερη συγκέντρωση Kin (0,01 mg/l). Η ριζογένεση των νέων βλαστών επιτεύχθηκε με καλλιέργειά τους σε 0,5 MS με 0.3 % Ενεργοποιημένο Ανθρακα (AC) για τα κορυφαία μεριστώματα και σε Mc.Stewart and Hsu θρεπτικό με 0,01 mg/l NAA για τους εμβρυακούς άξονες. Αναγεννημένα φυτά βαμβακιού προκύπτουν εντός 6-10 εβδομάδων από την απομόνωση των εκφύτων και την έναρξη της καλλιέργειας, ανάλογα με την ποικιλία.

Η περιγραφόμενη πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε με επιτυχία σε τέσσερις διαφορετικές Ελληνικές ποικιλίες βαμβακιού (M1, M2, M3, ΦΩΤΕΙΝΗ) με ποσοστό αναγέννησης ολόκληρων φυτών 5-10 %.

Για την πολλαπλή βλαστογένεση (στόχοι για γενετικό μετασχηματισμό) σε προγράμματα μικροπολλαπλασιασμού για το βαμβάκι, προτείνεται η αποκλειστική χρησιμοποίηση της κυτοκινίνης TDZ σε συγκεντρώσεις 0,022-2,2 mg/l. Σε προκαταρκτικά πειράματα με τις τέσσερις ποικιλίες βαμβακιού δεν παρατηρήθηκαν πολλαπλοί βλαστοί ανά έκφυτο μετά από 2 εβδομάδες καλλιέργειας. Επίσης παρουσιάζονται προκαταρκτικά πειράματα για την ευαισθησία σε διάφορες συγκεντρώσεις καναμυκίνης που επιδεικνύουν οι τύποι ιστών (κορυφαία μεριστώματα, εμβρυακοί άξονες) που θα χρησιμοποιηθούν ως έκφυτα για τον γενετικό μετασχηματισμό ώστε να καθοριστεί η χαμηλότερη συγκέντρωσή της για την επιλογή μετασχηματισμένων φυτών.

Ακόμα παρουσιάζονται μέθοδοι μοριακής ανάλυσης (απομόνωση γενωμικού DNA, αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για την ταυτοποίηση γονιδίων, ιστοχημικός

εντοπισμός της β-γλυκουρονιδάσης) όπως βελτιστοποιήθηκαν για ιστούς βαμβακιού με σκοπό να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση και τον εντοπισμό πιθανών μετασηματισμένων φυτών βαμβακιού. Τέλος, εξετάστηκε η δυνατότητα ανάπτυξης συστήματος παροδικής έκφρασης με τη μέθοδο της «αγροέγχυσης». Χρησιμοποιήθηκαν γονιδιακές κασσέτες επαγόμενης και συστατικής έκφρασης γονιδίων αμολυσματικότητας (*avr* γονιδίων) του φυτοπαθογόνου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* σε ποικιλίες βαμβακιού (φυτά μη-ξενιστές). Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν μεταξύ άλλων και ο προσδιορισμός ανθεκτικών φυτών που θα έφεραν γονίδια ανθεκτικότητας (*r* γονίδια) λειτουργικά αντίστοιχα με το γονίδιο αμολυσματικότητας του φυτοπαθογόνου με το οποίο γινόταν η δοκιμή ('gene-for-gene' hypothesis).

ABSTRACT

In the core of this Master dissertation is the description of a procedure for Greek cotton cultivars, that uses transformation-competent, pre-existing meristematic cells from the isolated shoot apex of aseptically germinating seedlings and from the excised embryonic axes of mature seeds. This clonal propagation system allows regeneration of cotton to be plant-driven and therefore, genotype independent.

Induction of shoot development was achieved on a simple MS-basal Medium supplemented with 0,1 mg/l Kin in the case of shoot apices and with 3 mg/l BAP in the case of embryo axes. Elongation of shoots was obtained on agar-solidified, MS-basal Medium supplemented with 0,01 mg/l Kin. *In vitro* shoots were rooted on half-strength MS-basal Medium with 0,3 % AC for shoot apices and on Mc.Stewart and Hsu Medium with 0,01 mg/l NAA for embryo axes, within 6-10 weeks from isolation, depending on the cotton cultivar.

All shoots regenerated directly without a callus phase.

The procedure was found to be applicable to four different Greek cotton varieties (M1, M2, M3, ΦΩΤΕΙΝΗ), giving an average of 5-10 % regeneration efficiency.

If shoot multiplication is desired the use of TDZ is proposed at the concentrations of 0,022-2,2 mg/l, though in so far experiments of ours multiple shoot production was not observed after 2 weeks in culture for the four cultivars.

Also presented here are, preliminary tests to determine the optimum kanamycin concentrations for selection of transformed meristematic tissues as well as molecular analysis methods such as DNA extraction, genomic template PCR and GUS-assaying methods optimized for cotton tissues in order to be used for the future detection of cotton transformants.

Finally, some preliminary results are presented on the development of the Agrobacterium-based transient expression assays based on the use of avirulence (*avr*) genes from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* as facile indicators of Hypersensitive Reaction and non-host resistance of Greek cotton cultivars.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός αυτής της διατριβής είναι η εξερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης των μεριστωματικών κυττάρων του κορυφαίου μεριστώματος *in vitro* νεαρών φυτών βαμβακιού με στόχο την αναγέννηση ολόκληρων φυτών Ελληνικών ποικιλιών χωρίς την μεσολάβηση φάσης κάλλου.

Προσπαθήσαμε να αναπτύξουμε ένα πρόγραμμα μικροπολλαπλασιασμού, ενός «αυθεντικού-στον-τύπο» (true-to-type), δηλαδή τρόπου πολλαπλασιασμού επιλεγμένων γονοτύπων βαμβακιού, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για την αναγέννηση (σε πρώτη φάση) και τον πολλαπλασιασμό (σε δεύτερη φάση) γενετικά τροποποιημένων φυτών βαμβακιού.

Το σύστημα μικροπολλαπλασιασμού που σχεδιάστηκε περιλαμβάνει:

Έναρξη κύκλου με απομόνωση και καλλιέργεια (σε υψηλά επίπεδα κυτοκίνης, Kin 0,1 mg/l για απλή βλαστογένεση ή TDZ 0,022-2,2 mg/l για πολλαπλή βλαστογένεση) φυλλοφόρων οφθαλμών (κορυφαίου και μασχαλαίων) από μεγαλωμένα *in vitro* φυτά βαμβακιού.

Συνέχεια κύκλου με παραγωγή βλαστών (επιμήκυνση σε χαμηλά επίπεδα κυτοκίνης Kin 0,01 mg/l) και διαχωρισμό τους για ριζοβόληση (καθόλου κυτοκίνη).

Λήξη κύκλου με αναγεννημένα φυτά βαμβακιού από οφθαλμούς (που θα φέρουν φυλλοφόρους οφθαλμούς, δηλ. νέο υλικό προς απομόνωση και καλλιέργεια).

Ο κύκλος πολλαπλασιασμού βλαστών (φυτών) με φυλλοφόρους οφθαλμούς μπορεί να επαναληφθεί με τους νέους οφθαλμούς.

Το ενδιαφέρον μας για το γενετικό μετασχηματισμό ποικιλιών βαμβακιού Ελληνικού ενδιαφέροντος, εστιάστηκε στην δυνατότητα χρήσης «ετερόλογων» γονιδίων που κωδικοποιούν για καταλυτικά ένζυμα βιοχημικών αντιδράσεων του βιοσυνθετικού μονοπατιού των φλαβονοειδών (ανθοκυανινών), με σκοπό την τροποποίηση του αντίστοιχου κεντρικού ενδογενούς μονοπατιού που είναι λειτουργικό στο βαμβάκι για την επίτευξη φυσικού χρώματος στην ίνα. Παράλληλα διερευνήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης μεθόδου παροδικής έκφρασης γονιδίων σε φυτά βαμβακιού με τη μέθοδο της «αγροέγχυσης».

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το βαμβάκι στην Ελλάδα, στο σύγχρονο οικονομικό περιβάλλον – Οικονομικά στοιχεία – Δημογραφικό ενδιαφέρον

[τα στοιχεία που παρουσιάζονται στο κείμενο προέρχονται απο τη Στατιστική Υπηρεσία Ελλάδος και τον Οργανισμό Βάμβακος και αφορούν μια περίοδο 5-7 τελευταίων χρόνων]

Για να καταδειχθεί η σπουδαιότητα της βαμβακοκαλλιέργειας [κορυφαία παγκοσμίως για την παραγωγή φυσικής ίνας και δεύτερη παγκοσμίως σε μέγεθος καλλιέργεια για την παραγωγή βιομηχανικών ελαίων-σπορελαίων (oilseed)] για τη χώρα μας θα πρέπει να σημειωθεί ότι απο τα 12 εκατ. στρ. της Ελληνικής Γεωργικής γης που αρδεύονται (μόνο το 5% του βαμβακιού που καλλιεργείται στη χώρα μας είναι ξηρικό), τα 8 εκατ. στρ. καταλαμβάνονται απο φυτά μεγάλης καλλιέργειας, 3.5 εκατ. στρ. (2001) εξ' αυτών καλλιεργούνται με βαμβάκι (12 – 16 εκατ. εκτάρια στις Η.Π.Α.).

Οι μέσες στρεμματικές αποδόσεις σε σύσπορο βαμβάκι [σύσπορο βαμβάκι = % ινών (εκκοκισμένο βαμβάκι) + % σπόρου + % υγρασίας σπόρου και ξένων υλών] εκτοξεύτηκαν τα τελευταία 50 – 70 χρόνια , χάρη κυρίως στη συμβολή του Ινστιτούτου και του Οργανισμού Βάμβακος, στα 260 – 280 Kg (275 Kg/στρμ το όριο ασφαλείας για τη στρεμματική απόδοση πέρυσι), γεγονός που κατατάσσει την Ελλάδα πέμπτη απο πλευράς αποδόσεων σε παγκόσμια κλίμακα (91).

Ετησίως στη χώρα μας παράγονται 1 εκατ. τον σύσπορου βαμβακιού, που αποδίδουν ένα συνολικό γεωργικό εισόδημα ύψους 260 δισ.δρχ. (~760 εκατ. ευρώ, 38 δισ. \$ το αντίστοιχο νόμμερο για τις Η.Π.Α. και επιπλέον 120 δισ.\$ εισόδημα απο βιομηχανίες που χρησιμοποιούν το βαμβάκι ως πρώτη ύλη). Απο αυτό, παράγονται περίπου 300.000 τον των ινών αξίας 90 δισ.δρχ. (~260 εκατ. ευρώ) απο τους οποίους το 50 % εξάγεται και το άλλο 50 % καλύπτει την εγχώρια αγορά και 530.000 τον του

βαμβακόσπορου αξίας 12.5 δισ.δρχ. (~360 εκατ. ευρώ) που οδηγούνται απευθείας, στην εγχώρια βιομηχανική παραγωγή ελαίων και ζωοτροφών.

Η ποιότητα των παραγομένων ινών είναι εξαιρετικό [95 % των δεμάτων του εκκοκισμένου βαμβακιού έχει μήκος ίνας 28 – 29 mm, το 80 % είναι «κυτίου» ή «τύπου» $3 \frac{1}{2}$ - $5 \frac{1}{2}$ (βαθμός «κυτίου» = χρωματισμός & καθαρότητα (ξένες ύλες), βαθμοί «κυτίου» 1 – 4 αποτελούν τις ανώτερες κλάσεις).

Με την καλλιέργεια του βαμβακιού στη χώρα μας ασχολούνται 87.500 (2002) γεωργικές εκμεταλλεύσεις και πάνω απο 150.000 υπάλληλοι και εργάτες στους τομείς της μεταποίησης και διακίνησης των προϊόντων του βαμβακιού.

Η κατά κεφαλή κατανάλωση εκκοκισμένου βαμβακιού ετησίως αποτελεί κριτήριο ανάπτυξης (~11.1 Kg για τον μέσο Αμερικανό, ~ 4.0 Kg για τον μέσο Έλληνα) (91).

Ως πρώτη ύλη, το βαμβάκι τροφοδοτεί σειρά μεταποιητικών βιομηχανιών και βιοτεχνιών όπως εκκοκιστήρια, κλωστήρια, υφαντήρια, πλεκτήρια, βαφεία, εργοστάσια κατασκευής ενδυμάτων και έτοιμων βαμβακερών ειδών, σποροελαιουργεία (το σπορέλαιο βαμβακόσπορου ανήκει στις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας) εργοστάσια ζωοτροφών (σπόρος ή περιβλήματά του στις «βαμβακόπιτες» – seed meal, πλούσιες σε απαραίτητα αμινοξέα και ως «στρωμή») που πολλαπλασιάζουν αρκετές φορές την αρχική αξία του προϊόντος (96).

Όσον αφορά τις ποικιλίες βαμβακιού που καλλιεργούνται στη χώρα μας, γενικά θεωρείται ότι υπάρχει ποικιλιακή πολυσπερμία, με αρκετές ελληνικές ποικιλίες να έχουν μεν περάσει εδώ και καιρό στην καλλιεργητική πρακτική (Ζετα 2, Ζετα 5, ΕΥΑ, ΚΟΡΙΝΑ, ΟΥΡΑΝΙΑ, ΦΩΤΕΙΝΗ, κ.α.), με προβλήματα όμως στην σποροπαραγωγή εξαιτίας της έλλειψης ενιαίου εθνικού φορέα σποροπαραγωγής (τον ρόλο αυτό παίζουν οι ιδιωτικές εταιρείες), αλλά με τον αριθμό των ξένων ποικιλιών εισαγωγής (κοινοτικός κατάλογος απο το 1990) να αυξάνει δραστικά χρόνο με χρόνο, κυρίως απο τη δραστηριότητα των πολυεθνικών εταιρειών.

Σήμερα οι ειδικοί θεωρούν ότι οι παράγοντες που αποτελούν απειλή για την βιωσιμότητα και το μέλλον της παραγωγής και βιομηχανίας βαμβακιού στη χώρα μας είναι: α) το συνεχώς αυξανόμενο κόστος της παραγωγής, β) οι στρεμματικές αποδόσεις υπο το πρίσμα των απαιτήσεων της καλλιέργειας σε νερό και της αναγκαίας διαχείρισης υδατικών πόρων, γ) οι στάσιμες τα τελευταία χρόνια τιμολογήσεις του προϊόντος και δ)

τα προβλήματα στις ενισχύσεις (προκαταβολές επιδοτήσεων και επιστροφή συνυπευθυνότητας) των παραγωγών απο την Ευρωπαϊκή Ένωση (δυσμενείς ρυθμίσεις που ψηφίστηκαν τον Μάιο του 2001 του εφαρμοζόμενου κοινοτικού κανονισμού 1051/2000) και το Ελληνικό κράτος (78).

Απο άλλη σκοπιά το βαμβάκι σήμερα, κυρίως λόγω των δυνατοτήτων της γεωργικής παραγωγής (χαμηλό κόστος πρωτογενούς παραγωγής, παραγωγή σε τεράστιες ποσότητες, διάθεση προϊόντος σε χαμηλές τιμές, χαμηλότερο σχετικά κόστος της διαδικασίας δευτερογενούς παραγωγής κ.α.) και της ποιότητας της ίνας του (τεχνολογικά χαρακτηριστικά) φαίνεται να αντιμετωπίζει το συναγωνισμό στις διεθνείς αγορές με επιτυχία απο τις άλλες φυσικές ίνες (μαλλί, λινάρι, μετάξι) και τις συνθετικές ίνες [ραιγιόν απο κυτταρίνη, οργανικά συνθετικά πολυμερή πολυεστέρων (Terylene, Dacron), πολυαμιδίων (Nylon, Perlon), βινυλικά παράγωγα (Saran, Velon, Isoryl, Orlon, Vinyon)] για την κατασκευή υφασμάτων και ενδυμάτων πολυτελείας και καθημερινής χρήσης (86). Σύμφωνα, με οικονομικούς αναλυτές αγορών, φαίνεται ότι οι τεχνητές και οι άλλες φυσικές ίνες μάλλον χρησιμεύουν για να συμπληρώνουν το έλλειμα της αγοράς σε βαμβάκι και να εμποδίζουν την υπερβολική αύξηση των τιμών παρά για να το υποκαταστήσουν ολότελα (η χρήση τους σε προσμίξεις βαμβακιού περιορίζει τη ζήτηση του τελευταίου). Φαίνεται όμως να χάνει αγορές, που σχετίζονται με τα λινά που χρησιμοποιούνται στα ελαστικά των αυτοκινήτων, ενώ υπάρχουν μερίδια σε αγορές για τα παραπροϊόντα επεξεργασίας του βαμβακιού (27).

1.2. Ταξινόμηση των ειδών βαμβακιού.

Το βαμβάκι κατατάσσεται στην οικογένεια Malvaceae και το γένος *Gossypium*. Στο γένος *Gossypium*, κατόπιν κυτταρογενετικών μελετών (χρωματοσωμικά ζευγαρώματα) και βάση ιστορικών στοιχείων και οικολογικών ερευνών (πιθανοί πρόγονοι, τόποι καταγωγής, μέσα διάδοσης καλλιιεργειών), έχουν περιγραφεί 50 διαφορετικά είδη, απο τα οποία 4 είναι τα «κοινά καλλιεργούμενα» (domesticated species, θεωρία 'εξέλιξης κάτω απο συνθήκες πολλαπλής, παράλληλης εξημέρωσης φυτών') (78):

α) *Gossypium herbaceum L.* (ποώδες ή Κινέζικο), που καλλιεργείται στις ξηρότερες περιοχές της Ασίας και της Αφρικής (διπλοειδές, $n = x = 13$).

β) *Gossypium arboreum L.* (δενδρώδες ή Ινδικό), που δεν παρουσιάζει σήμερα γεωργικό ενδιαφέρον (διπλοειδές, $n = x = 13$).

γ) *Gossypium hirsutum L.* (χνουδωτό ή Αμερικάνικο ή upland), είναι ένα C3 φυτό με υψηλό ρυθμό φωτοαναπνοής που διακρίνεται για την προσαρμοστικότητά του στις υποτροπικές περιοχές (τετραπλοειδές, $n = 2x = 26$).

Τα φυτά του είδους είναι μικροί, ετήσιοι θάμνοι με ύψος 1 έως 1 ½ μέτρο και με λίγους (ή κανένα) οφθαλμούς που θα παράγουν αποκλειστικά φυλλοφόρους βλαστούς (παρουσιάζουν ανάπτυξη συνήθως συμποδιακή). Τα φύλλα με 3 – 5 αβαθείς λοβούς (που καταλήγουν σε μύτη) μπορεί να ποικίλουν απο εντελώς λεία έως πολύ χνουδωτά. Τα άνθη (κυπελοειδής κάλυκας, τα νήματα στημόνων στη βάση ενώνονται σε σωλήνα γύρω απο το στύλο ενώ στην κορυφή είναι ελεύθερα φέροντας τους ανθήρες) διακρίνονται για το μέγεθός τους, ανοίγουν δε εντελώς. Τα φυτά του είδους (διασταυρώσεις και με άτομα με συμβατούς τύπους γονιδιωμάτων) πολλαπλασιάζονται εγγενώς. Η γονιμοποίηση μπορεί να γίνει είτε με αυτεπικονίαση (self-pollination) είτε με ετεροεπικονίαση (cross-pollination). Επικονιαστές είναι συνήθως τα έντομα *Apis mellifera* (μέλισσα) και του γένους *Bombus spp.* Η τοποθεσία, η εποχή, η απόσταση μεταφοράς και ο κρίσιμος πληθυσμός επικονιαστών παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία διασποράς της γύρης. Οι κάψες (καρύδια) είναι μεγάλες σφαιροειδείς ή επιμήκεις με 3 έως 5 χώρους και 5 έως 11 σπόρους στον κάθε χώρο, με την ωρίμανση σχίζονται στις ραφές των καρποφύλλων. Οι σπόροι περιβάλλονται απο παχύ στρώμα ινών μήκους 23 – 32 mm. Επίσης, μαύροι ελαιοφόροι αδένες είναι διάσπαρτοι ακανόνιστα πάνω σε όλους τους ιστούς του φυτού. Στο συγκεκριμένο είδος ανήκει το 90 % των ποικιλιών βαμβακιού που καλλιεργούνται παγκόσμια. Στην χώρα μας, το εν λόγω είδος καλλιεργείται αποκλειστικά.

δ) *Gossypium barbadense L.* (βαρβαδινό ή Αιγυπτιακό), με χαρακτηριστικά μεγάλο μήκος ίνας (extra long staple), ιδιαίτερης λεπτότητας και στιλπνότητας. Δίνει το υπόλοιπο 10 % της παγκόσμιας παραγωγής (τετραπλοειδές, $n = 2x = 26$).

Τα δύο πρώτα είναι τα λεγόμενα είδη βαμβακιού του «Παλαιού Κόσμου» ('Old World'), είναι διπλοειδή [για τα διπλοειδή βαμβάκια έχουν καθοριστεί 7 διαφορετικοί τύποι γονιδιώματος (A-G και K) με βάση χρωμοσωμικά ζευγαρώματα με ξεχωριστές

ομαδοποιήσεις γονιδίων], με γονιδίωμα A και 26 χρωματοσώματα. Η καταγωγή τους είναι από τον Ινδό ποταμό, όπου θεωρούνται ενδημικά είδη.

Τα δύο επόμενα είναι τα λεγόμενα είδη βαμβακιού του «Νέου Κόσμου» ('New World'), είναι αλλοτετραπλοειδή με 52 χρωματοσώματα [2 διαφορετικά σετ χρωματοσωμάτων στον ίδιο πυρήνα (disomic chromosome pairing), προερχόμενα από διασταύρωση πριν την εξημέρωση μεταξύ A γονιδιώματος «Παλαιού Κόσμου» (*G. herbaceum* L.) και D γονιδιώματος «Νέου Κόσμου» (*G. raimondii* Ulbrich)] και με γονιδίωμα AADD. Η καταγωγή τους (indigenous species) είναι από την Κεντρική Αμερική για το *G. hirsutum* L. και από την Νότια Αμερική για το *G. barbadense* L.

Το τετραπλοειδές γονιδίωμα του βαμβακιού έχει συνολικό μέγεθος (total recombinational length, η εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων γίνεται με βάση την πιθανότητα πραγματοποίησης γεγονότος γενετικού ανασυνδυασμού) 5200 cM (2119 cM είναι το A γονιδίωμα και 2140 cM είναι το D), κατανέμεται στα 26 χρωμοσώματα, παρουσιάζοντας μέσο περιεχόμενο σε DNA (average DNA content) της τάξης των 400,000 νουκλεοτιδίων (400 Kb) ανά μονάδα γενετικής απόστασης (cM: centi-Morgan).

Η εκτίμηση με βάση σύγχρονα δεδομένα για το «φυσικό» μέγεθος του τετραπλοειδούς γονιδιώματος του βαμβακιού είναι στα 2200 έως 3000 Mb DNA.

Υπολογίζεται ότι θα χρειαστεί να κατασκευαστούν περίπου 60.000 – 80.000 κλώνοι YAC (Yeast Artificial Chromosomes) ή BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) με μέσο μέγεθος ενθέματος 150 Kb (large-insert DNA library) για μια αρκετά ρεαλιστική (5X) κάλυψη του γονιδιώματος σε γενωμική βιβλιοθήκη (78, 86, 12).

1.3. Οι τρέχουσες εξελίξεις στον τομέα της βιοτεχνολογίας του βαμβακιού

1.3.1. Γενωμική ανάλυση και γενετική βελτίωση βαμβακιού

Όλοι οι χάρτες, που υπάρχουν σήμερα για το γονιδίωμα του βαμβακιού (*G. hirsutum* L.) έχουν καθόλου ή πολύ λίγη χρησιμότητα στη γενετική βελτίωσή του, λόγω

κυρίως των χαμηλών επιπέδων πολυμορφισμού που απαντάται μεταξύ των διαφόρων δεξαμενών γενετικού υλικού (gene pools).

Ο πιο αναλυτικός χάρτης που υπάρχει σήμερα για το βαμβάκι, κατασκευάστηκε το 1994 και περιλαμβάνει 705 χαρτογραφημένους γενετικούς τόπους (loci, σχετίζονται με φαινοτυπικές μεταλλάξεις) και 41 «ομάδες σύνδεσης» (linkage groups), παρέχοντας μια μέση απόσταση μεταξύ των γενετικών δεικτών (genetic markers) της τάξης των 3 cM. Αυτός ο γενετικός χάρτης χαρακτηρίζεται ως χαμηλής πυκνότητας (72).

Το μέγεθος όμως και η πολυπλοκότητα του γονιδιώματος του βαμβακιού έχει προάγει σε άμεση ανάγκη την κατασκευή ενός μοριακού χάρτη (σύντομα αναμένεται η έκδοσή του από ερευνητική ομάδα στο πανεπιστήμιο Texas A&M των Η.Π.Α.), που θα προσεγγίζει τις 3.000 χαρτογραφημένες γενετικές θέσεις και θέσεις μοριακών δεικτών. Πρόκειται για μια διαδικασία εμπλουτισμού του ήδη υπάρχοντος γενετικού χάρτη με μοριακούς δείκτες (“portable” PCR-based molecular markers, RAPDs, AFLPs, και SSRs κυρίως) μέσω της σήμανσης της δεξαμενής του DNA (γονιδίωμα) με την χρήση τεχνικών PCR και αυθαίρετα εκλεγμένους εκκινητές (arbitrary primers). Με αυτόν τον τρόπο θα δημιουργηθεί ένας κορεσμένος γενετικός – μοριακός (μεικτός) χάρτης υψηλής πυκνότητας (saturated high-density map), με απόσταση μεταξύ δεικτών περίπου 1 cM (~ 400 Kb), που θα χρησιμοποιηθεί στην προσπάθεια για τον καθορισμό ολόκληρης της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος του βαμβακιού (genome sequencing). Θα αποτελέσει έτσι την βάση για τον πρώτο «φυσικό» χάρτη με έτοιμες αλληλουχίες, ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση γονιδίων (positional ή map-based cloning through chromosome walking) (86).

Παράλληλα το CGC (NSF- χρηματοδοτούμενο, Cotton Genome Center στο Παν/μιο Καλιφόρνιας, στο Davis των Η.Π.Α., <http://cottongenomecenter.ucdavis.edu>) έχει κατασκευάσει μια BAC βιβλιοθήκη κλώνων γενωμικού DNA (large-insert, ordered BAC library) με μεγαλύτερη των 10 x κάλυψη του γονιδιώματος του *G. hirsutum L. cv. Maxxa* με τελικό στόχο την στρατηγικής σημασίας τοποθέτηση 5.000 DNA δεικτών στους BAC κλώνους.

Επί του παρόντος, έχουν επίσης προχωρήσει και στην αποκρυπτογράφηση των αλληλουχιών περίπου 8.000 ESTs (Expressed Sequence Tags), γονιδίων που εκφράζονται στην ίνα του *G. hirsutum L.*

1.3.2. *In vitro* αναγέννηση βαμβακιού

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το βαμβάκι είναι ένα φυτικό είδος που παρουσιάζει δυσκολία στην αναγέννηση ολόκληρων φυτών από *in vitro* καλλιέργειες κυττάρων ή οργάνων.

Στο επίκεντρο της έρευνας, για τους *in vitro* χειρισμούς ενός τέτοιου φυτικού είδους, έχει τεθεί η προσπάθεια για την εγκατάσταση σύγχρονων «βελτιωμένων» ποικιλιών βαμβακιού σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας, με τελικό στόχο την αναγέννηση από μεμονωμένα κύτταρα κανονικής ανάπτυξης, μη στειρών φυτών, που θα ανθοφορούν κανονικά και θα παράγουν ώριμα σπέρματα ικανά για βλάστηση και τη συνέχιση του βιολογικού κύκλου των φυτών. Αυτό θα επιτευχθεί με την ανάπτυξη ενός συστήματος αναγέννησης φυτών που θα έχει σε σύντομο χρονικό διάστημα επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα.

Σήμερα υπάρχουν δύο συστήματα ιστοκαλλιέργειας για την αναγέννηση φυτών βαμβακιού (83).

Το σύστημα της Σωματικής Εμβρυογένεσης (somatic embryogenesis), συγκεντρώνει για την ώρα το μεγαλύτερο ποσοστό προτίμησης ως μέθοδος αναγέννησης τόσο στον ιδιωτικό όσο και στον δημόσιο τομέα έρευνας της βιοτεχνολογίας βαμβακιού. Αφορά την εξ'ολοκλήρου αναγέννηση φυτών βαμβακιού, μέσω της επαγωγής (induction) και ανάπτυξης σωματικών εμβρύων, από αποδιαφοροποιημένα κύτταρα κάλλου.

Το σύστημα του Μικροπολλαπλασιασμού ή της καλλιέργειας μεριστώματων (meristem culture), από την άλλη, μόλις τα τελευταία χρόνια άρχισε να χρησιμοποιείται. Αφορά την χρήση φυτικών μεριστωμάτων ως εκφύτων και την εξ'ολοκλήρου αναγέννηση φυτών μέσω της απευθείας οργανογένεσης των εκφύτων αυτών. Παρακάτω αναλύονται οι βασικές πτυχές των συστημάτων.

Σωματική εμβρυογένεση ή καλλιέργεια μεριστωμάτων

Με το σύστημα της σωματικής εμβρυογένεσης για το βαμβάκι (στάδια: υποκοτύλια, επαγωγή καλλογένεσης, επιλεκτική καλλιέργεια εμβρυογόνων κάλλων,

ανώριμα σωματικά έμβρυα, ώριμα έμβρυα, αφυδάτωση και βλάστηση εμβρύων), η ανάκτηση ολόκληρων φυτών (και άρα πιθανών διαγονιδιακών σειρών) απαιτεί 8-10 μήνες (33).

Η ικανότητα σχηματισμού σωματικών εμβρύων (εμβρυογονικό δυναμικό) είναι άμεσα εξαρτώμενη απο τον γενότυπο. Μάλιστα, είναι πολύ λίγες οι ποικιλίες καλλιεργούμενου βαμβακιού με εμβρυογονικό δυναμικό (κληρονομούμενο χαρακτηριστικό, με πολύ μικρή όμως συχνότητα μετάδοσης στους απογόνους) απο τις οποίες έχουν αναπτυχθεί elite σειρές φυτών με ικανότητα αναγέννησης *in vitro* (elite regenerable lines). Αυτό έγινε ύστερα απο επιλογή μεταξύ ατόμων ενός πληθυσμού των εν λόγω ποικιλιών με ικανό ποσοστό παραλλακτικότητας για το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό. Μέχρι σήμερα μόνον αυτές οι σειρές μπορούν να αναγεννηθούν μέσω του συστήματος της σωματικής εμβρυογένεσης για το βαμβάκι (19).

Επιπλέον, λόγω της μεγάλης διάρκειας παραμονής της καλλιέργειας σε φάση κάλλου, αναπτύσσεται η δυναμική για σωμακλωνική παραλλακτικότητα (somaclonal variation), που μπορεί να εκδηλωθεί στα μετασχηματισμένα φυτά πρώτης γενεάς ως ποσοστό φυτών ανώμαλης ανάπτυξης, ποσοστό στείρων φυτών ακόμη και με τη μορφή κυτταρογενετικών ανωμαλιών σε κατά τα άλλα φυσιολογικά φυτά (85).

Τα σύγχρονα πρωτόκολλα, που εφαρμόζονται δίνουν με μεγάλη συχνότητα σωματικά έμβρυα, για τις επιλεγμένες για το εμβρυογονικό τους δυναμικό elite φυτικές σειρές, ενώ παράλληλα έχουν ελατώσει σημαντικά τα ποσοστά εμφάνισης στείρων ή ανώμαλης ανάπτυξης φυτών, κυρίως γιατί έχουν μειώσει την παραμονή στην καλλιέργεια σε λιγότερο των τριών μηνών χρονικό διάστημα (86).

Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί έτοιμες κυτταρικές σειρές (δυνατότητα συντήρησης με ψύξη και χρησιμοποίησης τους με απόψυξη) με ικανότητα αναγέννησης (regenerable cell lines) για τις ποικιλίες του *G. hirsutum* L.:

- 1988-1989, για τις Αμερικάνικες Coker 310, 312, 315, 201 και Paymaster 303.
- 1991, για την Siokra 1-3 (okra-τύπου φύλλου ποικιλία απο την Αυστραλία).
- 1996, για δυο Αμερικάνικες ποικιλίες Acala (Acala SJ2, Acala B1654) γνωστές για την ανώτερης ποιότητας ίνα τους.
- 1998-1999, για την Ινδική MCU-5 και την Κινεζική CRI 12.

-2000-2001, για την ποικιλία Maxxa (μια elite ποικιλία Acala, υψηλών αποδόσεων).

Πρόβλημα εξακολουθούν να παραμένουν οι διαφορετικοί ρυθμοί ανάπτυξης και ωρίμανσης των σωματικών εμβρύων, οπότε πρέπει αναγκαστικά η βλάστηση των εμβρύων και η επιλογή μετασχηματισμένων φυταρίων να γίνονται κάθε φορά που υπάρχει έτοιμο υλικό (90).

Η ικανότητα γενετικού μετασχηματισμού (transformation efficiency), που αφορά τον αριθμό των ανεξάρτητα μετασχηματισμένων κυττάρων (ενσωμάτωση διαγονιδίου σταθερά στο γονιδίωμα του φυτικού κυττάρου) με ικανότητα αναγέννησης και παραγωγής φυτών (διαγονιδιακών σειρών, που θα μεταδίδουν στους απογόνους τους το διαγονίδιο), που παράγονται από ένα και μοναδικό γεγονός μετασχηματισμού (stable germline transformation event) είναι της τάξης του 70 – 80 % για το σύστημα σωματικής εμβρυογένεσης-αγροβακτηρίου στο βαμβάκι (69, 68).

Η μέχρι σήμερα πρακτική για την εισαγωγή διαγονιδίων σε καλλιεργούμενες ποικιλίες βαμβακιού υψηλών αποδόσεων, αφορά τον γενετικό μετασχηματισμό κάποιας εκ των κυτταρικών σειρών με ικανότητα παραγωγής σωματικών εμβρύων (π.χ. την Coker 312), την αναγέννηση μετασχηματισμένων φυτών και την εισαγωγή τους (επιλεγμένων διαγονιδιακών σειρών) σε προγράμματα βελτίωσης με ανάδρομες διασταυρώσεις (back-cross breeding program) για την μεταφορά του διαγονιδίου στις προσαρμοσμένες κατά καλλιεργητικό περιβάλλον, σύγχρονες «βελτιωμένες» σειρές (adapted elite germplasm breeding lines) και την επιλογή για την έκφραση του διαγονιδίου μαζί με τα υπόλοιπα επιθυμητά αγρονομικά χαρακτηριστικά (66, 67).

Αντίθετα, ο αριθμός των φυτών που αναγεννούνται με το σύστημα της καλλιέργειας βλαστικών μεριστωμάτων (στάδια: κορυφαίο ή πλευρικά φυτικά μεριστώματα, βλαστογένεση, ριζογένεση) είναι σχετικά υψηλότερος (higher frequency of regeneration), η ανάκτηση δε αυτών λαμβάνει χώρα χωρίς τη μεσολάβηση φάσης σχηματισμού κάλλου (καλλογένεσης) μέσα σε 6 εβδομάδες με 3 μήνες (δυναμικότερη ανάκτηση σειρών διαγονιδιακών φυτών) (17). Το σύστημα έχει ήδη δοκιμαστεί και δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα για την ποικιλία Paymaster 145 του *G. hirsutum* L.(1991) (24).

Τα τελευταία χρόνια, απο αρκετά εργαστήρια που ασχολούνται με την παραγωγή φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού μέσω μικροπολλαπλασιασμού (micropropagation), αναφέρθηκε ότι η συχνότητα εμφάνισης γενετικών μεταλλαγών και σωμακλωνικής παραλλακτικότητας είναι ιδιαίτερα χαμηλή στα φυτά που αναγεννούνται απο καλλιέργειες *in vitro* βλαστικών μερών. Ένας απο τους λόγους για το φαινόμενο αυτό είναι η απουσία βημάτων αποδιαφοροποίησης, τα οποία πυροδοτούν την δραστηριότητα ρετροτρανσποζονίων στο γονιδίωμα φυτικών κυττάρων, όπως σε καλλιέργειες με στόχο την καλλογένεση και την σωματική εμβρυογένεση και τα οποία προκαλούν την εμφάνιση μόνιμων μεταλλαγών (23).

Έτσι ο μικροπολλαπλασιασμός σαν ο «αυθεντικός-στον-τύπο» τρόπος πολλαπλασιασμού ανεξαρτήτως γενοτύπου, απο την μια παρακάμπτει το πρόβλημα της γενοτυπικής εξάρτησης που χαρακτηρίζει τη μέθοδο της σωματικής εμβρυογένεσης (όπου λίγοι μόνο γενότυποι μπορούν να δώσουν σωματικά έμβρυα) και απο την άλλη εξασφαλίζει όσο γίνεται πιο όμοια γενετική σύσταση για τα αναγεννημένα φυτά (κλωνική αναπαραγωγή) (25).

Το αρχικό μέγεθος και η προέλευση των μεριστωμάτων είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν κυρίως την συχνότητα αναγέννησης φυτών, καθώς μεγαλύτερης ηλικίας μεριστωματικοί ιστοί παρουσιάζουν μεγαλύτερη δυσκολία στην οργανογένεση, ενώ έκφυτα απο πλευρικούς-μασχαλιαίους οφθαλμούς (axillary buds) στους κόμβους των κοτυληδόνων και του πρωτεύοντος και δευτερεύοντος φύλλου φαίνεται να ανταποκρίνονται καλύτερα στους χειρισμούς αναγέννησης απ'ότι το κορυφαίο μερίστωμα (35).

Η ριζοβόληση των αναπτυσσόμενων βλαστικών μερών είναι σχετικά ασταθής, με πολλά προβλήματα, που υποδηλώνει ότι η ριζογένεση στο βαμβάκι είναι σε υψηλό βαθμό εξαρτώμενη απο τον γενότυπο. Βελτιωμένα πρωτόκολλα και η τεχνική του εμβολιασμού βλαστικών μοσχευμάτων σε ήδη ριζοβολημένα ιστοσυμβατά υποκείμενα (grafting on seedling rootstocks) προσφέρουν διεξόδους στο πρόβλημα της ριζοβόλησης (51, 48).

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου εξουδετερώνονται απο την πολύ μικρή συχνότητα εμφάνισης σταθερών γεγονότων μετασχηματισμού με δυνατότητα παραγωγής σειρών γενετικά τροποποιημένων φυτών, που είναι της τάξης του 5–10 % για το σύστημα

μικροπολλαπλασιασμού-αγροβακτηρίου. Τα προβλήματα αφορούν τη διείδυση σε κυτταρικά στρώματα της επιδερμίδας (L2, L3) που έχουν την ικανότητα παραγωγής σταθερών διαγονιδιακών κυτταρικών σειρών και τους τραυματισμούς των ιστών αυτών, αφού οι χειρουργικοί χειρισμοί ή η δράση του GeneGun καταστρέφουν τις κυτταρικές δομές των ιστών που δεν μπορούν πλέον να επιβιώσουν στην ιστοκαλλιέργεια (75, 80).

Τελευταία, η επαγωγή πολλαπλής οργανογένεσης (multiple shoot induction) με ποσοστό 3.4 – 8.3 βλαστούς / αρχικό έκφυτο απο λανθάνοντες (dormant) πλευρικούς οφθαλμούς (axillary buds) με την χρήση της κυτοκινίνης TDZ (που κάτω από την επιλεκτική πίεση μπορεί να προκαλέσει εσωτερική αναδιοργάνωση εντός των πιθανών διαγονιδιακών περιοχών προς σχηματισμό νέων μεριστωμάτων) σε συνδυασμό με την μέθοδο της διχοτόμησης των βλαστικών μεριστωμάτων (split-shoot tip method) που εκθέτει στον παράγοντα μετασχηματισμού (αγροβακτήριο ή μικροσωματίδια με επίσρωση DNA) κυτταρικά στρώματα της επιδερμίδας των μεριστωμάτων με δυνατότητα για επ'άπειρον αναπαραγωγή και άρα για δυνατότητα παραγωγής κυτταρικών σειρών (germline potential, μετάδοση αυτούσιας της γενετικής πληροφορίας σε επόμενες γενεές) αποτελούν σήμερα την καλύτερη στρατηγική για τη βελτίωση του ποσοστού παραγωγής μετασχηματισμένων φυτών (1, 57).

Τέλος, το επιλεκτικό κλάδεμα μετά τον μετασχηματισμό μεριστωματικών ιστών εξαναγκάζει σε ανάπτυξη πλευρικούς οφθαλμούς επιτρέποντας σε 'κρυμμένα' μετασχηματισμένα κύτταρα (μέσα σε χμαιρικούς ιστούς) να εκπτυχθούν σε μετασχηματισμένους βλαστούς οι οποίοι θα αναγεννήσουν διαγονιδιακά φυτά (88, 89).

1.3.3. Γενετική τροποποίηση βαμβακιού

Μεταφορά γονιδίων με την μέθοδο του αγροβακτηρίου (Agrobacterium-mediated gene transfer) ή με την μέθοδο του βομβαρδισμού σωματιδίων (particle gun bombardment).

Η μέθοδος του αγροβακτηρίου είναι σήμερα το πιο αποτελεσματικό σύστημα μεταφοράς γονιδίων σε φυτά. Εκμεταλλεύεται τις φυσικές αλληλεπιδράσεις (γενετικός αποικισμός) του *Agrobacterium tumefaciens* (οικ. *Rhizobiaceae*), ενός Gram- αρνητικού,

ραβδόμορφου βακτηρίου εδάφους με φυτικά κύτταρα σε τραυματισμένους ιστούς, της περιοχής του λαιμού του φυτικού σώματος. Κατά τις αλληλεπιδράσεις αυτές συμβαίνει μεταφορά DNA (T-DNA περιοχή του Ti-πλασμιδίου) από το αγροβακτήριο στα πυρηνικά γονιδιώματα των φυτικών κυττάρων που προσβάλλονται και επαγωγή νεοπλασιών (καρκίνος του λαιμού). Σε συνδυασμό με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA (genetic engineering) χρησιμοποιείται για την παραγωγή διαγονιδιακών φυτών.

Επιτυχής γενετικός μετασχηματισμός με την μέθοδο του αγροβακτηρίου και αναγέννηση φυτών μέσω σωματικής εμβρυογένεσης έχει αναφερθεί από το 1987 για κάποιες ποικιλίες βαμβακιού (μερικές από τις εμπορικά διαθέσιμες διαγονιδιακές ποικιλίες σήμερα έχουν παραχθεί με αυτόν τον συνδυασμό μεθόδων) και από κορυφαία μεριστώματα μόλις το 1999 για μια συγκεκριμένη ποικιλία βαμβακιού από το Τέξας των Η.Π.Α (85, 88).

Τα προβλήματα, που έχουν αναφερθεί, αφορούν την λεγόμενη διασυστηματική μόλυνση (μετά τον μετασχηματισμό και παρά την χρήση αντιβιοτικών για την θανάτωσή τους τα αγροβακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση παραμένουν στους ιστούς) που δεν αγγίζει το βαμβάκι γιατί είναι σπόρο-πολλαπλασιαζόμενο και όχι κλωνικά πολλαπλασιαζόμενο και την ένθεση αντιγράφων του διαγονιδίου [πολλαπλές (έως 6) ενθέσεις, ενσωμάτωση γειτονικών πλασμιδιακών αλληλουχιών κ.α.)(76).

Η μέθοδος του βομβαρδισμού σωματιδίων είναι ένας εναλλακτικός τρόπος μεταφοράς γονιδίων σε φυτά, που έχει όμως μικρότερη αποδοτικότητα. Η τεχνική έχει αποδειχθεί αποτελεσματική κυρίως για φυτικά είδη όπου οι άλλες μέθοδοι μετασχηματισμού έχουν αποτύχει εξαιτίας της ύπαρξης γενετικών φραγμών (70).

Η βασική αρχή της μεθόδου αφορά την χρήση επιταχυνόμενων (μεγάλης ταχύτητας) σωματιδίων ανενεργού υλικού (χρυσός ή βολφράμιο), καλυμμένα συνήθως με DNA (συν-καθίζηση αιθανόλης-σωματιδίων χρυσού ή CaCl_2 και σπερμιδίνης-σωματιδίων βολφραμίου) ώστε να διαπεράσουν τα κυτταρικά τοιχώματα και τις εξωτερικές κυτταρικές μεμβράνες και να εισαχθούν στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων ή απευθείας στον πυρήνα. Το εισαγόμενο DNA θα πρέπει να προφυλαχθεί από την δράση νουκλεασών μέχρι την ένθεσή του στο φυτικό γονιδίωμα ξεπερνώντας με

κάποιο τρόπο τον φραγμό του πυρηνικού φακέλου (φάση του κυτταρικού κύκλου) εάν με τον βομβαρδισμό κυτταρικά εντοπιζόταν στο κυτταρόπλασμα (95).

Απο το 1990 έχει αναφερθεί επιτυχής γενετικός μετασχηματισμός με την «μέθοδο του βομβαρδισμού σωματιδίων» και αναγέννηση φυτών απο κυτταρικές σειρές με ικανότητα παραγωγής σωματικών εμβρύων για συγκεκριμένες ποικιλίες βαμβακιού (και αυτός ο συνδυασμός συστημάτων έχει δώσει διαγονιδιακές ποικιλίες ήδη σε εμπορική χρήση) και απο το 1993 απο οργανωμένους ιστούς κορυφαίων μεριστωμάτων για συγκεκριμένες ποικιλίες βαμβακιού (19,51).

Τα προβλήματα της μεθόδου αφορούν τον σχηματισμό χμαιρών, την παροδική έκφραση του διαγονιδίου, τις πολλαπλές ενθέσεις αντιγράφων του εισαγόμενου διαγονιδίου (έως και 20) και την πρόκληση τραυμάτων απο τον βομβαρδισμό που αλλοιώνουν το ολοδυναμικό των κυττάρων για την αναγέννησή τους (9).

Ο συνδυασμός βομβαρδισμού-καλλιέργειας μεριστωμάτων έχει πολύ χαμηλή αποδοτικότητα μετασχηματισμού, μόλις 0,001 – 0,01 % για τα L2, L3 κυτταρικά στρώματα επιδερμίδας του κορυφαίου μεριστώματος. Είναι αυτά που είναι τα μόνα με την δυνατότητα παραγωγής σταθερά μετασχηματισμένων κυττάρων με δυνατότητα αναγέννησης (stable germline transformants). Το L1 επιδερμικό κυτταρικό στρώμα παρουσιάζει μεν υψηλή συχνότητα μετασχηματισμού (επιτυγχάνεται η μεταφορά γονιδίων) όμως αυτή αφορά την παροδική έκφραση του διαγονιδίου (transient όχι stable integration) και την μη μετάδοσή του στους απογόνους (82). Το επιλεκτικό κλάδεμα μετά τον μετασχηματισμό προωθεί την αποτελεσματικότητα του συστήματος «βομβαρδισμού – καλλιέργειας μεριστωμάτων» στο 0,09%.

Απο την άλλη, πολλαπλοί βομβαρδισμοί εμβρυογόνων κυτταρικών καλλιεργειών σε συνδυασμό με τις διαδοχικές μεταφορές των παροδικής έκφρασης μετασχηματισμένων κυττάρων σε κλιμακούμενης επιλεκτική πίεσης συνθήκες καλλιέργειας για την ανάκτηση σταθερών μετασχηματισμένων κυττάρων, αποφέρουν ποσοστό μετασχηματισμού γύρω στο 4 % (69).

Τέλος η αποδοτικότητα μετασχηματισμού του συστήματος αγροβακτηρίου-εμβρυογόνων κυτταρικών καλλιεργειών είναι συνήθως της τάξης του 70 – 80 % ή και μεγαλύτερες. Αντίθετα για το σύστημα «αγροβακτηρίου- κορυφαίων μεριστωμάτων» το ποσοστό είναι της τάξης του 5 – 10 %. Αναμένεται όμως να είναι υψηλότερο με την

εφαρμογή των, υπο εξέλιξη ακόμα, συστημάτων πολλαπλής οργανογένεσης για το βαμβάκι (49).

Οι κανόνες της γονιδιακής μεταφοράς για το βαμβάκι και τα φυτά γενικότερα. [64, 65]:

⇒ Ένα, μοναδικό κατά προτίμηση, αντίγραφο του διαγονιδίου θα πρέπει να ενσωματώνεται κατά τρόπο σταθερό (σταθερός μετασχηματισμός και όχι παροδική έκφραση) στο γονιδίωμα του πρωτεύοντος μετασχηματιζόμενου φυτού (primary transformant) και να μεταδίδεται στους απογόνους διαδοχικών γενεών (F1, F2 progeny) σε σχεδόν Μενδελιανές αναλογίες. Πρότυπο κληρονομικότητας : αναλογίες διάσχισης (χαρακτήρας ενός γονιδίου με κυρίαρχο αλληλόμορφο, επιθυμητό γονίδιο σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία) 3 : 1 (F1 διασταύρωση) και 1 : 1 (ανάδρομη διασταύρωση). Η ένθεση πολλαπλών αντιγράφων (στην ίδια θέση ή σε διάσπαρτες θέσεις) ανα γονιδίωμα αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης γονιδιακής σίγησης και του φαινομένου της συγκαταστολής και περιπλέκει τα πρότυπα κληρονομικότητας.

⇒ Η θέση όπως και η φορά ενσωμάτωσης εξωχρωματοσωμικών DNA αλληλουχιών στο γονιδίωμα του φυτικού κυττάρου, που μετασχηματίζεται, είναι άγνωστη και τυχαία καθώς η ένθεση γίνεται με ομόλογο ή με μη ομόλογο ανασυνδυασμό ανάλογα αν τα γενετικά στοιχεία, που ανασυνδυάζονται, παρουσιάζουν ή όχι ομοιότητα μεταξύ τους. Ενζυμικοί παράγοντες, που συμμετέχουν στους μηχανισμούς ανασυνδυασμού και επιδιόρθωσης του DNA του κυττάρου, φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο. Ρόλο επίσης φαίνεται να παίζει και η φάση του κυτταρικού κύκλου, στην οποία βρίσκεται το κύτταρο που μετασχηματίζεται.

⇒ Η ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του φυτικού κυττάρου είναι δυνατόν να δημιουργήσει κάποια μετάλλαξη εάν η ένθεση γίνει μέσα σε κωδική περιοχή κάποιου εκφραζόμενου φυτικού γονιδίου. Με τα πολλαπλά αντίγραφα αυξάνει αυτή η πιθανότητα (positional effect). Πρέπει να γίνεται επιλογή φυτών που δεν έχουν καμία φαινοτυπική διαφορά με το αρχικό υλικό.

⇒ Το αντίγραφο του διαγονιδίου, που ενσωματώνεται, θα πρέπει να περιλαμβάνει αυτούσια την αλληλουχία όπως υπάρχει μεταξύ των δυο συνοριακών του T-DNA, χωρίς

να ανιχνεύονται τμήματα (κομμάτια της αλληλουχίας) αντιγράφων απο χρωμοσωμικές ανακατατάξεις σε διάφορες θέσεις στο γονιδίωμα (fragmented ή rearranged copies).

⇒ Για να επιλεγεί μια διαγονιδιακή σειρά για εμπορική προώθηση δεν πρέπει γειτονικές (flanking) DNA αλληλουχίες που εντοπίζονται έξω απο τα T-DNA συνοριακά του πλασμιδιακού φορέα μετασχηματισμού, να ενσωματώνονται στο φυτικό γονιδίωμα μαζί με την αλληλουχία του διαγονιδίου (αφορά κυρίως το σύστημα του αγροβακτηρίου).

⇒ Η επιλογή για επιθυμητά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου και επίτευξης του επιθυμητού φαινοτύπου γίνεται μέσα απο ικανό σε μέγεθος πληθυσμό φυτών (περί τα 30) που αναγεννήθηκαν απο ανεξάρτητα μετασχηματισμένα κύτταρα (primary transformant). Κάποιες φορές χρειάζεται απομάκρυνση αντιγράφων, γονιδίων επιλογής κ.α. και περαιτέρω επιλεγμένες διασταυρώσεις προτού παραχθεί μια διαγονιδιακή σειρά φυτων.

⇒ Η μοριακή ανάλυση πρωτευόντων μετασχηματιζόμενων φυτών (primary transformants) και των φυτών F1 και F2 γενεών που προκύπτουν απο αυτά αφορά: επιλογή στο μάρτυρα ανθεκτικότητας (resistant phenotypes), Southern-Northern-Western και PCR αναλύσεις, βιοδοκιμές (bioassays) κ.α.

1.3.4. Διαγονιδιακό βαμβάκι σε εμπορική χρήση

Στη δεκαετία '90 με την πρώτη γενιά γενετικά τροποποιημένου βαμβακιού για εμπορική χρήση στη συμβατική γεωργία, έγινε προσπάθεια να εισαχθούν σε καλλιεργούμενα στον αγρό φυτά νέα χαρακτηριστικά (κατά βάση ελεγχόμενα απο ένα μόνο γονίδιο, single-gene “input” traits) που θα ενίσχυαν τις αγρονομικές τους επιδόσεις, μειώνοντας παράλληλα τις δυσμενείς για το περιβάλλον επιδράσεις διαφόρων καλλιεργητικών πρακτικών. Αφορούσαν κατά κύριο λόγο χαρακτηριστικά, που προσέφεραν ανθεκτικότητα σε βιοτικούς (παθογόνους μικροοργανισμούς, επιβλαβή έντομα-ζιζάνια κ.α) παράγοντες καταπόνησης (39).

Έτσι, στην καλλιεργητική περίοδο 1996 καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά στις Η.Π.Α.(Cotton-Belt περιοχές, NuCOTN33TM ποικιλία απο την Delta & Pine Land Co.)

γενετικά τροποποιημένο για Bt – ανθεκτικότητα (Bt – ενδοτοξίνες, CryIA(b) και CryIA(c) του *Bacillus thuringiensis*) βαμβάκι με το εμπορικό όνομα Bollgard (R) (Coker διαγονιδιακή σειρά φυτών απο την Monsanto) και ομάδα βιολογικού στόχου κάποια είδη λεπιδοπτέρων σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο βιολογικού κύκλου.

Μέχρι σήμερα για το πρώτο διαγονιδιακό βαμβάκι σε εμπορική καλλιέργεια στις Η.Π.Α. είναι γνωστό ότι: α) αν και δεδομένα για αποδόσεις και κόστη παραγωγής δεν δημοσιοποιήθηκαν, απο τότε μέχρι σήμερα έχουν αυξηθεί οι καλλιεργούμενες, στις Η.Π.Α. και στον κόσμο, εκτάσεις με διαγονιδιακό βαμβάκι, β) εκδηλώθηκαν σε μεγάλο ποσοστό αγρών εξάρσεις προσβολών (ποσοστού εξάπλωσης και έντασης φαινομένων) απο έντομα του βιολογικού στόχου, που για να αντιμετωπιστούν απαιτήθηκε χρήση χημικών εντομοκτόνων, τα οποία η διαγονιδιακή καλλιέργεια είχε σαν στόχο να αντικαταστήσει, γ) δεν υπήρξε καμία επίδραση σε δυναμικό πληθυσμών για έντομα εκτός ομάδας βιολογικού στόχου ή για βακτήρια εδάφους, δ) εκφράζονται φόβοι για ανάπτυξη ανθεκτικών πληθυσμών, όμως υπάρχουν στρατηγικές διαχείρισης της ανθεκτικότητας (12).

Το 1997 έγινε εμπορικά διαθέσιμο (RoundupReady, Monsanto) σε 39 εμπορικές ποικιλίες διαγονιδιακό βαμβάκι ανεκτικό στο ζιζανιοκτόνο Roundup (R) με δραστική ουσία το glyphosate (glyphosate-tolerant), ενώ το 1998 εμφανίστηκαν ποικιλίες (Stoneville, BXN-resistant, Calgene) διαγονιδιακού βαμβακιού με ανθεκτικότητα στην δραστική ουσία Bromoxynil (εμπορική ονομασία Buctril (R)). Σήμερα τουλάχιστον δυο ακόμη εταιρείες (Aventis και Novartis) έχουν σε διαδικασίες ανάπτυξης προϊόντος ποικιλίες διαγονιδιακού βαμβακιού με ανεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα (herbicide-tolerant).

Παράλληλα σε στάδιο βασικής έρευνας εξετάζονται άλλες μη Bt- εντομοκτόνες πρωτεΐνες (χιτινάσες, λεκτίνες, πολυφαινολοξειδάσες κ.α.), αντιμικροβιακές πρωτεΐνες (γλυκανάσες, λυσοζύμες, thionines, defensins, lipid transfer proteins κ.α.), συνθετικά πεπτίδια (D4E1) για την πιθανή χρησιμοποίησή τους στην παραγωγή διαγονιδιακού βαμβακιού. Εξετάζονται επίσης συνδυασμοί διαγονιδίων (pyramiding) για την διαμόρφωση συνολικά ανθεκτικών- ανεκτικών φαινοτύπων.

Στην περίοδο 1999-2000, διαγονιδιακές ποικιλίες βαμβακιού καλλιεργούνταν στην Αργεντινή, Αυστραλία, Κίνα, Μεξικό, Νότια Αφρική και Η.Π.Α (20). Η επόμενη γενιά

γενετικά τροποποιημένου βαμβακιού (σήμερα και για τα επόμενα 5 – 10 χρόνια) στοχεύει στη βελτίωση πολυγονιδιακών χαρακτηριστικών (“output” traits), η έκφραση των οποίων στη διαμόρφωση φαινοτύπου ελέγχεται από πολύπλοκους μηχανισμούς σε επίπεδο κυττάρου (βιοχημική, γενετική ρύθμιση) και φυτού (φυσιολογική, περιβαλλοντική ρύθμιση) (πίνακας 1) (40).

Πίνακας 1 : Βιοτεχνολογία βαμβακιού : χαρακτηριστικά προς βελτίωση / η επόμενη γενιά γενετικής τροποποίησης	
Χαρακτήρες ίνας	
Απόδοση :	Αναλογία ινών και σπόρου, Kg ίνας/στρμ.
Ποιότητα :	Μήκος ίνας, αντοχή, στιλπνότητα, ομοιομορφία, ελαστικότητα, χρωματισμός, κόμποι-ψοφάκια.
Μετασυλλεκτικές ιδιότητες :	Απορρόφηση υγρασίας, βαφικές ιδιότητες (uptake), υφαντικές ιδιότητες.
Καινοφανή χαρακτηριστικά :	Ίνες για θερμοάντοχα υλικά, φυσικός χρωματισμός ινών, βιοαποκατάσταση εδαφών, παραγωγή φαρμακευτικού-ιατρικού βαμβακιού με φυσικές αντιμικροβιακές ιδιότητες.
Χαρακτήρες σπόρου	
Περιεκτικότητα σε λάδι και ποιότητα σπόρου :	Ποσότητα και σύσταση απαραίτητων λιπαρών οξέων, εξάλειψη ελεύθερης και δεσμευμένης γκοσσυπόλης.
Περιεχόμενο σε θρεπτικά συστατικά :	Απαραίτητα αμινοξέα, πρωτεΐνες, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία, εξάλειψη μικροβιακών τοξινών.
Χαρακτήρες που σχετίζονται με την ανάπτυξη του φυτού	
Φωτοσυνθετική ικανότητα :	Βελτιωμένη αφομοίωση CO ₂ και καλύτερη ανακύκλωση μεταβολιτών.
Ισοζύγιο του νερού :	Πρόσληψη και διακίνηση νερού.

1.4. Ανάπτυξη της ίνας στο βαμβάκι

Οι ίνες του βαμβακιού είναι μονοκύτταρα μή αδενικά τριχώματα (unicellular trichomes, προέλευση πρωτόδερμα) χωρίς διακλαδώσεις, που σχηματίζονται όταν μερικά (το 25 % των κυττάρων αυτών, τυχαία κατανεμημένων, διαφοροποιούνται προς αυτήν την κατεύθυνση) από τα κύτταρα της εξωτερικής επιδερμίδας της σπερματικής βλάστης (25 – 30 σπερματικές βλάστες / βαμβακόσποροι ανά ωοθήκη-κάψα-καρύδι) αρχίζουν ταυτόχρονα να επιμηκύνονται ξεκινώντας από την ή κοντά στην ημέρα που γίνεται το άνοιγμα του άνθους (Day Of Anthesis, DOA). Μετά τη γονιμοποίηση του άνθους αρχίζει η ανάπτυξη του σπόρου [ώριμος σπόρος: έμβρυο (δύο αναδιπλωμένες κοτυληδόνες και φύτρο), περισπέρμιο, υπολείμματα ενδοσπερμίου], και η διαμόρφωση του εμβρύου (2- 4 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση ο ζυγώτης διαιρείται, στις 7 ημέρες το έμβρυο φτάνει στο σφαιρικό στάδιο, στις 10 – 12 ημέρες έχει την καρδιάσχημη μορφή του και στις 15 φτάνει στο στάδιο της τορπίλλης με διαφοροποιημένα τα ακραία μεριστώματα). Το λάδι (περιεκτικότητα 18 –21 %) σχηματίζεται έντονα μέσα στο σπόρο (ελαιώδεις αδένες στις κοτυληδόνες και το υπέργειο μέρος του φύτρου) 15 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση και μέχρι τις 50 ημέρες.

Οι πρώτες επιδερμικές τρίχες του περισπερμίου του βαμβακόσπορου (πρόκειται για τυπικά φυτικά κύτταρα με κυτταρικό τοίχωμα και τεράστιο κεντρικό χυμοτόπιο) που αρχίζουν να επιμηκύνονται τις πρώτες 2 – 5 ημέρες μετά την άνθηση και φτάνουν στα 22 – 30 mm μήκος, είναι οι πραγματικές ίνες (lint fibers, επιθυμητές εμπορικά) ενώ όσες σχηματίζονται αργότερα και φτάνουν στα 15 mm μήκος αποτελούν το χνούδι (fuzz fibers ή linters).

Το κύριο συστατικό, σε ποσοστό 95 % του νωπού βάρους, της ώριμης ίνας είναι η κυτταρίνη του πρωτογενούς και δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος (δευτερογενές κυτ. τοίχωμα ίνας δεν περιέχει καθόλου λιγνίνη) (44).

Η ανάπτυξη της ίνας πάνω στο φυτό πραγματοποιείται σε τέσσερα επικαλυπτόμενα αναπτυξιακά στάδια:

1. Έναρξη ανάπτυξης ιών, την ημέρα που γίνεται το άνοιγμα του άνθους: δίνεται το έναυσμα για ταυτόχρονη διαφοροποίηση και κυτταρική επιμήκυνση 13.000 με 21.000 επιδερμικών κυττάρων ίνας / σπερματική βλαστη.

2. Κυτταρική επιμήκυνση, για 27 – 39 ημέρες μετά την άνθηση: πραγματοποιείται κυτταρική αύξηση, με συμμετοχή κυρίως των αυξινών και γιββεριλλινών, εν μέρει με επιμήκυνση κορυφής και εν μέρη με εναπόθεση νέων υλικών, πολυσακχαριτών, που μεταφέρονται μέσω Golgi και εκκρίνονται στην περιοχή σύνθεσης, στη φορά επιμήκυνσης. Στο στάδιο αυτό γίνεται σύνθεση νουκλεϊκών οξέων - πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης και εσωτερικών μεμβρανικών δομών - οργανιδίων – συστατικών κυτταροπλάσματος, σύνθεση πρωτογενούς κυτ. τοιχώματος (τυπική σύσταση πρωτογενούς κυτ.τοιχώματος φυτικού κυττάρου δικοτύλων απο κυτταρίνη, ημικυτταρίνες, πηκτίνες, συμμετοχή κυτταροσκελετού και ενζύμων που συμμετέχουν σε διαδικασίες έκτασης κυτ. τοιχωμάτων π.χ. δ-tubulin, MIP, εξπανσίνες, 1,4-β-γλυκανάσες κ.α), εισροή οργανικών συστατικών μέσω πλασμοδεσμάτων και ιόντα K⁺, πρωτεΐνες ρύθμισης ωσμωτικού δυναμικού (proton translocating ATPases, V-, PM-H⁺-ATPase) (74). Η φάση αυτή καθορίζει τον χαρακτήρα, μήκος ίνας (fiber length).

3. Δευτερογενής πάχυνση κυτταρικών τοιχωμάτων (secondary wall deposition), περίοδος 17 – 53 ημέρες μετά την άνθηση, οπότε διαλυτά σάκχαρα (σακχαρόζη, ένζυμο SuSy συνθετάση της σακχαρόζης) μεταφέρονται στις ίνες και μετατρέπονται σε κυτταρίνη (μακρομόριο απο 8.000-15.000 μόρια γλυκόζης στη σειρά ενωμένα με β-1,4 δεσμούς, σε κρυσταλλική μορφή). Μικροϊνίδια κυτταρίνης (δεσμίδα 40-70 μακρομορίων κυτταρίνης που συγκρατούνται με υδρογονικούς δεσμούς) εναποτίθενται σε διαδοχικά στρώματα (το ένα πάνω στο άλλο), στο εξωτερικό του πρωτογενούς κυτ.τοιχώματος, καλύπτοντας όλο το μήκος της αναπτυσσόμενη ίνας (ταυτόχρονη βιοσύνθεση πρωτογενούς και δευτερογενούς κυτ.τοιχώματος), με ελικοειδή προσανατολισμό ως προς τον κατά μήκος άξονα της, έως το πάχος του κυτ. τοιχώματος φτάσει στα 3-4 μm (73). Η φάση αυτή (πάχος κυτ.τοιχώματος) καθορίζει τους χαρακτήρες, αντοχή (fiber strength) και λεπτότητα (fiber fineness) ίνας.

4. Ωρίμανση (maturation): στις 45 – 60 ημέρες μετά την άνθηση, μετά απο έντονη αφυδάτωση των κυττάρων της ίνας (κατά την διάρρηξη της κάψας) το πρωτόπλασμα νεκρώνεται (πιθανώς διαδικασία PCD, Programmed Cell Death), διατηρούνται τα κυτταρικά τοιχώματα, στη θέση του κεντρικού χυμοτοπίου εμφανίζεται κοιλότητα, με την εξωκυττάρια μήτρα του ζωντανού κυττάρου να αποτελεί την φυσική ίνα του βαμβακόσπορου, που ενδιαφέρει εμπορικά την υφαντουργία.

Σε επίπεδο έκφρασης γονιδίων, τυπικού επιδερμικού φυτικού κυττάρου πέραν αυτών που σχετίζονται με την βιοσύνθεση κυτταρίνης, και ρύθμισης αυτής (όλα τα επίπεδα: μεταγραφικό – μετα μεταφραστικό φαίνεται να λειτουργούν κατά την ανάπτυξη της ίνας) υπάρχουν γονίδια ίνας, που εκφράζονται αποκλειστικά κατά την έναρξη ανάπτυξης και τη φάση επιμήκυνσης της ίνας, γονίδια που εκφράζονται αποκλειστικά κατά τη φάση της δευτερογενούς πάχυνσης του κυτ. τοιχώματος (tissue-specific expression) και μια τρίτη κατηγορία γονιδίων ίνας που εκφράζονται συστατικά (constitutively expressed) σ' όλες τις φάσεις ανάπτυξης της ίνας.

Διαφορές στις ίνες (ποιότητα, fiber quality = fiber strength + fiber length + fiber fineness) παρουσιάζονται από σπόρο σε σπόρο, στους σπόρους του ίδιου καρυδιού, μεταξύ καρυδιών, σε φυτά της ίδιας ποικιλίας αλλά και μεταξύ ποικιλιών και ειδών βαμβακιού. Παράλληλα οι συνθήκες του περιβάλλοντος (υγρασία, ηλιοφάνεια, έδαφος κ.α.) επιτρέπουν ή όχι στις ίνες να φτάσουν τα χαρακτηριστικά τους στα προκαθορισμένα γενετικώς επίπεδα.

Μέχρι σήμερα προγράμματα κλασσικής γενετικής βελτίωσης βαμβακιού, με επιλογή απογόνων από διασταυρώσεις επιλεγμένων σειρών βοήθησαν (38):

– Στη βελτίωση των χαρακτήρων, που σχετίζονται με την ποιότητα των παραγόμενων ινών. Τα σημερινά επίπεδα έφτασαν σε πλατώ, δηλαδή έχουν εξαντληθεί οι δυνατότητες σε σχέση με τις ανάγκες της κλωστικής τεχνολογίας.

– Στην ταυτοποίηση (μέσω της χρήσης χαρτών με DNA δείκτες, marker-assisted) και τον χρωματοσωμικό εντοπισμό (εντοπισμένα στο D γονιδίωμα του μη ικανού για παράγωγη ίνας προγόνου) ποσοτικών χαρακτήρων (QTLs, Quantitative Trait Loci) για μήκος, αντοχή και λεπτότητα ίνας.

– Στην ταυτοποίηση μεταλλαγμάτων (προέκυψαν αυθόρμητα μέσα στα χρόνια από τις βελτιωτικές προσπάθειες) που αφορούν γονίδια που εκφράζονται κατά την ανάπτυξη ινών και ελέγχουν (ένα γονίδιο για κάθε χαρακτήρα, single-gene control) την κατά μήκος και κατά πάχος αύξηση τους. Στην βιβλιογραφία αναφέρονται τα : α) Ligon-lintless (*Li1, Li2*) για μειωμένο μέγεθος κυττάρων ίνας, β) naked seed mutant (*N1*) για καθόλου χνούδι και πολύ μικρό μήκος πραγματικών ινών, γ) pilose mutant (*H2*) για κοντύτερη και παχύτερη ίνα και αυξημένη πυκνότητα κατανομής τριχών στα φύλλα, και δ) immature fiber mutant (*im*) που δεν μπορεί να παράγει ώριμο δευτερογενές κυτ. τοίχωμα.

Αναμένεται η εφαρμογή και τα αποτελέσματα νέων μεθόδων (DNA markers, differential display, cotton fiber *in vitro* development, transformation) να βοηθήσουν την επιλογή σε νέα, καλύτερα σχεδιασμένα προγράμματα βελτίωσης των χαρακτηριστικών της ίνας.

Το προϊόν που συγκομίζεται στο χωράφι είναι το σύσπορο βαμβάκι, το οποίο θα υποβληθεί σε ειδική μηχανική επεξεργασία, τον εκκοκισμό (ginning) και έτσι θα χωριστούν τα δυο κύρια προϊόντα (σπόρος και ίνες που τον περιβάλλουν) που αποτελούν τον αποκλειστικό σκοπό της καλλιέργειας του βαμβακιού.

1.5. Επεξεργασία ίνας βαμβακιού

Οι ίνες σε φυσική κατάσταση (raw lint, χρώμα άσπρο-εκρού) που προορίζονται για την υφαντουργία, καθαρίζονται από ξένες ύλες (cleaning) και στη συνέχεια υποβάλλονται σε σειρά μηχανικών επεξεργασιών που περιλαμβάνουν το λανάρισμα (carding), το γνέσιμο (τράβηγμα, στρίψιμο και τύλιγμα ινών με σκοπό την νηματοποίηση, roving), το τύλιγμα (spinning) του νήματος στην εξευγενισμένη του μορφή (combed lint, yarn) όπως τελικά θα οδηγηθεί για το πλέξιμό (knitting) και την ύφανσή (weaving) του. Για τον χρωματισμό του το κατεργασμένο νήμα του βαμβακιού υποβάλλεται σε χημική λεύκανση (bleaching) με χλωρίνη, υπεροξείδιο του υδρογόνου κ.α. και βαφή (dyeing) με χρωστικές ύλες φυσικής ή τεχνητής προέλευσης.

1.6. Φυσικά χρώματα

Σήμερα είναι γνωστό ότι οι σημαντικότερες φυσικές χρωστικές ουσίες (σήμερα αναφερόμαστε σε σύμπλοκα χρωστικών ουσιών, pigment complexes) που είναι υπεύθυνες για το φυσικό χρώμα των ανθέων είναι τα φλαβονοειδή (flavonoids) και κυρίως οι ανθοκυανίνες (anthocyanins), τα καροτενοειδή (carotenoids) και οι μπεταλαΐνες (betalains).

Οι δυο πρώτες από τις τρεις αυτές μεγάλες κατηγορίες χρωμοφόρων συνδυαζόμενες φαίνεται να συνεισφέρουν, για την παραγωγή της γκάμας χρωμάτων για

πορτοκαλί, κίτρινα, άλικά, καφέ/μαύρα άνθη σε μερικά σημαντικά καλλωπιστικά είδη φυτών και για τα ίδια χρώματα στα φθινοπωρινά φύλλα των φυλλοβόλων ειδών.

Οι χλωροφύλλες γενικά θεωρούνται λιγότερο σημαντικές ως χρωστικές για το χρώμα άν και φαίνεται ότι κάποιες φορές είναι οι αποκλειστικά υπεύθυνες για περιπτώσεις πράσινων ανθέων (π.χ. *Helleborus*)(10).

1.6.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι οι υπεύθυνες ενώσεις για τα χρώματα : ροζ, κόκκινο, πορτοκαλί, άλικο, μωβ-μενεξεδί, μπλέ και σκούρο μπλέ των ανθέων και για μερικά κίτρινα. Επιπλέον προσφέρουν «βάθυχρωμία» στα περισσότερα λευκά ή κρέμ λουλούδια (acyanic).

Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς περιέχει 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτυλίους (A- και B- δακτύλιοι), που συνδέονται με μια γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα που αναφέρεται και ως κεντρικός ετεροδακτύλιος (C – δακτύλιος). Η δομή αυτή είναι το αποτέλεσμα της συνένωσης δυο προϊόντων που προέρχονται από δυο διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια. Ο αρωματικός δακτύλιος B και η γέφυρα των τριών ατόμων άνθρακα, είναι μια φαινυλπροπανική μονάδα που προέρχεται μέσω φαινυλαλανίνης από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Τα έξι άτομα άνθρακα του άλλου αρωματικού δακτυλίου (A- δακτύλιος) προέρχονται από το μονοπάτι του μαλονικού οξέος (οξικό ιόν) (28).

Για τα φλαβονοειδή υπάρχει μια πρωτογενής ταξινόμηση σε ομάδες (classes of flavonoids) με βάση τον βαθμό οξειδωσης των ατόμων άνθρακα της γέφυρας, σε χαλκόνες (αρχικές πρόδρομες ενώσεις, κίτρινου χρώματος, λίγο σημαντικές ως χρωστικές), φλαβανόνες (ενδιάμεσες πρόδρομες ενώσεις, άχρωμες), φλαβόνες και φλαβονόλες (μερικές ανοικτού κίτρινου χρώματος, λιγότερο σημαντικές ως χρωστικές, συνεισφέρουν όμως σημαντικά στα φαινόμενα «co-pigmentation» και “depth”, ρόλοι: προστασία των κυττάρων από UV ακτινοβολία που την απορροφούν και στο σχηματισμό των «οδηγών νέκταρος»), ανθοκυανιδίνες (κόκκινων και μπλέ αποχρώσεων, οι πιο σημαντικές χρωστικές) (56).

Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών μπορεί να έχει πολυάριθμους υποκαταστάτες, διαφορετικούς μεταξύ τους (υδρόξυ-, μεθόξυ-, σουλφοξυ-, ακυλιώσεις, γλυκοσυλιώσεις) και σε διαφορετικές θέσεις των δακτυλίων και της γέφυρας (R θέσεις υποκατάστασης).

Ανάλογα με τις υποκαταστάσεις προκύπτουν τα ξεχωριστά είδη των ενώσεων αυτών.

Τα περισσότερα φλαβονοειδή, που υπάρχουν στη φύση, απαντώνται κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών (υποκατάσταση θέσεων A- δακτυλίου και γέφυρας, O-γλυκοζίτες) με τη θέση και το είδος του σακχάρου, που συμμετέχει στη δομή της ένωσης (γλυκόζη, ραμνόζη κ.α.) να επηρεάζει και τις ιδιότητές της (σταθεροποίηση μορίου, διαλυτότητα στο νερό, μεταγενέστερες τροποποιήσεις μορίου).

Η γονιδιακή έκφραση, η *de novo* σύνθεση και η καταλυτική δραστηριότητα των κύριων βιοσυνθετικών (και των τροποποιητικών) ενζύμων (συνθετάση της χαλκόνης, ισομεράση της χαλκόνης, 3β υδροξυλάση της φλαβανόνης, συνθετάση της φλαβόνης, συνθετάση της φλαβονόλης, ρεδουκτάση της διϋδροφλαβονόλης, συνθετάση της ανθοκυανιδίνης) του μονοπατιού βιοσύνθεσης φλαβονοειδών του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτικών κυττάρων υπόκεινται στον έλεγχο πολύπλοκων μηχανισμών ρύθμισης, οι οποίοι με την σειρά τους επηρεάζονται από ποικίλους εξωτερικούς και εσωτερικούς παράγοντες, όπως π.χ. (βιοχημικοί): transcription factors, επαγωγείς (elicitors), ανταγωνισμοί υποστρωμάτων, ανάδρομοι μηχανισμοί, ορμόνες, (φυσιολογικοί) : επίπεδα θρεπτικών ουσιών (αζώτου, φωσφόρου και θείου), ηλιακό φως - UV ακτινοβολία (φυτόχρωμα), χαμηλές θερμοκρασίες, τραυματισμοί φυτικών ιστών, προσβολές από παθογόνα (22).

Σήμερα το αναλυτικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των κύριων τύπων φλαβονοειδών είναι εκτενώς χαρακτηρισμένο (πρόδρομες ενώσεις, βήματα, ένζυμα, ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα) για μερικά φυτικά είδη (πετούνια, καλαμπόκι, αντίρρινο, όχι όμως για το βαμβάκι) (16) (βλέπε Εικόνα 1 Παραρτήματος).

1.6.2. Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανιδίνες (άγλυκο μέρος), ένα απο τα τελικά προϊόντα του βιοχημικού μονοπατιού, κάτω απο κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, είναι ασταθείς ενώσεις και δεν συσσωρεύονται στα φυτικά κύτταρα, αλλά σταθεροποιούνται με την προσθήκη σακχάρων (ειδικά ένζυμα, γλυκοσυλτρανσφεράσες) προς το σχηματισμό ανθοκυανινών (ανθοκυανίνες = ανθοκυανιδίνες + σάκχαρο).

Οι ανθοκυανίνες εντοπίζονται αποκλειστικά στα επιδερμικά κύτταρα των πετάλων των έγχρωμων ανθέων, σε επιδερμικά κύτταρα περικαρπίου (π.χ. στο μήλο, αντίθετα οι καρποί ντομάτας περιέχουν χρωμοπλάστες - καροτενοειδή), στο περισπέρμιο έγχρωμων σπόρων και σε μερικά φυτικά είδη στα φθινοπωρινά φύλλα (στα ζωηρά χρώματα κυρίως, σε μικρότερο όμως ποσοστό απο τα καροτενοειδή).

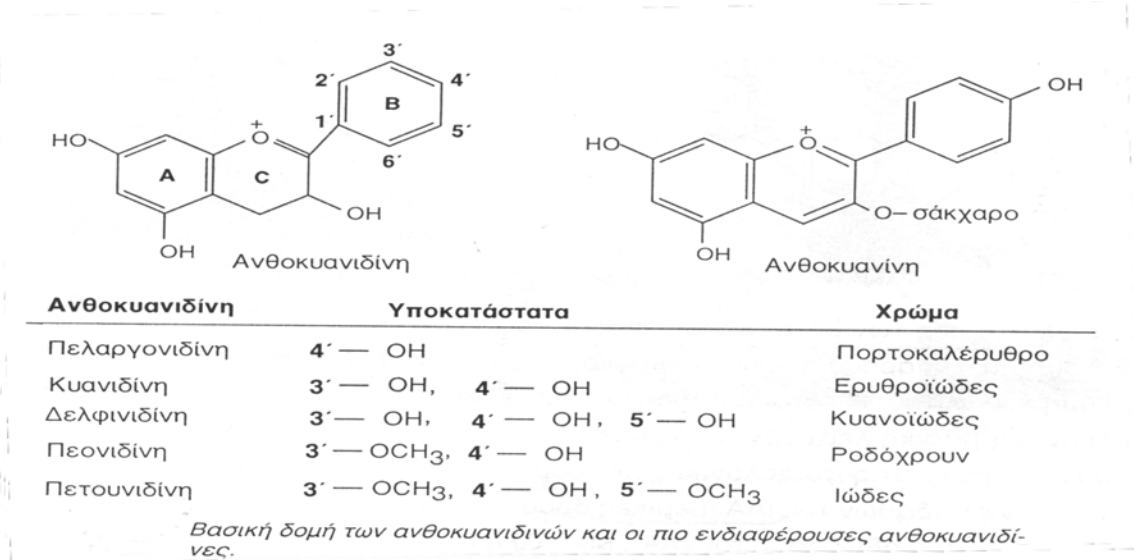
Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές ουσίες που αποταμιεύονται στο ελαφρώς όξινο απο πλευράς pH χυμοτόπιο (εντός κυττάρουπλάσματος ως ειδικοί υποκυτταρικοί σχηματισμοί, «ανθοκυανοπλάστες»).

Σε υδατικές συνθήκες, οι ανθοκυανίνες για να επιτύχουν σταθερότητα σε μοριακό επίπεδο ώστε να εμποδιστεί η ενυδάτωσή τους και κατ'επέκταση η απώλεια του χρώματος προχωρούν σε διατάξεις δευτεροταγών δομών και σχηματισμό μοριακών συμπλόκων μεταξύ μορίων ίδιας χρωστικής και διαφορετικών χρωστικών (intra-, inter-molecular co-pigmentation) μια διαδικασία, που είναι γνωστή ως «συγχρωματισμός». Έτσι παράγεται μια απεριόριστη ποικιλία χρωμάτων μέσω δημιουργίας συμπλόκων με συγχρωστικές φλαβονοειδείς ουσίες, με μεταλλικά ιόντα (σχηματισμός χηλικών ενώσεων με Al^{+3} , Fe^{+3} ή Mg^{+2}), με παραπέρα (δευτερογενείς) τροποποιήσεις μορίου τους όπως γλυκοσυλιώσεις, ακυλιώσεις, μεθυλιώσεις και αλλαγών του pH του κυτταρικού χυμοτοπίου (*Ph* γονίδια) (77).

Σε τέτοια σύμπλοκα χρωστικών ανθοκυανινών, που έχουν δεχτεί τις τελικές μοριακές τους τροποποιήσεις, φαίνεται να μεταφέρεται μια γλουταθειομάδα (glutathione residue) απο μια τρανσφεράση της γλουταθειόνης (glutathione-S-transferase). Στην συνέχεια τα σημανθέντα κατ'αυτόν τον τρόπο σύμπλοκα μεταφέρονται στο χυμοτόπιο (vacuolar targeting) με τη βοήθεια μιας $MgATP$ -εξαρτώμενης αντλίας συμπλόκων-S-

γλουταθειόνης (translocator against a concentration gradient, μία αντλία ανά τονοπλάστη).

Τρεις είναι οι βασικές ομάδες ανθοκυανινών (ανάλογα με τα -OH στον Β δακτύλιο) που συναντώνται συνήθως : τα παράγωγα της πελαργονιδίνης (πορτοκαλί, ρόζ ή κόκκινο χρώμα), της κυανιδίνης (κόκκινο ή μωβ) και της δελφινιδίνης (ιώδες, μπλέ, μπλου-μπλακ) (βλέπε Εικόνα 1, παρακάτω) (92).



Εικόνα 1 Βασική δομή των ανθοκυανιδινών και οι πιο ενδιαφέρουσες ανθοκυανιδίνες Πηγή: (92)

Πέραν όλων των άλλων, πρέπει να αναφερθεί ότι και η φυσική κατασκευή των κυττάρων της επιδερμίδας των πετάλων των ανθέων (epidermal cell shape, *mixta* γονίδια αντίρρινου) φαίνεται πως επηρεάζει την αίσθηση του αντιλαμβανόμενου χρώματος.

Τέλος, αναλυτικά χημικά εργαστήρια έχουν επιτύχει σταθεροποίηση του χρώματος φυσικών χρωμοφόρων (in vitro reconstitution of isolated pigments) και τεχνητών με παραπλήσιες δομές.

1.6.3. Καροτενοειδή-μπεταλαΐνες

Τα καροτενοειδή απαντώνται στα κύτταρα σχεδόν όλων των φυτικών ειδών. Είναι υδατάνθρακες με βασική δομή μια αλυσίδα 40 ατόμων άνθρακα (πρόδρομη ένωση: φυτοένιο). Τα καροτενοειδή [καροτένια, λυκοπένια ντομάτας (α- & β-), ξανθοφύλλες

(ζεαξανθίνη,βιολαξανθίνη,ανθεραξανθίνη κ.α)] ευθύνονται για συγκριτικά μικρότερη ποικιλία χρωμάτων, κυρίως κίτρινου (ξανθοφύλλες) και πορτοκαλί (καροτένια) και σε μερικά φυτικά είδη (πάπρικα, πιπεριά) για το κόκκινο (καψανθίνη, καψορουμπίνη). Σε αντίθεση με τα φλαβονοειδή, είναι υδρόφοβες λιποδιαλυτές ουσίες και εντοπίζονται στις κυτταρικές ή υποκυττάριας μεμβράνες, συχνά σαν σύμπλοκα με ειδικές πρωτεΐνες στο στρώμα των πλαστιδίων. Σε όργανα όπως τα πέταλα των ανθέων, τους καρπούς και τις ρίζες συντίθενται και αποθηκεύονται στους χρωμοπλάστες (διαφοροποιημένα πλαστίδια). Κύριος ρόλος τους είναι η προστασία των φωτοσυνθετικών ιστών (φύλλα, χλωροπλάστες, δέσμευση ηλιακής ενέργειας σε συμπληρωματικά μήκη κύματος και μεταφορά αυτής στην χλωροφύλλη α) απο φωτο-οξειδωση.

Οι μεταλαΐνες (μπετακυανίνες, μπεταξανθίνες των παντζαριών), είναι αζωτούχες ενώσεις απο το αμινοξύ τυροσίνη, που έχουν σαν χρωμοφόρο το μπεταλαμικό οξύ (κιτρινο), με κυτταρικό εντοπισμό στο χυμοτόπιο κυττάρων σε ανθικούς ιστούς και βλαστικά όργανα μερικών όμως φυτικών ειδών που περιορίζονται στην τάξη *Caryophyllales*, αλλά και στον μύκητα *Amanita muscaria* και παράγουν κίτρινα - πορτοκαλί (μπεταξανθίνες, ινδικαξανθίνη της φραγκοσυκιάς), κόκκινα -μωβ-μενεξεδιά (μπετακυανίνες) χρώματα. Οι ανθοκυανίνες και οι μπεταλαΐνες ποτέ δεν συνυπάρχουν στο ίδιο φυτό.

Σήμερα έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως τα γονίδια, που κωδικοποιούν ένζυμα για τη βιοσύνθεση διαφόρων χρωστικών ουσιών απο προκαρυώτες και κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μεταξύ των οποίων γονίδια που συμμετέχουν στην σύνθεση καροτενοειδών (carotenogenic bacteria) και του indigo σε βακτήρια αλλά και απο ανώτερα φυτά. Μερικά απο αυτά έχουν κλωνοποιηθεί και έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε πειράματα τροποποιήσεων της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών, κυρίως, για την παραγωγή νέων χρωμάτων σε διάφορα καλλωπιστικά φυτά (*Petunia*, *Nicotiana*, *Rosa*)

Οι ουσίες που είναι υπεύθυνες για τα φυσικά χρώματα στο βαμβάκι (ποικιλίες με έγχρωμα άνθη) είναι τα φλαβονοειδή (78). Επομένως πρέπει να θεωρείται δεδομένο οτι τουλάχιστον τα αρχικά υποστρώματα, τα γονίδια που συμμετέχουν και κάποια τμήματα του μονοπατιού βιοσύνθεσης (τα αρχικά βιοσυνθετικά ένζυμα του κεντρικού μονοπατιού

και κάποιοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί) είναι λειτουργικά στα είδη του βαμβακιού και τους τύπους κυττάρων του.

1.7. Βαμβάκια με φυσικό χρώμα ίνας

Υπάρχουν έγχρωμα άγρια είδη βαμβακιού (π.χ. *G. tomentosum*, με χρώμα ιών ορφνό ή κόκκινο σαν σκουριά και μήκος ίνας μόλις 10 mm που καθιστά δύσκολη έως αδύνατη τη μηχανική τους επεξεργασία), που όμως δεν παράγουν τυπικές βιομηχανοποιήσιμες ίνες και είναι δύσκολη η διασταύρωσή τους (ασυμβίβαστο) με καλλιεργούμενα βαμβάκια.

Υπάρχουν ποικιλίες των *G. barbadense* (φυσικό χρώμα ίνας κιτρινωπό) και *G. hirsutum* (φυσικό χρώμα ίνας λευκό- εκρού) με φυσικά χρωματισμένα ίνα (σε αποχρώσεις του κίτρινου, του πορτοκαλί, του πράσινου και του καφετί, πουθενά όμως δεν συναντώνται έντονα χρώματα όπως το μπλέ ή το κόκκινο), που έχουν εγκαταλειφθεί ή παραγκωνιστεί για χρόνια, μιας και η παραγωγή ακολουθεί τις επιταγές των αναγκών της βιοτεχνίας για βιομηχανοποιημένη επεξεργασία. Άλλες (πάλι έγχρωμες), που καλλιεργούνται σποραδικά ή που έχουν εγκλιματιστεί σε συγκεκριμένες οικολογικές συνθήκες και η μεταφορά τους σε πιο ευνοϊκές, καλλιεργητικά, αποδεικνύεται εκ των υστέρων ακατάλληλη.

Τα τελευταία χρόνια στις αναπτυγμένες χώρες (Η.Π.Α κυρίως), απο τη μιά με την στροφή προς την οργανική καλλιέργεια (αποκλειστικά ιδιωτική πρωτοβουλία) και απο την άλλη με την παράλληλη αλλά ανεξάρτητη ανάπτυξη βιοτεχνολογικών μεθόδων (έρευνα σε πανεπιστήμια και ιδιωτικές εταιρείες σποροπαραγωγής), γίνονται προσπάθειες για εκτίμηση του γενετικού υλικού (germplasm potential) και τη βελτίωση, με κλασική γενετική (επιλογή και διασταυρώσεις) αλλά και την απευθείας μεταφορά γονιδίων, των τεχνολογικών χαρακτηριστικών και της ευπάθειας στις καταπονήσεις των έγχρωμων ποικιλιών βαμβακιού.

Ο σκοπός τέτοιων προσπαθειών είναι απο την μιά η εξάλειψη της χρήσης χημικών (επιβάρυνση περιβάλλοντος, πιθανά αλλεργιογόνα), σ'όλες τις φάσεις παραγωγής (λίπανση, φυτοπροστασία) και επεξεργασίας (λεύκανση, βαφή) του προϊόντος και απο

την άλλη η επίτευξη ικανοποιητικών αποδόσεων και ποιότητας προϊόντος, για την εμπορική εκμετάλλευση έγχρωμων ποικιλιών βαμβακιού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα αντιδραστήρια για την παρασκευή των διαλυμάτων προμηθεύτηκαν σε μορφή σκόνης με υψηλό βαθμό χημικής καθαρότητας από την Sigma Chemicals Co. και την Duchefa Biochemie BV. Τα περιοριστικά ένζυμα προήλθαν από τις εταιρείες Minotech και New England Biolabs (NEB). Τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας των βακτηριακών στελεχών προήλθαν από τις εταιρείες Oxoid, Difco, Merck, Sigma. Τα ολιγονουκλεοτίδια - εκκινητές συντέθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ι.Μ.Β.Β. (Ι.Τ.Ε.) και τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) προήλθαν από την εταιρεία Promega.

Η θερμοσταθερή πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Taq polymerase από την εταιρεία Minotech όπως και το PCR reaction buffer.

2.1 Καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών, φορείς, παρασκευαστικές και βακτηριολογικές μέθοδοι

2.1.1 Παρασκευή στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας βακτηριακών στελεχών

Το θρεπτικό υπόστρωμα LB (Luria-Bertani) για την καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών *E.coli* (DH5a, HB101) παρασκευάστηκε με βάση τις οδηγίες των Maniatis *et.al.* (50). Το θρεπτικό μέσο N.A. (Nutrient Agar) παρασκευάστηκε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή (Oxoid) και χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών *E.coli* (DH5a) και *Agrobacterium tumefaciens* (LBA 4404) καθώς και για την καλλιέργεια του *Agrobacterium rhizogenes* με ποικίλα αποτελέσματα.

Για την παρασκευή του μέσου King's B για την μη-επιλεκτική απομόνωση και καλλιέργεια ψευδομονάδων (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* διάφορα στελέχη και φυλές) με ικανότητα φθορισμού ή παραγωγής χρωστικών προστίθενται τα υλικά στις ποσότητες: 20 gr Proteose peptone No.3 (Difco), 10 ml Glycerol, 1,5 gr K_2HPO_4 (anhydrous), 1,5 gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 gr Agar (Bacteriological Agar), απεσταγμένο νερό μέχρι το 1 λίτρο. Όλα τα υλικά πλην του $MgSO_4$ αναδεύονται καλά σε δοχείο (θέρμανση, συνεχή ανάδευση) για την διαλυτοποίηση του στερεοποιητικού παράγοντα και μόνο μετά την ρύθμιση του pH στο 7,2 προστίθεται το $MgSO_4$ (αργά). Το μέσο αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο για 15 min στους $121^\circ C$ και κατανέμεται σε ποσότητες των 20-25 ml / τρυβλίο Petri (3, 4).

Για την παρασκευή του υποστρώματος M9R-Glucose, μιας παραλλαγής του minimal υποστρώματος όπως περιγράφεται από τους Maniatis *et.al.* (50), για τον καθαρισμό και επιλογή μετασχηματισμένων αγροβακτηριακών στελεχών (*Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404) από πιθανές προσμείξεις βακτηριακών κυττάρων *E.coli* παρασκευάστηκαν ξεχωριστά τα διαλύματα:

R salts: (για παρασκευή 250 ml δ/τος), 20 gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 gr $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ και 1 ml συμπυκνωμένου HCl, σε απεσταγμένο νερό.

20 x M9 Medium: (για παρασκευή 500 ml δ/τος), 60 gr $NaHPO_4$, 30 gr KH_2PO_4 , 5 gr NaCl, 1 gr NH_4Cl σε απεσταγμένο νερό.

Διαλύματα: 1 M $MgSO_4$, 1 M $CaCl_2$, 1 M Glucose (σαν πηγή άνθρακα).

Water-Agar: (για παρασκευή 500 ml δ/τος), 470 ml H_2O και 7,5 gr Agar (Bacteriological Agar).

Αποστειρώθηκαν στο αυτόκαυστο σε ξεχωριστά δοχεία.

Για την δημιουργία του M9R-Glucose (1 x, 500 ml δ/τος), που συνήθως χρησιμοποιείται για την επιλεκτική καλλιέργεια ψευδομονάδων στο Water-Agar προστίθενται ασηπτικά 25 ml 20 x M9 Medium, 3,5 ml R salts, 1 ml 1M $MgSO_4$, 50 μlit 1 M $CaCl_2$, 2,5 ml 1 M Glucose. Μετά από καλή ανάδευση το μέσο κατανέμεται σε τρυβλία και μπορεί να αποθηκευτεί στους $4^\circ C$ μέχρι την χρησιμοποίησή του.

Για την παρασκευή του minimal υποστρώματος *Agrobacterium* Medium για την επιλεκτική απομόνωση και καλλιέργεια (selective isolation and culture) του

Agrobacterium rhizogenes και του στελέχους (strain) του *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 παρασκευάστηκαν ξεχωριστά τα διαλύματα (18):

50 x Medium stock: (για 500 ml δ/τος) 30 gr Na_2HPO_4 , 25 gr KNO_3 , 2,5 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ σε απιονισμένο νερό με τιμή pH 7,3-7,5.

10 x supplement stock: (για 100 ml δ/τος) 33,5 gr $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,025 gr Fe-NaEDTA.

1 gr/ml Lactose stock (παρασκευή 10 ml δ/τος).

Αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο σε ξεχωριστά δοχεία.

Για την δημιουργία του *Agrobacterium* Medium (500 ml δ/τος) ασηπτικά προστίθενται 10 ml του 50 x Medium stock, 50 ml του 10 x supplement stock και 2,5 ml του 1 gr/ml Lactose stock σε 440 ml απιονισμένου νερού που περιέχει 7,5 gr Agar (Water-Agar).

Αφού ανακατευτεί καλά το μέσο κατανέμεται σε τρυβλία και μπορεί να αποθηκευτεί στους 4 °C μέχρι την χρησιμοποίησή του.

Όλα τα θρεπτικά συμπληρώθηκαν με τα κατάλληλα αντιβιοτικά: Αμπικιλίνη (Amp, διαλύτης νερό, συγκέντρωση stock 50 mg/ml, τελική συγκέντρωση επιλογής 50 µg/ml), Καρμπενικιλίνη (Carb, διαλύτης νερό, συγκέντρωση stock 100 mg/ml, τελική συγκέντρωση επιλογής 100 µg/ml), Ριφαμπικίνη (Rif, διαλύτης μεθανόλη, συγκέντρωση stock 50 mg/ml, τελική συγκέντρωση για επιλογή 100 µg/ml) και Καναμυκίνη (Km, διαλύτης νερό, συγκέντρωση stock 100 mg/ml, τελική συγκέντρωση επιλογής 100 µg/ml) (18).

2.1.2 Γονίδια και φορείς για γενετικό μετασχηματισμό

Το ενδιαφέρον μας για το γενετικό μετασχηματισμό Ελληνικών ποικιλιών βαμβακιού, στα πλαίσια αυτής της διατριβής, εστιάστηκε στην δυνατότητα χρήσης «ετερόλογων» γονιδίων που κωδικοποιούν για καταλυτικά ένζυμα βιοχημικών αντιδράσεων του κεντρικού βιοσυνθετικού μονοπατιού των φλαβονοειδών (ανθοκυανινών), με σκοπό την τροποποίηση του αντίστοιχου ενδογενούς μονοπατιού που είναι λειτουργικό στο βαμβάκι, για την επίτευξη φυσικού χρώματος στην ίνα. Τα πιο σημαντικά ένζυμα του μονοπατιού είναι αυτά της συνθάσης της χαλκόνης και της

ισομεράσης της χαλκόνης, που καταλύουν τις «βραδύτερες» αντιδράσεις (rate-limiting steps) της βιοσύνθεσης.

Για τα γονίδια των ενζύμων αυτών έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί cDNA κλώνοι απο πετούνια και κριθάρι (εξωτερικοί συνεργάτες, αποτελέσματα όχι εδώ).

Το *chs* απο κριθάρι (cDNA κλώνος μεγέθους ~1200bp, EcoRI ένθεσης στον pBLUESCRIPT SK+, κλώνοι με το χαρακτηρισμό «clone A» σε sense orientation και «clone 'J' No. 6» σε antisense orientation και Kpn I-BamHI ένθεσης στον pBINAR με τον χαρακτηρισμό «clone CHS 'J'» σε sense orientation), το *chsa* απο πετούνια (cDNA κλώνος μεγέθους ~1300bp, EcoRI-HindIII ένθεσης στον pBLUESCRIPT SK+, κλώνος με τον χαρακτηρισμό «clone (P10)» σε antisense orientation και BamHI-SalI ένθεσης στον pBINAR με τον χαρακτηρισμό «clone P56» σε antisense orientation) και το *chia* απο πετούνια (cDNA κλώνος μεγέθους 730bp, EcoRI ένθεσης στον pBLUESCRIPT SK+, κλώνοι με το χαρακτηρισμό «clone P21» σε sense orientation και «clone P20» σε antisense orientation) χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή. Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν ύστερα απο ηλεκτροφόρηση και περιοριστική ανάλυση. Όλοι οι αναφερθέντες κλώνοι διατηρούνται σε περιβάλλον *E.coli* κυττάρων DH5a.

Καθαρό πλασμιδιακό DNA των κλώνων έχει απομονωθεί με την βοήθεια στηλών QIAGEN (βλέπε μέθοδοι μοριακής ανάλυσης) στις συγκεντρώσεις «clone CHS 'J'» 110 ng/μlit, «clone P56» 130 ng/μlit, «clone (P10)» 80 ng/μlit, «clone P20» 1 μg/μlit, «clone P21» 0.3 μg/μlit.

Ο δυαδικός φορέας μετασχηματισμού φυτών pBINAR, που φέρει τη διαγονιδιακή κασσέτα, κατασκευάστηκε με αντικατάσταση (EcoRI-HindIII ένθεση) της περιοχής του πολυσυνδέτη (polylinker) του Bin 19 (πλασμίδιο μεγέθους ~12Kb) απο κασσέτα έκφρασης που περιέχει τον 35S υποκινητή του Μωσαϊκού του κουνουπιδιού (35S of CaMV), μια μερική περιοριστική αλληλουχία του πολυσυνδέτη του pUC18 (partial pUC18 polylinker) και την ληκτική ακολουθία του γονιδίου της «συνθάσης της οκτοπίνης» (termination sequence of the octopine synthase gene). Επίσης μεταξύ των δυο συνοριακών του (T-DNA LB και RB) φέρει το NPTII γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη για επιλογή μετασχηματισμένων φυτών. Η βακτηριακή επιλογή γίνεται σε καναμυκίνη χάρη στο NPTIII γονίδιο του πλασμιδίου εκτός των συνοριακών (32) (Εικόνα 2, Παραρτήματος).

2.1.3 Μεταφορά ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε αγροβακτήρια με «υποβοηθούμενη (τριών γονέων) βακτηριακή σύζευξη»

Η μεταφορά δυαδικών φορέων, πλασμιδίων δηλαδή που φέρουν τη διαγονιδιακή κασσέτα εντός των T-DNA συνοριακών (Left and Right T-DNA Borders) και που θα χρησιμοποιηθούν για το γενετικό μετασχηματισμό φυτών έγινε από το στέλεχος *E.coli* DH5a (pBINAR) στο στέλεχος *A.tumefaciens* LBA 4404 (chromosomal background και *vir* region στο pAL4404 Ti πλασμίδιο) με τη μέθοδο της «βακτηριακής σύζευξης τριών γονέων». Ως βοηθητικό της σύζευξης στέλεχος (helper strain) χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E.coli* HB101 (pRK2013, RK2 origin of replication).

Αναλυτικά η διαδικασία ήταν ως εξής (18):

Μονήρεις βακτηριακές αποικίες των *E.coli* (Km 100 µg/ml), *A.tumefaciens* (Rif 100 µg/ml), *E.coli* (Km 50 µg/ml) μεταφέρονται ασηπτικά με τη βοήθεια βακτηριακής λούπας σε 5 ml θρεπτικού μέσου LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά ανά ξεχωριστή καλλιέργεια και αφήνονται να μεγαλώσουν (με ανάδευση) στους 37 °C (ένα βράδυ) για τις *E.coli* καλλιέργειες και στους 28 °C (δυο βράδια) για την *A.tumefaciens* καλλιέργεια. Στην συνέχεια μεταφέρονται 100 µlit από κάθε καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο LB. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και σε δεύτερο τρυβλίο με στερεό LB (2 τρυβλία για συζεύξεις με τους τρεις γονείς). Ακολουθεί επώαση των τρυβλίων στους 28 °C κατά την διάρκεια της νύκτας. Κατόπιν, με στείρα λούπα μεταφέρονται 2 «streaks» κυττάρων από καθένα από τα δυο τρυβλία σε 500 µlit φρέσκο LB υγρό μέσο, όπου και επαναδιαλύονται σχηματίζοντας βακτηριακό εναιώρημα πιθανών συζευγμένων αγροβακτηρίων. Από το εναιώρημα αυτό γίνεται μεταφορά σε στερεού θρεπτικού LB μέσου τρυβλία επιλογής μετασχηματισμένων αγροβακτηρίων με Ριφαμπυκίνη και Καναμυκίνη (100 µg/ml καθένα).

Μετά από επώαση για δυο μέρες στους 28 °C θα πρέπει να εμφανιστούν στα τρυβλία επιλογής με τα δυο αντιβιοτικά μονήρεις αποικίες συζευχθέντων-μετασχηματισθέντων αγροβακτηρίων, τα οποία θα φέρουν αρχικά μαζί με το χρωματοσωμικό τα τρία πλασμίδια pRK2013 (βοηθητικό της σύζευξης), pBINAR (δυαδικός φορέας) και pAL4404 (αφοπλισμένο Ti) και τελικά μόνο τα δύο τελευταία να

πολλαπλασιάζονται και να μεταφέρονται στα νέα κύτταρα μιας ενώ το πρώτο απαλείφεται σχεδόν αμέσως μετά την σύζευξη.

Οι αρνητικοί μάρτυρες της σύζευξης με τρεις γονείς (οι γονείς απο μόνοι τους και η ίδια διαδικασία για τους συνδυασμούς ανά δυο των τριών γονέων) δεν μπορούν να δώσουν αποικίες στα τρυβλία επιλογής με τα δυο αντιβιοτικά.

2.1.4 Μετασηματισμός αγροβακτηρίων (*A.tumefaciens* LBA 4404 & *A.rhizogenes*) με πλασμιδιακό DNA με ηλεκτοπόρωση

Αρνητικά κατά Gram βακτηριακά κύτταρα μπορούν να μετασηματιστούν επιτυχώς με ηλεκτρικούς παλμούς σχετικά υψηλού δυναμικού (8-17 KV/cm) αφού προηγουμένως έχουν υποστεί σχετική κατεργασία ώστε να κατασταθούν δεκτικά (ικανότητα πρόσληψης πλασμιδιακού DNA) (88). Η αποδοτικότητα μετασηματισμού τέτοιων κυττάρων με ηλεκτρικούς παλμούς είναι της τάξης των 10¹⁰ μετασηματισμένα κύτταρα / μgDNA (55).

Προετοιμασία βακτηριακών κυττάρων ώστε να κατασταθούν δεκτικά:

Κωνική φιάλη των 2 l (για επαρκή αερισμό) που περιέχει 1 l φρέσκου αποστειρωμένου θρεπτικού LB υγρού (κατάλληλα αντιβιοτικά) εμβολιάζεται με 1/100 του όγκου του με φρέσκια (overnight) καλλιέργεια βακτηρίων (απο μονήρη αποικία καλλιέργεια των 100 ml). Τα κύτταρα αφήνονται να μεγαλώσουν στους 37 °C με ισχυρή ανάδευση μέχρι οπτικής πυκνότητας στα 600 nm 0,5-0,8 (πρώιμη – μέση λογαριθμική φάση ανάπτυξης). Για την συγκομιδή των βακτηριακών κυττάρων η φιάλη ψύχεται στον πάγο για 15 – 30 min, η καλλιέργεια διαμοιράζεται στο cold room (συνθήκες κοντά στο 0 °C για τη όλη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω) σε δοχεία φυγοκέντρου και ακολουθεί φυγοκέντρωσή της στα 4000 g για 15 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται με ελαφρύ πιπτεάρισμα για να μην λυθούν τα κύτταρα σε 1 l παγωμένου αποστειρωμένου νερού. Μετά απο νέα φυγοκέντρωση στις ίδιες με προηγουμένως συνθήκες και απομάκρυνση του υπερκειμένου η βακτηριακή πελλέτα επαναδιαλύεται σε 500 ml παγωμένου αποστειρωμένου νερού και ξανά φυγοκεντρείται. Το νέο ίζημα επαναδιαλύεται περίπου σε 20 ml παγωμένου αποστειρωμένου νερού με 10% γλυκερόλη και φυγοκεντρείται για τελευταία φορά. Η τελική βακτηριακή πελλέτα

κυττάρων επαναδιαλύεται σε τελικό όγκο 2-3 ml παγωμένου αποστειρωμένου νερού και 10% γλυκερόλης ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων να είναι 1-3 10¹⁰ κύτταρα / ml. Τα δεκτικά πλέον βακτηριακά κύτταρα χρησιμοποιούνται αμέσως ή αποθηκεύονται στους – 80 °C για τουλάχιστον 6 μήνες σε κλάσματα (aliquots) των 100 µl (2, 55).

Μετασηματισμός κυττάρων με ηλεκτρικούς παλμούς:

Εναιώρημα δεκτικών κυττάρων 50 µl που δεν έχουν ξεπαγώσει πλήρως μεταφέρεται μαζί με 1-2 µl πλασμιδιακού DNA (δυναδικός φορέας pBINAR συγκέντρωσης 0.4-1 µg/ml) σε αποστειρωμένη παγωμένη κυβέττα ηλεκτροπόρωσης των 2 mm, ανακατεύονται καλά χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες και η κυβέττα τοποθετείται στον πάγο για περίπου 1 min. Αφού απομακρυνθεί η υγρασία από τις εξωτερικές επιφάνειες της κυβέττας με κάποιο χαρτί τοποθετείται στον θάλαμο του electroporator που έχει τις ρυθμίσεις:

- Capacitance selector στα 50 mF (fixed στο μηχάνημα που χρησιμοποιήσαμε).
- Load resistance στα 200 W (fixed στο μηχάνημα που χρησιμοποιήσαμε).
- Maximum power στα 25 W (fixed στο μηχάνημα που χρησιμοποιήσαμε).
- Current στα 25 mA (fixed στο μηχάνημα που χρησιμοποιήσαμε).
- Voltage δοκιμάστηκαν δυο τιμές 1600 Volts και 1800 Volts (δυνατότητα αλλαγής ρυθμίσεων στο μηχάνημα που χρησιμοποιήσαμε).

Η εφαρμογή του παλμού για την κάθε κυβέττα είναι 20-30 sec. Στην συνέχεια αμέσως μόλις βγει η κυβέττα από τον θάλαμο προστίθονται 900 µl παγωμένου LB (χωρίς αντιβιοτικά) στο περιεχόμενό της, κύτταρα και θρεπτικό αναμειγνύονται με ελαφρύ πιπτετάρισμα και όλα μαζί μεταφέρονται σε erpendorf tube για επώαση στους 28 °C για 2-4 ώρες. Στο τέλος της επώασης 100 µl καλλιέργειας διασπείρονται (plating) σε στερεού θρεπτικού LB μέσου τρυβλία επιλογής μετασηματισμένων αγροβακτηρίων με Ριφαμπυκίνη και Καναμυκίνη (100 µg/ml καθένα). Μετά από επώαση για δυο με τέσσερις μέρες στους 28 °C θα πρέπει να εμφανιστούν στα τρυβλία επιλογής με τα δυο αντιβιοτικά μονήρεις αποικίες μετασηματισθέντων αγροβακτηρίων.

Οι αρνητικοί μάρτυρες μετασηματισμού με ηλεκτρικούς παλμούς (αγροβακτήρια electroporated χωρίς όμως DNA και μη-electroporated αγροβακτήρια από την αρχική καλλιέργεια) δεν μπορούν να δώσουν αποικίες στα τρυβλία επιλογής με τα δυο αντιβιοτικά.

2.1.5 Θερμοκρασιακή δοκιμή για την πιστοποίηση επιλεκτικής καλλιέργειας βακτηρίων του γένους *Agrobacterium*

Για την τελική φάση καθαρισμού μεικτών αποικιών (colony purification) και την επιλογή (isolation of purified *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 transformants) των μετασχηματισμένων αγροβακτηριακών κυττάρων από πιθανές προσμειξεις βακτηριακών κυττάρων *E.coli* μονήρεις αποικίες (ύποπτες για προσμειξεις) μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο LB χωρίς Ριφαμπικίνη και μόνο Καναμυκίνη (Km, 100 µg/ml) και αφήνονται να μεγαλώσουν για δυο εικοσιτετράωρα (2 μέρες) στους 42 °C (control σε ξεχωριστά τρυβλία ένα καθαρό *E.coli* στέλεχος και ένα καθαρό *Agrobacterium* στέλεχος) και στους 28 °C. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται έχοντας υπόψη ότι *E.coli* βακτήρια μεγαλώνουν σε υψηλές θερμοκρασίες αλλά όχι σε χαμηλές ενώ αγροβακτήρια μεγαλώνουν σε χαμηλές και όχι σε υψηλές.

2.1.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (δυναδικών φορέων και Ti πλασμιδίων) από μετασχηματισμένα κύτταρα *A.tumefaciens* LBA 4404 και *A.rhizogenes*

Μετά την φάση επιλογής (θρεπτικό μέσο με δύο αντιβιοτικά) και την ανάπτυξη μόνο των μετασχηματισμένων αγροβακτηρίων (είτε μέσω σύζευξης είτε μέσω ηλεκτροπόρωσης), οι ακολουθίες ενδιαφέροντος (διαγονιδιακές κασσέτες) και οι φορείς τους πρέπει καταρχήν να ελεγχθούν για την ύπαρξή τους εντός των αγροβακτηρίων με τα οποία θα πραγματοποιηθεί ο γενετικός μετασχηματισμός φυτών βαμβακιού. Θα πρέπει όμως παράλληλα να εξασφαλιστεί και το ακέραιο σε επίπεδο ακολουθίας μιας και είναι δυνατόν να έχουν συμβεί κατά τη διαδικασία μεταφοράς των πλασμιδίων, ανακατατάξεις ή απαλοιφές.

Οι δυναδικοί φορείς μετασχηματισμού φυτών όπως και τα μη ογκογονικά Ti μέγαπλασμίδια (~180-250 Kb) είναι μικρού αριθμού αντιγράφων όταν πολλαπλασιάζονται σε αγροβακτηριακό περιβάλλον. Η διαδικασία απομόνωσής τους είναι ακριβώς ίδια με την

αλκαλική λύση κυττάρων *E.coli* όπως παρουσιάζεται στους Maniatis *et.al.* (50, 2) με τις εξής επιστημονικές-τροποποιήσεις πρωτοκόλλου:

–Οι τυπικοί χρόνοι εμφάνισης νέας γενιάς για το αγροβακτήριο είναι περίπου 2 h ενώ για το *E.coli* είναι περίπου 20 min. Οπότε η συγκομιδή μετασηματισμένων αγροβακτηριακών κυττάρων γίνεται απο 3 ml υγρής καλλιέργειας σε LB με τα δυο αντιβιοτικά, η οποία όμως έχει μεγαλώσει για μια ολόκληρη ημέρα.

–Τα SDS 10 % και NaOH 5 M διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την αλκαλική λύση παρασκευάζονται φρέσκα πριν απο κάθε απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

Η ενζυματική πέψη των απομονωθέντων πλασμιδίων με κατάλληλα επιλεγμένα περιοριστικά ένζυμα (πρότυπο περιοριστικών πέψεων) ή ακόμα η χρήση της αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR εντοπισμός) με κατάλληλα επιλεγμένους εκκινητές μπορούν να διασφαλίσουν την ύπαρξη των επιθυμητών ακολουθιών σε σωστή κατεύθυνση και φορά έκφρασης πάνω στον φορέα μετασηματισμού εντός των αγροβακτηρίων. Οι κατάλληλες φωτογραφίες απο ηλεκτροφορήσεις παρουσιάζονται στα αποτελέσματα.

2.1.7 Εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας μετά απο ένεση βακτηριακών αιωρημάτων σε κοτυληδονόφυλλα ποικιλιών βαμβακιού

Το κάθε φυσικό φυτοπαθογόνο βακτήριο μπορεί να προσβάλλει (εκδήλωση ασθένειας) ένα συγκεκριμένο αριθμό φυτικών ειδών ή ποικιλιών (ευπαθή φυτά) που αποτελούν το φάσμα των «ξενιστών» του (host plants).

Υπάρχουν όμως περιπτώσεις φυτών που ανήκουν στους «ξενιστές» άλλα και στους «μη-ξενιστές» (non-host plants) που έχουν αναπτύξει φυσικούς μηχανισμούς αυτοάμυνας σε συγκεκριμένες βακτηριολογικές προσβολές (ανθεκτικά φυτά).

Τέτοιοι μηχανισμοί μπορεί να προϋπάρχουν ('παθητικοί') στο φυτό πριν την εκδήλωση μόλυνσης και αποτελούν την πρώτη γραμμά άμυνας του φυτού, είτε ενεργοποιούνται- «επάγονται» ('ενεργητικοί') μετά απο την παθολογική προσβολή (93).

Ένας απο τους τρόπους εκδήλωσης της μεταμολυσματικής ενεργοποίησης μηχανισμών άμυνας είναι η ονομαζόμενη «αντίδραση υπερευαισθησίας» που χαρακτηρίζεται απο την ταχεία νέκρωση των κυττάρων του φυτού στο σημείο εισβολής

του παθογόνου. Η αντίδραση αυτή χαρακτηρίζει τις ονομαζόμενες «ασύμβατες αλληλεπιδράσεις» μεταξύ ενός μη μολυσματικού παθογόνου (avirulent) και ενός ανθεκτικού (non-host plant) φυτού ξενιστή ή μη και έχει κυτταρολογικά χαρακτηριστικά όμοια με εκείνα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ή απόπτωσης στα φυτά. Η τοπική νέκρωση του μολυσμένου ιστού προστατεύει τους υγιείς παρακείμενους φυτικούς ιστούς από τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση του παθογόνου (94).

Η ανθεκτικότητα των φυτών (gene-for-gene hypothesis) καθορίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις από μονά επικρατή γονίδια ανθεκτικότητας (*r*, Resistance genes) και εκδηλώνεται μόνο όταν το ανθεκτικό φυτό που φέρει ένα συγκεκριμένο γονίδιο ανθεκτικότητας μολυνθεί από το παθογόνο με το λειτουργικά αντίστοιχο γονίδιο αμολυσματικότητας (*avr*, Avirulence genes) (36).

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια ανθεκτικότητας στα φυτά και αμολυσματικότητας στα φυτοπαθογόνα συνιστούν τα μοριακά σήματα αναγνώρισης ενός συστήματος επικοινωνίας μέσω του οποίου τα φυτά αντιλαμβάνονται την παρουσία εν δυνάμει παθογόνων στα αρχικά στάδια της μόλυνσής τους. Οι πρωτεΐνες αμολυσματικότητας φαίνεται να μεταφέρονται από τα βακτήρια στα φυτικά κύτταρα μέσω ενός εξειδικευμένου καναλιού εξαγωγής πρωτεϊνών (σαν τη βακτηριακή σύζευξη και τη βακτηριακή ογκογένεση των φυτών όπου συμβαίνει μεταφορά κυρίως DNA) (84).

Οι ποικιλίες βαμβακιού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι M1, M2, M3, ΦΩΤΕΙΝΗ, 71-1, EYA, ΜΑΚΑΝΑΙΡ, ΛΙΛΑ, ΑΚΑΛΑ.

Τα στελέχη των φυτοπαθογόνων ψευδομονάδων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: *P. syringae* pv. *phaseolicola* Race 1, strain 3121 και Race 6, strain 1448A σαν θετικοί μάρτυρες, τα μετασχηματισμένα *P. syringae* pv. *phaseolicola* Race 7, strain 1449B (pAV511) και *P. syringae* pv. *phaseolicola* RW 60 (pAV511-, παράγωγο εκδίωξης του πλασμιδίου pAV511). Καλλιεργήθηκαν σε King's B μέσο στους 28 °C, με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Μονήρεις αποικίες χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία υγρών βακτηριακών αιωρημάτων (bacterial suspensions) συγκέντρωσεων 10⁶-10⁸ CFU / ml σε 1 mM MgCl₂. Τα κοτυληδονόφυλλα (primary leaves) των ποικιλιών βαμβακιού (μή-ξενιστής) επιμολύνθηκαν (δύο ενέσεις ανά φύλλο σε κάτω και άνω επιφάνεια του φύλλου) με εμβολιασμό χρησιμοποιώντας σύριγγα από την οποία είχε προηγουμένως

αφαιρεθεί η βελόνα. Ακολούθησε επώαση στους 25 °C. Η καταγραφή των αποτελεσμάτων γίνεται στις 6, 12, 24, 36 και 48 h απο την μικροέγχυση.

Τα στελέχη του αγροβακτηρίου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: *A. tumefaciens* C58C1 (pGV2260) σαν αρνητικός μάρτυρας (χωρίς *avr* γονίδιο), τα μετασχηματισμένα με *avr* γονίδια σε γονιδιακές κασσέτες επαγόμενης ανθεκτικότητας, *A. tumefaciens* C58C1 (pGV2260 + pBIN –Hyg-Tx-HSR/*avrPphB*) με υποκινητή που ενεργοποιείται στα αρχικά στάδια μόλυνσης απο συμβατά παθογόνα (disease-specific promoter) και *A. tumefaciens* C58C1 (pGV2260 + pBIN-hyg-Tx-35S/*avrPphB*) με υποκινητή συστατικής έκφρασης.

Για την παροδική έκφραση *avr* γονιδίων στο βαμβάκι με το «σύστημα του αγροβακτηρίου» ολονύκτια υγρή καλλιέργεια των στελεχών σε θρεπτικό μέσο LB με κατάλληλα αντιβιοτικά, στους 28 °C μέχρι οπτικής απορρόφησης OD600 = 0,5-0,8, φυγοκεντρήθηκε και επαναδιαλύθηκε σε 1 mM MgCl₂ σε τελική OD600 = 2,4. Βακτηριακά αιωρήματα αυτού του τύπου χρησιμοποιήθηκαν για τον εμποτισμό με βοήθεια σύριγγας, ιστών πλήρως ανοιγμένων κοτυληδοφυλλών.

Η HR επάγεται μόνο όταν ζωντανά παθογόνα βακτήρια που φέρουν τα *avr* γονίδια ενεθούν στο μεσοκυττάριο χώρο και αποπλάστη κυττάρων στην περιοχή του μεσοφύλλου φυτών που φέρουν το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας (ένα *avr* που θα αντιστοιχεί σε υπάρχον *r* στην δοκιμαζόμενη ποικιλία) ικανό να πυροδοτήσει μηχανισμό αυτοάμυνας.

«Συμβατές αλληλεπιδράσεις» εκφράζονται με την μορφή μη αποχρωματισμένων ιστών σε υδαρή κατάσταση μετά απο 2-4 ημέρες (αργή αντίδραση) ενώ «ασύμβατες αλληλεπιδράσεις» (εκδήλωση ανθεκτικότητας-*avr* γονίδια φυτοπαθογόνου) εκφράζονται με την μορφή τυπικών νεκρώσεων καφέ χρώματος εντός 24 h (ταχεία αντίδραση) σε όσα φυτικά κύτταρα βρεθούν σε επαφή με βακτήρια.

2.2 Μέθοδοι ιστοκαλλιέργειας βαμβακιού

2.2.1 Φυτικό Υλικό

2.2.1.1 Επιφανειακή απολύμανση σπερμάτων βαμβακιού

Μετά τον εκκοκισμό, ο σπόρος του βαμβακιού μένει συνήθως σκεπασμένος με κοντό χνούδι. Υπολογίζεται ότι περίπου το 5,5 % του βάρους του σπόρου είναι το χνούδι του. Η απομάκρυνση του χνουδιού από τον βαμβακόσπορο στο εργαστήριο γίνεται συνήθως χημικά με την χρήση πυκνού διαλύματος θειικού οξέος και ξέπλυμα με άφθονο νερό. Έχει αναφερθεί ότι τέτοιος χειρισμός πριν την επιφανειακή απολύμανση με διάλυμα χλωρίνης επιφέρει πρωϊμότητα στο φύτρωμα, βελτιώνει τη βλαστική ικανότητα και καταστρέφει επιβλαβείς μικροοργανισμούς στην επιφάνεια του σπόρου (96).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε με επαναλήψιμα αποτελέσματα και ανεκτά επίπεδα μολύνσεων είναι το παρακάτω:

- Οι σπόροι (για την αποχρόωση τους) τοποθετούνται σε πυκνό διάλυμα θειικού οξέος 95 % για 10 min (15 ml περίπου για κάθε 100 γραμμάρια σπόρων) υπό συνεχή ανάδευση.

- Ξεπλύνονται καλά για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του οξέος με άφθονο σαπουνόνερο (περιέχει κυρίως χλωρίνη και κάποιο απορρυπαντικό) σε τρία στάδια. Από εδώ και στο εξής όλες οι ενέργειες πραγματοποιούνται υπό στείρες συνθήκες εντός του θαλάμου νηματικής ροής.

- Εμβάπτιση σπόρων σε διάλυμα 70 % αιθανόλης για λιγότερο από ένα min (30 sec).

- Ξέπλυμα με αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό σε τρία στάδια.

- Οι σπόροι αφήνονται να διαβραχούν μένοντας για 15 περίπου min σε διάλυμα 20 % v/v χλωρίνης εμπορίου στο οποίο έχει προστεθεί κάποιο διαβρεκτικό είτε TritonX-100 (3 σταγόνες για 200 ml) είτε Tween-20 (δυο σταγόνες για 100 ml) υπό συνεχή ανάδευση 50-100 rpm αλλάζοντας το διάλυμα κάθε 5 min.

- Ξέπλυμα διεξοδικά σε τέσσερα στάδια με αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό.

- Οι σπόροι μένουν υγροί στο τέταρτο νερό ξεπλύματος, επί 30 min πριν γίνει η σπορά τους στο θρεπτικό υπόστρωμα. Είναι το στάδιο του «μουσκέματος» σπόρου και αποσκοπεί στην προσρόφηση υγρασίας από τον σπόρο ώστε να ξεκινήσει την διαδικασία του φυτρώματος.

- Καλό στέγνωμα σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί. Μπορούν έτσι να διατηρηθούν ως την σπορά.

- Αν είναι δυνατό, καλό θα είναι να αφαιρεθεί το περισπέρμιο, διότι στο βαμβάκι η κατασκευή των περιβλημάτων των σπόρων εμποδίζει την πρόσληψη του νερού, ίσως και του οξυγόνου με αποτέλεσμα την εμφάνιση ληθαργικών φαινομένων.

2.2.1.2 Βλάστηση σπερμάτων βαμβακιού υπο ασηπτικές συνθήκες

Σπόροι βαμβακιού που έχουν απολυμανθεί εξωτερικά και βρίσκονται στο στάδιο του «μαλακώματος» μεταφέρονται ασηπτικά σε ειδικά γυάλινα βαζάκια ιστοκαλλιέργειας που περιέχουν Μέσο Βλάστησης Σπόρων (M.B.Σ. ή SGM-Seed Germination Medium) (15-20 ml M.B.Σ./βαζάκι) και κυριολεκτικά «φυτεύονται» μέσα στο στερεό υπόστρωμα (δεν τοποθετούνται απλά πάνω στην επιφάνειά του) προκειμένου να βλαστήσουν.

Το M.B.Σ. έχει τη βασική MS (58, 59) σύσταση για μακρο- και ιχνοστοιχεία, τη σύσταση των B5 Gamborg βιταμινών [21] για ελάχιστες οργανικές απαιτήσεις (βλ. σύσταση και προετοιμασία θρεπτικών), με 0,15 % (w/v) Gelrite σαν στερεοποιητικό, 3 % (w/v) σακχαρόζη σαν πηγή άνθρακα και pH στο 5,7-5,8 ρυθμισμένο πριν την προσθήκη του στερεοποιητικού και πριν την αποστείρωσή του με το αυτόκαυστο.

Η βλάστηση των σπόρων βαμβακιού εξαρτάται από την ποικιλία, την ηλικία (συγκομιδή του) και τον λήθαργο (περισπερμίου και εμβρύου).

2.2.1.3 Ανάπτυξη νεαρών φυτών βαμβακιού *in vitro*

Για να αποφευχθούν προβλήματα στο φύτευμα του βαμβακιού, πρέπει να εξασφαλιστούν οι απαραίτητες συνθήκες- *in vitro* -αερισμού, θερμοκρασίας και υγρασίας. Πρέπει επίσης ο σπόρος, που θα χρησιμοποιηθεί, να έχει διατηρήσει σε καλό ποσοστό την φυτρωτική του ικανότητα και να μην βρίσκεται σε κατάσταση λήθαργου γιατί θα καθυστερήσει η εκβλάστησή του.

Με την εκβλάστηση στην κάτω άκρη αναπτύσσεται το ριζίδιο (αρχική ρίζα), που ανοίγοντας δίοδο από τη μικροπύλη, προβάλλει έξω από το σπόρο και εισχωρεί κατακόρυφα στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Στην πάνω μεριά του φύτρου (έμβρυο) βρίσκεται το βλαστίδιο. Το μέρος του κάτω από τις κοτυληδόνες, γνωστό ως υποκοτύλιο σχηματίζει μια καμπούρα (hook) και με την κορυφή της σπρώχνει το θρεπτικό υπόστρωμα για να ξεμυτίσει πάνω από την επιφάνεια. Όταν το κατορθώσει, με κανονικές συνθήκες, χρειάζεται μια-δυο μέρες για να πάρει κατακόρυφη θέση. Έτσι όμως παρασύρει σ' αυτή τη θέση και τις κοτυληδόνες και το αρχέφυτρο του βλαστιδίου που βρίσκεται μεταξύ των.

Η διαδικασία της εκβλάστησης σπερμάτων βαμβακιού και της ανάπτυξης νεαρών φυταρίων (προτού αναπτυχθούν τα πρώτα μόνιμα φύλλα) διαρκεί συνήθως 7-14 ημέρες (79).

Μετά την εκβλάστηση του σπέρματος το βλαστίδιο εξελίσσεται σε ένα κύριο κατακόρυφο βλαστό, από όπου θα παραχθούν αργότερα, με έκπτυξη πλευρικών-μασχαλιαίων οφθαλμών, πλευρικοί βλαστοί. Ο κύριος βλαστός παρουσιάζει ακραία απεριόριστη αύξηση, χάρη στη δραστηριότητα μεριστωματικού ιστού που βρίσκεται στην άκρη του βλαστού (κορυφαίο μερίστωμα από το αρχέφυτρο του βλαστιδίου).

Στη μασχάλη κάθε φύλλου υπάρχουν οι καταβολές δύο οφθαλμών. Ο ένας είναι ο πραγματικός μασχαλιαίος οφθαλμός. Ο άλλος οφθαλμός αναπτύσσεται κάπως παράμερα και είναι γνωστός ως πλευρικός (ή βοηθητικός ή λανθάνων) οφθαλμός.

Συνήθως ένας έως τέσσερις μασχαλιαίοι οφθαλμοί (οι δυο των κοτυληδόνων και του πρώτου και δεύτερου φύλλου), από αυτούς που βρίσκονται στο κατώτερο μέρος του φυτού αναπτύσσουν φυλλοφόρους βλαστούς.

Τόσον οι πλευρικοί οφθαλμοί, καθώς και οι μασχαλιαίοι που βρίσκονται προς την κορυφή του φυτού όταν και αν εκπτυχθούν παράγουν κατά κανόνα βλαστούς ανθοφόρους, διαφορετικά μένουν σε λανθάνουσα κατάσταση (96).

2.2.2 Τεχνικές ασηπτικής απομόνωσης εκφύτων

2.2.2.1 Απομόνωση κορυφαίου και μασχαλιαίων μεριστωμάτων από *in vitro* νεαρά φυτά βαμβακιού

Ο στόχος στην καλλιέργεια μεριστωμάτων είναι η ανάκτηση ολόκληρου φυτού από μια μικρή ομάδα μεριστωματικών κυττάρων και της εγκατάστασής τους σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Τα μεριστωματικά κύτταρα των φυτών διατηρούν την ικανότητα για πολλαπλές κυτταροδιαιρέσεις και μπορούν σε κάποια φάση της ανάπτυξής τους να δημιουργήσουν νέες μεριστωματικές ζώνες (νέους οφθαλμούς).

Μετά την εγκατάστασή τους στο θρεπτικό μέσο οι οφθαλμοί αυτοί αναπτύσσονται σε βλαστούς με πλάγιους οφθαλμούς που επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν αρχικό υλικό για την ανάπτυξη νέων βλαστών. Με τη διαδικασία αυτή μπορούν να παραχθούν σε σύντομο χρονικό διάστημα πολλά φυτά με το ίδιο γενετικό υπόβαθρο

Υπάρχει μια γενικότερη σύγχυση στη βιβλιογραφία σχετικά με τον όρο «καλλιέργεια μεριστωμάτων». Το «πραγματικό» κορυφαίο μερίστωμα (shoot apical meristem) αποτελείται αποκλειστικά και μόνο από την περιοχή του απομονωμένου μεριστωματικού θόλου (shoot apical dome) χωρίς την ύπαρξη ορατών γειτονικών καταβολών φύλλων. Γενικά όμως θεωρείται αποδεκτό να καλλιεργούνται η περιοχή του θόλου μαζί με 2 έως 4 παρακείμενες καταβολές φύλλων και αυτό να παίρνει το όνομα «καλλιέργεια κορυφαίου μεριστώματος» (βλέπε Εικόνα 3 Παραρτήματος). Τα αρχικά μασχαλιαία μεριστώματα (καταβολές) σχηματίζονται στις μασχάλες των καταβολών των φύλλων και εξελίσσονται σε μασχαλιαίους βλαστοφόρους οφθαλμούς (lateral ή axillary buds).

Όταν το αρχικό μασχαλιαίο μερίστωμα έχει διαφοροποιηθεί τελείως σε μασχαλιαίο βλαστοφόρο οφθαλμό, το κορυφαίο του μερίστωμα (κορυφή βλαστοφόρου οφθαλμού) θα έχει όλα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά ενός επάκριου βλαστικού μεριστώματος (βλέπε Εικόνα 4 Παραρτήματος). Αντίστοιχα απομονώνοντας και καλλιεργώντας την περιοχή του κορυφαίου μεριστώματος του μασχαλιαίου βλαστοφόρου οφθαλμού έχουμε την «καλλιέργεια μασχαλιαίων μεριστωμάτων».

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για το βαμβάκι έχει τα στάδια (23):

◆ Νεαρά *in vitro* φυτάρια βαμβακιού * μεταφέρονται ένα κάθε φορά, ασηπτικά, απο το δοχείο βλαστησής τους με το Μ.Β.Σ. σε άδειο και στειρό τρυβλίο Petri. Για να ενισχυθεί μάλιστα η πιθανότητα επιβίωσης καλό θα είναι να επιλέγονται φυτάρια σε φάση ταχύτατης ανάπτυξης.

◆ Οι κοτυληδόνες, εντός των οποίων εγκλείεται το κορυφαίο μεριστώμα και ένα μέρος του υποκοτυλίου χωρίζονται απο το υπόλοιπο φυτικό σώμα.

◆ Η μια απο τις δυο κοτυληδόνες πιέζεται προς τα κάτω μέχρι να αποκοπεί τελείως. Εκτίθεται έτσι η περιοχή του κορυφαίου μεριστώματος (Εικόνα 5 Παραρτήματος).

◆ Αφαιρείται η κορυφή (έκφυτο τάξης μεγέθους 1 - 1.5 cm) με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας με λεπτές απολήξεις και νυστεριού που έχει λεπτή κοπίδα. Η οποία στη συνέχεια μεταφέρεται κάτω απο στερεοσκόπιο (στη μεγαλύτερη δυνατή μεγέθυνση) ή στην καλύτερη περίπτωση κάτω απο μικροσκόπιο (μικρότερη μεγέθυνση) για να μειωθεί ακόμα περισσότερο το μέγεθος του εκφύτου.

◆ Με τη βοήθεια αποστειρωμένης βελόνας, κυριολεκτικά «ξεφλουδίζεται» το έκφυτο απο τα περιβάλλοντα μικροσκοπικά φύλλα εως ότου αποκαλυφθεί η ελάχιστη περιοχή που θα περιλαμβάνει το μεριστωματικό θόλο και τις 2 - 4 καταβολές πλευρικών φύλλων.

◆ Τα όργανα που χρησιμοποιούνται για το «ξεφλούδισμα» εμβαπτίζονται πριν απο κάθε επαφή με το έκφυτο σε αλκοόλη και αφού αναφλεγούν, κρύνουν προτού χρησιμοποιηθούν.

◆ Απαιτείται μέγιστη προσοχή γιατί πρόκειται για εξαιρετικά ευαίσθητο ιστό που δεν πρέπει να τραυματίζεται με το νυστέρι ή να συνθλιβεται με τη λαβίδα καθ'οποιοδήποτε τρόπο ή λόγο διότι το τραυματισμένο υλικό δεν θα μεγαλώσει στην καλλιέργεια.

◆ Αφού επιτευχθεί το επιθυμητό μέγεθος εκφύτου, αφαιρείται μικρό μέρος του πλεονάζοντος ιστού απο τη βάση του (αντίθετο άκρο απο το θόλο). (μέγεθος τελικού εκφύτου: επιπέδου χιλιοστών)

◆ Δεν αφαιρούνται όλες οι καταβολές των φύλλων ή φύλλα που βρίσκονται σε φάση επιμήκυνσης γιατί αποτελούν για το έκφυτο πηγή προσφοράς φυτικών ορμονών και θρεπτικών βοηθώντας έτσι στην παραπέρα ανάπτυξή του.

◆ Τοποθετούνται 5 - 10 έκφυτα, όρθια σε κατακόρυφη θέση, σε ένα τρυβλίο με Μ.Ε.Β. και τα τρυβλία στη συνέχεια μεταφέρονται στον θάλαμο ανάπτυξης με τις καθορισμένες συνθήκες.

◆ Μετά απο μια εβδομάδα περίπου καταγράφεται η κατάσταση (πράσινα-ζωντανά, καφέτιασμα-στάση ανάπτυξης) και αφαιρούνται απο τον θάλαμο οι καλλιέργειες που εμφάνισαν μολύνσεις του μέσου. Η επαγωγική πίεση ασκείται στα έκφυτα για τις επόμενες 2 - 3 εβδομάδες στο Μ.Ε.Β. με αλλαγή θρεπτικού μέσου (σε φρέσκο υπόστρωμα) κάθε βδομάδα.

◆ Οι ζωντανοί εκπτυσσόμενοι βλαστοί αφού αποκτήσουν το μέγιστο δυνατό ύψος στο Μ.Ε.Β. (2 - 3 cm) μεταφέρονται σε Μ.ΕΠ.Β. για περαιτέρω επιμήκυνση.(τελικό ύψος 5 - 10 cm)

◆ Μετά απο 2-3 εβδομάδες καταγράφεται ο αριθμός των βλαστών που έχουν επιβιώσει καθώς και ο αριθμός των βλαστών που έχει προκύψει απο κάθε έκφυτο (οφθαλμό) (multiplication αν έχει συμβεί). Μονήρεις βλαστοί με οφθαλμούς μεταφέρονται σε φρέσκα θρεπτικά μέσα για ριζοβολία (Μ.Ρ.Β.) (αναγέννηση) ή οι απομονωμένοι οφθαλμοί τους ξανά σε Μ.Ε.Β. για διαδοχικές φάσεις καλλιέργειας του συστήματος μικροπολλαπλασιασμού.

* Για την απομόνωση του κορυφαίου μεριστώματος χρειάζονται φυτά ηλικίας 7 ημερών. Για την απομόνωση κόμβων πρωτεύοντος και δευτερεύοντος φύλλου και κόμβων των κοτυληδόνων χρειάζονται φυτάρια ηλικίας 14 - 35 ημερών.

2.2.2.2 Ασηπτική απομόνωση εμβρυακού άξονα και αρχέφυτρου του βλαστιδίου ώριμου εμβρύου απο εμποτισμένους σε νερό σπόρους βαμβακιού

Σπέρματα βαμβακιού που έχουν απολυμανθεί εξωτερικά και βρίσκονται στο στάδιο του «μαλακώματος» (σε αποστειρωμένο νερό για 8 έως 24 ώρες σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου) μεταφέρονται ασηπτικά (απο εδώ και πέρα σε στείρες συνθήκες) σε τρυβλίο Petri. Με τη βοήθεια λαβίδας και νυστεριού κάτω απο

στερεοσκόπιο, αφαιρούνται τα σκληρά περιβλήματα των σπόρων και απομονώνεται το έμβρυο.

Το έμβρυο του βαμβακιού είναι τυπικό των δικοτυλήδων και αποτελείται από τον εμβρυακό άξονα (κυλινδρική κατασκευή μεγέθους περίπου 5 mm) τις δυο κοτυληδόνες (καταλαμβάνουν όλο τον χώρο του σπέρματος). Κάτω από τις κοτυληδόνες στο άνω άκρο του εμβρυακού άξονα υπάρχει μια κατασκευή 50-70 μm που εκτείνεται σε βάθος 30-40 μm και είναι το αρχέφυτρο του βλαστιδίου με τον μεριστωματικό θόλο και δυο προσχηματισμένες εμβρυακές καταβολές φύλλων. Για την απομόνωσή του αφαιρούνται οι δυο κοτυληδόνες και παράλληλα γίνεται μια τομή στον άξονα υποκοτυλίου-ρίζας κάτω από τον κόμβο των κοτυληδόνων για την αφαίρεση των καταβολών των ριζών (9, 79).

2.2.3 Σύσταση και προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων. Συνθήκες ιστοκαλλιέργειας

Ανόργανα Θρεπτικά Συστατικά

Η πιο δημοφιλής σύσταση για ανόργανα άλατα σε θρεπτικά μέσα καλλιέργειας φυτικών οργάνων και κυττάρων είναι αυτή των Murashige και Skoog (MS-ανόργανα θρεπτικά). Το ξεχωριστό χαρακτηριστικό των MS-ανόργανων θρεπτικών είναι το σχετικά υψηλό ποσοστό τους σε νιτρικά, αμμωνιακά ιόντα και ιόντα καλίου σε σύγκριση με άλλες συνταγές για άλατα σε θρεπτικά. Στον Πίνακα 1 του παραρτήματος παρουσιάζεται αναλυτικά η σύσταση των τριών βασικών μητρικών διαλυμάτων (stock solutions) για την παρασκευή θρεπτικών μέσων ιστοκαλλιέργειας φυτικών μερών-κυττάρων. Η προετοιμασία τους γίνεται πάντα με απιονισμένο νερό και χημικά μέγιστης καθαρότητας. Το μητρικό διάλυμα των μακροστοιχείων ετοιμάζεται 10 φορές της τελικής τους συγκέντρωσης στο μέσο ώστε να προστίθεται με την αναλογία των 100 ml για κάθε 1000 ml προετοιμαζόμενου θρεπτικού μέσου. Πρέπει να προστατεύεται από τον φωτισμό (σκούρου χρώματος ή περιτυλιγμένο με αλουμινόχαρτο δοχείο). Φυλάσσεται στο ψυγείο (+ 4 °C) χωρίς σοβαρές μεταβολές στις συγκεντρώσεις για αρκετούς μήνες. Νεφελώδης εμφάνιση ή εμφάνιση ιζημάτων στον πυθμένα του δοχείου αποθήκευσης δεικνύει την ανανέωσή του. Τα μητρικά διαλύματα των ιχνοστοιχείων και των βιταμινών

ετοιμάζονται 1000 φορές της τελικής τους συγκέντρωσης στο μέσο ώστε να προστίθενται με την αναλογία του 1 ml για κάθε 1000 ml προετοιμαζόμενου θρεπτικού. Φυλάσσονται στην κατάψυξη (- 20 οC) και προστίθενται κατευθείαν με το ξεπάγωμά τους.

Βιταμίνες

Η βιταμίνη που θεωρείται σημαντική για τα φυτικά κύτταρα είναι η Θιαμίνη (B1). Άλλες βιταμίνες, όπως το Νικοτινικό οξύ (B3) και η Πυριδοξίνη (B6) προστίθενται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας καθώς θεωρείται ότι προωθούν κυτταρικές αποκρίσεις (enhance cellular responses). Προστίθενται στο θρεπτικό μέσο πριν την αποστείρωσή του με το αυτόκαυστο.

Υδατάνθρακες

Τα πράσινα φυτικά κύτταρα σε καλλιέργεια θεωρούνται ότι δεν είναι φωτοσυνθετικά ενεργά και χρειάζονται μια πηγή άνθρακα. Το ρόλο αυτό παίζουν η σακχαρόζη ή η γλυκόζη.

Φυτικές ορμόνες

Το είδος και η συγκέντρωση των φυτικών ρυθμιστών αύξησης που θα χρησιμοποιηθούν επιλέγονται με βάση τον επιδιωκόμενο τελικό στόχο της ιστοκαλλιέργειας και τις φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης που πρέπει να επιτευχθούν. Οι αυξίνες είναι απαραίτητες από σχεδόν όλα τα φυτικά κύτταρα για διαίρεση και επαγωγή ριζοβολίας. Οι κυτοκινίνες προωθούν την κατά πάχος αύξηση των κυττάρων και την διαφοροποίηση και έκπτυξη πλευρικών οφθαλμών.

Για την παρασκευή μητρικών διαλυμάτων Kin (θερμοσταθερή) και BAP (σταθερή) (stock συγκέντρωση: 100 mg / 100 ml) ζυγίστηκαν 10 mg ουσίας σε 200-ml beaker, προστέθηκαν μερικές σταγόνες από 1 N HCl και σταγόνες νερού με ανάδευση για να διαλυθούν οι κρύσταλλοι, κατόπιν προστέθηκαν ταχύτατα 90 ml δις απεσταγμένου νερού για τον τελικό όγκο στα 100 ml σε ογκομετρικό κύλινδρο. Με τον ίδιο τρόπο παρασκευάστηκε το μητρικό διάλυμα NAA (θερμοσταθερή) μόνο που για την διάλυση των κρυστάλλων χρησιμοποιήθηκε 1 N KOH.

Τα μητρικά διαλύματα μπορούν να αποθηκευτούν για μερικούς μήνες στο ψυγείο.

Σε πειράματα που διαρκούν για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να υπάρξει φωτοχημική απώλεια της δραστηριότητας φυτοορμονών στο μέσο καλλιέργειας (26).

Στερεοποιητικός παράγοντας

Το Gelrite που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα με το βαμβάκι είναι ένας πολυσακχαρίτης, προϊόν ζύμωσης από είδη του γένους *Pseudomonas*, που προσδίδει τελείως διάφανη εμφάνιση και επιθυμητή συνεκτικότητα στο μέσο.

Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Για τα πειράματα με το βαμβάκι χρησιμοποιήθηκαν το κιτρικό οξύ και το ασκορβικό οξύ σε συγκεντρώσεις των 100 mg/l.

pH του μέσου

Το pH των θρεπτικών μέσων καλλιέργειας φυτικών κυττάρων και ιστών γενικά, ρυθμίζεται μεταξύ των τιμών 5,5 με 6. Κάτω από 5,5 το μέσο δεν πήζει όπως πρέπει ενώ πάνω από 6 είναι πολύ συνεκτικό. Η ρύθμισή του γίνεται πάντα πριν την προσθήκη του στερεοποιητικού παράγοντα με προσθήκη σταγόνων 1 N HCl ή 0.1 N NaOH υπο συνεχή ανάδευση. Συνήθως η τιμή του pH του μέσου ελατώνεται κατά 0,6 έως 1,3 μονάδες μετά την αποστείρωσή του με το αυτόκαυστο ενώ το ίδιο αποτέλεσμα έχουν και η έκκριση οργανικών οξέων ή η κατανάλωση του αζώτου από μερικές καλλιέργειες μερικών φυτικών ειδών. Γενικά οι παράγοντες που επηρεάζουν το pH του μέσου είναι : τα ανόργανα άλατα, η πηγή άνθρακα, ο στερεοποιητικός παράγοντας, η μέθοδος συντήρησης του μέσου, η χρήση υλικών όπως ο ενεργοποιημένος άνθρακας κ.α.

Αποστείρωση μέσων ιστοκαλλιέργειας

Η αποστείρωση των θρεπτικών μέσων ιστοκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε στο αυτόκαυστο (autoclave) στους 121°C (21 psi) για 15 min.

Τα θρεπτικά μέσα κατανέμονται, μετά την αποστείρωσή τους και μόλις η θερμοκρασία τους κατέβει σε ανεκτά για χειρισμούς με γυμνά χέρια επίπεδα, εντός του θαλάμου νηματικής ροής σε ήδη αποστειρωμένα δοχεία ιστοκαλλιέργειας.

Η περίοδος επώασης και οι περιβαλλοντικές συνθήκες (παράμετροι με δυνατότητα καθορισμού) του θαλάμου ανάπτυξης των φυτών, για τα πειράματα με το βαμβάκι είναι :

Περίοδος επώασης : ημέρες ανάλογα με το επιδιωκόμενο μορφογενετικό αποτέλεσμα..

Θερμοκρασία : 27-30 °C, *optimal* : 28 °C κατά τη διάρκεια της ημέρας. Η θερμοκρασία κατά την περίοδο σκότους (νύκτα) μπορεί να κατέβει 1-2 °C.

Ποιότητα φωτισμού (φάσμα ακτινοβολίας) : λευκός φωτισμός απο λάμπες φθορισμού, όχι λάμπες πυρακτώσεως γιατί ανεβάζουν την θερμοκρασία κλειστού χώρου.

Φωτοπερίοδος : συνήθως σταθερή 16 h.

Ένταση φωτισμού : εκφράζεται σε φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία (P.A.R.- Photosynthetically Active Radiation) και κατά κανόνα ρυθμίζεται στα 90 μmol ή $\mu\text{Einstein}$ ανα m^2 και ανα sec.

Ποσοστό Σχετικής Υγρασίας : 70-80 %, αλλά δεν ελέγχεται απόλυτα σε όλες τις θέσεις του θαλάμου.

2.2.4 Καλλιέργεια εκφύτων με στόχο την αναγέννηση φυτών βαμβακιού

Ο στόχος της καλλιέργειας μεριστωμάτων είναι η έκπτυξη και η ανάπτυξη προϋπαρχόντων μαχαλαίων και κορυφαίου οφθαλμών υπο την επίδραση φυτορρυθμιστικών παραγόντων.

Στην πράξη όμως, τα περισσότερα συστήματα μικροπολλαπλασιασμού περιλαμβάνουν όλα τα δυνατά οργανογενετικά μονοπάτια (συμπεριλαμβανομένου και αυτό του σχηματισμού μη-προϋπαρχόντων, επιγενών οφθαλμών) και αυτό διότι είναι πρακτικά αδύνατο να αποφευχθεί η *de novo* παραγωγή βλαστών με την εξωγενή χρήση φυτορρυθμιστικών ουσιών (15, 26).

2.2.4.1 Έναρξη καλλιέργειας κορυφαίων και άλλων μεριστωμάτων με στόχο τη βλαστογένεση

Το θρεπτικό μέσο για έναρξη καλλιέργειας μεριστωμάτων (Μέσο Έναρξης Βλαστογένεσης M.E.B. ή S.I.M.-Shoot Initiation Medium) βαμβακιού έχει ως εξής :

Μάκρο-ιχνοστοιχεία: MS macro- and micro- elements.

Βιταμίνες: B5 Gamborg.

Πηγή άνθρακα: σακχαρόζη 3 % (w/v).

Στερεοποιητικός παράγοντας: Gelrite 0,15 % (w/v).

pH: 5,7-5,8.

Φυτικές ορμόνες: Κυτοκινίνες : στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε Kinetin (0,1 mg/l) [μπορεί όμως να χρησιμοποιηθεί και η BAP (0,1 mg/l)] ή TDZ εκτίμηση συγκέντρωσης για το βαμβάκι (0,022-2,2 mg/l).

Συνθήκες θαλάμου ανάπτυξης: οι στάνταρ που περιγράφονται για τα πειράματα με το βαμβάκι.

Περίοδος διατήρησης της καλλιέργειας μεριστωμάτων σ' αυτή την φάση για 2-3 εβδομάδες, με αλλαγές θρεπτικών κάθε βδομάδα.

2.2.4.2 Επιμήκυνση- ανάπτυξη των νεαρών βλαστών

Το θρεπτικό μέσο για την επιμήκυνση βλαστών απο εκπυσσόμενα φυτικά μεριστώματα βαμβακιού (M.E.P.B.) έχει ως εξής :

Μάκρο-ιχνοστοιχεία: MS macro-and micro-elements.

Βιταμίνες: B5 Gamborg.

Πηγή άνθρακα: σακχαρόζη 3 % (w/v).

Στερεοποιητικός παράγοντας: Gelrite 0,15 % (w/v).

pH: 5,7-5,8.

Φυτικές ορμόνες: Κυτοκινίνες : Kinetin (0,01 mg/l). Προς επίτευξη στόχος η ανάπτυξη-επιμήκυνση εκπυσσόμενων βλαστών απο προϋπάρχοντες και μη-προϋπάρχοντες οφθαλμούς. Καθόλου αυξίνες.

Συνθήκες θαλάμου ανάπτυξης: οι στάνταρ που περιγράφονται για τα πειράματα με το βαμβάκι.

Περίοδος διατήρησης της καλλιέργειας μεριστωμάτων σ' αυτή την φάση για 2-3 εβδομάδες, με αλλαγές θρεπτικών κάθε βδομάδα.

2.2.4.3 Ριζοβόληση βλαστών

Το Μέσο Ριζοβόλησης Βλαστών (M.P.B. ή Rooting Medium R.M.) βαμβακιού έχει σύσταση:

Μάκρο-ιχνοστοιχεία: 0,5 MS macro- and micro elements.

Βιταμίνες: B5 Gamborg.

Πηγή άνθρακα: σακχαρόζη 4 % (w/v).

Στερεοποιητικός παράγοντας: Gelrite 0,15 % (w/v).

pH: 5,7-5,8.

Φυτικές ορμόνες: Καθόλου κυτοκινίνες ή αυξίνες. Προς επίτευξη στόχος η ριζογένεση με παράλληλη ανάπτυξη ριζικού συστήματος και ανάπτυξη βλαστικών μερών.

Πρόσθετα συστατικά: Ενεργοποιημένος Άνθρακας (E.A.) αδρανοποιημένος σε συγκέντρωση 0,3 % w/v.

Πιθανά προβλήματα απο την χρήση του E.A. έχουν να κάνουν με την μερική οξίνιση του pH του θρεπτικού μέσου και την υδρόλυση της σακχαρόζης μετά απο την αποστείρωσή του με το αυτόκαυστο (61).

2.2.4.4 Αναγέννηση ολόκληρων φυτών και μεταφορά τους στο θερμοκήπιο

Επειδή τα νεαρά φυτάρια (με ή χωρίς ρίζα) που έχουν αναγεννηθεί με τεχνικές μικροπολλαπλασιασμού είναι ευαίσθητα φυσιολογικώς και ανατομικώς, επιβάλλεται ο βαθμιαίος εγκλιματισμός τους σε συνθήκες ανάπτυξης θερμοκηπίου. Η διαδικασία προσαρμογής ή «σκληραγώγησης» όπως ονομάζεται αποσκοπεί στην ομαλή μετάβαση απο απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης φυτών στους θαλάμους ανάπτυξης σε μερικώς ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης θερμοκηπίου.

Η διαδικασία της «σκληραγώγησης» μπορεί να ξεκινήσει *in vitro* με την ελάτωση της σχετικής υγρασίας στους θαλάμους ανάπτυξης. Στη συνέχεια τα δοχεία ιστοκαλλιέργειας με τα φυτά μεταφέρονται απευθείας στο θερμοκήπιο, αφαιρούνται τα προστατευτικά καλύμματα και για μερικές μέρες τα φυτά μένουν έτσι χωρίς να μεταφερθούν απο το μέσο καλλιέργειάς τους. Οι μολύνσεις σε αυτό το στάδιο δεν αποτελούν πρόβλημα εκτός και αν τα φυτάρια παραμείνουν στα ανοικτά δοχεία περισσότερο απο μια βδομάδα.

Κατόπιν κάθε φυτό αφαιρείται προσεκτικά απο το υπόστρωμα ανάπτυξης, το άγαρ ξεπλένεται διεξοδικά με νερό (αν δεν ξεπλυθεί καλά αποτελεί υπόστρωμα ανάπτυξης παθογόνων) και τοποθετείται σε ατομικό γλαστράκι που περιέχει κατάλληλη ποσότητα

μίγματος στείρας οργανικής κομπόστας : τύρφης : περλίτη (2 : 2 : 1, όπου 1 μέρος = περίπου με 20 – 30 τετραγωνικά εκατοστά).

Το βαμβάκι χρειάζεται ουδέτερο pH και είναι ευαίσθητο σε τροφοπενίες ασβεστίου.

Η διατήρηση κατάλληλης (όχι πολύ υψηλής) έντασης φωτισμού και υψηλών ποσοστών σχετικής υγρασίας για τις πρώτες μέρες της μεταφύτευσης αυξάνουν τα ποσοστά επιτυχίας. Για αυτό το σκοπό συνήθως χρησιμοποιούνται διαφανείς σακκούλες πολυαιθυλενίου για σκέπασμα κάθε γλάστρας ενώ διενεργούνται συχνά ποτίσματα. Με τη θερμοκρασία χώρου σταθερά στους 25 °C, σχετική υγρασία χώρου στο 70 % και σταθερή φωτοπερίοδο μόλις το ριζικό σύστημα εγκατασταθεί τα φύλλα θα αναπτυχθούν και τα φυτά θα μεγαλώνουν κανονικά.

Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι :

–Βλαστοί με πλήρες αναπτυγμένο ριζικό σύστημα *in vitro* μεταφυτεύονται (*ex vitro* συνθήκες) με ιδιαίτερη προσοχή στο μίγμα ανάπτυξης για να αποφεύγονται οι κίνδυνοι από τραυματισμούς.(σημεία εισόδου μυκήτων *Fusarium*, *Pythium* ή άλλων παθογόνων, εκδήλωση προσβολής και εμφάνιση ασθενειών των ριζών ή του λαιμού). Το ριζικό σύστημα μπορεί και να καταστραφεί από μόνο του (αποτυχία κατά την μεταφύτευση) με συνέπεια τα φυτά να μπουν σε διαδικασία για ανάπτυξη νέων ριζών και άρα την συνολική καθυστέρηση στην ανάπτυξη ολόκληρου του φυτού.

–Βλαστοί χωρίς ή με αναπτυσσόμενο *in vitro* ριζικό σύστημα εμβαπτίζονται (η βάση του βλαστού) σε σκόνη ή σε διάλυμα ριζοβόλησης πριν μεταφυτευτούν απευθείας στο μίγμα ανάπτυξης.

2.2.4.5 Καλλιέργεια εμβρυακών ιστών

Οι απομονωμένοι εμβρυακοί άξονες και τα αρχέφυτρα των βλαστιδίων τοποθετούνται σε όρθια θέση (κατεύθυνση προς τα πάνω), 10-20 τεμάχια / τρυβλίο. Το θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια εμβρυακών μεριστωμάτων ή εμβρύων (Μέσο Καλλιέργειας Εμβρυακών Ιστών, Μ.Κ.Ε.Ι. ή Embryo Culture Medium, ECM) βαμβακιού έχει σύσταση:

Μάκρο-ιχνοστοιχεία: MS macro- and micro- elements.

Βιταμίνες: B5 Gamborg.

Πηγή άνθρακα: σακχαρόζη 3 % (w/v).

Στερεοποιητικός παράγοντας: Gelrite 0,15 % (w/v).

pH: 5,7-5,8, πρίν την αποστείρωση.

Φυτικές ορμόνες: Κυτοκίνη : BAP (3 mg/l). Προς επίτευξη στόχος η φυσιολογική ανάπτυξη σε διαστάσεις του εμβρύου (χωρίς παραμορφώσεις), η έκπτυξη φύλλων (προσηματισμένων καταβολών), η ανάπτυξη φυταρίων.

Συνθήκες θαλάμου ανάπτυξης: οι στάνταρ που περιγράφονται για τα πειράματα με το βαμβάκι.

Μέσα σε 2 εβδομάδες εμφανίζονται τα φύλλα ενώ παράλληλα μεγαλώνει σε μέγεθος το υποκοτύλιο. Οι νεκροί ιστοί απομακρύνονται ασηπτικά. Για την ριζοβόληση και την ανάπτυξη ριζικού συστήματος τα πράσινα πλέον νεαρά βλαστάρια μεταφέρονται σε Μέσο Ριζοβόλησης M.P. ή Rooting Medium R.M. με σύσταση:

Μάκρο-ιχνοστοιχεία: McD. Stewart and Hsu.

Βιταμίνες: 4 μM nicotinic acid, 4 μM pyridoxine . HCL, 4 μM thiamine . HCL.

Πηγή άνθρακα: σακχαρόζη 2 % (w/v).

Στερεοποιητικός παράγοντας: Gelrite 0,15 % (w/v).

pH: 5,5, πρίν την αποστείρωση.

Φυτικές ορμόνες: αυξίνη: NAA (0,01 mg/l) ή καθόλου φυτικές ορμόνες. Προς επίτευξη στόχος η φυσιολογική ανάπτυξη ριζικού συστήματος χωρίς την μεσολάβηση φάσης κάλλου.

Συνθήκες θαλάμου ανάπτυξης: οι στάνταρ που περιγράφονται για τα πειράματα με το βαμβάκι.

Μέσα σε 6 εβδομάδες υπάρχει ριζικό σύστημα ικανό να επιτρέψει την μεταφορά των νεαρών φυταρίων στο θερμοκήπιο.

Η σύσταση του θρεπτικού McD. Stewart and Hsu (52) είναι: KNO₃ 5 mM, NH₄NO₃ 3 mM, MgSO₄ .7H₂O 2 mM, CaCl₂.2H₂O 1,2 mM, KH₂PO₄ 0,2 mM, Fe.EDTA 15 μM, H₂BO₄ 30 μM, MnSO₄.4H₂O 30 μM, ZnSO₄.7H₂O 9 μM, KI 1,5 μM, NaMoO₄.2H₂O 0,9 μM, CuSO₄.5H₂O 0,03 μM, CoCl₂.6H₂O 0,03 μM.

2.2.4.6 Επαγωγή πολλαπλής οργανογένεσης

Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος TDZ (συγκέντρωση stock: 1 mM) ζυγίστηκαν 22,02 mg ουσίας, τα οποία εκτέθηκαν σε 1 ml διαλύτη 1 N KOH για λιγότερο του 1 λεπτού, κατόπιν προστέθηκαν 99 ml δις απεσταγμένου νερού για να επιτευχθεί ο τελικός όγκος (100 ml). Σχηματίζεται ένα ανοικτού καφέ χρώματος διάλυμα που μπορεί να αποθηκευτεί στο ψυγείο (+ 4 °C) για τουλάχιστον ένα μήνα χωρίς σημαντική απώλεια δραστηριότητας. Η φυτοορμόνη TDZ μπορεί να αποστειρωθεί στο αυτόκαυστο μαζί με το μέσο διατηρώντας σε υψηλά επίπεδα τη δραστηριότητά της.

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης TDZ που θα χρειαστεί για την πολλαπλή βλαστογένεση στο βαμβάκι με βάση τη βιβλιογραφία κυμαίνεται στα 0,022-2,2 mg/l ή 100 nM-10 μM.

Προκαταρκτικά πειράματα έγιναν σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις TDZ με σύσταση Μέσου Πολλαπλής Οργανογένεσης (Μ.Π.Ο.) ή Multiple Shoot Induction Medium (Μ.Σ.Ι.Μ.) την παρακάτω:

Μάκρο-ιχνοστοιχεία: MS θρεπτικού μέσου.

Βιταμίνες: 4,1 μM nicotinic acid, 2,4 μM pyridoxine . HCL, 1,5 μM thiamine.HCL, 555 μM myo-inositol.

Πηγή άνθρακα: σακχαρόζη 3 % (w/v).

Στερεοποιητικός παράγοντας: Gelrite 0,15 % (w/v).

pH: 5,7-5,8, πριν την αποστείρωση.

Φυτικές ορμόνες: TDZ σε συγκεντρώσεις 1 nM, 100 nM, 1 μM και 10 μM. Προς επίτευξη στόχος η πολλαπλή βλαστογένεση χωρίς την μεσολάβηση φάσης κάλλου.

Συνθήκες θαλάμου ανάπτυξης: οι στάνταρ που περιγράφονται για τα πειράματα με το βαμβάκι.

Τα θρεπτικά κατανεμήθηκαν μετά την αποστείρωσή τους ανά 25 ml σε 100 x 20 mm πιάτα Petri. Δέκα κορυφαία μεριστώματα από *in vitro* μεγαλωμένα φυτάρια βαμβακιού ηλικίας 7 ημερών καλλιεργήθηκαν ανά πιάτο Petri με Μ.Π.Ο. για τέσσερις διαφορετικές εμπορικές ποικιλίες βαμβακιού (M1, M2, M3, ΦΩΤΕΙΝΗ) για κάθε συγκέντρωση TDZ. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε 3 φορές. Ως μάρτυρες

χρησιμοποιήθηκαν μεριστώματικοί ιστοί στο ίδιο θρεπτικό υλικό χωρίς την παρουσία TDZ.

Αποτελέσματα (επαγωγή ή όχι πολλαπλών βλαστών) σημειώθηκαν για τις 5 ημέρες, 10 ημέρες και 14 ημέρες στο Μ.Π.Ο.

2.2.5 Έλεγχος ευαισθησίας στην καναμυκίνη

Στα προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν χρησιμοποιήθηκε η ουσία Kanamycin Monosulfate σε συγκεντρώσεις 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l.

Το μητρικό διάλυμα καναμυκίνης παρασκευάστηκε φρέσκο ειδικά για το τεστ (διατήρησή του στους - 20 οC) σε συγκέντρωση (stock concentration) 100 mg/ml με απευθείας διάλυση της ζυγισμένης σκόνης σε απεσταγμένο νερό και αποστείρωση με φίλτρο των 0,22 μm. Η προσθήκη της καναμυκίνης για την επίτευξη των επιλεγμένων συγκεντρώσεων έγινε απευθείας στο θρεπτικό μέσο μετά την αποστείρωσή του, όταν η θερμοκρασία του ήταν κατάλληλη και αμέσως μοιράστηκαν οι ποσότητες σε τρυβλία Petri.

Οι τύποι εκφύτων ήταν κορυφαία μεριστώματα, εμβρυακοί άξονες και φυλλικοί δίσκοι της ποικιλίας βαμβακιού ΦΩΤΕΙΝΗ.

Το θρεπτικό διάλυμα είχε την στάνταρ σύσταση MS (basal) μακρο-ιχνοστοιχεία, B5 Gamborg βιταμίνες, σακχαρόζη 3 % (w/v), Gelrite 0,15 % (w/v), χωρίς φυτικές ορμόνες και pH ρυθμισμένο στο 5,7-5,8 μετά την προσθήκη του στερεοποιητικού και πριν την αποστείρωση με το αυτόκαυστο.

Τοποθετήθηκαν 10 έκφυτα / πιάτο Petri με θρεπτικό υλικό σε τρεις επαναλήψεις. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια έκφυτα στο ίδιο θρεπτικό χωρίς όμως καναμυκίνη. Παρατηρήσεις που αφορούν το Σχετικό Νωπό Βάρος (Relative Fresh Weight) σε σχέση με τον μάρτυρα και σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση καναμυκίνης λαμβάνονται στις 7, 12 και 24 ημέρες καλλιέργειας.

2.3 Μέθοδοι μοριακής ανάλυσης

2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA- Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού- Ανάλυση μορίων DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η απομόνωση σε μικρή κλίμακα πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης, η αναλυτική μέθοδος για τη διαδικασία και η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στους Maniatis *et.al.* (50). Για την παρασκευή μεγαλύτερων ποσοτήτων DNA και υψηλότερης καθαρότητας εφαρμόστηκε η μέθοδος της μοριακής διήθησης με στήλες διαχωρισμού QIAGEN, το αναλυτικό πρωτόκολλο και οι συστάσεις των χρησιμοποιούμενων διαλυμάτων περιγράφονται στο εγχειρίδιο της εταιρείας.

Οι περιοριστικές πέψεις πραγματοποιήθηκαν με βάση τις άριστες συνθήκες για το κάθε ένζυμο (θερμοκρασία, pH, μοριακότητα ρυθμιστικού διαλύματος σε άλατα) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας και τα σχετικά πρωτόκολλα των Maniatis *et.al.* (50) και Ausubel *et.al.* (2).

Η ανάλυση περιοριστικών τμημάτων DNA έγινε με βάση τις ηλεκτροφορητικές τους ιδιότητες (μέγεθος μορίων, διαμόρφωση μορίων) σε πηκτή αγαρόζης κατάλληλης περιεκτικότητας ανάλογα με τα μόρια που πρόκυτε να διαχωριστούν (0,7 – 1,5 % w/v). (50, 2). Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης ήταν TAE, η χρωστική Orange G σε ηλεκτροφορητική συσκευή παροχής συνεχούς τάσης 50 – 120 volt για επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού.

2.3.2 Απομόνωση γενωμικού DNA απο νεαρά και αποξηραμένα φύλλα βαμβακιού

Για την απομόνωση DNA απο νεαρά φύλλα βαμβακιού εφαρμόστηκε μια νέα (2001), γρήγορη (δυο βημάτων: απομόνωση πυρήνων, λύση πυρήνων), που επιτρέπει τη χρήση vortex για γρήγορη ανάδευση, υψηλών αποδόσεων σε DNA (500-600 µg/gr φρέσκου ιστού φύλλου) χρησιμοποιώντας σχετικά μεσαίες ποσότητες αρχικού ιστού (0,1gr) μέθοδος εκχύλισης. Αναλυτικά η μέθοδος (47):

Διαλύματα:

Extraction Buffer (E.B.): 100 μ M Tris-base και 5 μ M EDTA. Πρίν την χρήση του προστίθονται Sodium Bisulfite 0.4 gr/100ml Buffer και 0.35 M Sorbitol.

Lysis Buffer (L.B.): 0.2 M Tris-base (pH 8,0), 50 μ M EDTA (pH 8,0), 2 M NaCl και 55 μ M CTAB (HexadecylTrimethylAmmonium Bromide).

5% Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine, sodium salt).

TE buffer: 10mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA pH 8.0.

Διαδικασία:

1. Συλλογή ιστών. Συλλέγονται περίπου 0,05 – 0,1 gr νεαρών φύλλων (2 – 2,5 cm διάμετρο), διπλώνονται και τοποθετούνται σε πλαστικά σωληνάκια μικροφυγοκέντρου των 1,5 ml και αμέσως εμβαπτίζονται στο υγρό άζωτο. Ακολουθεί λειοτριβήση του ιστού ατομικά μέσα στο κάθε σωληνάκι με την βοήθεια ειδικά διαμορφωμένου άκρου πιπέτας (εν είδει γουδοχειριού).

2. Εκχύλιση του DNA. Στην σκόνη που δημιουργήθηκε, προστίθενται 600 μ l Extraction Buffer (E.B.) και αναδεύονται στο vortex για 40 – 60 sec, μέχρι να σχηματιστεί ομοιογενές μίγμα. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 6.500 – 7.000 g για 15 – 30 min. σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, προστίθονται εκ νέου 250 μ l Extraction Buffer (E.B.) στο ίζημα και ανάδευονται (vortex) για 40 – 60 sec. Προστίθονται 5 μ l RNase (pancreatic RNase A) 10 mg/ml, 600 μ l Lysis Buffer (L.B.) και 60 μ l 5 % Sarkosyl. Με ανάμειξη των περιεχομένων με αναστροφή των σωλήνων 20 – 40 φορές επιτυγχάνεται ο σχηματισμός ομοιογενούς μίγματος. Ακολουθεί επώαση στους 65 $^{\circ}$ C για 15 min. Στην συνέχεια προσθήκη 500 μ l χλωροφορμίου : ισοαμλικής αλκοόλης (24 : 1 v/v) και ανάδευση (vortex) για 40 – 60 sec. Μετά την φυγοκέντρωση στα 6.500 – 7.000 g για 5 – 10 min. σε θερμοκρασία δωματίου, με την πιπέτα μεταφέρεται προσεκτικά η υδατική υπερκείμενη φάση σε νέο σωληνάκι και επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά η εκχύλιση με χλωροφόρμιο : ισοαμλική αλκοόλη.

3. Κατακρήμνιση του DNA. Πραγματοποιείται με την προσθήκη ενός όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης (- 20 $^{\circ}$ C) και ανακατεύοντας με αναστροφή των σωλήνων μέχρις ότου καθιζήσει το DNA. Μετά απο φυγοκέντρωση στα 6.500 – 7.000 g για 15 – 30 min. και απόρριψη του υπερκειμένου ακολουθεί 2 φορές ξέπλυμα του DNA ιζήματος με 70 % αιθανόλη και στέγνωμά του για 30 min. Το DNA επαναδιαλύεται σε 30 – 60 μ l

νερού ή διαλύματος TE, τα δείγματα μπορούν σ' αυτή την κατάσταση να διατηρηθούν στους -20°C για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά, με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm και έχοντας υπ' όψη ότι σε υδατικά διαλύματα DNA που δεν υπάρχουν προσμείξεις (RNA, πρωτεΐνες κ.α.) όταν η οπτική απορρόφηση ($\text{O.D.}_{260} = 1,0$) είναι ίση με την μονάδα τότε η συγκέντρωση του DNA είναι 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από αποξηραμένο ιστό το αρχικό βάρος του προς εκχύλιση ιστού ελατώθηκε κατά 5 φορές (13, 63). Έτσι ζυγίστηκαν προς εκχύλιση 0,02 gr ξηρού ιστού φύλλου. Η εκχύλιση του DNA έγινε με το Nucleon Phytorepure kit της εταιρείας Amersham. Το αναλυτικό πρωτόκολλο και οι συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στο σχετικό εγχειρίδιο της εταιρείας.

2.3.3 Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για την ταυτοποίηση του γονιδίου της ακτίνης του βαμβακιού

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση ενός τμήματος 900 περίπου βάσεων με την βοήθεια δυο ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών για το γονίδιο της ακτίνης του βαμβακιού (Acc. Num.AF059484). Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών ήταν:

Forward primer: 5'-AAGATGGCTGATGGTGAGGA-3', μήκος εκκινητή 20 νουκλεοτίδια, 50,0 % GC, 1 $\mu\text{g} = 159,56$ pmole, M.B. = 6,3 KD, $T_m = 60,6^{\circ}\text{C}$.

Reverse primer: 5'-ACCACTGGCATATAGGGAGAG-3', μήκος εκκινητή 21 νουκλεοτίδια, 52,4 % GC, 1 $\mu\text{g} = 154,22$ pmole, M.B. = 6,5 KD, $T_m = 58,2^{\circ}\text{C}$.

Η κάθε PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μl σε συσκευή PCR (thermal cycler). Το μίγμα της κάθε αντίδρασης είχε τα διαλύματα και τις ποσότητες: 2,5 μl 10 x PCR buffer (με MgCl_2), 2 μl από το 4 dNTP mix 2,5 mM (0,2 mM τελική συγκέντρωση), 50-150 ng template genomic DNA (undiluted), ποσότητα από τον καθένα εκκινητή ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,5 μM (50 μM ή 50 pmole/ μl αρχική συγκέντρωση), Taq DNA polymerase 2,5 U / τελικό όγκο αντίδρασης, όγκο νερού ρυθμισμένο κατάλληλα για την επίτευξη του τελικού όγκου της αντίδρασης (2, 50).

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης ήταν: 95 °C για 5 min σαν προθέρμανση (μια φορά-κύκλος), 30 κύκλοι αντιγραφής απο: αποδιάταξη στους 95 °C για 30 sec, υβριδισμό στους 56 °C για 45 sec (annealing), σύνθεση στους 72 °C για 2 min και τέλος στους 72 °C για 5 min σαν τελική επιμήκυνση (μια φορά-κύκλος).

Τα προϊόντα της αντίδρασης (ενισχυμένα DNA τμήματα-στόχοι) αναλύθηκαν σε 1,5 % πηκτή αγαρόζης, η αντίχνευσή τους έγινε ύστερα απο χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο κάτω απο υπεριώδες φώς. Οι φωτογραφίες παρουσιάζονται στα αποτελέσματα.

2.3.4 Ανάλυση ενζυμικής δραστηριότητας και ιστοχημικός εντοπισμός της β-γλυκουρονιδάσης

Το γονίδιο *uidA* του *E.coli* που κωδικοποιεί το ένζυμο της β-γλυκουρονιδάσης (GUS), είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο γονίδιο αναφοράς (μάρτυρας, reporter gene) στους μετασχηματισμούς φυτών για τη μελέτη παροδικής έκφρασης γονιδίων (transient expression).

Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει απομονωθεί, έχει βρεθεί ολόκληρη η αλληλουχία του και έχει κλωνοποιηθεί σε φορείς έκφρασης με διάφορες δομικές τροποποιήσεις ώστε η έκφραση ενός προκαρυωτικού γονιδίου και η λειτουργικότητα του μηνύματός του να είναι σταθερές στο ευκαρυωτικό περιβάλλον των μετασχηματιζόμενων φυτικών κυττάρων.

Η β-γλυκουρονιδάση καταλύει την υδρόλυση μιας μεγάλης ποικιλίας β-γλυκουρονιδίων.

Είναι ένα πολύ σταθερό πρωτεϊνικό μόριο, λειτουργικό σε φυσιολογικές τιμές pH με optimum μεταξύ 5.2 - 8.0 και ανθεκτικό στους περισσότερους λιποδιαλύτες (απορρυπαντικά), στις διαφορετικές ιονικές συνθήκες και στην θερμοκρασιακή απενεργοποίηση. Ενδογενής δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου δεν έχει παρατηρηθεί για τα περισσότερα φυτικά είδη, γεγονός που επιτρέπει την αντίχνευση χαμηλών επιπέδων ενζυμικής δραστηριότητας σε μετασχηματισμένους φυτικούς ιστούς.

Το ένζυμο β-γλυκουρονιδάση (ως προϊόν ποσοτικής, τοπικής, χρονικής έκφρασης του GUS γονιδίου) μπορεί να ελεγχθεί βιοχημικά με τη χρήση διαφόρων υποστρωμάτων

που κυκλοφορούν στο εμπόριο. Ένα απο αυτά είναι το 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλο-β-D-γλυκουρονιδίου ή γλυκουρονικού οξέος (X-Gluc, indigogenic substrate).

Τα προϊόντα της ενζυμικής δράσης της β-γλυκουρονιδάσης στο υπόστρωμα X-Gluc είναι κάποια ινδόξυλ-παράγωγα (X και το ταυτομερές του XH), διαλυτά και άχρωμα. Τα παράγωγα αυτά μπορούν να υποστούν οξειδωτικό διμερισμό για τον σχηματισμό αδιάλυτων κατακρημνισμάτων έντονου μπλέ χρώματος (indigo) χρωστικών (diX-indigo diXH-leucoindigo) στον τόπο ενζυμικής δράσης. Ο διμερισμός διεγείρεται απο το ατμοσφαιρικό οξυγόνο και μπορεί να ενταθεί με την χρήση καταλυτών στην αντίδραση οξειδωσης (37, 41).

Για την πραγματοποίηση της βιοχημικής δοκιμής παρασκευάστηκαν τα διαλύματα:

–μητρικό διάλυμα phosphate buffer (pH 7.0), 0,5 M stock απο 1 M Na_2HPO_4 και 1 M NaH_2PO_4 για την ρύθμιση του pH.

–μητρικά διαλύματα των καταλυτών οξειδωσης potassium ferricyanide, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 50 mM stock και potassium ferrocyanide, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 50 mM stock με δυνατότητα διατήρησης στους 4 °C για αρκετές εβδομάδες.

Το υπόστρωμα X-Gluc έχει προμηθευτεί ως cyclohexylammonium salt (Sigma) σκόνη (αποθήκευση στους -20°C ως υγρή σκόνη).

Για την παρασκευή του διαλύματος X-Gluc (2 mM τελική συγκέντρωση) ζυγίστηκαν 10 mg X-Gluc σκόνης και διαλύθηκαν σε 100 μl dimethyl formamide στην εστία απορρόφησης ατμών (fume hood). Στην συνέχεια προστέθηκαν 2 ml phosphate buffer (pH 7,0) (τελική συγκέντρωση 100 mM), 100 μl (5 mM τελική συγκέντρωση για τον καθένα) απο καθένα απο τα δυο μητρικά διαλύματα των καταλυτών οξειδωσης και 100 μl (τελική συγκέντρωση 0,1 % v/v) TritonX-100. Ο τελικός όγκος μέχρι τα 10 ml συμπληρώθηκε με αποσταγμένο νερό. Στο διάλυμα δεν συμπεριελήφθει EDTA αν και υπήρχαν πρωτόκολλα στη βιβλιογραφία που συνιστούσαν την χρήση του σε τελική συγκέντρωση 0,25 M για την προστασία του ενζύμου απο βαρέα μεταλλικά ιόντα, κυρίως του Cu^{++} , Zn^{++} . Το διάλυμα X-Gluc μπορεί να διατηρηθεί για τουλάχιστον μια εβδομάδα στους 4 °C προστατευμένο απο το φώς, συνιστάται όμως να παρασκευάζεται φρέσκο για κάθε δοκιμή.

Για την χρώση GUS τα έκφυτα εμβαπτίζονται στο διάλυμα X-Gluc και υποβάλλονται σε διήθηση κενού για τουλάχιστον 5 min με σκοπό τη διεύθυνση του

υποστρώματος στους ιστούς των εκφύτων. Τα δείγματα επωάζονται στο σκοτάδι, στους 37 °C, όλο το βράδυ και την επόμενη μέρα οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή εκχυλίζονται από τους ιστούς με διαδοχικές εκχυλίσεις με 70 % αιθανόλη ώστε όλοι οι μη κεχρωσμένοι, από την δράση του ενζύμου (εκδήλωση παροδικής έκφρασης γονιδίου μάρτυρα), ιστοί να είναι λευκοί.

Η χρώση GUS πραγματοποιήθηκε για βομβαρδισμένους, με πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο αναφοράς, απομονωμένους εμβρυακούς άξονες και ανώριμες σπερματικές βλάστες στον ύπερο (*in situ*) των ανθέων βαμβακιού.

Σκοπός ήταν η απόδειξη της δυνατότητας μεταφοράς και παροδικής έκφρασης γονιδίων με το «σύστημα του βομβαρδισμού σωματιδίων» σε έκφυτα βαμβακιού. Τα έκφυτα παρατηρήθηκαν κάτω από το στερεοσκόπιο αλλά δεν φωτογραφήθηκαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

3.1 Καλλιέργειες βακτηριακών στελεχών

Στελέχη *E.coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* και *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* καθώς και μετασηματισμένα αγροβακτήρια (με βακτηριακή σύζευξη και με ηλεκτροπόρωση) δοκιμάστηκαν και ελέγχθηκαν κάτω από το στερεοσκόπιο για την ανάπτυξη απλών αποικιών σε διάφορα θρεπτικά μέσα με την παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Οι παρατηρήσεις μας οδήγησαν στον παρακάτω πίνακα 2.

Στελέχη/ στερεά θρεπτικά μέσα	LB (Luria-Bertani)	N.A. (Nutrient Agar)	King's B	M9R-Glucose	Agrobacterium Medium
<i>E.coli</i> HB101 (pRK2013) (helper strain) <i>E.coli</i> DH5a (pBINAR) (donor strain) <i>E.coli</i> DH5a (pBSK+)	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	-	Δυσκολία στην ανάπτυξη και τον σχηματισμό απλών αποικιών	Δεν μεγαλώνουν ούτε σχηματίζονται απλών αποικιών
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LBA 4404)	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	Δεν μεγαλώνουν ούτε σχηματίζονται απλών αποικιών	-	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	Δεν μεγαλώνουν ούτε σχηματίζονται απλών αποικιών
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Μεγαλώνουν κανονικά, Rif R made, σχηματισμός απλών αποικιών	Δεν μεγαλώνουν ούτε σχηματίζονται απλών αποικιών	-	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	Δεν μεγαλώνουν ούτε σχηματίζονται απλών αποικιών
«clone CHS 'J'», <i>A.tumefaciens</i> LBA 4404 (pBINAR) (recipient strain)	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	Δεν μεγαλώνουν ούτε σχηματίζονται απλών αποικιών	-	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	-

	αποικιών			αποικιών	
«clone P56», <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4404 & <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (pBINAR) (electroporated)	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	Δεν μεγαλώνουν ούτε σχηματίζονται απλών αποικιών	-	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> Race 1, strain 3121	-	-	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> Race 6, strain 1448A (avr γονίδια)	-	-	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> Race 7, strain 1449B (pAV511+)	-	-	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> RW 60 (pAV511-)	-	-	Μεγαλώνουν κανονικά, ανάλογα με τα αντιβιοτικά, σχηματισμός απλών αποικιών	-	-

Πίνακας 2: Ποιά στελέχη μεγαλώνουν σε ποιο θρεπτικό μέσο.

Για την επιλογή των μετασχηματισμένων «clone CHS 'J'», *A.tumefaciens* LBA 4404 (pBINAR) (recepient strain) και «clone P56», *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (pBINAR) (electroporated) απο πιθανές προσμείξεις βακτηριακών κυττάρων *E.coli* μονήρεις αποικίες εμφανίστηκαν σε θρεπτικό μέσο LB χωρίς Ριφαμπικίνη και μόνο Καναμυκίνη (Km, 100 µg/ml) μετά απο δυο εικοσιτετράωρα (2 μέρες) στους 28 °C. Αντίθετα δεν εμφανίστηκαν στο ίδιο ακριβώς θρεπτικό μέσο για το ίδιο χρονικό διάστημα στους 42 °C. (Θερμοκρασιακή δοκιμή που θα διαφοροποιούσε το *Agrobacterium* απο το *E. coli*)

3.2 Γονίδια για τον γενετικό μετασχηματισμό ποικιλιών βαμβακιού, φορείς.

Κατασκευάστηκαν επιτυχώς stabs και glycerol stocks για αποθήκευση στους + 4 °C και - 80 °C αντίστοιχα σε περιβάλλον *E.coli* κυττάρων DH5a (σε φορέα pBLUESCRIPT SK+ και σε δυαδικό φορέα για γενετικό μετασχηματισμό φυτών pBINAR) οι εξής cDNA κλώνοι γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα του βιοσυνθετικού μονοπατιού των φλαβονοειδών: *chs* απο κριθάρι, *chsa* απο πετούνια και *chia* απο πετούνια.

Πλασμιδιακό DNA των κλώνων που είχε απομονωθεί με την βοήθεια στηλών QIAGEN (γνωστές συγκεντρώσεις, βλέπε υλικά & μέθοδοι) υποβλήθηκαν σε περιοριστική ανάλυση με τα κατάλληλα ένζυμα για επιβεβαίωση του μεγέθους και προσανατολισμού των ενθεμάτων (Εικόνες 2 και 3).

Εδώ, όπως και σε άλλα σημεία της διατριβής οι όροι «κωδική κατεύθυνση» (sense orientation) και «αντικωδική κατεύθυνση» (antisense orientation) υποδηλώνουν τη φορά μεταγραφής της αλυσίδας του ένθετου, σε σχέση με τον παραπλήσιο υποκινητή.

Ο cDNA κλώνος του *chs* γονιδίου απο κριθάρι, με το χαρακτηρισμό «clone A», περιέχει σε «κωδική κατεύθυνση», EcoRI ένθεσης, κομμάτι μεγέθους ~1200 bp της αλληλουχίας του γονιδίου στον φορέα pBLUESCRIPT SK+.

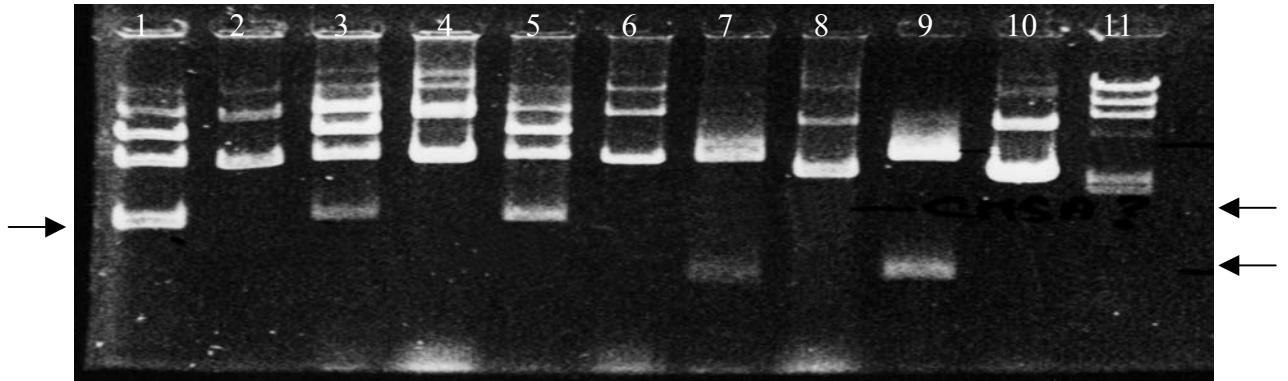
Ο cDNA κλώνος του *chs* γονιδίου απο κριθάρι με το χαρακτηρισμό «clone 'J' No. 6», περιέχει σε «αντικωδική κατεύθυνση», EcoRI ένθεσης, κομμάτι μεγέθους ~1200 bp, της αλληλουχίας του γονιδίου στον φορέα pBLUESCRIPT SK+.

Ο cDNA κλώνος του γονιδίου *chsa* απο πετούνια, με τον χαρακτηρισμό «clone (P10)», περιέχει σε «αντικωδική κατεύθυνση», EcoRI - Hind III ένθεσης, κομμάτι μεγέθους ~1300 bp, της αλληλουχίας του γονιδίου στον φορέα pBLUESCRIPT SK+.

Ο cDNA κλώνος του γονιδίου *chsa* απο πετούνια, με το χαρακτηρισμό «clone P21» περιέχει σε «κωδική κατεύθυνση», EcoRI ένθεσης, κομμάτι μεγέθους 730 bp της αλληλουχίας του γονιδίου στον φορέα pBLUESCRIPT SK+.

Ο cDNA κλώνος του γονιδίου *chia* απο πετούνια, με το χαρακτηρισμό «clone P20» περιέχει σε «αντικωδική κατεύθυνση», EcoRI ένθεσης, κομμάτι μεγέθους 730 bp της αλληλουχίας του γονιδίου στον φορέα pBLUESCRIPT SK+.

Ύστερα απο ηλεκτροφόρηση λάβαμε την Εικόνα 2:



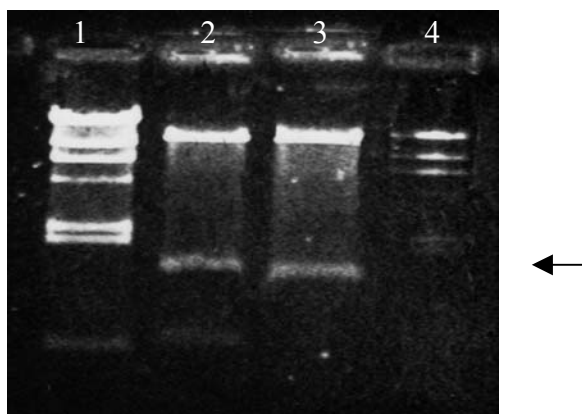
Εικόνα 2 : περιοριστική ανάλυση cDNA κλώνων γονιδίων για ένζυμο του βιοσυνθετικού μονοπατιού των φλαβονοειδών στον πλασμιδιακό φορέα pBluescriptSK+.

Σε 0.8 % (w/v) πηκτή αγαρόζης, απο αριστερά προς τα δεξιά: στήλη 1: «clone A» ύστερα απο πέψη με EcoRI (cut) – η χαμηλή ζώνη αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA των ~1200 bp, στήλη 2: «clone A» άκοπο (uncut), στήλη 3: «clone 'J' No. 6» ύστερα απο πέψη με EcoRI (cut) – η χαμηλή ζώνη αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA των ~1200 bp, στήλη 4: «clone 'J' No. 6» άκοπο (uncut), στήλη 5: «clone (P10)» ύστερα απο πέψη με EcoRI-Hind III (cut) – η χαμηλή ζώνη αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA των ~1300 bp, στήλη 6: «clone (P10)» άκοπο (uncut), στήλη 7: «clone P20» ύστερα απο πέψη με EcoRI (cut) – η χαμηλή ζώνη αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA των ~730 bp, στήλη 8: «clone P20» άκοπο (uncut), στήλη 9: «clone P21» ύστερα απο πέψη με EcoRI (cut) – η χαμηλή ζώνη αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA των ~730 bp, στήλη 10: «clone P21» άκοπο (uncut), στήλη 11: μάρτυρας περιοριστικών τμημάτων DNA λ Hind III. Στις στήλες διακρίνεται και ο φορέας pBLUESCRIPT SK+ (~ 3 Kb φορέας σε γραμμική μορφή, υψηλή ζώνη).

Ο cDNA κλώνος του *chs* γονιδίου απο κριθάρι, με τον χαρακτηρισμό «clone CHS 'J'», περιέχει σε «κωδική κατεύθυνση» και KpnI - BamHI ένθεσης, κομμάτι μεγέθους ~1200 bp της αλληλουχίας του γονιδίου στον φορέα pBINAR.

Ο cDNA κλώνος, του *chsa* γονιδίου απο πετούνια, με τον χαρακτηρισμό «clone P56», περιέχει σε «αντικωδική κατεύθυνση» και BamHI - SalI ένθεσης, κομμάτι μεγέθους ~1300 bp της αλληλουχίας του γονιδίου στον φορέα pBINAR.

Ομοίως ύστερα απο ηλεκτροφόρηση λάβαμε την Εικόνα 3:



Εικόνα 3: περιοριστική ανάλυση cDNA κλώνων γονιδίων για ένζυμα του βιοσυνθετικού μονοπατιού των φλαβονοειδών στον δυαδικό φορέα pBINAR που θα χρησιμοποιηθούν για τη γενετική τροποποίηση φυτών βαμβακιού.

Σε 0.8 % (w/v) πηκτή αγαρόζης, απο αριστερά προς τα δεξιά: στήλη 1: μάρτυρας περιοριστικών τμημάτων DNA (λ Hind III marker), στήλη 2: «clone P56» ύστερα απο πέψη με BamHI - SalI (cut) – η χαμηλή ζώνη αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA των ~1300 bp, στήλη 3: «clone CHS 'J'» ύστερα απο πέψη με KpnI – BamHI (cut) – η χαμηλή ζώνη αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA των ~1200 bp, στήλη 4: λ Hind III marker. Στη φωτογραφία διακρίνεται και ο φορέας pBINAR (~11 Kb φορέας σε γραμμική μορφή, υψηλή ζώνη).

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τις θέσεις περιορισμού πάνω στον εκάστοτε φορέα και την ύπαρξη των επιθυμητού μεγέθους ενθεμάτων στις αναφερόμενες κατευθύνσεις.

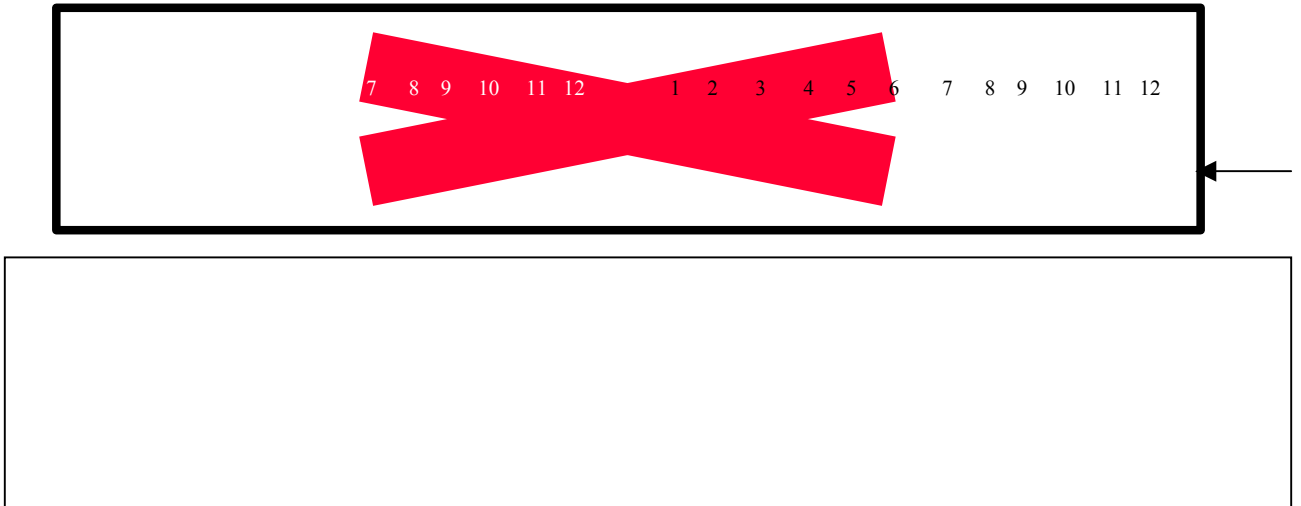
Πραγματοποιήθηκαν επίσης, απομονώσεις πλασμιδιακού DNA (*Agrobacterium mini-preps*) απο μετασχηματισμένα αγροβακτηριακά κύτταρα του στελέχους *A.tumefaciens* LBA 4404, απο τις μονήρεις αποικίες που αναπτύχθηκαν ύστερα απο επώαση σε τρυβλία επιλογής με δυο αντιβιοτικά.

Ο μετασχηματισμός των συγκεκριμένων αγροβακτηριακών στελεχών έγινε με τον δυαδικό φορέα pBINAR (για γενετική τροποποίηση φυτών) που έφερε τον cDNA κλώνο του *chsa* γονιδίου («clone P56») μέσω ηλεκτρικών παλμών (βλέπε ηλεκτοπόρωση αγροβακτηρίων).

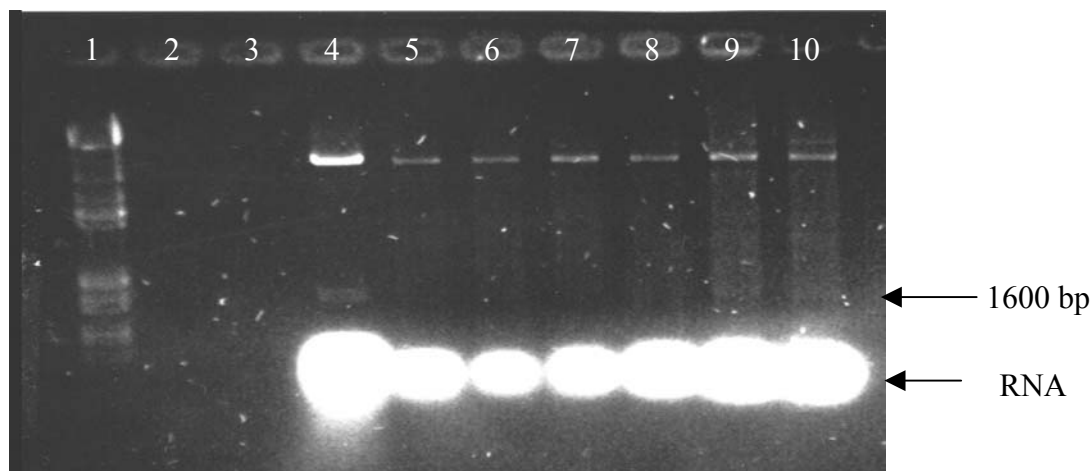
Για να εξασφαλιστεί η ύπαρξη και ο πολλαπλασιασμός του φορέα εντός των μετασχηματισμένων αγροβακτηρίων και για να διασφαλιστεί η ύπαρξη της ακολουθίας του κλώνου στη σωστή κατεύθυνση και φορά έκφρασης πάνω στον φορέα πρίν χρησιμοποιηθούν για πειράματα γενετικής τροποποίησης φυτών βαμβακιού, έγινε ο PCR

εντοπισμός του φορέα με κατάλληλα επιλεγμένους εκκινητές (Εικόνα 4) και η ενζυματική πέψη των απομονωθέντων πλασμιδίων με κατάλληλα επιλεγμένα περιοριστικά ένζυμα (πρότυπο περιοριστικών πέψεων ίδιο ανεξάρτητα με το βακτηριακό περιβάλλον, Εικόνα 5).

Η αντίδραση της πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε για απομονώσεις πλασμιδιακού DNA (*Agrobacterium* minipreps) από μετασχηματισμένα αγροβακτήρια (συνθήκες, διαλύματα, συγκεντρώσεις και αλληλουχίες δεν παρουσιάζονται αλλά είναι στην διάθεση του συγγραφέα) με εκκινητές σχεδιασμένους για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος μεγέθους ~700 bp του γονιδίου NPTII που προσδίδει την ανθεκτικότητα στο δεύτερο αντιβιοτικό (Καναμυκίνη).



Οι ίδιες απομονώσεις πλασμιδιακού DNA (6 από τα 9 *Agrobacterium* minipreps) από μετασχηματισμένα αγροβακτήρια υποβλήθηκαν σε περιοριστική ανάλυση με τα κατάλληλα ένζυμα για επιβεβαίωση περιοριστικών θέσεων και μεγέθους αλληλουχίας ένθεσης.



Εικόνα 5: πρότυπο περιοριστικής ανάλυσης πλασμιδιακού DNA μετασηματισμένων αγροβακτηρίων

Σε 0.8 % (w/v) πηκτή αραρόζης, από αριστερά προς τα δεξιά: στήλη 1: μάρτυρας περιοριστικών τμημάτων DNA, λ Hind III / EcoRI, στήλες 2 & 3 κενές, στήλη 4: πλασμιδιακό DNA του «clone P56» που είχε απομονωθεί με την βοήθεια στηλών QIAGEN από *E.coli*, DH5a κύτταρα ύστερα από πέψη με EcoRI-Hind III (cut) – η χαμηλή ζώνη αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA των ~1600 bp (ολόκληρη η κασσέτα CaMV - 35 S, αλληλουχία του cDNA κλώνου του CHSA γονιδίου BamHI - Sal I ένθεσης μεγέθους ~1300 bp, ληκτική ακολουθία του γονιδίου της οκτοπίνης), στήλες 5-10: 6 *Agrobacterium* minipreps [πλασμιδιακό DNA του «clone P56» που είχε απομονωθεί από μετασηματισμένα με τον δυαδικό φορέα pBINAR (για γενετική τροποποίηση φυτών) αγροβακτηριακά κύτταρα του στελέχους *A.tumefaciens* LBA 4404] ύστερα από πέψη με EcoRI-Hind III (cut) – η χαμηλή (αχνή ώστε να μην φαίνεται) ζώνη αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA των ~1600 bp. Στη φωτογραφία διακρίνονται ο φορέας pBINAR (~11 Kb, υψηλή ζώνη) και το RNA καθώς δεν έχει γίνει πέψη με RNase.

3.3 Εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας μετά από ένεση βακτηριακών αιωρημάτων σε κοτυληδονόφυλλα ποικιλιών βαμβάκιού.

Για την παροδική έκφραση *avr* γονιδίων στο βαμβάκι με τη μέθοδο της αγροβακτηριακής έγχυσης χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά αιωρήματα για να εμποτιστούν οι ιστοί πλήρως ανοιγμένων κοτυληδονοφύλλων

Η HR επάγεται μόνο όταν ζωντανά παθογόνα βακτήρια που φέρουν τα *avr* γονίδια ενεθούν στο μεσοκυττάριο χώρο και αποπλάστη κυττάρων στην περιοχή του μεσοφύλλου φυτών που φέρουν το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας (ένα *avr* που θα αντιστοιχεί σε υπάρχον *r* στην δοκιμαζόμενη ποικιλία) ικανό να πυροδοτήσει μηχανισμό αυτοάμυνας που εκδηλώνεται με την μορφή τυπικών νεκρώσεων καφέ χρώματος εντός 24 h (ταχεία αντίδραση) σε όσα φυτικά κύτταρα βρεθούν σε επαφή με βακτήρια.

Οι πίνακες 2 και 3 που ακολουθούν παρουσιάζουν τα αποτελέσματα όπως καταγράφηκαν μετά την πάροδο 48 ωρών από την στιγμή που πραγματοποιήθηκε η μικροέγχυση.

Στελέχη/ποικιλίες	M1	M2	M3	ΦΩΤΕΙΝΗ
1mM phosphate Buffer pH 7.0	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό
<i>A. tumefaciens</i> C58C1 (pGV2260) σαν αρνητικός μάρτυρας	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό
<i>A. tumefaciens</i> C58C1 (pGV2260, pBIN-Hyg-Tx-HSR/avrPphB) (disease-specific promoter)	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό
<i>A. tumefaciens</i> C58C1 (pGV2260, pBIN-hyg-Tx-35S/avrPphB) υποκινητή συστατικής έκφρασης.	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> Race 1, strain 3121 θετικός μάρτυρας (με avr γονίδια)	θετικό	θετικό	θετικό	θετικό
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> Race 6, strain 1448 A (με avr γονίδια)	θετικό	Slow reaction 48+ ώρες απο την μικροέγχυση	Slow reaction 48+ ώρες απο την μικροέγχυση	θετικό

Πίνακας 2: H.R. σε κοτυληδονόφυλλα ποικιλιών βαμβακιού

Στελέχη / ποικιλίες	71-1	EYA	ΜΑΚΑΝΑΙΡ	ΛΙΛΑ	ΑΚΑΛΑ	Σπόροι για δοκιμή απο εταιρία Syngenta
1mM MgCl ₂	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	Αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> Race 6, strain 1448 A (με avr γονίδια)	θετικό	θετικό	Ασθενές θετικό	θετικό	θετικό	θετικό
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> Race 7, strain 1449B (pAV511+)	θετικό	Θετικό	θετικό	θετικό	θετικό	θετικό
<i>P. syringae</i>	θετικό	Null	Ασθενές	Null	Water	Ασθενές

<i>pv.</i> <i>phaseolicola</i> RW 60 (pAV511-)		reaction	θετικό	reaction	soaking	θετικό
<i>P. syringae</i> <i>pv.</i> <i>phaseolicola</i> Race 1, strain 3121 θετικός μάρτυρας (με <i>avr</i> γονίδια)	θετικό	θετικό	θετικό	θετικό	θετικό	θετικό

Πίνακας 3: : H.R. σε κοτυληδονόφυλλα ποικιλιών βαμβακιού

Οι παρατηρήσεις μας σχετικά με τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα παρακάτω:

- τα αγροβακτήρια δεν εκφράζουν το T-DNA αρκετά ώστε να δούμε φαινότυπο ή οι ποικιλίες δεν έχουν λειτουργικά αντίστοιχο *r* γονίδιο του *avrPphB*. Χρειάζεται να γίνει επαγωγή με ακετοσυριγγόνη.
- Οι ποικιλίες ΦΩΤΕΙΝΗ, M2 έδωσαν ενδιαφέρουσα αντίδραση αργής ανάπτυξης (μετά την 3η μέρα) με το στέλεχος 1448A, φυλή 6 χωρίς *avr* γονίδια της *P. syringae pv. phaseolicola*.
- Η διαφορά των *P. syringae pv. phaseolicola* Race 7, strain 1449B (pAV511+) και *P. syringae pv. phaseolicola* RW 60 (pAV511-) αφορά τις σαφώς πιο ασθενείς αντιδράσεις του δεύτερου σε σχέση με το πρώτο.
- Εμφάνιση null φαινοτύπου, υπεύθυνο γονίδιο της ψευδομονάδας.

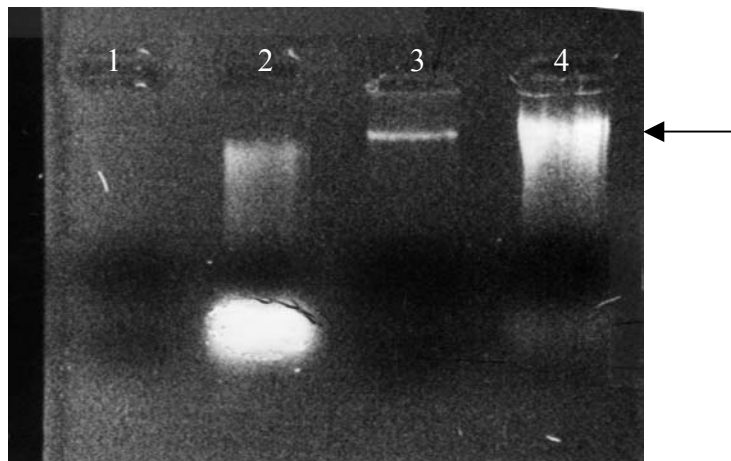
3.4 Απομόνωση γενωμικού DNA απο νεαρά και αποξηραμένα φύλλα βαμβακιού – Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για την ταυτοποίηση του γονιδίου της ακτίνης του βαμβακιού

Για την απομόνωση ολικού (γενωμικού, μιτοχονδριακού, πλαστιδικού) DNA απο νεαρά φύλλα βαμβακιού που συλλέχθηκαν απο το θερμοκήπιο αλλά και απο *in vitro* μεγαλωμένα φυτά, χρησιμοποιήθηκαν σχετικά μικρές ποσότητες αρχικού ιστού (0,1 gr). Η μέθοδος εκχύλισης για νεαρά φύλλα προσφέρει υψηλή για το βαμβάκι απόδοση σε DNA (500-600 μg/gr φρέσκου ιστού φύλλου) που είναι εμπλουτισμένο σε γενωμικό καθώς η διαδικασία αφορά την απομόνωση πυρήνων και λύση τους.

Είναι γνωστό ότι το βαμβάκι ανήκει στα φυτικά είδη που είναι πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες. Τα υδατικά διαλύματα του DNA που προέκυψαν δεν είχαν κολλοειδή εμφάνιση (υπερβολικές ποσότητες πολυσακχαριτών), ούτε καφέ χρωματισμό (φαινολικά). Στερούνταν δηλαδή των ανεπιθύμητων προσμίξεων που εκχυλίζονται μαζί με το DNA από τους φυτικούς ιστούς και εμποδίζουν την παραπέρα επεξεργασία του.

Για τους αποξηραμένους ιστούς το βάρος ελατώθηκε κατά 5 φορές, ζυγίστηκαν προς εκχύλιση 0,02 gr ιστού ξηρού φύλλου. Η απόδοση σε DNA ήταν χαμηλότερη (ανεμένεται με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή του kit ~ 200 µg/gr φρέσκου ιστού φύλλου), τα δε ιζήματα DNA των δειγμάτων πριν την τελική επαναδιάλυση και τα τελικά υδατικά διαλύματα είχαν καφέ χρωματισμό.

Το μέγεθος του εκχυλιζόμενου DNA (length) προσδιορίζεται με PFGE (Pulse-Field Gel Electrophoresis) σε πηκτή αγαρόζης. Σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής φορτώθηκαν έως και 10 µg DNA (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Υψηλής καθαρότητας εκχυλιζόμενο DNA από φύλλα βαμβακιού

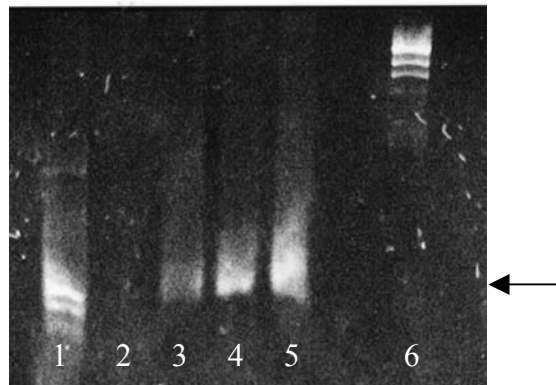
Σε 1 % (w/v) πηκτή αγαρόζης στην πρώτη στήλη, από τα αριστερά έχει φορτωθεί μάρτυρας περιοριστικών μεγεθών DNA (DNA ladder) για μεγάλα μεγέθη, πολύ λίγο ορατός, στην δεύτερη στήλη είναι το απομονωμένο DNA από ξηρό ιστό φύλλου χωρίς να έχει υποστεί χειρισμό με RNase A, στην τρίτη στήλη είναι το DNA από φρέσκο ιστό φύλλου (ποιότητα Southern) και στην τελευταία είναι το DNA από ξηρό ιστό φύλλου που όμως έχει υποστεί κατεργασία με RNase A. Τα δείγματα δεν υποβλήθηκαν σε πέψεις με περιοριστικά ένζυμα, γιατί αυτό δεν είχε θεωρηθεί απαραίτητο για εκείνη την χρονική στιγμή.

Το Υψηλού Μοριακού Βάρους DNA (HMW, High Molecular Weight DNA) που απομονώθηκε πρέπει να έχει μήκος της τάξεως έως και 50 Kb.

Τα δείγματα από ξηρούς ιστούς παρουσιάζουν σαφώς αποσύνθεση λόγω των εκάστοτε χειρισμών και λόγω της δράσης των νουκλεασών των φυτικών κυττάρων. Η

ποιότητα της διαδικασίας απομόνωσης, η συγκέντρωση και το μέγεθος του εκχυλιζόμενου DNA είναι τέτοια που να επιτρέπουν στα δείγματα να δεχθούν ενζυματικούς χειρισμούς, όπως η δράση περιοριστικών ενζύμων και η ενίσχυση τμημάτων DNA με την αντίδραση της πολυμεράσης, για να χρησιμοποιηθούν για RAPD, AFLP, RFLP, Microsatellite αναλύσεις και σε αναλύσεις κατά Southern.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση ενός τμήματος 900 περίπου βάσεων με την βοήθεια ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών για το γονίδιο της ακτίνης του βαμβακιού (Acc. Num.AF059484). Ως template DNA χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA που είχαν εκχυλισθεί από ζωντανούς ιστούς με την περιγραφόμενη μέθοδο. Ποσότητα που αντιστοιχεί σε από 100 ng γενωμικού DNA και πάνω (≥ 100 ng ή 10^4 μόρια, κύτταρα) είναι αρκετή ώστε το 10 % της PCR αντίδρασης να δώσει ορατό προϊόν από μοναδική ανα μόριο αλληλουχία, σε πηκτή αγαρόζης κεχρωσμένη με βρωμιούχο αιθίδιο (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: PCR εντοπισμός του γονιδίου της ακτίνης του βαμβακιού σε εκχυλιζόμενο DNA με την περιγραφόμενη μέθοδο

Στην πρώτη στήλη, από τα αριστερά μάρτυρας περιοριστικών μεγεθών DNA (DNA ladder 100 bp PROMEGA, 1000 bp – 900 bp οι δυο έντονα φωτισμένες μπάντες), στην δεύτερη στήλη αρνητικός μάρτυρας (no DNA control), στην τρίτη, τέταρτη και πέμπτη PCR αντιδράσεις (μικρότερος, μεσαίος, μεγαλύτερος όγκος αντίδρασης φορτώθηκαν στην πηκτή), στην τελευταία στήλη μάρτυρας μεγεθών λ Hind III ladder.

Τα δείγματα από νεκρούς ιστούς που παρουσιάζαν αποσύνθεση μπορούν θεωρητικά να χρησιμοποιηθούν σε PCR αντιδράσεις, όμως στην περίπτωσή μας δε μπορέσαμε παρά τις προσπάθειές μας να πολλαπλασιάσουμε οποιαδήποτε αλληλουχία από τέτοια δείγματα.

Τα προϊόντα της αντίδρασης (ενισχυμένα DNA τμήματα-στόχοι) αναλύθηκαν σε 1,5 % πηκτή αγαρόζης, 10 μl απο κάθε αντίδραση φορτώθηκαν σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής.

Η ανίχνευσή τους έγινε ύστερα απο χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο κάτω απο υπεριώδες φώς.

3.5 Ιστοχημικός εντοπισμός της β-γλυκουρονιδάσης - Έλεγχος ευαισθησίας στην καναμυκίνη

Σκοπός της χρώσης GUS ήταν ο έλεγχος της δυνατότητας μεταφοράς γονιδίων με το «σύστημα του βομβαρδισμού σωματιδίων» σε έκφυτα βαμβακιού μέσω της εκδήλωσης της παροδικής έκφρασης γονιδίου μάρτυρα.

Ένας ειδικός φορέας έκφρασης (πλασμίδιο) που έφερε το γονίδιο αναφοράς GUS, χρησιμοποιήθηκε για να επιστρώσει σωματίδια για τον βομβαρδισμό απομονωμένων εμβρυακών αξόνων και ανώριμων σπερματικών βλαστών στον ύπερο (*in situ*) των ανθέων βαμβακιού. Μετά την χρώση πραγματοποιήθηκε οπτική ανίχνευση – εντοπισμός κηλίδων μπλέ χρώματος απο την δράση του ενζύμου, κάτω απο στερεοσκόπιο (μη διαθέσιμες φωτογραφίες) στα δείγματα.

Όλοι οι ιστοί που εξετάστηκαν ήταν λευκοί, μη κεχρωσμένοι μιας και οι φυτικές χρωστικές είχαν ήδη εκχυλισθεί. Εντοπίστηκαν κηλίδες χρώματος (1-2 σκοραρίστηκαν ως τέτοιες σε διάφορα σημεία των ιστών. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων ενζυμικής δραστηριότητας στους παροδικά μετασηματισμένους φυτικούς ιστούς δεν επιχειρήθηκε.

Στην περίπτωση των εμβρυακών ιστών το όλο εγχείρημα αποδείχθηκε δύσκολο διότι, οι ελαιοφόροι αδένες που υπάρχουν σε ολόκληρο το σώμα τους έχουν τη μορφή κηλίδων (μαύρου χρώματος) και ο διαχωρισμός τους απο τις κηλίδες μπλέ χρώματος απο την δράση της γλυκουρονιδάσης ήταν αδύνατος κάτω απο το στερεοσκόπιο.

Στα πειράματα με τις διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις της καναμυκίνης και την ευαισθησία που επιδεικνύουν οι τύποι ιστών που χρησιμοποιούνται ως έκφυτα, ο στόχος ήταν ο προσδιορισμός της χαμηλότερης συγκέντρωσης του αντιβιοτικού που παρεμποδίζει την ανάπτυξη ώστε να χρησιμοποιηθεί ως συγκέντρωση επιλογής σε πειράματα γενετικού μετασηματισμού των φυτών.

Μετρήσεις που αφορούν το Σχετικό Νωπό Βάρος (Relative Fresh Weight) των ιστών δεν πραγματοποιήθηκαν. Τα όποια αποτελέσματα είναι προκαταρκτικά και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

3.6. Αναγέννηση φυτών βαμβακιού

Πέρα από τα συνήθη προβλήματα της ιστοκαλλιέργειας από μικροβιακές μολύνσεις κατά την συχνή μεταφορά των εκφύτων σε φρέσκα θρεπτικά υλικά, που αντιμετωπίστηκαν επιτυχώς, το βασικό πρόβλημα της ιστοκαλλιέργειας του βαμβακιού είναι η έντονη παραγωγή φαινολικών ουσιών (εκκρίσεις, τραυματισμοί κατά την απομόνωση) με αποτέλεσμα το μαύρισμα των ιστών και την αναστολή της ομαλής ανάπτυξης των εκφύτων.

Ύστερα από δοκιμές (σακχαρόζη σαν πηγή άνθρακα, συχνότερη μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα, έκφυτα διαφόρων μεγεθών, ειδικό άγαρ ιστοκαλλιέργειας - Gelrite) οδηγήθηκαμε σε μια λίγο-πολύ επιτυχή συνταγή, η οποία και χρησιμοποιήθηκε σαν πλατφόρμα για τα θρεπτικά μέσα ιστοκαλλιέργειας βαμβακιού.

Από τις 8 εμπορικές ποικιλίες βαμβακιού Ελληνικού ενδιαφέροντος με τις οποίες ξεκίνησε αρχικά ο σχεδιασμός του προγράμματος μικροπολλαπλασιασμού για το βαμβάκι επιλέχθηκαν 4 τελικά (ΦΩΤΕΙΝΗ, M1, M2, M3) με βάση προηγούμενες παρατηρήσεις και εκτιμήσεις.

Για όλα τα πειράματα ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν ιδίου τύπου έκφυτα, που τοποθετούνταν σε θρεπτικό υπόστρωμα MSO (η βασική σύσταση MS ανόργανων θρεπτικών συστατικών – B5 Gamborg οργανικών, χωρίς την παρουσία φυτορρυθμιστικών ουσιών).

Παρακάτω εκτός από την εικόνα 8 (φωτογραφία) με τον μάρτυρα (δοχείο χωρίς ανάπτυξη φυτών) και τα αναγεννημένα φυτά (διάφορα αναπτυξιακά στάδια, με ριζικό σύστημα και χωρίς) παρουσιάζονται οι πίνακες αξιολόγησης (5, 6, 7 και 8) κάθε μιας ποικιλίας ξεχωριστά. Προσφέρονται αναλυτικά στοιχεία όπως ο αριθμός και τύπος εκφύτων, η αντίδραση και το ποσοστό επιβίωσης εκφύτων στις εκάστοτε μορφογενετικές συνθήκες καθώς και προσωπικά σχόλια και εκτιμήσεις. Τα στοιχεία που παρατίθενται μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με πληροφορίες για τα αγρονομικά

χαρακτηριστικά της κάθε ποικιλίας στη διαμόρφωση ολοκληρωμένης άποψης, για τη δυνατότητα χρησιμοποίησης της ποικιλίας σε πειράματα γενετικής της τροποποίησης.

Αν και ο αριθμός των βλαστών που εκπύσσονται απο έκφυτα κορυφαίων βλαστικών μεριστωμάτων δεν κρίνεται ικανοποιητικός για την εξ'ολοκλήρου αναγέννηση φυτών (συνολική ικανότητα αναγέννησης της τάξης του 6%, 7 αναγεννημένα φυτά / 120 έκφυτα) φαίνεται ότι τα περισσότερα έκφυτα ανταποκρίνονται θετικά στην συγκέντρωση των 0,1 mg/l της Kin.

Η ανάπτυξη των βλαστών όπου παρατηρήθηκε ήταν αυθόρμητη αντίδραση, η ριζοβόλησή τους όμως είναι προβληματικά χαμηλή και σε υψηλό βαθμό εξαρτώμενη απο το γενότυπο. Αποτελεί ίσως το αδύνατο σημείο του συστήματος.

Τα εμβρυακά μεριστώματα φαίνεται να δίνουν καλύτερα ποσοστά βλαστογένεσης (7 βλαστοί / 40 έκφυτα, στη συγκέντρωση των 3 mg/l της BAP) με προβλήματα και πάλι στη ριζοβόληση.

Όσα φυτά επιβίωσαν της μεταφύτευσης στο θερμοκήπιο (7 συνολικά), επέδειξαν κανονικό φαινότυπο με φυσιολογική ανάπτυξη και έφτασαν στην ενηλικίωση γόνιμα (κανονική άνθηση και παραγωγή σπόρων).

Όσον αφορά την πολλαπλή βλαστογένεση με την βοήθεια της φυτοορμόνης TDZ, αναφέρουμε ότι, σε καμία περίπτωση (~ 120 κορυφαία μεριστώματα/ ποικιλία) και για καμία απο τις 4 δοκιμασθείσες ποικιλίες βαμβακιού δεν παρατηρήθηκαν εκείνοι οι σχηματισμοί στα έκφυτα (νέες καταβολές οφθαλμών μεταξύ των διαφοροποιημένων ιστών του εκφύτου-κορυφαίου οφθαλμού) που με βάση την βιβλιογραφία να δικαιολογούν τον χαρακτηρισμό «επαγωγή πολλαπλής βλαστογένεσης απο επάκριο οφθαλμό». Το μόνο ενθαρρυντικό στοιχείο για περαιτέρω διερεύνηση, που προέκυψε απο τα πειράματα αυτά, προέρχεται απο την παρατήρηση ότι για τις συγκεντρώσεις της φυτοορμόνης TDZ 1 nM και 10 μM σχεδόν όλα τα έκφυτα νεκρώθηκαν ύστερα απο 2 εβδομάδες καλλιέργειας, αφού πρώτα απώλεσαν το πράσινο χρώμα τους. Αντίθετα για τις συγκεντρώσεις των 100 nM και 1 μM κανένα έκφυτο δεν επέδειξε απώλεια πράσινου χρώματος μέσα στις 2 εβδομάδες.

Φαίνεται δηλαδή ότι η απόκριση μεριστωματικών ιστών βαμβακιού στον χειρισμό με TDZ είναι εξαρτώμενη της δόσης (stimulation is a dose-dependent response).

Ο προσδιορισμός της κρίσιμης συγκέντρωσης που θα φέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα (αυξημένο ποσοστό βλαστών / έκφυτο) και ίσως η χρησιμοποίηση λανθανόντων μασχαλαίων οφθαλμών ή εμβρυακών μεριστωμάτων να μπορέσει να δώσει τα αποτελέσματα ώστε το σύστημα της πολλαπλής οργανογένεσης να έχει εφαρμογή στο γενετικό μετασχηματισμό του βαμβακιού.

Συμπερασματικά, το σύστημα αναγέννησης του βαμβακιού, στην τρέχουσα μορφή του, δεν θα μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ως έχει σε πειράματα γενετικής τροποποίησης και επιλογής μετασχηματισμένων φυτών (στόχος τα 30 ανεξάρτητα μετασχηματισμένα-αναγεννημένα φυτά ως υλικό για την κρίσιμη φάση της επιλογής γονοτύπου). Διότι, από τα συνολικά 400 (120 σε Kin, 40 σε BAP και 240 σε TDZ) έκφυτα βαμβακιού που τοποθετήθηκαν σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας τον περασμένο χρόνο 14 έδωσαν έκπτυξη σε βλαστούς επιθυμητού μεγέθους και μόνο 7 φυτά επιβίωσαν τελικά για να φτάσουν στην ώριμη ηλικία. Συνιστάται όμως, να αυξηθεί ο αριθμός των εκφύτων ανά καλλιέργεια (κορυφαία μεριστώματα-Kin, εμβρυακά μεριστώματα- BAP) να φτάσει τα 1000 ώστε και στατιστικά τα συμπεράσματα να είναι περισσότερο ασφαλή (scale-up των πειραμάτων). Για να γίνει αυτό όμως, είναι απαραίτητη η συμμετοχή εξειδικευμένου εργατικού προσωπικού για την διαχείριση του όγκου της χειρωνακτικής εργασίας που πρέπει να επιτελεσθεί.



Εικόνα 8: Αναγεννημένα φυτά βαμβακιού

Πίνακας 5: Μορφογενετικές αποκρίσεις της ποικιλίας ΦΩΤΕΙΝΗ.

Φωτεινή	Ασηπτική Βλάστηση σπόρων	Επαγωγή βλαστογένεσης	Επιμήκυνση εκπτυχθέντων βλαστών	Ριζοβόληση	Μεταφορά στο θερμοκήπιο	Ποσοστό επιβίωσης (αριθμός αναγεννημένων φυτών/αριθμός αρχικών εκφύτων
Χαρακτηριστικά μέσου ιστοκαλλιέργειας	Βασική σύσταση MS-B5Gamborg	Kin 0,1 mg/l	Kin 0,01 mg/l	½ Βασικής σύστασης MS-B5Gamborg, 0,3% E.A.	Μίγμα κομπόστας / τύρφης / περλίτη	
Αριθμός κορυφαίων μεριστωμάτων / αριθμός σπόρων	27/30	Σχεδόν 30 τοποθετήθηκαν σε συνθήκες επαγωγής βλαστογένεσης	4 κορυφαία μεριστώματα εκπύχθηκαν σε αναπτυσσόμενους βλαστούς	4 νεοαναπτυχθέντες βλαστοί τοποθετήθηκαν σε συνθήκες επαγωγής ριζογένεσης	4 νεοαναπτυχθέντες βλαστοί μεταφέρθηκαν σε συνθήκες θερμοκηπίου	2 μοσχεύματα επέζησαν της μεταφύτευσης.
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ (αριθμός των εκφύτων που παρουσίασαν επιθυμητό αποτέλεσμα /αρχικός αριθμός εκφύτων	(90%). Εύκολα, υγιές αρχικό υλικό	Μόλις 4 απο τα σχεδόν 30 σκοραρίστηκαν σαν θετική αντίδραση μέσα στις 2-3 πρώτες εβδομάδες	τέσσερεις απο τα σχεδόν 30 επιμηκύνθηκαν κατά λίγα εκατοστά τις επόμενες 2-3 εβδομάδες	Ενας νεαρός βλαστός σκοραρίστηκε ως θετική αντίδραση μέσα στις τελευταίες εβδομάδες ιστοκαλλιέργειας	τρεις χωρίς εμφανές ριζικό σύστημα και 1 με αναπτυσσόμενη πρωτογενή ρίζα	Τα 2 (2/~30) φυτά έφτασαν κανονικά στην ωριμότητα, φυσιολογική ανάπτυξη
Αριθμός εμβρυακών ιστών που απομονώθηκαν	Μεταξύ 10-20	Σε 3mg/l BAP		Σε McD. Stewart & Hsu μέσο με 0,01 mg/l NAA	Δεν μεταφέρθηκαν	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	Εύκολα, υγιές αρχικό υλικό	3-4 εβδομάδες για την έκπτυξη των πρώτων φύλλων	Χρονοβόρα, χωρίς σημαντικά αποτελέσματα, λίγα εκατοστά	Δύσκολη έως αδύνατη	2/10 έβρυσά έδωσαν μοσχεύματα	2 βλαστοί με ανεπτυγμένα φύλλα χωρίς όμως ριζικό σύστημα προέκυψαν απο την καλλιέργεια εμβρύων
Πολλαπλή Οργανογένεση	1nM, 100nM, 1μM, 10μM TDZ δοκιμάστηκαν	30 κορυφαία μεριστώματα -έκφυτα για κάθε συγκέντρωση	Δεν παρατηρήθηκε για κανένα απο τα έκφυτα σχηματισμός και έκπτυξη περισσότερων βλαστών			Για τις συγκεντρώσεις 1nM & 10μM TDZ η πλειονότητα των εκφύτων οδηγήθηκε σε νέκρωση

Πίνακας 6: Μορφογενετικές αποκρίσεις της ποικιλίας M1.

M1	Ασηπτική βλάστηση σπόρων	Επαγωγή βλαστογένης	Επιμήκυνση εκπτυχθέντων βλαστών	Ριζοβόληση	Μεταφορά στο θερμοκήπιο	Ποσοστό επιβίωσης (αριθμός αναγεννημένων φυτών/αριθμός αρχικών εκφύτων
Χαρακτηριστικά μέσου ιστοκαλλιέργειας	Βασική σύσταση MS-B5Gamborg	Kin 0,1 mg/l	Kin 0,01 mg/l	½ Βασικής σύστασης MS-B5Gamborg, 0,3% E.A.	Μίγμα κομπόστας/ τύρφης/ περλίτη	
Αριθμός κορυφαίων μεριστωμάτων που απομονώθηκαν/ αριθμός σπόρων	25/30	Σχεδόν 30 τοποθετήθηκαν σε συνθήκες επαγωγής βλαστογένεσης	5 κορυφαία μεριστώματα εκπύχθηκαν σε αναπτυσσόμενους βλαστούς	5 νεοαναπτυχθέντες βλαστοί τοποθετήθηκαν σε συνθήκες επαγωγής ριζογένεσης	5 νεοαναπτυχθέντες βλαστοί μεταφέρθηκαν σε συνθήκες θερμοκηπίου	5 επέζησαν της μεταφύτευσης.
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ (αριθμός των εκφύτων που παρουσίασαν επιθυμητό αποτέλεσμα / αριθμός αρχικών εκφύτων	(83%). Εύκολα, υγιές αρχικό υλικό	5 απο τα σχεδόν 30 σκοραρίστηκαν σαν θετική αντίδραση μέσα στις 2-3 πρώτες εβδομάδες	5 απο τα σχεδόν 30 επιμήκυνθηκαν κατά λίγα εκατοστά τις επόμενες 2-3 εβδομάδες	Και τα 5 σκοραρίστηκαν σαν θετική αντίδραση.	Πέντε φυτά με πρωτογενές ριζικό σύστημα μεταφέρθηκαν	Τα 5 (5/~30) φυτά έφτασαν κανονικά στην ωριμότητα, φυσιολογική ανάπτυξη
Αριθμός εμβρυακών ιστών που απομονώθηκαν	Μεταξύ 10-20	Σε 3mg/l BAP		Σε McD. Stewart & Hsu μέσο με 0,01mg/l NAA	Δεν μεταφέρθηκαν	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	Εύκολα, υγιές αρχικό υλικό	3-4 εβδομάδες για την έκπτυξη των πρώτων φύλλων	Χρονοβόρα, χωρίς σημαντικά αποτελέσματα ,λίγα εκατοστά	Δύσκολη έως αδύνατη	3/10 έμβρυα έδωσαν μοσχεύματα	3 βλαστοί με ανεπτυγμένα φύλλα χωρίς ριζικό σύστημα προέκυψαν απο την καλλιέργεια εμβρύων
Πολλαπλή Οργανογένεση	1nM, 100nM, 1μM, 10μM TDZ δοκιμάστηκαν	30 κορυφαία μεριστώματα-έκφυτα για κάθε συγκέντρωση	Δεν παρατηρήθηκε για κανένα απο τα έκφυτα σχηματισμός και έκπτυξη περισσότερων βλαστών			Για τις συγκεντρώσεις 1nM & 10μM TDZ η πλειονότητα των εκφύτων οδηγήθηκε σε νέκρωση

Πίνακας 7: Μορφογενετικές αποκρίσεις της ποικιλίας M2.

M2	Ασηπτική βλάστηση σπόρων	Επαγωγή βλαστογένεσης	Επιμήκυνση εκπτυχθέντων βλαστών	Ριζοβόληση	Μεταφορά στο θερμοκήπιο	Ποσοστό επιβίωσης (αριθμός αναγεννημένων φυτών/αριθμός αρχικών εκφύτων)
Χαρακτηριστικά μέσου ιστοκαλλιέργειας	Βασική σύσταση MS-B5Gamborg	Kin 0,1 mg/l	Kin 0,01 mg/l	½ Βασικής σύστασης MS-B5Gamborg, 0,3% E.A.	Μίγμα κομπόστας/ τύρφης/ περλίτη	
Αριθμός κορυφαίων μεριστωμάτων που απομονώθηκαν/ αριθμός σπόρων	5/30	Μόνο 5 τοποθετήθηκαν σε συνθήκες επαγωγής βλαστογένεσης				
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ (αριθμός των εκφύτων που παρουσίασαν επιθυμητό αποτέλεσμα / αριθμός αρχικών εκφύτων)	(~17%). Εύκολα, υγιές αρχικό υλικό	Ουδένα δεν είχε θετική αντίδραση μέσα στις 4 εβδομάδες καλλιέργειας				0/30 (0% επιβίωση)
Αριθμός εμβρυακών ιστών που απομονώθηκαν	Μεταξύ 10-20	Σε 3mg/l BAP		Σε McD. Stewart & Hsu μέσο με 0.01mg/l NAA	Δεν μεταφέρθηκαν	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	Εύκολα, υγιές αρχικό υλικό	3-4 εβδομάδες για την έκπτυξη των πρώτων φύλλων	Χρονοβόρα, χωρίς σημαντικά αποτελέσματα, λίγα εκατοστά	Δύσκολη έως αδύνατη	1/10 έμβρυα έδωσαν μοσχεύματα	1 βλαστός με ανεπτυγμένα φύλλα χωρίς όμως ριζικό σύστημα προέκυψαν από την καλλιέργεια εμβρύων
Πολλαπλή Οργανογένεση	1nM, 100nM, 1μM, 10μM TDZ δοκιμάστηκαν	30 κορυφαία μεριστώματα-έκφυτα για κάθε συγκέντρωση	Δεν παρατηρήθηκε για κανένα από τα έκφυτα σχηματισμός και έκπτυξη περισσότερων βλαστών			Για τις συγκεντρώσεις 1nM & 10μM TDZ η πλειονότητα των εκφύτων οδηγήθηκε σε νέκρωση

Πίνακας 8: Μορφογενετικές αποκρίσεις της ποικιλίας M3.

M3	Ασηπτική βλάστηση σπόρων	Επαγωγή βλαστογένης	Επιμήκυνση εκπτυχθέντων βλαστών	Ριζοβόληση	Μεταφορά στο θερμοκήπιο	Ποσοστό επιβίωσης (αριθμός αναγεννημένων φυτών/αριθμός αρχικών εκφύτων
Χαρακτηριστικά μέσου ιστοκαλλιέργειας	Βασική σύσταση MS-B5Gamborg	Kin 0,1 mg/l	Kin 0,01 mg/l	½ Βασικής σύστασης MS-B5Gamborg, 0,3% E.A.	Μίγμα κομπόστας/ τύρφης/ περλίτη	
Αριθμός κορυφαίων μεριστωμάτων που απομονώθηκαν/ αριθμός σπόρων	6/30	6 τοποθετήθηκαν σε συνθήκες επαγωγής βλαστογένεσης				.
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ (αριθμός των εκφύτων που παρουσίασαν επιθυμητό αποτέλεσμα/ αριθμός αρχικών εκφύτων)	(~20%). Εύκολα, υγιές αρχικό υλικό	Καμία θετική αντίδραση μέσα στις 2-3 πρώτες εβδομάδες				0/30 (0% επιβίωση)
Αριθμός εμβρυακών ιστών που απομονώθηκαν	Μεταξύ 10-20	Σε 3mg/l BAP		Σε McD. Stewart & Hsu μέσο με 0,01mg/l NAA	Δεν μεταφέρθηκαν	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	Εύκολα, υγιές αρχικό υλικό	3-4 εβδομάδες για την έκπτυξη των πρώτων φύλλων	Χρονοβόρα, χωρίς σημαντικά αποτελέσματα, λίγα εκατοστά	Δύσκολη έως αδύνατη	1/10 έμβρυα έδωσαν μοσχεύματα	1 βλαστός με ανεπτυγμένα φύλλα χωρίς όμως ριζικό σύστημα προέκυψαν από την καλλιέργεια εμβρύων
Πολλαπλή Οργανογένεση	1nM, 100nM, 1μM, 10μM TDZ δοκιμάστηκαν	30 κορυφαία μεριστώματα- έκφυτα για κάθε συγκέντρωση	Δεν παρατηρήθηκε για κανένα από τα έκφυτα σχηματισμός και έκπτυξη περισσότερων βλαστών			Για τις συγκεντρώσεις 1nM & 10μM TDZ η πλειονότητα των εκφύτων οδηγήθηκε σε νέκρωση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.

Σήμερα υπάρχουν δύο συστήματα ιστοκαλλιέργειας για την αναγέννηση φυτών βαμβακιού «το σύστημα της Σωματικής Εμβρυογένεσης» και «το σύστημα του Μικροπολλαπλασιασμού» (86). Το περισσότερο χρησιμοποιούμενο από τα δυο είναι το πρώτο, έχει όμως έναν σημαντικό περιορισμό όσον αφορά την επιτυχία του σε Ελληνικές ποικιλίες βαμβακιού (η αναγέννηση μέσω φάσης κάλλου και σωματικής εμβρυογένεσης μέχρι τώρα είχε επιτυχία μόνο σε ποικιλίες τύπου Coker, δεν περιλαμβάνεται η πλειονότητα των σύγχρονων «βελτιωμένων» ποικιλιών βάμβακος που καλλιεργούνται στις περισσότερες βαμβακοπαραγωγικές χώρες, μεταξύ αυτών και οι Ελληνικού ενδιαφέροντος) (70).

Το σύστημα του Μικροπολλαπλασιασμού έχει το πλεονέκτημα ότι είναι περισσότερο ανεξάρτητο (πλήν του σταδίου της ριζοβόλησης) από το γενότυπο και επιτρέπει έτσι την γρηγορότερη και ευκολότερη ανάκτηση σειρών φυτών (23).

Η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται σ' αυτή την εργασία, χρησιμοποιεί κύτταρα του κορυφαίου και εμβρυακών μεριστωμάτων νεαρής ηλικίας φυτών βαμβακιού *in vitro* με σκοπό την αναγέννηση ολόκληρων φυτών Ελληνικών ποικιλιών χωρίς τη μεσολάβηση φάσης κάλλου.

Η συνολική ικανότητα αναγέννησης φυτών βαμβακιού, από έκφυτα κορυφαία μεριστώματα στη συγκέντρωση των 0,1 mg/l Kin, που επιτεύχθηκε μετά από την πάροδο χρονικού διαστήματος 6- 10 εβδομάδων ήταν της τάξης του 6% (7 πλήρως αναγεννημένα φυτά / 120 έκφυτα). Τα σημαντικότερα προβλήματα αφορούν το στάδιο της ριζοβόλησης. Το ποσοστό επαγωγής και έκπτυξης βλαστών για τα εμβρυακά μεριστώματα (δεν σημειώθηκε ποσοστό ριζογένεσης) είναι στο 20 % περίπου (7 βλαστοί / 40 έκφυτα). Η συνολική όμως, ικανότητα αναγέννησης φυτών από έκφυτα εμβρυακά μεριστώματα αναμένεται να είναι χαμηλότερη (προβλέπεται στο επίπεδο των κορυφαίων μεριστωμάτων) αν και όταν επιτευχθεί ριζογένεση.

Ένα τέτοιο ποσοστό αναγέννησης συμφωνεί με αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας (23, 24, 80) για επίτευξη ανάλογων ποσοστών σε ξένες ποικιλίες καλλιεργούμενου βαμβακιού.

Οι μεθοδολογίες γενετικής τροποποίησης που έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία στο βαμβάκι είναι: «η μέθοδος του Αγροβακτηρίου» και «η μέθοδος του Βομβαρδισμού Σωματιδίων» (71).

Επιλέγοντας ένα πρόγραμμα μικροπολλαπλασιασμού σαν αυτό που περιγράφηκε για την αναγέννηση φυτών βαμβακιού, ο στόχος για τον γενετικό μετασχηματισμό των οργανωμένων φυτικών μεριστωμάτων του είναι τα L1 (λιγότερες πιθανότητες για σταθερό μετασχηματισμό) και τα L2 και L3 (περισσότερες πιθανότητες σταθερού μετασχηματισμού) μεριστωματικά κυτταρικά στρώματα (24, 80) (βλέπε Εικόνα 6 και Εικόνα 7 Παραρτήματος).

Είναι φανερό ότι μετά τον γενετικό τους μετασχηματισμό οι μεριστωματικοί ιστοί θα είναι σχεδόν πάντοτε χμαιοειδείς. Κάποια δηλαδή, κύτταρα θα έχουν μετασχηματιστεί και κάποια όχι, ανάλογα με την θέση τους στον ιστό και τον παράγοντα μετασχηματισμού. Καταλήγουμε λοιπόν να έχουμε έναν ιστό με κύτταρα διαφορετικού τύπου (μετασχηματισμένα και μη) που έχουν την δυνατότητα να διαιρούνται, παράγοντας όμοιά τους (ίδιο γενετικό υπόβαθρο), μεταξύ των οποίων όσο προχωρά η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση του ιστού εκδηλώνεται ανταγωνισμός ως προς την τελική επικράτηση στο παραγόμενο φυτικό σώμα και το τι είδους φυτό θα καταφέρουμε να αναγεννήσουμε. Εδώ ακριβώς είναι δυνατή η παρέμβαση *in vitro* με χειρισμούς με φυτορρυθμιστικές ουσίες των χμαιοειδών μεριστωμάτων προς την κατεύθυνση της επικράτησης των μετασχηματισμένων κυττάρων της επαγωγής και έκπτυξης μη προϋπαρχόντων οφθαλμών και πολλαπλής οργανογένεσης από μετασχηματισμένα μεριστωματικά κύτταρα. Έτσι αυξάνονται οι πιθανότητες αναγέννησης σταθερά μετασχηματισμένων φυτών από χμαιοειδείς μεριστωματικούς ιστούς (25).

Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία το ποσοστό επιτυχίας του μετασχηματισμού φυτών βαμβακιού (ξένων ποικιλιών) μέσω της διαδικασίας αναγέννησης από μεριστωματικά κύτταρα συνδυαζόμενη με την μέθοδο διχοτόμησης των μεριστωματικών ιστών (για έκθεση των L2 και L3 κυτταρικών στρωμάτων) υπολογίζεται στο επίπεδο του 0,1 % ή και μεγαλύτερο ανεξάρτητα της μεθόδου μετασχηματισμού (86).

Το ενδιαφέρον μας εστιάστηκε στην τροποποίηση του βιοσυνθετικού μονοπατιού των φλαβονοειδών σε πειράματα γενετικής τροποποίησης φυτών ποικιλιών βαμβακιού με την χρήση κατάλληλων «ετερόλογων» γονιδίων για ένζυμα των βιοχημικών αντιδράσεων-κλειδιών, για την επίτευξη φυσικού χρώματος στο βαμβάκι και την μετατροπή της άχρωμης ίνας σε έγχρωμη. Κάποια απο τα γονίδια αυτά (δυναδικοί φορέας) μεταφέρθηκαν επιτυχώς με την εφαρμογή δυο μεθόδων (βακτηρικής σύζευξης και ηλεκτοπόρωσης) σε αγροβακτηριακά στελέχη χωρίς να πραγματοποιηθούν μολύνσεις εκφύτων, τα οποία στη συνέχεια θα εισέρχονταν στο σχεδιασμένο πρόγραμμα μικροπολλαπλασιασμού για την αναγέννηση των φυτών.

Αντ' αυτού διερευνήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής μεθόδου παροδικής έκφρασης γονιδίων σε φυτά βαμβακιού με τη μέθοδο της «αγροέγχυσης». Η μέθοδος αποδείχθηκε ελπιδοφόρα στα κοτυληδονόφυλλα νεαρών φυτών βαμβακιού.

Πιστεύουμε ότι για τον επιτυχή γενετικό μετασχηματισμό και παραγωγή έγχρωμης ίνας στο βαμβάκι θα πρέπει να ξεπεραστούν μια σειρά από τεχνικά προβλήματα που σχετίζονται με: α) την ανάγκη ταυτόχρονης εισαγωγής και έκφρασης περισσότερων του ενός γονιδίων του συγκεκριμένου βιοσυνθετικού μονοπατιού, β) την ιστοειδική έκφραση γονιδίων «χρώματος» στην ίνα και όχι και στους υπόλοιπους ιστούς.

Για τον πρώτο σκοπό θα πρέπει να κατασκευαστούν ειδικοί φορείς (πολυγονιδιακές κασσέτες), για τον δεύτερο σκοπό θα πρέπει να απομονωθούν ειδικοί υποκινητές (promoters) που θα λειτουργούν ενεργά κατά προτίμηση στη διάρκεια της μορφογένεσης της ίνας. Ήδη είναι γνωστοί δυο τέτοιοι υποκινητές, ο E6 που έχει ήδη χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε πειράματα γενετικής τροποποίησης βαμβακιού με στόχο την παραγωγή πολυϋδρόξυβουτυρικού οξέος στην ίνα (με το γονίδιο *pha*, της συνθέτασης του πολυϋδρόξυαλκανοϊκού) και την παραγωγή βιοπλαστικής ίνας βαμβακιού (39, 49) και ο FbL 2A που αφορά την βιοσύνθεση κυτταρίνης στην ίνα και έχει χρησιμοποιηθεί σε παρόμοιες προσπάθειες γενετικής τροποποίησης (73).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agrawal D.C., Banerjee A.K., Kolala R.R., Dhage A.B., Kulkarni A.V., Nlawade S.M., Hazra S. and Krishnamurthy K.V. 1997. In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.* 16:647-652.
2. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., More D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (eds) 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Sons, WY.
3. Bacteriological Analytical Manual online for M69 King's B Medium at <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/m69.html>.
4. Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K-H. (eds.). 1992. *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Second edition. Volume III. Chapter 162. Schroth M.N., Hildebrand D.C. and Panopoulos N. "Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads". pp.3104-3130. Springer-Verlag.*
5. Barton M.K. 1998. Cell type specification and self-renewal in the vegetative shoot apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 37-42.
6. Bowman J.L. and Eshed Y. 2000. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant Sci.* 5(3): 110-115.
7. Callahan F.E. and Mehta A.M. 1991. Alternative approach for consistent yields of total genomic DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 9(3): 252-261.
8. Chaudhry B., Yasmeen A., Husnain T. and Riazuddin S. 1999. Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17: 1-7.
9. Chlan C.A., Lin J., Cary J.W. and Cleveland T.E. 1995. A procedure for biolistic transformation and regeneration of transgenic cotton from meristematic tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13(1): 31-37.
10. Chopra V.L., Malik V.S., Bhat S.R. 1999. *Applied Plant Biotechnology. Chapter 6. "Application of recombinant DNA to floriculture", pp. 181-235. Science Publishers, Inc.*

11. Clark S.E. 2001. Cell signaling at the shoot meristem. *Nature Reviews/Molecular Cell Biology* 2:276-284.
12. Cotton Biotechnology- Resource Series- Seed Biotechnology Center at UC Davis at http://sbc.ucdavis.edu/resource/cotton_biotech.htm.
13. Dabo M.S., Mitchell D.E., Melcher U. 1993. A method for isolation of nuclear DNA from cotton (*Gossypium*) leaves. *Anal Biochem.* 210: 34-38.
14. Delmer D.P., Holland D. 2000. Method for assaying genetic attributes in cotton fiber cells. U.S. Patent No. 6,166,301.
15. Dixon R.A. and Gonzales R.A. (Eds). 1998. *Plant Cell Culture. A Practical Approach. Second Edition. Chapter 6. "Micropropagation"*. Oxford University Press, Walton str. Oxford.
16. Dixon R.A. and Steele C.L. 1999. Flavonoids and isoflavonoids- a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4: 394-400.
17. Djataev S.A., Nasirova G.B., Holmuratov E.G., Jakubov M.D. and Abdugarimov A. 2000. Plant regeneration and transformation from cotton apical meristems. The Inter-regional Cooperative Research Network on Cotton. Joint Workshop 20-24 September 2000. Adana, Turkey.
18. Draper J., Scott R., Armitage P. and Walden R. 1988. *Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual*. Alden Press, Oxford, Great Britain.
19. Firoozabady E., DeBoer D.L., Merlo D.J., Halk E.L., Amerson L.N., Rashka K.E. and Murray E.E. 1987. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Mol. Biol.* 10: 105-116.
20. Galum E. and Breiman A. 1997. *Transgenic plants*. Imperial College Press.
21. Gamborg O.L., Miller R.A. and Ojima K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-157.
22. Geneve R.L. Preece J.E. and Merkle S.A. (eds.). 1997. *Biotechnology of ornamental plants. Chapter 15. "Flower Colour"*. pp. 259-285. CAB INTERNATIONAL.
23. Gould J. and Magallanes-Cedeno M. 1998. Adaptation of cotton shoot apex culture to Agrobacterium-Mediated transformation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16: 1-10.

24. Gould J., Devey M., Hasegawa O., Ulian E., Peterson G. and Smith R.H. 1991. Transformation of *Zea mays* L., using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol.* 95: 426-434.
25. Gupta S.K., Srivastava A.K., Singh P.K. and Tuli R. 1997. In vitro proliferation of shoots and regeneration of cotton. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51: 149-152.
26. Hall R.D. (Ed). 1997. *Methods in Molecular Biology. Vol. 111: Plant Cell Culture Protocols*. Chapter 1, pp.1-18 and Chapter 11, pp.115-125. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
27. Hamdy E. 1994. Cotton production prospects for the decade to 2005: a global overview. World Bank technical paper no 231.
28. Heldt H-W. 1999. *Plant biochemistry & molecular biology*. Oxford University Press. Oxford. U.K.
29. Hellens R., Mullineaux P., Klee H. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5(10): 446-451.
30. Hemphill J.K., Maier C.G.A., Chapman K.D. 1998. Rapid in-vitro plant regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.* 17: 273-278.
31. Hoekema A., Hirsch P.R. Hooykaas P.J.J. and Schilperoort R.A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180.
32. Hofgen R. and Willmitzer L. 1990. Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci.* 66: 221-230.
33. Holmuratov E.G., Nasirova G.B., and Djataev S.A. 2000. The induction of callus-forming and regenerating process in different cotton explants. The Inter-regional Cooperative Research Network on Cotton. Joint Workshop 20-24 September 2000. Adana, Turkey.
34. Huetteman C.A. and Preece J.E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 105-119.
35. Hussey G., Johnson R.D. and Warren S. 1989. Transformation of meristematic cells in the shoot apex of cultured pea shoots by *Agrobacterium tumefaciens* and *A.rhizogenes*. *Protoplasma* 148: 101-105.

36. Jackson R.W., Athanassopoulos E., Tsiamis G., Mansfield J.W., Sesma A., Arnold D.L., Gibbon M.J., Murillo J., Taylor J.D., Vivian A. 1999. Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 10857-10880.
37. Jefferson R.A. 1988. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405.
38. Jiang C-X., Wright R.J., El-Zik K. and Paterson A.H. 1998. Polyploid formation created unique avenues for response to selection in *Gossypium* (cotton). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 4419-4424.
39. John M.E. 1996. Structural characterization of genes corresponding to cotton fiber mRNA, E6: reduced E6 protein in transgenic plants by antisense gene. Plant Mol. Biol. 30: 297-306.
40. John M.E. and Keller G. 1996. Metabolic pathway engineering in cotton: biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12768-12773.
41. Jones H. (ed). 1997. *Methods in Molecular Biology. Vol. 49: Plant Gene Transfer and Expression Protocols. Chapter 10. The β -Glucuronidase (gus) reporter gene system.* pp.125-141. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
42. Kaneda Y., Tabei Y., Nishimura S., Harada K., Akihama T., Kitamura K. 1997. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. Plant Cell Rep. 17: 8-12.
43. Kerstetter R.A. and Hake S. 1997. Shoot meristem formation in vegetative development. Plant Cell 9: 1001-1010.
44. Kim H.J. and Triplett B.A. 2001. Cotton fiber growth in planta and in vitro. Models for plant cell elongation and cell wall biogenesis. Plant Physiol. 127: 1361-1366.
45. Kumar S., Sharma P., Pental D. 1998. A genetic approach to in vitro regeneration of non-regenerating cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. Plant Cell Rep. 18: 59-63.
46. Lee M.H. and Nicholson P. 1997. Isolation of genomic DNA from plant tissues. Nat. Biotechnol. 15:805-806.

47. Li H., Luo J., Hemphill J.K., Wang J-T. and Gould J.H. 2001. A rapid and high yielding DNA miniprep for Cotton (*Gossypium* spp.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 1-5.
48. Luo J. and Gould J.H. 1999. In vitro shoot-tip grafting improves recovery of cotton plants from culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 57:211-213.
49. Maliyakal J. 1997. Transgenic cotton plants producing heterologous polyhydroxy(e) butyrate bioplastic. U.S. Patent No. 5,602,321.
50. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring harbor, NY.
51. Mc Cabe D. and Martinell B.J. 1993. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *Bio/Technol.* 11: 596-598.
52. McD. Stewart J. and Hsu C.L. 1977. In-ovulo embryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* 137: 113-117.
53. McD. Stewart J. and Zhang J. 2000. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. *J. Cotton Sci.* 4: 193-201.
54. Medford J.I. 1992. Vegetative apical meristems. *Plant Cell* 4: 1029-1039.
55. Mersereau M., Pazour G.J. and Das A. 1990. Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene* 90: 149-151.
56. Mol J.N.M., Holton T.A. and Koes R.E. 1995. Floriculture: genetic engineering of commercial traits. *Trends Biotechnol.* 13: 350-355.
57. Morre J.L., Permingeat H.R., Romagnoli M.V., Heisterborg C.M., Vallejos R.H. 1998. Multiple shoot induction and plant regeneration from embryonic axes of cotton. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54: 131-136.
58. Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
59. Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth of and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
60. Pan M.J. and van Staden J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture - A review. *Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
61. Pan M.J. and van Staden J. 1999. Effect of activated charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. *Plant Growth Regulation* 29: 135-141.

62. Paterson A.H., Brubaker C.L. and Wendel J.F. 1993. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11(2): 122-127.
63. Permingeat H.R., Romagnoli M.V. and Vallejos R.H. 1998. A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16: 1-6.
64. Potrykus I. 1990. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiol. Plant.* 79: 125-134.
65. Potrykus I. 1991. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 205-225.
66. Rajasekaran K. 1996. Regeneration of plants from cryopreserved embryogenic cell suspension and callus cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.* 15: 859-864.
67. Rajasekaran K., Grula J.W. and Anderson D.M. 1996. Selection and characterization of mutant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cell lines resistant to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Plant Sci.* 119: 115-124.
68. Rajasekaran K., Grula J.W., Hudspeth R.L., Pofelis S. and Anderson D.M. 1996. Herbicide-resistant Acala and Coker cottons transformed with a native gene encoding mutant forms of acetohydroxyacid synthase. *Mol. Breed.* 2: 307-319.
69. Rajasekaran K., Hudspeth R.L., Cary J.W., Anderson D.M., Cleveland T.E. 2000. High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 19: 539-545.
70. Rangan T.S. 1993. Regeneration of cotton. U.S. Patent No. 5,244,802.
71. Reichert N.A., Lim T-K, Young M.M. 1999. Method for transformation of cotton and kenaf and organogenic regeneration. U.S. Patent No. 5,998,207.
72. Reinisch A.J. Dong J-M, Brubaker C.L., Stelly D.M., Wendel J.F. and Paterson A.H. 1994. A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. *Genetics* 138: 829-847.

73. Rinehardt J.A., Petersen M.W. and John M.E. 1996. Tissue-specific and developmental regulation of cotton gene FbL2A. Demonstration of promoter activity in transgenic plants. *Plant Physiol.* 112: 1331-1341.
74. Ruan Y-L, Llewellyn D.J. and Furbank R.T. 2001. The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K⁺ transporters and expansin. *Plant Cell* 13: 47-60.
75. Saeed N.A., Zafar Y. and Malik K.A. 1997. A simple procedure of *Gossypium* meristem shoot tip culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51: 201-207.
76. Satyavathi V.V., Prasad V., Lakshmi G., Lakshmi Sita G. 2002. High efficiency transformation protocol for three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 162: 215-223.
77. Shirley B.W. 1996. Flavonoid biosynthesis: “new” functions for an “old” pathway. *Trends Plant Sci.* 1: 377-382.
78. Smith C.W, Cothren J.T. (eds.). 1999. *Cotton: origin, history, technology and production*. Wiley series in crop science. John Wiley, NY.
79. Smith R.H. 2000. *Plant tissue culture. Techniques and experiments. Second edition*. Academic press.
80. Smith R.H., Gould J.H., Ulian E. 1992. Method for transforming plants via the shoot apex. U.S. Patent No. 5,164,310.
81. Srivatanakul M., Park S.H., Sanders J.R., Salas M.G. and Smith R.H. 2000. Multiple shoot regeneration of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system. *Plant Cell Rep.* 19: 1165-1170.
82. Strickland S.G. 1998. Cotton transformation. U.S. Patent No. 5,846,797.
83. Sunilkumar G. and Rathore K.S. 2001. Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. *Mol. Breed.* 8: 37-52.
84. Tsiamis G., Mansfield J.W., Hockenhull R., Jackson R.W., Sesma A., Athanassopoulos E., Bennett M.A., Stevens C., Vivian A., Taylor J.D. and Murillo J. 2000. Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to avrPphF in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J.* 19(13): 3204-3214.

85. Umbeck O., Johnson G., Barton K., and Swain W. 1987. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Bio/Technol.* 5: 263-266.
86. Wilkins T.A., Rajasekaran K. and Anderson D.M. 2000. Cotton biotechnology. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19 (6): 511-550.
87. Wirth R. Friesenegger A. and Fiedler S. 1989. Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electrororation. *Mol. Gen. Genet.* 216: 175-177.
88. Zapata C., Park S.H., El-Zik K.M., Smith R.H. 1999. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex. *Theor. Appl. Genet.* 98: 252-256.
89. Zapata C., Srivatanakul M., Park S.H., Lee B.M., Salas M.G. and Smith R.H. 1999. Improvements in shoot apex regeneration of two fiber crops: cotton and kenaf. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 56: 185-191.
90. Zhang B-H., Liu F., Yao C-B. 2000. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 60: 89-94.
91. Αυγουλάς Χ. 1995. *Το βαμβάκι και η καλλιέργειά του*. Εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
92. Καράταγλης Σ.Σ. 1999. *Φυσιολογία Φυτών*. Κεφ. 10. Δευτερογενείς μεταβολίτες. Σελ.365-427. Εκδόσεις ART OF TEXT.
93. Ταμπακάκη Α. 1999. Μοριακή και βιοχημική μελέτη πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* και διερεύνηση του ρόλου τους στην αντίδραση υπερευαισθησίας των φυτών. Διδακτορική Διατριβή. Τμήμα Βιολογίας. Πανεπιστήμιο Κρήτης.
94. Ταμπακάκη Α., Μπαστάκη Μ., Πανόπουλος Ν. 2001. Οι κώδικες μοριακής επικοινωνίας μεταξύ των φυτοπαθογόνων βακτηρίων και φυτών και οι εφαρμογές τους στη βιοτεχνολογία της φυτοπροστασίας. Πρακτικά Ημερίδας με θέμα «Αγροχημικά στο θερμοκήπιο: Σύγχρονες τάσεις». Γεωτεχνικό Επιμελητήριο, Παράρτημα Κρήτης.
95. Χατζόπουλος Π. 2001. *Βιοτεχνολογία φυτών*. Εκδόσεις Έμβρυο.
96. Χρηστίδης Β.Γ. 1965. *Το Βαμβάκι*. Κεφ.5 σελ.6-113, Κεφ.15 σελ.419-448. Εκδόσεις Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.