

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΣΩΜΑΤΙΚΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΓΕΝΟΣ *SOLANUM*  
ΜΕΣΩ ΣΥΝΤΗΞΗΣ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΟΥ ΑΓΓΕΛΟΥ ΠΕΡΟΥΛΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
Δρ. Ι. Ν. ΞΥΝΙΑΣ  
Αναπληρωτής Καθηγητής**

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2004

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή δρ. Ι. Ν. Ξυνιά για το ενδιαφέρον που έδειξε ώστε να παραδοθεί και να παρουσιαστεί η εργασία αυτή με την καλύτερη δυνατή μορφή.

Θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην εισηγήτρια σε αυτή την εργασία καθηγήτρια δρ. Άννα Rosa Carrasco Perez και για τη καταλυτική βοήθεια της για την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ την ερευνητική εταιρία APPACALE A.E. καθώς και όλο το προσωπικό της, για τα μέσα και τη βοήθεια που μου παραχώρησαν ώστε να πραγματοποιηθεί η πτυχιακή αυτή διατριβή.

Εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου στο Τ. Ε. Ι. Καλαμάτας και την εταιρία ACTION διαχειρίστρια του ευρωπαϊκού προγράμματος Leonardo da Vinci όπου και μου έδωσε την κατάλληλη χρηματοδότηση για το ταξίδι μου στην Ισπανία και την εμπλοκή μου με το θέμα της διατριβής.

Τέλος, σε όλους τους φίλους και συγγενείς που με στήριξαν συστηματικά, αλλά και σε όλους εκείνους που με τον ένα ή άλλο τρόπο βοήθησαν να έχει ένα καλό τέλος αυτή η εργασία.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....  | 5  |
| 2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....  | 7  |
| 1.1 ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ.....                       | 7  |
| 1.2 ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....                                    | 10 |
| 1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΓΓΕΝΙΚΑ ΕΙΔΗ.....  | 11 |
| 1.4 ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ.....  | 12 |
| 1.5 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΗΣ ΕΓΓΕΝΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ.....                                       | 14 |
| 2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΙΛΟΓΗΣ.....   | 16 |
| 2.1.1. Παραδοσιακό σύστημα.....   | 17 |
| 2.1.2. Βελτίωση σε διπλοειδές επίπεδο.....                                      | 19 |
| 2.1.2.1. Απόκτηση διαπλοειδών.....  | 21 |
| 2.1.2.2. Δημιουργία βελτιωμένων διπλοειδών πληθυσμών.....                       | 21 |
| 2.1.2.3. Επιστροφή στο τετραπλοειδές επίπεδο.....                               | 22 |
| 2.2. ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΑΓΡΙΩΝ ΕΙΔΩΝ ΣΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ.....                      | 23 |
| 2.3. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ.....                           | 25 |
| 2.3.1. Πολλαπλασιασμός βλαστικού υλικού.....                                    | 26 |
| 2.3.2. Καλλιέργεια μεριστωμάτων.....  | 36 |
| 2.3.3. Απόκτηση απλοειδών.....  | 27 |
| 2.3.4. Σωμακλωνική παραλλακτικότητα.....  | 28 |
| 2.4. ΣΩΜΑΤΙΚΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ.....  | 29 |
| 2.4.1. Ηλεκτροσύντηξη πρωτοπλαστών.....   | 31 |
| 2.4.2. Σωματικός υβριδισμός με αγρία είδη.....                                  | 35 |
| 2.4.3. Γνωρίσματα των σωματικών υβριδίων.....                                   | 36 |
| 2.4.3.1. Οργανδιακή σύνθεση των σωματικών υβριδίων.....                         | 37 |
| 2.4.3.2. Πολυγενετικοί και μονογενετικοί χαρακτήρες των σωματικών υβριδίων..... | 38 |
| 2.4.4. Προσδιορισμός και επιλογή των σωματικών υβριδίων.....                    | 39 |
| 2.4.5. Ενσωμάτωση των σωματικών υβριδίων σε προγράμματα βελτίωσης.....          | 41 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....   | 43 |
| 3.1 ΥΛΙΚΑ.....  | 43 |
| 3.1.1. ΒΛΑΣΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....  | 43 |
| 3.1.2. ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....  | 43 |
| 3.1.3 ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ.....  | 44 |
| 3.1.4 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ.....   | 44 |
| 3.1.5 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟΥ.....   | 45 |
| 3.1.6 ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΟ ΥΛΙΚΟ.....   | 45 |
| 3.2. ΜΕΘΟΔΟΣ.....   | 45 |
| 3.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΒΛΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....              | 45 |
| 3.2.2. ΣΥΝΤΗΞΗ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ.....  | 47 |
| 3.2.2.1. Απομόνωση και εξυγίανση των πρωτοπλαστών.....                          | 47 |
| 3.2.2.2. Ηλεκτροσύντηξη πρωτοπλαστών.....                                       | 48 |
| 3.2.2.3. Καλλιέργεια των πρωτοπλαστών και αναγέννηση των φυτών.....             | 48 |
| 3.2.2.4. Εγκλιματισμός των φυταρίων στο θερμοκήπιο.....                         | 52 |
| 3.2.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΥΒΡΙΔΙΩΝ.....              | 52 |
| 3.2.3.1. Μοριακός χαρακτηρισμός.....  | 52 |
| 3.2.3.1.1. Εξαγωγή DNA.....   | 52 |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.3.1.2. Ενίσχυση του πολυμορφισμού στο άγαρ.....   | 53 |
| 3.2.3.2. Κυτταρολογικός χαρακτηρισμός.....  | 54 |
| 3.2.3.2.1. Καθορισμός του επιπέδου πλοειδίας.....   | 64 |
| 3.2.3.2.2. Βιωσιμότητα της γύρης.....   | 55 |
| 3.2.3.2.3. Εκτίμηση των σωματικών και των συμβατικών υβριδίων.....                            | 55 |
| 3.2.4. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΙΟΥΣ.....   | 56 |
| 3.2.4.1. Οι ιοί X (PVX) και Y (PVY).....  | 56 |
| 3.2.4.2. Ο ιός του καρουλίσματος (PLRV).....  | 56 |
| 3.2.5. ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΑΜΥΛΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΞΗΡΑΣ ΟΥΣΙΑΣ.....                           | 57 |
| <br>  |    |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....  | 58 |
| 4.1 ΣΥΝΤΗΞΗ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ.....   | 58 |
| 4.1.1. Κατευθυνόμενες συντήξεις.....  | 58 |
| 4.1.1.1. Απομόνωση και εξυγίανση των πρωτοπλαστών.....  | 58 |
| 4.1.1.2. Καλλιέργεια των πρωτοπλαστών και αναγέννηση των φυτών.....                           | 58 |
| 4.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΥΒΡΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΩΝ ΣΥΝΤΗΞΕΩΝ..... | 64 |
| 4.2.1. Μοριακός χαρακτηρισμός.....  | 64 |
| <br>  |    |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....  | 71 |
| 5.1. ΣΥΝΤΗΞΗ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ.....  | 71 |
| 5.1.1. Κατευθυνόμενες συντήξεις.....  | 71 |
| 5.1.1.1. Απομόνωση και εξυγίανση των πρωτοπλαστών.....  | 71 |
| 5.1.1.2. Ηλεκτροσύντηξη πρωτοπλαστών.....   | 73 |
| 5.1.1.3. Καλλιέργεια των πρωτοπλαστών και αναγέννηση των φυτών.....                           | 74 |
| 5.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΥΒΡΙΔΙΩΝ.....                              | 77 |
| 5.2.1. Μοριακός χαρακτηρισμός των κατευθυνόμενων συντήξεων.....                               | 77 |
| <br>  |    |
| 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....  | 79 |
| <br>  |    |
| 7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....  | 80 |
| <br>  |    |
| 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....  | 81 |

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η πατάτα αποτελεί μια από τις σπουδαιότερες καλλιέργειες σε όλο τον κόσμο. Αποτελεί μια πολύ καλή τροφή για ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού της γης. Είναι η κύρια πηγή αμύλου, που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τόσο της παραγωγής τροφίμων όσο και της παραγωγής διαφόρων άλλων προϊόντων. Επίσης, παρά τη μικρή περιεκτικότητά της σε βιταμίνη C, επειδή καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες, αποτελεί την κύρια πηγή βιταμίνης αυτής για τον άνθρωπο.

Η διαιτητική σπουδαιότητα της πατάτας είναι μεγάλη και για το λόγο αυτό με την Ίδρυση του Ελληνικού κράτους καταβλήθηκε ιδιαίτερη προσπάθεια για να ενσωματωθεί στο διαιτολόγιο του Έλληνα. Ο τελευταίος ήταν πολύ δύσκολος στο να δεχθεί το νέο προϊόν και κανένας δεν το προμηθεύονταν. Για το λόγο αυτό χρειάστηκε μεγάλη προσπάθεια για να γίνει αποδεκτό. Μάλιστα, ο Ι. Καποδίστριας, για να αναγκάσει τους Έλληνες να χρησιμοποιήσουν τις πατάτες, έβαλε φύλακες να προσέχουν τις αποθήκες όπου ήταν αποθηκευμένες. Αυτό ανάγκασε τους Έλληνες να σκεφθούν ότι για να τις φυλάνε θα πρέπει να είναι πολύτιμες οπότε άρχισαν να τις κλέβουν και να τις δοκιμάζουν. Εννοείται ότι οι φρουροί που τις φύλαγαν είχαν την εντολή να κάνουν τα "στραβά μάτια", επιτρέποντας τις κλοπές.

Η πατάτα αποτελεί ένα πολύ πολυμορφικό φυτό κατέχοντας τα περισσότερα είδη από οποιαδήποτε άλλη καλλιέργεια. Το κύριο κέντρο καταγωγής της βρίσκεται στη Ν. Αμερική και αποτελεί ένα από τα προϊόντα που οι Ισπανοί έφεραν στην Ευρώπη από τον λεγόμενο Νέο Κόσμο. Αν και η παραγωγική και προσαρμοστική της συμπεριφορά είναι πολύ καλές, υπάρχουν πολλοί βιοτικοί αλλά και αβιοτικοί παράγοντες που ταλαιπωρούν την καλλιέργειά της. Από αυτούς τα έντομα και ιδιαίτερα ο δορυφόρος της πατάτας είναι εύκολο να αντιμετωπισθούν με ήπια χημικά μέσα. Μια άλλη όμως κατηγορία βιοτικών εχθρών, οι ιοί, αποτελούν ιδιαίτερα δύσκολο πρόβλημα. Από την άλλη πλευρά, έχει βρεθεί ότι η επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών μπορεί να βελτιώσει ιδιαίτερα την ποιότητα του προϊόντος. Αυτός είναι άλλωστε ο λόγος για τον οποίο οι καλύτερες πατάτες παράγονται σε ψυχρές περιοχές (π. χ. Παρανάστι Δράμας). Οι χαμηλές όμως θερμοκρασίες μπορεί να καταστρέψουν το υπέργειο μέρος του φυτού και να μειώσουν την απόδοση. Η δημιουργία φυτών ανθεκτικών στις χαμηλές θερμοκρασίες είναι ο πλέον ενδεδειγμένος τρόπος για να αντιμετωπισθεί το πρόβλημα αυτό. Για το λόγους αυτούς θα πρέπει να εξασφαλίζεται κάθε φορά υγιές πολλαπλασιαστικό υλικό που να

αντέχει κατά το δυνατό στις χαμηλές θερμοκρασίες. Η κλασική βελτίωση έχει συμβάλει αποφασιστικά στη δημιουργία καλλιεργούμενων γενοτύπων που να είναι ανθεκτικοί (κατά το δυνατό) σε αρκετούς βιοτικούς παράγοντες. Πολύτιμα γονίδια που εξασφαλίζουν ανθεκτικότητα σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης, υπάρχουν σε άγρια συγγενικά είδη της καλλιεργούμενης πατάτας. Τα τελευταία όμως είναι δύστροπα στο χειρισμό τους και η χρησιμοποίηση των ειδών αυτών είναι δύσκολη. Βεβαίως η ανάπτυξη της τεχνικής της ιστοκαλλιέργειας έχει συμβάλει αποφασιστικά στην κατεύθυνση αυτή. Όμως και άλλες από τις σύγχρονες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για να βοηθήσουν τα πράγματα. Μια τέτοια τεχνική είναι και η σύντηξη των πρωτοπλαστών, που χρησιμοποιείται στην παρούσα διατριβή. Όμως, οποιαδήποτε μέθοδος και να χρησιμοποιηθεί η τελική αξιολόγηση του γενετικού υλικού που θα δημιουργηθεί θα πρέπει να γίνει με πειράματα στον αγρό, όπου το υλικό θα έλθει σε επαφή με τις πραγματικές συνθήκες καλλιέργειας της πατάτας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

1. Βελτίωση των μεθόδων καλλιέργειας και αναγέννησης των πρωτοπλαστών στη πατάτα.
2. Μοριακός χαρακτηρισμός των σωματικών υβριδίων στο γένος *Solanum*, που έχουν αποκτηθεί με την τεχνική της ηλεκτροσύντηξης πρωτοπλαστών.
3. Προσδιορισμός και αξιολόγηση των σωματικών κλώνων του *S. tuberosum*.

## 2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

### 2.1. Καταγωγή και εξέλιξη της καλλιεργούμενης πατάτας.

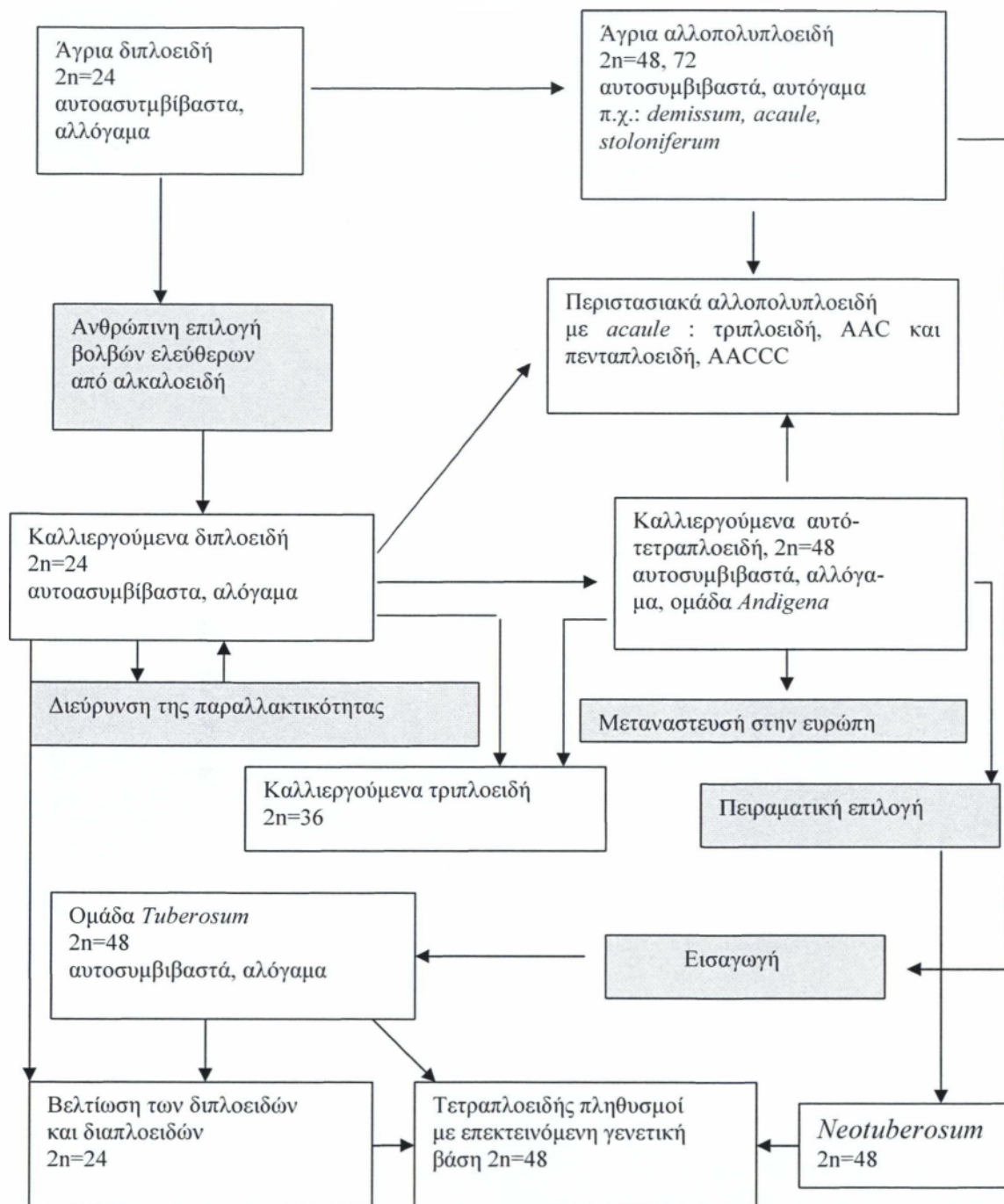
Η πατάτα (*Solanum tuberosum* L.) είναι μια από τις πιο σπουδαίες καλλιέργειες στον κόσμο, τέταρτη σε παραγωγή πίσω από το σιτάρι, τον αραβόσιτο και το ρύζι (FAO 2003). Οι ζώνες καταγωγής και διαφοροποίησης εκτείνονται κατά μήκος της οροσειράς των Άνδεων από το νότο της Χιλής έως την Βενεζουέλα και από την κεντρική Αμερική έως το νότο του Μεξικού. Το κέντρο των ήμερων ειδών της πατάτας μπορεί να τοποθετηθεί στις Άνδεις του νοτίου Περού και της βόρειας Βολιβίας, που εντοπίζεται στην περιοχή του Lago Titikaka.

Ο βασικός αριθμός χρωμοσωμάτων της καλλιεργούμενης πατάτας και των συγγενικών άγριων ειδών της είναι  $X=12$ . Στη Βόρεια και Κεντρική Αμερική απαντώνται λιγότερα από τα μισά από τα είδη αυτά και συμπεριλαμβάνουν διπλοειδή, αλλοτετραπλοειδή και αλλοεξαπλοειδή με 24, 48 και 72 χρωμοσώματα αντίστοιχα. Αντίθετα, η πλειοψηφία των αγρίων συγγενικών ειδών της πατάτας συναντώνται στη Νότια Αμερική και είναι στο μεγαλύτερο μέρος τους διπλοειδή. Από τα τελευταία έχουν προκύψει οι σημερινές καλλιέργειες, αν και έχουν συμβάλει σε αυτό τα τετραπλοειδή είδη *S. acaule* (Hawkes 1962, Schmiediche 1980). Έτσι, ενώ η πολυπλοειδία είναι συχνή σε αυτή την ομάδα, η εξελικτική αρχική πρόοδος είχε αρχίσει στο διπλοειδές επίπεδο (Εικόνα 1).

Η γενική συνέπεια των πρώτων φάσεων της εξέλιξης της πατάτας ήταν η διασπορά, μέσω των υψιπέδων της Νοτίου Αμερικής μιας μεγάλης ομάδας διπλοειδών, αυτοτριπλοειδών και αυτοτετραπλοειδών ειδών, που είχαν ως κέντρο καταγωγής την περιοχή μεταξύ του Περού και της Βολιβίας. Άλλες δευτερεύουσες συνέπειες ήταν η εγκατάσταση στη Χιλή μια ομάδας τετραπλοειδών ειδών, που ήταν προσαρμοσμένα στα μεγάλα ύψη και η εμφάνιση στις Κεντρικές Άνδεις διάφορων αλλοτριπλοειδών (*S. juzepczukii*,  $2n=2x=36$ ) και αλλοπενταπλοειδών (*S. curtilobum*,  $2n=5x=60$ ) ειδών που ήταν προϊόντα υβριδοποίησης με τα τετραπλοειδή είδη *S. acaule*.

Τα καλλιεργούμενα είδη πατάτας μπορούν να είναι από διπλοειδη έως πενταπλοειδή ενώ τα άγρια αυτοφυή, που καρποφορούν, είναι από διπλοειδή έως εξαπλοειδή. Οι σχέσεις της εξελικτικής τους συγγένειας παρουσιάζονται στην Εικόνα 2. Ο Hawkes (1981) έκανε μια υπόθεση σύμφωνα με την οποία το *S. tuberosum* ήταν αλλοτετραπλοειδές, προερχόμενο από τη διασταύρωση μεταξύ *S. sparsipilum* και *S. stenotomum*. Βέβαια, άλλοι συγγραφείς είχα υπερασπιστεί την ιδέα ότι

πρόκειται για ένα αυτοτετραπλοειδές λαμβάνοντας υπ' όψη την κυτταρογενετική του συμπεριφορά (Iwanaga και Peloquin 1982).

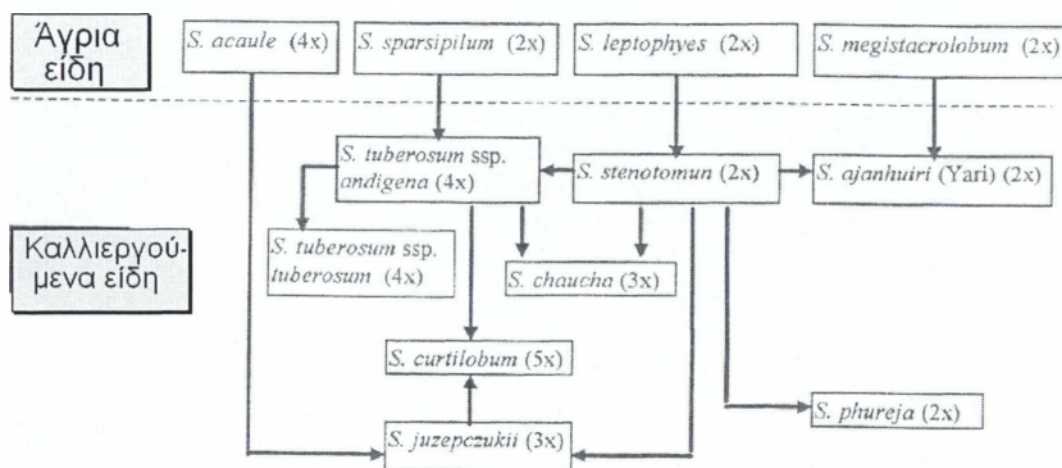


Εικόνα 1. Ανάπτυξη της καλλιεργούμενης πατάτας, *Solanum tuberosum* L. (Simmonds 1976)

Ο Gottschalk (1984) έδειξε τη αυτοτετραπλοειδή φύση της πατάτας και υποστήριξε ότι το *S. stenotomum* ή κάποιο άγνωστο είδος ήταν ο πρόγονός της. Ο Hosaka (1986) επιβεβαίωσε την υπόθεση αυτή διαμέσου μιας ανάλυσης DNA



χλωροπλαστών. Άλλοι ερευνητές θεωρούν το *S. tuberosum* σαν ένα «τμηματικό» άλλοτετραπλοειδές με τετρασωμική κληρονομικότητα κατά το μεγαλύτερο μέρος των χαρακτήρων του (Howard 1970).



Εικόνα 2. Εξελικτικές σχέσεις της καλλιεργούμενης πατάτας και του επιπέδου πολυπλοειδίας.

Η εισαγωγή της καλλιεργούμενης πατάτας στην Ευρώπη, ακολούθησε δύο δρόμους. Ο πρώτος από την Ισπανία το 1570 και ο δεύτερος από την Αγγλία κατά το 1590 (Burton 1989). Οι ευρωπαίοι βοτανολόγοι απέκτησαν τα πρώτα τους φυτά από τον Φλαμανδό Carol Clusius, που προόριζε το φορτίο του για την Ισπανία και την Ιταλία. Οι πατάτες αυτές φυτεύτηκαν στις λιγότερο κρύες περιοχές των χωρών αυτών και καρποφόρησαν από τον Δεκέμβριο έως τον Ιανουάριο. Όλες αυτές οι πατάτες ανήκουν στο τετραπλοειδές είδος *Solanum tuberosum* L. ssp. *andigena* Hawkes, και χρειάστηκε να γίνει διαλογή αρκετών αιώνων για να προσαρμοστεί το είδος αυτό στις μεγάλες μέρες του καλοκαιριού στο νότο της Ευρώπης. Ο εγκλιματισμός τους επιτεύχθηκε μετά τα τέλη του 18<sup>ου</sup> - αρχές του 19<sup>ου</sup> αιώνα και αυτό επέτρεψε τελικά την καλλιέργεια και την εξάπλωση τους από την κεντρική έως την ανατολική Ευρώπη.

Η πατάτα έφθασε στις νότιο-αμερικάνικες αποικίες, έως τις Βερμούδες, το 1691 προερχόμενη από μια αγγλική εισαγωγή το 1613. Οι Βρετανοί ιεραπόστολοι τις μετέφεραν στην Ινδία και στη Κίνα τον 17<sup>ο</sup> αιώνα και εισήχθησαν σε Ιαπωνία και Αφρική σχεδόν την ίδια εποχή. Στη Νέα Ζηλανδία εμφανίστηκε το 1769 και άρχισε η καλλιέργεια της από τους Μαόρι το 1840 (Hawkes 1990). Έτσι, η πατάτα της οποίας η καλλιέργεια ήταν περιορισμένη στην Αμερική έως τον 16<sup>ο</sup> αιώνα έφτασε να είναι

μια από τις πιο σπουδαίες και διαδεδομένες καλλιέργειες σε όλο τον κόσμο σε λιγότερο από 300 χρόνια

## **2. 2. Οικονομική σημασία της καλλιέργειας.**

Η παγκόσμια παραγωγή της πατάτας κατά το έτος 2002 ανέρχονταν σε 307.440.446 Mt. Από την ποσότητα αυτή περίπου το 1/3 παράχθηκε στην Ευρωπαϊκή Ένωση, ένα άλλο 1/3 παράχθηκε στην Ασία και το υπόλοιπο σε όλο τον άλλο κόσμο (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Παγκόσμια κατανομή της παραγωγής πατάτας (FAO 2002).

| Παραγωγή πατάτας (Mt) | Έτος        |             |             |             |             |             |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                       | 1997        | 1998        | 1999        | 2000        | 2001        | 2002        |
| Παγκόσμια             | 302.657.999 | 300.809.583 | 300.897.628 | 329.361.197 | 311.843.226 | 307.440.446 |
| Αφρική                | 9.595.879   | 11.008.534  | 11.989.306  | 12.697.389  | 14.223.523  | 12.543.382  |
| Ασία                  | 106.247.530 | 108.563.906 | 109.679.917 | 121.059.474 | 118.070.798 | 120.575.226 |
| Ευρώπη                | 144.157.301 | 137.795.994 | 134.958.043 | 149.603.402 | 137.587.753 | 130.486.644 |
| Ε. Σ. Σ. Δ.           | 37.039.712  | 31.418.370  | 31.343.850  | 33.979.500  | 34.965.200  | 31.900.000  |
| Η. Π. Α.              | 21.116.000  | 21.580.600  | 21.691.500  | 23.297.460  | 19.862.270  | 21.011.030  |
| Αυστραλία             | 1.286.130   | 1.371.610   | 1.326.760   | 1.199.622   | 1.250.000   | 1.260.000   |

Η παραγωγή πατάτας στην Ευρωπαϊκή Ένωση είναι, με μικρές διακυμάνσεις, σταθερή σε υψηλά επίπεδα. Οι χώρες που παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή είναι η Γερμανία, Ολλανδία, Γαλλία, Ηνωμένο Βασίλειο και η Ισπανία (Πίνακας 2). Στην Ελλάδα η παραγωγή πατάτας είναι αρκετά σταθερή και βρίσκεται σε ένα επίπεδο υψηλότερο των 850.000 Mt. Τα περιθώρια όμως που υπάρχουν για επέκταση της καλλιέργειας της πατάτας είναι αρκετά και αυτό φαίνεται από τις μεγάλες εισαγωγές που γίνονται κατά διαστήματα. Με τη δημιουργία ποικιλιών ανθεκτικών στις χαμηλές θερμοκρασίες, η καλλιέργεια της πατάτας θα μπορούσε να επεκταθεί και σε περιοχές που αυτή τη στιγμή είναι μειονεκτικές. Έτσι, το όφελος θα ήταν διπλό, γιατί εκτός από την αύξηση της παραγωγής θα εξασφάλιζε και ένα σοβαρό κίνητρο για την συγκράτηση των πληθυσμών στις περιοχές αυτές.

Πίνακας 2. Η κατανομή της παραγωγής της πατάτας στην Ευρωπαϊκή Ένωση .

| Παραγωγή<br>πατάτας<br>(Mt) | Έτος       |            |            |            |            |            |
|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                             | 1997       | 1998       | 1999       | 2000       | 2001       | 2002       |
| E. E. (15)                  | 48.626.329 | 43.689.513 | 49.259.640 | 49.832.047 | 45.544.632 | 46.454.814 |
| Αυστρία                     | 676.872    | 646.915    | 711.730    | 694.609    | 694.602    | 684.000    |
| Βέλγιο                      | 2.899.238  | 2.455.777  | 3.006.630  | 3.033.000  | 2.587.000  | 2.796.000  |
| Δανία                       | 1.545.000  | 1.455.960  | 1.502.137  | 1.645.240  | 1.543.028  | 1.504.000  |
| Φιλανδία                    | 754.100    | 590.000    | 791.100    | 785.200    | 732.800    | 780.100    |
| Γαλλία                      | 6.690.000  | 6.053.000  | 6.645.000  | 6.434.053  | 6.077.891  | 6.762.606  |
| Γερμανία                    | 12.067.359 | 11.711.720 | 12.031.200 | 13.694.283 | 11.916.834 | 11.491.694 |
| Ελλάδα                      | 883.428    | 876.086    | 866.716    | 883.289    | 936.703    | 875.000    |
| Ιρλανδία                    | 472.000    | 482.000    | 559.000    | 455.000    | 478.000    | 519.000    |
| Ιταλία                      | 2.019.995  | 2.194.020  | 2.068.600  | 2.053.047  | 2.009.851  | 2.074.914  |
| Λουξεμβούργο                | 0*         | 0*         | 0*         | 23.430     | 22.770     | 19.000     |
| Ολλανδία                    | 7.973.000  | 5.249.400  | 8.221.100  | 8.126.800  | 7.015.253  | 7.363.000  |
| Πορτογαλία                  | 1.049.300  | 1.224.932  | 1.367.327  | 1.250.000  | 1.150.000  | 1.2000.000 |
| Ισπανία                     | 3.253.937  | 3.128.803  | 3.367.400  | 3.138.000  | 2.956.900  | 3.103.500  |
| Σουηδία                     | 1.214.100  | 1.198.900  | 990.800    | 980.100    | 925.000    | 907.000    |
| H. B.                       | 7.128.000  | 6.422.000  | 7.130.900  | 6.636.000  | 6.498.000  | 6.375.000  |

\*Η παραγωγή του Λουξεμβούργου περιλαμβάνεται στην αντίστοιχη του Βελγίου.

### **2. 3. Ταξινόμηση και συγγενικά είδη.**

Η καλλιεργούμενη πατάτα έχει πιθανώς τα περισσότερα είδη από οποιαδήποτε άλλη καλλιέργεια: στο γένος *Solanum* υπάρχουν 2000 είδη σε όλο τον κόσμο. Η γενετική ανάπτυξη και οι δυνάμεις της διαλογής, η αποδημία, η μετάλλαξη, η υβριδοποίηση και η πολυπλοειδία συνέβαλαν στην εκτροπή και έτσι εξηγείται η μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα που παρουσιάζεται στα άγρια και καλλιεργούμενα είδη που κονδυλοποιούν. Στις μέρες μας υπάρχουν 7 διαφορετικά καλλιεργούμενα και 228 άγρια είδη που έχουν ικανότητα κονδηλοποιήσεως.

Για την καλύτερη κατανόηση της ταξινόμησης και των εξελικτικών σχέσεων έγινε ο εξής διαχωρισμός: Μέσα στη κλάση *Petota* του υπογένους *Potatoe*, συναντώνται δυο "υποκλάσεις". Η πρώτη είναι η *Estolonifera*, που χαρακτηρίζετε από την απουσία στολώνων και κονδύλων, υποδιαιρούμενη με τη σειρά της στις

σειρές *Etuberosa* και *Juglandifolia*. Η δεύτερη <<υποκλάση>> του *Potatoe*, παράγει κονδύλους και υποδιαιρείται σε 19 σειρές.

Οι πρώτες συγκομιδές που επηρέασαν την εξέλιξη του *Solanum* τοποθετούνται χρονικά ανάμεσα στο 1920 και το 1930 (Hawkes και Hjerting 1989). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πολυάριθμες επιστημονικές αποστολές με στόχο να προσκομίσουν και να αξιολογήσουν καινούργια συγγενικά είδη (Sprooper 1995).

Η καλλιεργούμενη πατάτα έχει εξελιχθεί σε περιοχές με εύκρατο κλίμα, σε σημεία με συγκεκριμένες κλιματολογικές συνθήκες. Αυτό την κάνει πιο ευαίσθητη γιατί στις μέρες μας η καλλιέργεια της έχει επεκταθεί πολύ μακρύτερα από τα αρχικά της εδάφη. Από την άλλη το ευρύ επίπεδο της οικολογικής προσαρμογής των άγριων αυτοφυών ειδών της και η έντονη γεωγραφική κατανομή τους, είναι χαρακτηριστικά με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα προγράμματα βελτίωσης, γιατί είναι έκδηλη η ικανότητα προσαρμογής τους σε περιβαλλοντολογικές καταπονήσεις και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε ιούς και μύκητες.

#### **2. 4. Ασθένειες της πατάτας.**

Οι ασθένειες που προσβάλλουν τη πατάτα οφείλονται σε ιούς και προκαλούν σημαντικές οικονομικές ζημιές. Οι ιοί μπορούν να πολλαπλασιαστούν στα κύτταρα του φυτού και να μετακινηθούν διαμέσου του αγγειακού συστήματος του σε όλα τα μέρη του φυτού, από τις ρίζες έως τα σπόρια του. Σε εκείνες τις καλλιέργειες που χρησιμοποιείται οποιοδήποτε μέρος του φυτού ως σπόρος, δηλαδή μη γονιμοποιημένος σπόρος, αν το φυτό είναι μολυσμένο ο ιός θα μολύνει και τα αναπτυσσόμενα δενδρύλλια που προήλθαν από το μολυσμένο φυτό. Για αυτό οι προσβεβλημένες πατάτες από ιούς, εκτός από τη μειωμένη ευρωστία που παρουσιάζουν, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πατατόσπορο.

Ένας από τους πιο σημαντικούς φορείς μετάδοσης των ιών είναι οι αφίδες και ανάμεσα σε αυτές διακρίνονται τα είδη *Myzus persicae*, *Aulacortum solani*, *Macrosiphum euphorbiae* και *Aphis nasturtii*. Επίσης λαμβάνουν χώρα μηχανικοί τρόποι μετάδοσης, όπως τα στοιχεία που χρησιμοποιούνται για τον χειρισμό των σπόρων και τα διάφορα χρησιμοποιούμενα αγροτικά εργαλεία αλλά και η επαφή των ιδίων των φυτών στο χωράφι. Ο τρόπος διάγνωσης των μολυσμένων από ιούς φυτών, πραγματοποιείται διαμέσου της τεχνικής ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Clark και Adams 1977). Γενικά μπορεί να ειπωθεί ότι δεν υπάρχουν

θεραπευτικές μέθοδοι και μόνο αν αποφευχθεί η μόλυνση ή / και γίνει εισαγωγή ανθεκτικών ποικιλιών μπορούν να υπάρξουν θετικά αποτελέσματα. Τα συμπτώματα μπορεί να είναι πρωτογενή ή δευτερογενή. Πρωτογενές σύμπτωμα είναι αυτό που παρουσιάζεται όταν ένα υγιές φυτό προσβάλλεται από τον ιό, καθώς και δευτερογενές σύμπτωμα είναι αυτό που εκδηλώνετε σε φυτά που προήλθαν από προσβεβλημένους κονδύλους.

Σύμφωνα με τους μηχανισμούς της ανθεκτικότητας, ένα φυτό μπορεί να μολυνθεί ή να παρουσιάζει ανοσία στον ιό. Αν είναι μολυσμένο μπορεί να συμπεριφερθεί ως ανθεκτικό ή ως ευαίσθητο (Cooper και Jones 1983) με πιθανές όλες τις ενδιάμεσες καταστάσεις. Κάθετη ανθεκτικότητα ονομάζεται η ανθεκτικότητα που παρουσιάζει μια καλλιέργεια σε μια συγκεκριμένη φυλή ή γενιά του ιού. Στην αντίθετη περίπτωση η ανθεκτικότητα ονομάζεται οριζόντια. Στην πατάτα υπάρχουν διάφοροι τύποι και επίπεδα ανθεκτικότητας, με μια ορολογία όχι πάντα τόσο ξεκάθαρη.

Διακρίνονται οι ακόλουθοι περιπτώσεις ανθεκτικότητας:

A) Ανθεκτικότητα υπερευαισθησίας.

Υπερευαισθησία είναι ο γρήγορος θάνατος των προσβεβλημένων κυττάρων του φυτού, παρεμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό την είσοδο των ιών στα συστήματα του φυτού (Russel 1978). Περιλαμβάνει μια ειδική αναγνώριση ανάμεσα στα τοξικά προϊόντα του γονιδίου του παθογόνου και στο προϊόν της ανθεκτικότητας του γονιδίου του φυτού. Μπορεί να προκαλέσει το θάνατο ολόκληρου του φυτού μετά από εκτεταμένη εκκόλαψη. Λίγες πληροφορίες υπάρχουν σε σχέση με αυτά τα γονίδια. Έχουν εντοπιστεί πάντως απλά κυρίαρχα γονίδια σε φυτά που εκδηλώνουν υπερευαισθησία και γενιές ιών που ξεπερνούν την ανθεκτικότητα αυτού του είδους. Αυτά τα γονίδια εντοπίζονται στα *Tuberosum* και *Antigena*, σε καλλιεργούμενα διπλοειδή και διάφορα άγρια είδη.

B) Ανθεκτικότητα ανεκτικότητας ή ανοχής.

Εκδηλώνεται με μια μικρή επίδραση στην αποδοτικότητα ή στη παραγόμενη ποιότητα (του φυτού) από τον συγκεκριμένο ιό. Μπορεί να οριστεί σαν μια αντίδραση που δεν εξαρτάται από την υπερευαισθησία του φυτού και προκαλεί μικρές βλάβες στον ξενιστή.

Γ) Ακραία ανθεκτικότητα ή ανοσία

Παρουσιάζεται με ένα υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας, ελεγχόμενο από κυρίαρχα γονίδια (Ross 1986) με αποτέλεσμα ο ιός να μην μπορεί να εγκατασταθεί στον ξενιστή. Γενικά, τα προσβεβλημένα φυτά δεν παρουσιάζουν συμπτώματα και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού του ιού είναι πολύ μειωμένος. Αποτελεί την πιο αποτελεσματική ανθεκτικότητα αφού εκφράζει ολική ή μερική ανικανότητα του ιού να πολλαπλασιαστεί στους ιστούς προσβεβλημένων φυτών.

#### Δ) Ανθεκτικότητα κατά την προσβολή.

Τα φυτά στην περίπτωση αυτή δε προσβάλλονται εύκολα με τη βοήθεια διαφόρων μηχανισμών που αντιτάσσονται στον πολλαπλασιασμό του ιού. Εκφράζεται με την τάση μιας καλλιέργειας να διαφύγει από την μόλυνση αν το επίπεδο αυτής είναι χαμηλό, είναι όμως πιθανό να νικηθεί αν το επίπεδο της μόλυνσης είναι αρκετά υψηλό (Swiezynski 1994).

#### Ε) Ανθεκτικότητα στους φορείς των ιών.

Συσχετίζεται με την παρουσία αδενωδών τριχών στην επιφάνεια των φύλλων (Tingey 1991).

Οι κυριότερες ασθένειες που αντιμετωπίζει η πατάτα είναι ο ιός A (PVA), ο ιός M (PVM), ο ιός του καρουλιάσματος (Leaf-roll) (PLRV) και ο ιός της ράβδωσης Y (PVY). Όπου και οι πιο σημαντικοί κατά την παραγωγή πατατόσπορου είναι οι PLRV και PVY.

### **2. 5. Παράμετροι εγγενούς ποιότητας.**

Η μεταποίηση των επεξεργασμένων προϊόντων της πατάτας έχει αποδεσμευτεί από την έρευνα ενός αρχικού υλικού που ρυθμίζει την απαραίτητη ποιότητα για όλες τις επεξεργασίες. Τα απαιτούμενα χαρακτηριστικά από την βιομηχανία συσχετίζονται με το μέγεθος των κονδύλων, την απουσία εσωτερικών ελαττωμάτων και περισσότερο από όλα με την χημική τους σύσταση, η οποία επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων.

Ο κόνδυλος περιέχει περισσότερο από 75% του συνολικού του βάρους νερό, μια υψηλή ποσότητα σε υδατάνθρακες, μικρή σύσταση νιτρικών και πολύ λίγα λιπαρά (Πίνακας 3). Η σύσταση εξαρτάται από την καλλιεργούμενη ποικιλία, τις εδαφικές και κλιματικές συνθήκες καθώς και από τις τεχνικές παραγωγής. Τα βασικά γνωρίσματα που είναι απαραίτητα για την βιομηχανοποίηση και μεταποίηση της πατάτας παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 3. Χημική σύνθεση των κονδύλων της πατάτας (Gravouelle 1997).

| Συστατικά             | Μέση τιμή<br>(% του νεπού προϊόντος) | Εύρος τιμών |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------|
| Νερό                  | 78,5                                 | 73-84       |
| Ξηρό βάρος            | 21,5                                 | 16-27       |
| Ολικά σάκχαρα         | 18,5                                 | 13-30       |
| Άμυλο                 | 15,1                                 | 10-20       |
| Σακχαρόζη             | 0,1-0,2                              | 0,04-0,34   |
| Γλυκόζη και φρουκτόζη | 0,06-0,45                            | 0,05-0,70   |
| Κυτταρίνη             | 0,7                                  | 0,2-2,2     |
| Πηκτίνη               | 0,6                                  | -           |
| Πρωτεΐνες             | 1,9                                  | 0,7-4,4     |
| Λίπη                  | 0,1                                  | 0,02-0,96   |
| Τέφρα                 | 1,0                                  | 0,4-1,9     |

Πίνακας 4. Γνωρίσματα των βολβών για την απόκτηση των αρχικών μεταποιημένων προϊόντων (Gravouelle 1997).

| Προϊόν         | Μέγεθος<br>(mm) | Σχήμα                | Ξηρά<br>ουσία | Σάκχαρα<br>ρυθμιστές |
|----------------|-----------------|----------------------|---------------|----------------------|
| Τηγανιτές      | >50             | Επιμήκης ωοειδής     | 21-23         | <0,4-0,6             |
| Αφυδατωμένες   | >35             | -                    | 20-25         | <0,6                 |
| Chips          | 35-60           | Ωοειδής στρογγυλή    | 23-25         | <0,2-0,3             |
| Αποστειρωμένες | <40             | ανάλογα με το προϊόν | 18-20         | <0,6                 |

Το περιεχόμενο ξηρό βάρος είναι ένας πολύ σπουδαίος παράγοντας ποιότητας των κονδύλων και συσχετίζεται με άλλα γνωρίσματα, όπως είναι η υφή και η ευαισθησία σε μηχανικά τραύματα (Storey και Davies 1992). Ο προσδιορισμός του γίνεται από το ειδικό βάρος του κονδύλου. Το περιεχόμενο ξηρό βάρος είναι γνώρισμα που επηρεάζεται από τον γενότυπο και για το λόγο αυτό η περιεκτικότητα των κονδύλων μπορεί να αυξηθεί αν εφαρμοσθεί μια αποτελεσματική μέθοδος επιλογής. Όμως, το γνώρισμα αυτό επηρεάζεται πιο πολύ από το περιβάλλον (Singh 1969). Επιπλέον, το ειδικό βάρος είναι ποσοτικό γνώρισμα με μικρή

κληρονομικότητα στην οποία μπορεί να εμπλέκονται και υποτελή γονίδια. Η αναλογία του ιδανικού (optimum) ξηρού βάρους εξαρτάται από την τελική χρήση της καλλιέργειας. Οι κόνδυλοι που προορίζονται για μαγείρεμα στο νερό ή στον ατμό θα πρέπει να έχουν μια μέση περιεκτικότητα 17-20%. Αυτοί που προορίζονται για τηγάνισμα ή μαγείρεμα σε λίπη θα πρέπει να έχουν ξηρό βάρος από 20% έως 24%. Αυτό θα δώσει στο τελικό προϊόν καλή ποιότητα και χαμηλή κατακράτηση λαδιού. Τέλος, στις αμυλώδης ποικιλίες μια υψηλή περιεκτικότητα σε ξηρό βάρος (ξ.β.>25%) είναι και το μοναδικό επιδιωκόμενο κριτήριο.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μικρή περιεκτικότητα της πατάτας σε σάκχαρα ρυθμιστές (γλυκόζη και φρουκτόζη). Ο κυριότερος λόγος είναι ότι κατά το τηγάνισμα σε υψηλές θερμοκρασίες να τα σάκχαρα βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση, τότε μαζί με τα αμινοξέα εμπλέκονται σε μια αντίδραση που προκαλεί σκούρο χρώμα και ανεπιθύμητη γεύση στο τελικό προϊόν (Schallenberg 1959). Για το λόγο αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη η ώρα της μετρήσεως των σακχάρων, η θερμοκρασία αποθήκευσης και αν οι κόνδυλοι ήταν ήδη διατηρημένοι σε χαμηλή θερμοκρασία, γιατί έτσι αυξάνεται το περιεχόμενό τους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι έχουν γίνει προσπάθειες να διαχειριστούν τα σάκχαρα στις ήδη υπάρχουσες καλλιέργειες με μοριακές μεθόδους (Davies και Viola 1992) ή ενσωματώνοντας στις καλλιεργούμενες ποικιλίες τη σταθερότητα των περιεχομένων σακχάρων των αγρίων συγγενών ειδών στις χαμηλές θερμοκρασίες (Colon 1989).

Το άμυλο είναι το κύριο συστατικό του ξηρού βάρους του κονδύλου, φθάνοντας έως το 70% των στερεών του ουσιών. Μια βιομηχανική ποικιλία θα πρέπει να έχει υψηλή περιεκτικότητα σε άμυλο, δεδομένου ότι υπάρχουν διαφορές στη σύνθεση τους που εξαρτώνται από την αντίδραση ανάμεσα σε αμυλόζη / αμυλοπηκτική και του περιεχομένου φωσφορικού οξέος. Η αντίδραση αυτή μπορεί να ελεγχθεί τροποποιώντας τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αντίδραση σύνθεσης της αμυλοπηκτικής. Τέλος, έχει παρατηρηθεί μια ελεύθερη μετάλλαξη της αμυλόζης (Hovenkamp και Hermelink 1987).

## **2. 6. Μέθοδοι επιλογής.**

Η εκπόνηση ενός προγράμματος γενετικής βελτίωσης μπορεί να διαχωριστεί στις ακόλουθες φάσεις (Rouselle και Bourgeois 1994).

- Ανάλυση των βιολογικών και γενετικών γνωρισμάτων του είδους.



- Καθορισμός των αντικειμενικών σκοπών της επιλογής.
- Περιγραφή του βασικού σχήματος για τη δημιουργία του βελτιωμένου βλαστικού υλικού και της μεθοδολογίας για την εξέλιξη των διάφορων γνωρισμάτων.
- Περιγραφή των μεθόδων που θα επιτρέψουν την υλοποίηση του σχεδίου και θα αυξήσουν την υπάρχουσα παραλλακτικότητα.

Συγκεκριμένα για τη πατάτα τα επιθυμητά γνωρίσματα είναι πάρα πολλά για να συγκεντρωθούν στον ίδιο γενότυπο. Τα γνωρίσματα αυτά σχετίζονται με την προσαρμοστικότητα, την παραγωγικότητα, την ανθεκτικότητα σε ασθένειες και εχθρούς. Τέλος, τα ποιοτικά γνωρίσματα διαφοροποιούνται ανάλογα με την χρήση της πατάτας κατά την κατανάλωση.

### **2. 6. 1. Κλασικό σύστημα.**

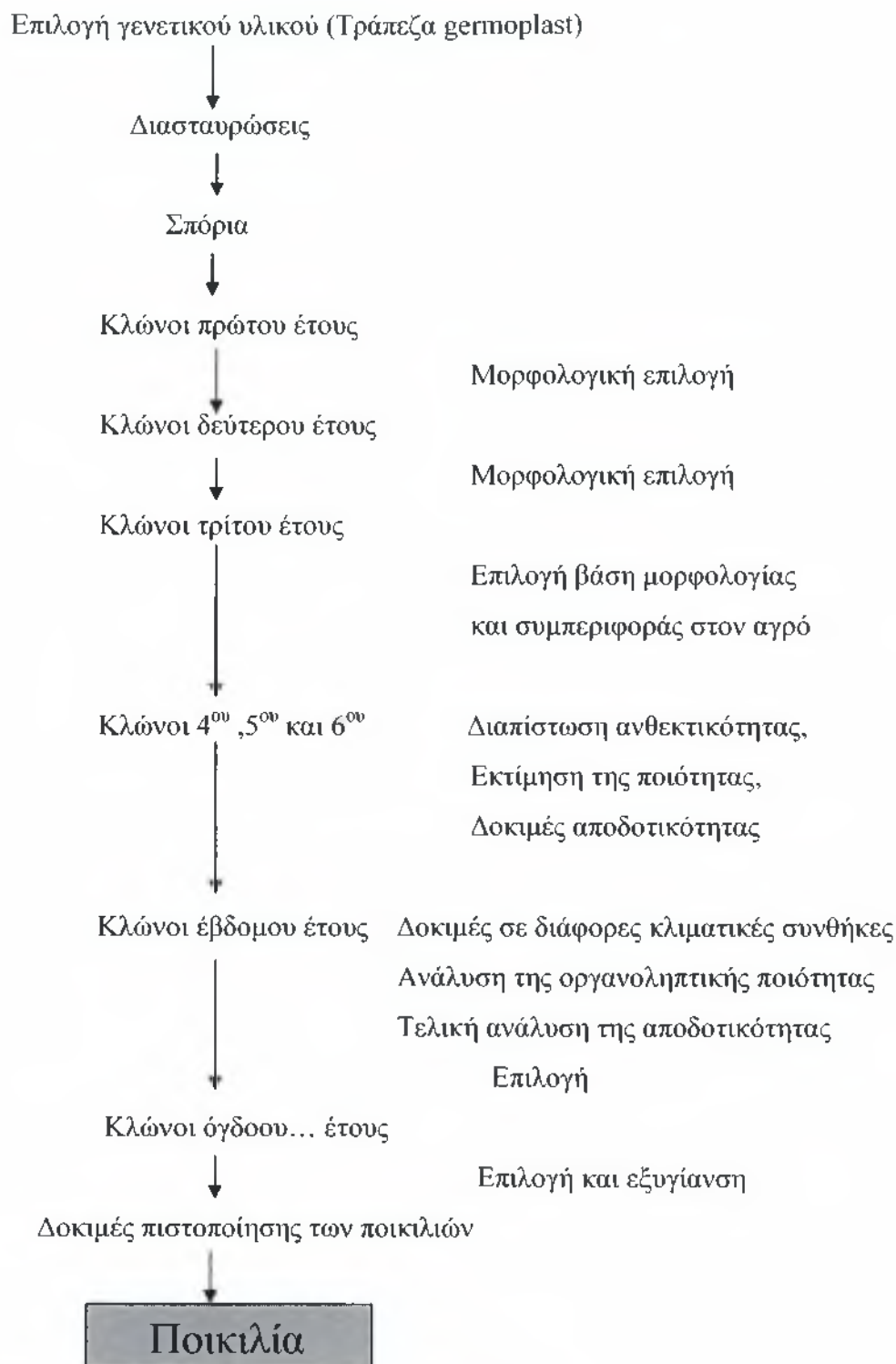
Ο βασικός σκοπός ενός προγράμματος βελτίωσης της πατάτας είναι η εξέλιξη της καλλιέργειας της όπου η παραγωγικότητα και η προσαρμοστικότητα της θα είναι ανώτερη σε σχέση με τις υπάρχουσες. Η αγενής μέθοδο της εισαγωγής και δοκιμής και τα μικρό-μεσοπρόθεσμα αποτελέσματα είναι ένα πρώτο βήμα. Ωστόσο, όταν σε μια περιοχή παρουσιάζονται κλιματολογικές ή/ και βιολογικές συνθήκες καταπόνησης τότε συνήθως η παραγωγικότητα μειώνεται. Στην περίπτωση αυτή ο μόνος τρόπος για να υπερκεραστεί το πρόβλημα είναι η δημιουργία νέας παραλλακτικότητας διαμέσου κατευθυνόμενων διασταυρώσεων. Η στρατηγική αυτή θεμελιώνεται αν τη δημιουργία νέας γενετικής παραλλακτικότητας ακολουθήσει επιλογή των επιθυμητών γενοτύπων στους απογόνους της  $F_1$  και στις διαδοχικές γενεές.

Για τη επιτυχία της εγγενούς μεθόδου θα πρέπει να υλοποιηθούν τρεις βασικές φάσεις.

- 1.Επιλογή των προγόνων.
2. Εγγενής υβριδοποίηση
3. Διαλογή των φυτών της πρώτης γενεάς.

Οι επιλεγμένοι από την πρώτη γενεά φυτών κόνδυλοι συνεχίζουν να αξιολογούνται διαμέσου των κλωνικών γενεών του 1<sup>ου</sup> έως και του 5<sup>ου</sup> χρόνου έως ότου πιστοποιηθούν τα ειδικά γνωρίσματά τους.

---



Εικόνα 3. Σχηματική παράσταση της κλασικής μεθόδου βελτίωσης μέσω εγγενούς αναπαραγωγής.

Τελικά, οι κλώνοι που θα παραμείνουν μετά το τέλος της επιλογής χρησιμοποιούνται σε πειράματα αξιολόγησης με μάρτυρες, που είναι οι πλέον δοκιμασμένες ποικιλίες στην περιοχή. Αν ο κλώνος ξεπεράσει τους μάρτυρες, τότε θα μπορεί να αποτελέσει τη βάση δημιουργίας μιας καινούργιας ποικιλίας. Ο χρόνος που χρειάζεται για τη δημιουργία μιας καινούργιας ποικιλίας είναι 7 με 10 χρόνια.

Μια από τις δυσκολίες της μεθόδου αυτής είναι η ανάγκη διαχείρισης μεγάλων πληθυσμών φυτών σε συνδυασμό με τις λίγες πιθανότητες για την εμφάνιση ενός καλού κλώνου. Η εφαρμοζόμενη επιλογή είναι πολύ αυστηρή στις αρχικές φάσεις, όπου το κριτήριο είναι τα μορφολογικά γνωρίσματα, χωρίς να αξιολογούνται σε αυτά τα στάδια άλλοι σημαντικοί χαρακτήρες, όπως είναι αυτοί που έχουν να κάνουν με την εμπλεκόμενη ποιότητα ή την προσαρμοστικότητα σε διαφορετικές κλιματικές συνθήκες ή την αντοχή σε ιούς και μύκητες.

### **2. 1. 2. Βελτίωση σε διπλοειδές επίπεδο.**

Μια άλλη συμπληρωματική μέθοδος είναι η βελτίωση της πατάτας σε διπλοειδές επίπεδο. Το είδος *tuberosum* του γένους *Solanum* περιέχει πολλά υποείδη, από διπλοειδή ( $2n=2x=24$ ) έως εξαπλοειδή ( $2n=6x=72$ ). Οι βοτανικοί σπόροι μπορούν να αναπτυχθούν, κανονικά, όταν παρουσιάζουν μια σχέση χρωμοσωμάτων 2/3/2, στο έμβρυο, το ενδοσπέρμιο και τους σωματικούς ιστούς του μητρικού φυτού. Η διασταύρωση ανάμεσα σε γονείς με διαφορετικό επίπεδο πλοειδίας αλλάζει αυτή την αναλογία προκαλώντας την ανικανότητα του ενδοσπερμίου να διαφοροποιηθεί και να θρέψει το έμβρυο. Όσον αφορά την παραγωγή σπόρων, αυτοί μπορεί να μην είναι βιώσιμοι ή να μη έχουν δημιουργηθεί γιατί η χρωμοσωματική διαφοροποίηση μπορεί να έχει προκαλέσει στειρότητα. Οι καταστάσεις αυτές είναι δυνατό να αποφευχθούν χρησιμοποιώντας την τεχνική της διαπλοειδίας και τη χρησιμοποίηση μη μειωμένων γαμετών σαν χρήσιμες μεθόδους για τον χειρισμό του επιπέδου πολυπλοειδίας (Uhrig 1985).

Μια ομάδα από τα υποείδη του *S. tuberosum*, λόγω της γενετικής τους κατασκευής, μπορούν να ταξινομηθούν ως αυτοτετραπλοειδή. Αυτό δημιουργεί μια σειρά προβλημάτων κατά την εφαρμογή ενός προγράμματος βελτίωσης, αφού καθιστά αδύνατη την παρουσία υποτελών γονιδίων σε φυτά που προκύπτουν μετά από διασταυρώσεις και δυσχεραίνει πολύ την κληρονομικότητα πολυγονιδιακών γνωρισμάτων. Τα γνωρίσματα που σχετίζονται με την υπερευαισθησία ή το χρώμα των βολβών ακολουθούν Μεντελική κληρονομικότητα που είναι μονογονιδιακή ή

ολιγογονιδιακή και βρίσκεται σε μορφή συνδεδεμένων γονιδίων (Ross 1986). Χωρίς αμφιβολία υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός γνωρισμάτων που ελέγχονται από πολλά γονίδια (ανθεκτικότητα, παραγωγικότητα ή περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία). Για να αξιοποιηθούν λοιπόν τα γνωρίσματα αυτά από ένα πρόγραμμα βελτίωσης, είναι αναγκαία η διαχείριση μεγάλων πληθυσμών για να πραγματοποιηθούν οι επιθυμητοί γενετικοί συνδυασμοί. Αντίθετα, θα ήταν εφικτό να αποκτηθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα χρησιμοποιώντας άγρια είδη που παρουσιάζουν ενδιαφέροντα γονίδια, αφού τα περισσότερα από τα 228 είδη του *Solanum*, που παράγουν κονδύλους, είναι διπλοειδή (Iwanaga και Schmiediche 1989).

Όλες οι παραπάνω απόψεις, δείχνουν τα πλεονεκτήματα πραγματοποίησης της βελτίωσης σε διπλοειδές επίπεδο, αφού επιτρέπει την αξιοποίηση διασταυρώσεων με διπλοειδή είδη, έχοντας αρκετές εγγυήσεις επιτυχίας. Επιπλέον, η βελτίωση σε αυτό το επίπεδο επιτρέπει την γρήγορη απόρριψη γονιδίων και τον πιο αποτελεσματικό συνδυασμό χαρακτήρων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Έτσι, είναι δυνατό να δημιουργηθούν νέοι τετραπλοειδείς κλώνοι, στους οποίους να συμμετέχουν γενώματα από άγρια διπλοειδή είδη, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην αύξηση της γενετικής παραλλακτικότητας. Για να ολοκληρωθεί όμως η επιλογή, είναι απολύτως αναγκαίο να εφαρμοσθούν μέθοδοι εξαγωγής χρωμοσωμάτων από διπλοειδή φυτά εκτός από τα τετραπλοειδή και αντιστρόφως μέθοδοι σύνθεσης τετραπλοειδών φυτών εκτός τα διπλοειδή, με την τελική απόκτηση του ιδανικού επιπέδου πολύπλοειδίας που στη πατάτα είναι το τετραπλοειδές. Αυτό το επίπεδο εξασφαλίζει την καλή φαινοτυπική σταθερότητα χάρη στο αυξημένο αριθμό αλληλόμορφων και ακόμα η τετρασωμική κληρονομικότητα αυξάνει τις πιθανότητες να υπάρχουν τέσσερα αλληλόμορφα γονίδια σε κάθε γονιδιακή θέση (Loci). Αποτέλεσμα της τελευταίας κατάστασης είναι η εμφάνιση του φαινομένου της ετέρωσης, κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ αλληλομόρφων και γονιδιακών θέσεων. Έτσι ένα πρόγραμμα βελτίωσης σε διπλοειδές επίπεδο αποτελείται από τρεις φάσεις:

- Απόκτηση διπλοειδών ( $2n=2x=24$ ) εκτός από των τετραπλοειδών κλώνων.
- Δημιουργία βελτιωμένων διπλοειδών πληθυσμών.
- Επιστροφή στο τετραπλοειδές επίπεδο.

### **2. 6. 2. 1. Απόκτηση των διαπλοειδών.**

Η ανάπτυξη διαπλοειδών εμβρύων με παρθενογένεση (*in-situ*) πραγματοποιείται με διασταύρωση τετραπλοειδών γενοτύπων με διάφορους κλώνους του *S. phureja* (Hougas 1958). Για να γίνει αυτό θα πρέπει να αποφευχθεί η διπλή γονιμοποίηση και να γονιμοποιηθεί ο δεύτερος πυρήνας από ένα αποκατεστημένο και σχηματισμένο σε δοκιμαστικό σωλήνα πυρήνα, παράγοντας με τον τρόπο αυτό ένα λειτουργικό εξαπλοειδές ενδοσπέρμιο (Von Wangenheim κ. ά. 1960, Montelongo-Escobedo και Rowe 1969). Επίσης, μπορούν να δημιουργηθούν τριπλοειδή έμβρυα, αλλά τα περισσότερα από αυτά εκφυλίζονται. Ο αριθμός των σπόρων που αποκτούνται αν επικονιασθούν άνθη, καθώς και η αναλογία των διαπλοειδών ποικίλουν εξαρτώνται από τον γενότυπο του τετραπλοειδούς γονέα και από τις συνθήκες του περιβαλλοντικές (Rousselle και Russelle-Bourgeois 1994).

Οι διαπλοειδείς κλώνοι που αποκτούνται με τον τρόπο αυτό έχουν τον ίδιο αριθμό χρωμοσωμάτων με τον αντίστοιχο των διπλοειδών, αλλά το επίπεδο πλοειδίας τους είναι αυτό των καλλιεργούμενων φυτών. Ωστόσο, υπάρχουν δεδομένα που αποκαλύπτουν ότι σε πολλές περιπτώσεις μεταβιβάζονται χρωμοσώματα (ολόκληρα ή τμήμα τους) στους διαπλοειδείς κλώνους από τον δότη *S. phureja* (Clulow κ. ά. 1991). Τα διαπλοειδή που αποκτώνται έχουν μικρή ευρωστία και παρουσιάζουν μειωμένη παραγωγικότητα. Εμφανίζουν επίσης μια μεγάλη παραλλακτικότητα στη μορφολογία των φυτών, την πρωιμότητα και μερικές φορές στην ανθεκτικότητα σε βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες καταπόνησης.

### **2. 6. 2. 2. Δημιουργία βελτιωμένων διαπλοειδών πληθυσμών.**

Αποκτώνται διαμέσου διασταυρώσεων μεταξύ καλλιεργούμενων διαπλοειδών και άγριων διπλοειδών ειδών. Οι διασταυρώσεις αυτές γίνονται για να εισαχθούν επιθυμητά γονίδια που δεν υπήρχαν στη καλλιεργούμενη μορφή, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την ευρωστία και την παραγωγικότητα τους. Στην αρχική φάση επιλέγονται τα καλύτερα υβρίδια της πρώτης γενεάς, τα οποία στη συνέχεια θα διασταυρωθούν με άλλα διπλοειδή είδη (Rousselle-Bourgeois και Rousselle 1992). Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως μετά την επιστροφή τους στο τετραπλοειδές επίπεδο. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένας βελτιωμένος πληθυσμός που παρουσιάζει μια καινούργια παραλλακτικότητα κατά την επιστροφή του στο *tuberosum*, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την γενετική του βάση.

Τα πρώτα καλλιεργούμενα είδη που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό ήταν τα *S. phureja* και *S. stenotomum*. Τα είδη αυτά είχαν το πλεονέκτημα ότι δεν φέρουν πολλά ανεπιθύμητα γνωρίσματα και παράγουν απογόνους με ένα καλό επίπεδο ετέρωσης. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν είδη που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στους νηματώδεις, όπως είναι τα είδη *S. gourlayi*, *S. sparsipilum*, *S. spregazzinii* και *S. vernei*. Πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα αποκτήθηκαν και από διασταυρώσεις μεταξύ διαπλοειδών και άλλων συγγενικών ειδών που επιλέχθηκαν από το *tuberosum* και συμπεριλαμβάνουν και είδη που ή δεν κονδυλοποιούν ή το κάνουν αυτόν με δυσκολία.

### **2. 6. 2. 3. Επιστροφή στο τετραπλοειδές επίπεδο.**

Ακόμα και οι καλύτεροι διπλοειδείς κλώνοι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν απ' ευθείας σαν εμπορικές καλλιέργειες λόγω της μικρής τους αποδοτικότητας. Για το λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία η μετατροπή τους σε τετραπλοειδείς. Για να επιτευχθεί αυτός ο σκοπός υπάρχουν τρεις δρόμοι: α) μιτωτική, β) μειωτική και γ) σωματική πολυπλοειδία.

#### **A) Μιτωτική πολυπλοειδία.**

Πραγματοποιείται με διπλασιασμό του αριθμού των χρωμοσωμάτων μετά από μεταχείριση με υδατικό διάλυμα διαφόρων συγκεντρώσεων κολχικίνης αν και συχνά δημιουργούνται χμαιρικά φυτά (De Maine και Fantes 1983). Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να πραγματοποιηθεί και διαμέσου της αναγέννησης μοσχευμάτων με ιστοκαλλιέργεια, στην οποία οι στιγμιαίοι διπλασιασμοί εμφανίζονται σε υψηλά επίπεδα και δεν παρουσιάζονται χμαιρικά φυτά (Rousselle 1989).

#### **B) Μειωτική πολυπλοειδία.**

Βασίζεται στην παρουσία διπλών-γαμετών ή  $2n$  γαμετών. Οι διπλοί-γαμέτες είναι γαμέτες που δεν έχουν υποστεί μείωση και έχουν τον ίδιο αριθμό χρωμοσωμάτων με το φυτό από το οποίο προήλθαν. Η εμφάνισή τους είναι σχετικά συχνή στα είδη του γένους *Solanum* που παράγουν κονδύλους και προέρχονται από ανωμαλίες κατά τη μειωτικής διαδικασίας. Η πολυπλοειδία μπορεί να είναι μονόπλευρη (διασταυρώσεις  $4x-2x$ ) είτε αμφίπλευρη ( $2x-2x$ ) και τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη διαμόρφωσή τους (Tai 1994).

- Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, η πρόωρη σύνθεση κυττάρων λαμβάνει χώρα μετά την μετάφαση II, για να πραγματοποιηθεί η τελόφαση, οπότε παράγονται γαμέτες του τύπου, αποκατάσταση της δεύτερης διαίρεσης SDR

(Second Division Restitution) που είναι ομοζύγωτοι στην περιοχή που περιλαμβάνεται ανάμεσα στο κεντρομερές και το πρώτο χίασμα ενώ μεταξύ τους είναι όλοι διαφορετικοί. Η μεταφορά είναι επιστροφή κατά 40% στον αρχικό τετραπλοειδή γενότυπο.

- Σύμφωνα με το δεύτερο μηχανισμό, η παραγωγή παράλληλων ενώσεων ή συγχωνεύσεων κατά τη μετάφαση II, ακολουθείται από το σχηματισμό ενός μόνο κυτταρικού τοιχώματος. Παράγονται γαμέτες του τύπου, αποκατάσταση της πρώτης διαίρεσης FDR (First Division Restitution) που είναι ετεροζύγωτοι και όλοι διαφορετικοί έως το πρώτο σημείο ανταλλαγής. Στην περίπτωση αυτή μεταβιβάζεται περίπου το 80% της ετεροζυγωτίας.
- Σύμφωνα με τον τρίτο μηχανισμό, η απουσία ολοκληρωτικού ζευγαρώματος των χρωμοσωμάτων μειώνει τον αριθμό των επαναδιασταυρώσεων. Η μείωση αυτή, σε συσχέτιση με τον σχηματισμό παράλληλων ενώσεων ή συγχωνεύσεων, συμβάλλει στην παραγωγή 2n γαμετών, που έχουν με το ίδιο γένωμα με το αρχικό φυτό.

### Γ) Σωματική πολυπλοειδία.

Για το λόγω αυτό χρησιμοποιείται η σύντηξη πρωτοπλαστών. Αποτελεί θεωρητικά την πιο σίγουρη οδό για τον συνδυασμό των γενοτύπων και των κυτταροπλασμάτων των διπλοειδών που παρουσιάζουν συμπληρωματικούς χαρακτήρες.

## **2. 7. Χρησιμοποίηση των αγρίων ειδών για τη γενετική βελτίωση της πατάτας.**

Τα πρώτα φυτά πατάτας που εξάχθηκαν στις εύκρατες χώρες του βορείου ημισφαιρίου προέρχονταν από τις περιοχές των μεγάλων υψιπέδων της Νοτίου Αμερικής. Τα φυτά αυτά εμφάνισαν προβλήματα επειδή δεν μπορούσαν να προσαρμοστούν στην φωτοπερίοδο των νέων περιοχών καλλιέργειας. Οι ασθένειες μείωναν τις συγκομιδές, περιορίζοντας την γενετική βάση της καλλιέργειας που θα μπορούσε να καλλιεργηθεί στο εύκρατο κλίμα. Αυτό οδήγησε σε διάφορες προσπάθειες για διεύρυνση της γενετικής βάσης του φυτού, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε τρία στάδια.

Ως πρώτο στάδιο χαρακτηρίστηκε η τυχαία διασταύρωση κατά τον 19<sup>ο</sup> αιώνα, των άγριων ειδών με κυριότερο το *S. demissum* με διάφορες καλλιεργούμενες ποικιλίες. Αυτό προήλθε ως συνέπεια της καταστροφής που συνέβη στην Ιρλανδία το

1845-47 που οφείλονταν στον μύκητα *Phytophthora infestans*. Ο γερμανός επιστήμονας Klotzsch, στην προσπάθειά του να διερευνήσει την ανθεκτικότητα της καλλιεργούμενης πατάτας στην παραπάνω ασθένεια, δημιούργησε το 1849 υβρίδια, διασταυρώνοντας το *S. tuberosum* με το *S. demissum*. Ένα δεύτερο στάδιο δημιουργίας υβριδίων άρχισε κατά το 1890, σε διάφορες χώρες και από διάφορους βελτιωτές. Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η αξιοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητας στον περονόσπορο που είχαν εντοπισθεί στο *S. demissum*. Μόνο πέντε από βελτιωτές αυτούς κατόρθωσαν να πετύχουν θετικά αποτελέσματα, μετατρέποντας τα υβρίδια τους σε προγόνους πολλών σημερινών καλλιεργούμενων ποικιλιών. Το τρίτο στάδιο δημιουργίας υβριδίων άρχισε το 1926 με την έρευνα σε άγρια είδη για γονίδια ανθεκτικότητας σε βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες καταπόνησης. Για το σκοπό αυτό οργανώθηκαν πολλές διεθνείς εκστρατείες στην Κεντρική και τη Νότια Αμερική, απ' όπου έγιναν καινούργιες εισαγωγές γενετικού υλικού.

Το φυτικό υλικό που έχει επιλεγεί τόσο από καλλιεργούμενες ποικιλίες όσο και από συγγενικά είδη, φυλάσσεται σε ειδικές τράπεζες γενετικού υλικού, που είναι κατανεμημένες σε όλο τον κόσμο. Επίσης, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές εργασίες αξιολόγησης του γενετικού υλικού για να βρεθούν πηγές ανθεκτικότητας στον περονόσπορο, στην ασθένεια του καρουλιάσματος (Leaf-roll), τους ιούς X και Y και στο έντομο *Leptinotarsa decemlineata*. Ανάμεσα στα αξιόλογα αποτελέσματα των ερευνών που έγιναν ήταν και η ανακάλυψη γονιδίων ανθεκτικότητας για το νηματώδη στο *S. vernei*, για το κρύο στο *S. acaule* και για το *Leptinotarsa decemlineata* στο *S. chacoense* (Bukasov και Kameraz 1973).

Ο Toxopeus (1952) έδειξε ότι η εισαγωγή γονιδίων από το *S. demissum* στην καλλιεργούμενη πατάτα είχε θετική επίπτωση στην αύξηση της αποδοτικότητας, όχι όμως στη  $F_1$  γενεά αλλά σε μεταγενέστερες γενεές που προέρχονταν από αναδιασταυρώσεις. Αυτό άλλαξε τη συμπεριφορά των βελτιωτών που αύξησαν την εισαγωγή και χρησιμοποίηση εξωτικού γενετικού υλικού. Αποτέλεσμα της αλλαγής αυτής η εντατική χρήση των ειδών αυτών. Η τάση οδήγησε στην ενσωμάτωση έξι άγριων ειδών στις ευρωπαϊκές καλλιέργειες: (α) το *S. demissum* (με ανθεκτικότητα στον μύκητα *P. infestans* και στον ιό *PLRV*), (β) το *S. acaule* (με ανθεκτικότητα στους ιούς *PVX*, *PLRV*, *PSTV*, στη μαύρη σκωρίαση, στο *Globodera sp.* και στον παγετό), (γ) το *S. chacoense* (με ανθεκτικότητα στους ιούς *PVA*, *PVY*, στον μύκητα *P. infestans*, στους σκαραβαίους και στις σκωριάσεις), (δ) το *S. spagazzini* (με



ανθεκτικότητα στους μύκητες *Fusarium sp.* και, μαύρη σκωρίαση καθώς και στο *Globodera sp.*), (ε) το *S. stoloniferum* (με ανθεκτικότητα στους ιούς *PVA* και *PVY*), και (στ) το *S. vernei* (με ανθεκτικότητα στο *Globodera sp.*). Σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί γονίδια από τα *S. microdontum*, *S. sparsipilum*, *S. verrucosum*, *S. phureja*, *S. tuberosum ssp. andgena*, *S. commersonii* και *S. maglia*. Όπως μάλιστα έχει τονίσει ο Ross (1986), το λιγότερο 97 ευρωπαϊκές ποικιλίες, περιέχουν γονίδια από αυτά τα 13 είδη.

Η μειωμένη γενετική παραλλακτικότητα της καλλιεργούμενης πατάτας αποδείχθηκε από τους Mendoza και Haynes (1974), που υπολόγισαν τον συντελεστή συγγένειας χρησιμοποιώντας μια ομάδα από αμερικανικές ποικιλίες. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων οι τιμές αυτές ήταν παρόμοιες ή μεγαλύτερες των θεωρητικών που είχαν υπολογισθεί ανάμεσα σε προγόνους και απογόνους ή ανάμεσα σε αδέρφια. Με τον ίδιο τρόπο ο Glendinning (1983) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το γενετικό «μωσαϊκό» των μοντέρνων ποικιλιών ήταν ακόμα περιορισμένο και στενά συγγενικό.

## **2. 8. Εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας στη βελτίωση της πατάτας.**

Η τεχνική της ιστοκαλλιέργειας είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στα προγράμματα βελτίωσης της πατάτας συμπληρώνοντας και προσδίδοντας μια καλύτερη αποδοτικότητα στις παραδοσιακές μεθόδους. Η εφαρμογή της καλλιέργειας ιστών με διαφορετικές οδούς όπως είναι ο μικροπολλαπλασιασμός, η καλλιέργεια κυττάρων, γύρης ή εμβρύων και η παραγωγή σωματικών υβριδίων και υβριδίων από σύντηξη πρωτοπλαστών, προσφέρει απεριόριστες προοπτικές για δημιουργία νέας γενετικής παραλλακτικότητας. Η ένταξη του φυτικού υλικού που έχει δημιουργηθεί από τα βελτιωτικά προγράμματα σε ιστοκαλλιέργεια μπορεί να πραγματοποιηθεί για διάφορους σκοπούς όπως :

- Διευκόλυνση της εισαγωγής και της διαχείρισης καινούργιου φυτικού υλικού που είναι δύσκολη η διατήρηση του διαμέσου σεξουαλικής αναπαραγωγής όπως απλοειδή, πολυπλοειδή ή ανευπλοειδή
- Απόκτηση απλοειδών διαμέσου ολόκληρης καλλιέργειας ή μόνο της σπέρμοβλάστης.
- Αύξηση της παραλλακτικότητας επιτρέποντας σωματικούς υβριδισμούς μεταξύ ειδών.

- Διατήρηση των πιο αξιόλογων και χρησιμοποιούμενων γεννητόρων, σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης.
- Γρήγορος μικροπολλαπλασιασμός παράγοντας φυτά ελεύθερα από ιούς.
- Υπέρβαση ασυμβατότητας στην επικονίαση διαμέσου της καλλιέργειας εμβρύων.
- Εξακρίβωση καινούργιων χαρακτήρων δια μέσου της σωματικής παραλλακτικότητας.

### **2. 8. 1. Πολλαπλασιασμός φυτικού υλικού.**

Μικροπολλαπλασιασμός ονομάζεται γενικά ο αγενής πολλαπλασιασμός του φυτικού υλικού, χρησιμοποιώντας πολύ μικρά φυτικά τμήματα και έχει σαν σκοπό την απόκτηση μεγάλου αριθμού κλώνων σε μικρό χρονικό διάστημα. Η κλωνοποίηση με καλλιέργεια ιστών με έναν οφθαλμό και ένα φύλλο εξασφαλίζει την απόκτηση ενός μεγάλου αριθμού φυτών. Αυτή η τεχνική φαίνεται να αντικαθιστά τη παραδοσιακή μέθοδο παραγωγής της βάσης της πατάτας, αφού παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα όπως: ταχύτητα, γενετική ομοιομορφία του πολλαπλασιαζόμενου υλικού και εγγύηση για την υγιεινή του κατάσταση. Επιπλέον, επιτρέπει τη συντήρηση μεγάλου αριθμού συλλογών από ποικιλίες. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της προσέγγισης αυτής είναι ότι γίνεται δυνατή η απόκτηση κονδύλων *in-vitro* διαμέσου μικροπολλαπλασιασμού (Calderon 1987). Με τον τρόπο αυτό η παραγωγή φυταριών και κονδύλων μπορεί να γίνεται ανεξάρτητα. Τα γενετικά αυτά υλικά είναι δυνατό να διατηρούνται επί μήνες χωρίς να είναι απαραίτητη η μεταφορά τους από το ένα χημικό διάλυμα στο άλλο.

### **2. 8. 2. Καλλιέργεια μεριστωμάτων.**

Στην πατάτα τα κύτταρα των κονδύλων μπορεί να φέρουν παθογόνους μικροοργανισμούς οι οποίοι συνήθως μολύνουν τα φυτά αργότερα, κατά τη διάρκεια της αναπτύξεως τους. Έτσι, για να παραχθούν υγιή σπόρια είναι αναγκαία η εξόντωση των παθογόνων. Οι ιοί, που προσβάλλουν τα φυτά της πατάτας και αποτελούν ένα σοβαρό πρόβλημα, δεν εισβάλλουν εύκολα στα μεριστωματικά (domo apical) και τα νεανικά θεμελιώδη κύτταρα. Για το λόγο αυτό τα μεριστωματικά κύτταρα, που βρίσκονται σε ιστούς με έντονη κυτταροδιαίρεση (π. χ. ακραίους ή μασχαλιαίους οφθαλμούς, καθώς και σε ακρορίζια), μπορούν να χρησιμοποιηθούν

στην παραγωγή φυτών που να είναι ελεύθερα παθογόνων. Για να γίνει αυτό θα πρέπει τα μεριστωματικά κύτταρα αφαιρεθούν υπό ασηπτικές συνθήκες και να τοποθετηθούν (εκ νέου υπό ασηπτικές συνθήκες) σε κατάλληλο και αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα. Στις περιπτώσεις όμως που δεν επιτυγχάνεται η πλήρης εξόντωση των παθογόνων διαμέσου της καλλιέργειας μεριστωμάτων, τότε είναι δυνατή η βελτίωση των αποτελεσμάτων αν χρησιμοποιηθούν μεριστώματα από φυτά που είχαν υποστεί την επίδραση θερμοκρασίας. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει καλλιέργεια του φυτικού υλικού για μερικές εβδομάδες σε θερμοκρασίες 35-38° C (Serrano και Pinol 1991). Με αυτό τον τρόπο η μεριστωματική καλλιέργεια επιτρέπει την διατήρηση και την εξυγίανση ποικιλιών με ενδιαφέρον, που χωρίς την βοήθεια αυτής της μεθόδου θα ήταν καταδικασμένες να εξαφανισθούν.

### **2. 8. 3. Απόκτηση απλοειδών.**

Η φυσική πορεία ενός γαμέτη είναι να ενωθεί με τον γαμέτη του αντίθετου φύλου και να δώσει τον ζυγώτη. Αυτή η πορεία του σεξουαλικού κύκλου του φυτού μπορεί να διακοπεί, αν καλλιεργηθούν σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα χωριστά οι στήμονες ή οι ωθήκες. Έτσι, μπορούν να αποκτηθούν απλοειδή φυτά, που θα φέρουν τον γαμετικό αριθμό χρωμοσωμάτων. Όμως τα απλοειδή αυτά φυτά είναι στείρα και για να διατηρηθούν θα πρέπει να πολλαπλασιασθούν αγενώς. Μια εναλλακτική λύση είναι να καταβληθεί προσπάθεια να γίνουν γόνιμα ύστερα από τεχνητό διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων τους. Αν ακολουθηθεί ο δεύτερος δρόμος (χρωμοσωματικός διπλασιασμός) είναι δυνατό να παραχθούν ταχύτατα 100% ομοζύγωτες σειρές, αποφεύγοντας έτσι της αναγκαίες αλλά χρονοβόρες αυτογονομοποιήσεις για τη σταθεροποίηση του γενετικού υλικού (Chu 1982). Επιπλέον, το απλοειδές υλικό αλλά και το υλικό που προκύπτει μετά τον χρωμοσωματικό διπλασιασμό, είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τον εντοπισμό και μελέτη μεταλλάξεων. Αυτό συμβαίνει γιατί στα απλοειδή άτομα υπάρχει μόνο το ένα γονίδιο που ακόμα και αν είναι υποτελές μπορεί να εκδηλώσει τη δράση του, με αποτέλεσμα την άμεση έκφραση της γενετικής μετάλλαξης που πιθανά υπήρχε. Έτσι, είναι δυνατό να εντοπισθούν και να επιλεγούν χρήσιμες μεταλλάξεις. Ένα επιτυχημένο παράδειγμα της προσέγγισης αυτής είναι η μετατροπή της σύστασης του αμύλου της πατάτας που επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας μονοαπλοειδή. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκε επιλέχθηκε και χαρακτηρίστηκε μια ποικιλία πατάτας, της οποίας το άμυλο ήταν ελεύθερο από αμυλόζη (Jacobsen, 1991). Η *in-vitro* παραγωγή των

απλοειδών φυτών μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας τα αρσενικά γαμετόφυτα (καλλιέργεια της γύρης) ή με γυνογένεση, χρησιμοποιώντας σπερμοβλάστες (Duhoux 1988). Η τεχνική της καλλιέργειας ανθέρων εφαρμόστηκε με επιτυχία στην πατάτα από τους Uhrig και Salamini (1987), οι οποίοι προηγούμενα είχαν εντοπίσει γενοτύπους που χαρακτηρίζονταν από υψηλή ικανότητα αναγέννησης.

#### **2. 8. 4. Σωμακλωνική παραλλακτικότητα.**

Η παραλλακτικότητα που εμφανίζεται στα φυτά τα οποία προέρχονται από τεχνικές ιστοκαλλιέργειας, ονομάζεται σωμακλωνική. Η τελευταία, μπορεί να αποδειχθεί ευεργετική σε προγράμματα βελτίωσης, ως μια συμπληρωματική πηγή της ήδη υπάρχουσας παραλλακτικότητας (Larkin και Scowcroft 1981). Αντίθετα, η σωμακλωνική παραλλακτικότητα μπορεί να εμποδίσει το βελτιωτικό πρόγραμμα αν ο στόχος του ήταν η αναγέννηση υλικού βέβαιης γενετικής σταθερότητας. Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα χρησιμοποιείται σε πολλά βελτιωτικά προγράμματα, όταν το γνώρισμα που ενδιαφέρει κληρονομείται και στην περίπτωση της πατάτας αν το γονίδιο αυτό μεταφέρεται με βλαστικό πολλαπλασιασμό σε ικανοποιητικό βαθμό. Η μέθοδος αυτή μπορεί να είναι ενδιαφέρουσα για γνωρίσματα όπως ανθεκτικότητα σε ιούς ή σε μύκητες όπως είναι ο *Phytophthora infestans* και το *Fusarium sp.*(Behnke 1979, 1980).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας είναι πολλοί, όπως ο χρόνος που απαιτείται έως την οργανωμένη μεριστωματική ανάπτυξη, η γενετική σύνθεση του υλικού που συμμετέχει, οι χρησιμοποιούμενοι ρυθμιστές ανάπτυξης στο διάλυμα της καλλιέργειας και η πηγή από όπου προήλθαν οι καλλιεργούμενοι ιστοί (Karp 1995). Παράλληλα, έχουν εντοπιστεί διάφορες γενετικές αλλαγές που είναι υπεύθυνες για τη σωμακλωνική παραλλακτικότητα στα φυτά και που περιλαμβάνουν αλλαγές στον καρυότυπο, γενετικές μεταλλάξεις στο πυρηνικό και κυτταροπλασματικό γένωμα, ανακατατάξεις, αντιστροφές, καταστροφές και τροποποιήσεις των χρωμοσωμάτων, αναδομήσεις γονιδίων και μη συμβατές μεταλλάξεις, όπως είναι οι ενισχύσεις και μεταφερόμενα στοιχεία (Peschke και Phillips 1992). Από την άλλη πλευρά, έχουν παρατηρηθεί υψηλά ποσοστά ακυτταροκινητικών κυττάρων (acytokinetic cells). Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι εάν ο σχηματισμός του κυτταρικού τοιχώματος πραγματοποιηθεί νωρίς τότε παρουσιάζεται μια αύξηση κατά τη συντήρηση και την αναπαραγωγή του αρχικού γενοτύπου (Everdink κ. ά. 1994).

Η καλλιέργεια πρωτοπλαστών έχει βοηθήσει στον εντοπισμό ορισμένων χρήσιμων μορφών παραλλακτικότητας, που αφορούσαν ανθεκτικότητα σε ασθένειες της πατάτας (Shepard 1980). Η μελέτη που ακολούθησε αποκάλυψε ότι τα φυτά αυτά ήταν ανευπλοειδή (Gill 1986). Έχουν βρεθεί ακόμα διαμέσου της καλλιέργειας εκφύτων και οφθαλμών πατάτας χρήσιμες μορφές παραλλακτικότητας που αφορούν την παραγωγικότητα (Thieme και Griess 1996). Επιπλέον έχουν εντοπισθεί φυτά των οποίων οι κόνδυλοι δεν σκουραίνουν μετά το ξεφλούδισμα καθώς και ένας γενότυπος που σκουραίνει πολύ γρήγορα (Thieme και Griess 1996). Ο πίνακας 5 δείχνει ορισμένα παραδείγματα απόκτησης ανθεκτικότητας στην πατάτα μέσω σωματικής παραλλακτικότητας.

Πίνακας 5. Απόκτηση ανθεκτικότητας στη πατάτα διαμέσου της σωματικής παραλλακτικότητας.

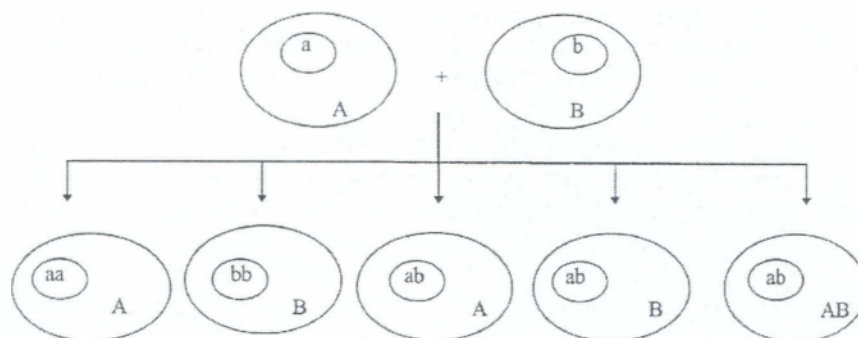
| Σύστημα καλλιέργειας | Επιλογή    | Παθογόνο                      | Από τον        |
|----------------------|------------|-------------------------------|----------------|
| Πρωτοπλάστες         | -          | <i>Phytophthora infestans</i> | Shepard (1980) |
| Πρωτοπλάστες         | -          | <i>Alternaria solani</i>      | Matern (1978)  |
| Πρωτοπλάστες         | -          | PVX                           | Wenzel (1986)  |
| Κάλιοι               | Με διήθηση | <i>Fusarium oxysporum</i>     | Behnke (1980)  |
| Κάλιοι               | Με διήθηση | <i>Phytophthora infestans</i> | Behnke (1979)  |

## **2.9. Σωματικός υβριδισμός.**

Ο σωματικός υβριδισμός πραγματοποιείται με τη σύντηξη φυτικών κυττάρων χωρίς κυτταρικό τοίχωμα ή πρωτοπλάστων και βασίζεται στην ικανότητα των κυττάρων και των απομονωμένων ιστών, από οποιοδήποτε φυτό, να αναγεννούν καινούργια όργανα ή ακόμα και ολόκληρα φυτά διαμέσου της καλλιέργειας ιστών. Η μέθοδος αυτή έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματική και έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς την αναγέννηση της πλειοψηφία των φυτικών ειδών. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αναγέννηση των φυτών από πρωτοπλάστες μελετήθηκαν διεξοδικά από τους Roest και Gilissen (1993).

Η διάσπαση του κυττάρου δεν συμβαίνει πριν να λάβει χώρα ο μεταβολισμός του αμύλου (Jones 1989). Στη συνέχεια, ο σχηματισμός ενός καινούργιου κυτταρικού τοιχώματος αργεί περίπου δυο ημέρες. Η διαίρεση των πρωτοπλαστών επίσης εξαρτάται από την φάση του κυτταρικού κύκλου, δείχνοντας μια αυξημένη

ενεργητικότητα στα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G-2 (Magnien 1982). Γενικά, η διαφοροποίηση του κάλου αρχίζει με την ανάπτυξη της πολικότητας μέσα σε ένα κύτταρο που έχει ιδιαίτερα αυξημένο μεταβολισμό και το οποίο αργότερα θα μετατραπεί σε μεριστωματικό. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να ακολουθήσει τον δρόμο της βλαστογένεσης ή της σωματικής εμβρυογένεσης. Φαίνεται να υπάρχει μια γραμμική σχέση ανάμεσα στην δημιουργία ξύλου και τη συχνότητα των οφθαλμών (Barr 1996). Χάρη σε αυτή την ικανότητα, η σύντηξη των φυτικών σωματικών κυττάρων κάνει δυνατό το σχηματισμό υβριδίων ανάμεσα σε είδη που είναι σεξουαλικά ασυμβίβαστα, επιτρέποντας την μεταφορά μόνο ολιγονιδιακών γνωρισμάτων ανάμεσα σε σειρές ή είδη. Η πρώτη σύντηξη πρωτοπλαστών πραγματοποιήθηκε ανάμεσα σε είδη του γένους *Nicotiana* και αναπτύχθηκε από τον Carlson (1972). Με τον τρόπο αυτό οι Shepard και Totten (1977) κατάφεραν για πρώτη φορά να αναγεννήσουν ολόκληρα φυτά από πρωτοπλάστες πατάτας. Τελευταία, ο σωματικός υβριδισμός στη πατάτα διαμέσου της σύντηξης πρωτοπλαστών έχει εφαρμοστή για το ξεπέρασμα του εμποδίου της σεξουαλικής ασυμβατότητας μεταξύ διαφορετικών ειδών (Austin 1985b) ή για την επιστροφή σε τετραπλοειδές επίπεδο βελτιωμένων διπλοειδών κλώνων στο τελικό στάδιο ενός προγράμματος βελτίωσης (Waara, 1992). Έτσι, δυο ετεροζύγωτα πυρηνικά γενώματα, μπορούν να συνεργαστούν χωρίς να ανασυνδυαστούν λόγω μείωσης. Αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για χαρακτήρες πολυγονιδιακού τύπου. Στην εικόνα 4 παρουσιάζονται τα πιθανά προϊόντα της συντήξεως κατά την εφαρμογή του σωματικού υβριδισμού.



Εικόνα 4. Διάφοροι συνδυασμοί μετά την πραγματοποίηση του σωματικού υβριδισμού.

Τα κυριότερα προβλήματα της παραπάνω μεθόδου είναι:

- Υψηλή συχνότητα αυτόματων διπλασιασμών των χρωμοσωμάτων των διπλοειδών κλώνων.
- Διαφορετική ικανότητα αναγέννησης *in-vitro* των διάφορων γενοτύπων.
- Δυσκολία εξακρίβωσης των υβριδίων ανάμεσα στα προϊόντα της αναγεννήσεως.

Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα που προσφέρει η σύντηξη πρωτοπλαστών θα μπορούσαν να σημειωθούν τα εξής.

- Η ύπαρξη στα σωματικά υβρίδια όλων των κυρίαρχων γνωρισμάτων και των δυο γονέων.
- Αποτελεί μια γρήγορη και ενδιαφέρουσα οδό για τη χρησιμοποίηση του γενετικού υλικού των άγριων ειδών στα οποία δεν είναι εξακριβωμένη η πλειοψηφία των γονιδίων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον.
- Είναι μια μέθοδος για την τροποποίηση και βελτίωση πολυγονιδιακών γνωρισμάτων.
- Κάνει δυνατή τη μετατροπή του διαπυρηνικού γενετικού υλικού για να αποκτηθεί ένα υβριδικό κύτταρο με ανάμιξη κυτταροπλάσματος και από τους δυο γονείς.

### **2. 9. 1. Ηλεκτροσύντηξη πρωτοπλαστών.**

Υπάρχουν δυο μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη σύντηξη των πρωτοπλαστών, η χημική, χρησιμοποιώντας την γλυκόλη του πολυαιθυλενίου-(PEG) και η ηλεκτρική. Μετά από την αρχική έμφαση που δόθηκε στη χημική σύντηξη, σήμερα, στην πλειοψηφία των εργαστηρίων εφαρμόζεται η ηλεκτρική που είναι λιγότερο επιθετική. Το πλεονεκτήματα ηλεκτρικής σύντηξης, είναι η μεγαλύτερη ταχύτητα της, η απλότητα και ο έλεγχος της, αποφεύγοντας τη χρησιμοποίηση χημικών ουσιών που πιθανώς είναι τοξικά για το κύτταρο (Bates 1989). Η πρώτη ηλεκτρική σύντηξη πραγματοποιήθηκε στην πατάτα, ανάμεσα στο *S. tuberosum* και το *S. phureja* και αναπτύχθηκε από τον Puite (1986).

Οι πρωτοπλάστες παρουσιάζουν συνήθως ένα αρνητικό επιφανειακό φορτίο που βοηθά στην απώθηση των γειτονικών κυττάρων, όμως πρέπει να έρθουν σε επαφή πριν τη σύντηξη. Αυτό επιτυγχάνετε με χημικούς ή φυσικούς παράγοντες.

Ανάμεσα στους τελευταίους συγκαταλέγεται η επαφή μεταξύ των πρωτοπλαστών με μηχανικά μέσα με τη βοήθεια δηλαδή μικροπιπέτων (Senda 1979), αφού διαμέσου της καθίζησης και λόγω της βαρύτητας, μέρος των πρωτοπλαστών εντοπίζεται στη βάση της πλάκας (Morikawa 1987). Επίσης, για τη σύντηξη των πρωτοπλαστών έχει χρησιμοποιηθεί και η διηλεκτροφόρηση (Zimmermann 1982, Tempelaar και Jones 1985). Στη διηλεκτροφόρηση, οι πρωτοπλάστες εισέρχονται σε ένα διάλυμα χαμηλής αγωγιμότητας, όπως είναι ένα διάλυμα μανιτόλης με κατάλληλη οσμωτική πίεση, που τοποθετείται ανάμεσα σε δυο ηλεκτρόδια στα οποία εφαρμόζεται εναλλασσόμενο ρεύμα υψηλής συχνότητας (0.5-1.5 MHz). Τα επιφανειακά φορτία των πρωτοπλαστών πολώνονται και συμπεριφέρονται σαν δίπολα και μεταναστεύουν κατά μήκος των γραμμών του ηλεκτρικού πεδίου σε περιοχές με μεγαλύτερη ένταση. Καθώς μεταναστεύουν έρχονται σε επαφή ο ένας με τον άλλο σχηματίζοντας παράλληλες αλυσίδες στις γραμμές του ηλεκτρικού πεδίου. Ο σχηματισμός γραμμών πρωτοπλαστών σε επαφή παρουσιάζει μια σειρά από πλεονεκτήματα, όπως είναι η ευκολία παρατήρησής τους ή ο έλεγχός κατά τη σύντηξη.

Ο γενετικός χειρισμός των φυτών διαμέσου της ηλεκτρικής σύντηξης εμπλέκεται με τη χρησιμοποίηση βιώσιμων πρωτοπλαστών. Η εφαρμογή ενός βραχέως ηλεκτρικού παλμού συνεχούς ρεύματος DC και υψηλής εντάσεως στα κύτταρα προκαλεί μια αναστρεφόμενη περατότητα στη μεμβράνη τους. Έτσι, οι πρωτοπλάστες που είναι σε επαφή μπορούν να συντηχθούν αν υποβληθούν σε ένα εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο θα προκαλέσει τον σχηματισμό προσωρινών αναστρεφόμενων πόρων στις πλασματικές μεμβράνες (Zimmerman και Scheurich 1981). Η πλασματική μεμβράνη κανονικά ενεργεί σαν μονωτικό υλικό και έχει υψηλή ηλεκτρική ανθεκτικότητα. Αυξάνοντας τη διαφορά δυναμικού, όταν αυτή φθάσει στο σημείο στο οποίο σπάει η μόνωση της μεμβράνης (τάση ρήξης της μεμβράνης) σχηματίζεται ένας πόρος. Επίσης, είναι δυνατό να επιτευχθεί μια άθροιση των πρωτοπλαστών, αφήνοντας τους να καθιζάνουν με την παρουσία PEG (Montane 1987) πριν την εφαρμογή του παλμού.

Ο απαραίτητος εξοπλισμός για την εφαρμογή της ηλεκτοσύντηξης περιλαμβάνει ένα θάλαμο από λαμαρίνα και μια ηλεκτρεγερτική δύναμη 100-200 V/cm με συχνότητα 1MHz. Τελικά, αν χρησιμοποιηθεί ένα ηλεκτρικό πεδίο AC των 30-40s, τότε η πλειοψηφία των πρωτοπλαστών θα παραταχθούν και θα συντηχθούν με την εφαρμογή ενός παλμού DC για 20-40μs. Η σύντηξη βλαστικών κυττάρων απαιτεί την εξάλειψη των κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι παραγόμενοι πρωτοπλάστες



είναι ευπαθείς και ευαίσθητοι σε φυσικές και χημικές βλάβες. Ωστόσο, όταν είναι συντηγμένοι ηλεκτρικά και παρότι είχαν υποβληθεί σε πεδία υψηλής τάσης είναι απολύτως βιώσιμοι και ικανοί να δώσουν ένα τέλειο φυτό υβρίδιο (Kohn 1985). Η χρησιμοποίηση καλής ποιότητας πρωτοπλάστων οδηγεί σε πιο καλά και ευκόλως επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα (Jones, 1985). Για το σχηματισμό αλυσίδων από πρωτοπλάστες με τη χρησιμοποίηση της διηλεκτροφόρησης απαιτείται ένα διάλυμα χαμηλής αγωγιμότητας. Στην πράξη, λόγω του μικρού χρόνου που χρειάζεται για την εφαρμογή της διαδικασίας της διηλεκτροφορήσεως, η εμφάνιση των πρωτοπλάστων σε ένα διάλυμα μανιτόλης χαμηλής αγωγιμότητας δεν παρουσιάζει προβλήματα. Στη συνέχεια οι πρωτοπλάστες θα πρέπει να εμβαπτιστούν σε διάλυμα κατάλληλο για την καλλιέργειά τους.

Η απόκτηση των προϊόντων της σύντηξης μπορεί να επηρεαστεί από φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των παραμέτρων των ηλεκτρικών παλμών, την σύνθεση του διαλύματος της σύντηξης, την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των πρωτοπλάστων και το είδος καθώς και το μέγεθος των κυττάρων. Η διηλεκτροφορητική ευθυγράμμιση των βλαστικών πρωτοπλάστων μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα εύρος ηλεκτρικών πεδίων AC, αν και η πλειοψηφία των ερευνητών χρησιμοποιούν 0.5-1.5Mhz και 100-200 V/cm, ανεξαρτήτως από τον τύπο και την προέλευση των πρωτοπλάστων. Αναμφισβήτητα, οι παλμοί DC που εξασφαλίζουν μια ιδανική σύντηξη ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Αυτοί κυμαίνονται από έναν ή πολυάριθμους παλμούς από 10 $\mu$ s και 1000V/cm έως 50 $\mu$ s και 2000V/cm. Οι πρωτοπλάστες που έχουν μεγάλη διάμετρο χρειάζονται μικρότερη τάση DC για την σύντηξη (Mehrlie 1990). Το γεγονός αυτό μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα, όταν κατά τη σύντηξη χρησιμοποιούνται πρωτοπλάστες που διαφέρουν πολύ ως προς το μέγεθος.

Οι άριστες συνθήκες που επιτρέπουν την υψηλή αποτελεσματικότητα της συντήξεως μπορούν, σε ορισμένες περιπτώσεις, να μειώσουν την βιωσιμότητα των κυττάρων και να διευκολύνουν την σύντηξη τριών ή και περισσότερων κυττάρων μεταξύ τους (Bates, 1985). Αν ο σκοπός της συντήξεως είναι η παραγωγή σωματικών υβριδίων, το ποσοστό των συντηγμένων κυττάρων δεν είναι τόσο σημαντικό όσο η ανάκτηση διπύρηνων βιώσιμων ετεροκαριωτικών κυττάρων. Τα προϊόντα σύντηξης πολλών κυττάρων παρουσιάζουν μειωμένη βιωσιμότητα και κατά την αναγέννηση τους σχηματίζουν φυτά υψηλότερου επιπέδου πλοειδίας καθώς και ανευπλοειδή. Τις

περισσότερες φορές ανακτώνται <10% των διπόρινων εταιροκαρυστικών κυττάρων (Hamil 1987, Hibi 1988)

Υπάρχουν δύο βασικά προβλήματα στο να παραχθούν υψηλές τιμές ετεροκαριωτικών κυττάρων. Κατά πρώτον θα πρέπει να υπάρχουν υψηλές πυκνότητες κυττάρων έτσι ώστε να ευνοείται η σύντηξη των σχηματοποιημένων κυττάρων στις μακριές αλυσίδες. Αυτή η κατάσταση αναπόφευκτα αυξάνει την απόκτηση πολυκύτταρων προϊόντων μετά την σύντηξη. Ακόμα με τη διηλεκτροφόρηση ευνοούνται οι κυτταρικές επαφές ανάμεσα σε πρωτοπλάστες του ίδιου τύπου, ευνοώντας έτσι τις ομοσυντήξεις έναντι των ετεροσυντήξεων. Από την άλλη υπάρχουν διαφορές όσον αφορά την τιμή του άριστου ηλεκτρικού πεδίου, τη διάρκεια του παλμού και του τρόπου εφαρμογής του. Αυτές οι διαφορές οφείλονται στους διαφορετικούς τρόπους χρησιμοποίησης των παλμών και στο μέγεθος των πρωτοπλαστών των διαφορετικών ειδών. Η θεωρητική περατότητα της κυτταρικής μεμβράνης που πραγματοποιείται από την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση.

$$V=3/4 r E \cos \theta$$

Όπου  $r$  είναι η ακτίνα του πρωτοπλάστη,  $E$  η ηλεκτρεγερτική δύναμη του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται και  $\theta$  η γεωμετρική γωνία που σχηματίζεται κατά την τομή ενός σημείου της μεμβράνης με το πεδίο (Cole 1968). Όταν αυξάνετε η ηλεκτρεγερτική δύναμη του πεδίου και η τάση πάρει μια τιμή που ονομάζεται κρίσιμη ( $V_{cr}$ ) τότε παρουσιάζεται ρήξη τη μεμβράνης. Η τιμή της κρίσιμης τάσης κυμαίνεται από 0.5 έως 1.5 V και διαφέρει ανάλογα με τη σύσταση της μεμβράνης, το είδος του κυττάρου και την προέλευση του. Ο σχηματισμός των πόρων, που αρχικά συμβαίνει στους ισημερινούς του κυττάρου, είναι ασύμμετρος και εμφανίζεται πρώτα μπροστά από την άνοδο. Το μέγεθος των απαιτούμενων παλμών για τη σύντηξη σχετίζεται με το μέγεθος των πρωτοπλαστών, γιατί απαιτούνται παλμοί μικρότερης τάσης όταν αυξάνεται η ακτίνα τους. Η διάρκεια των παλμών είναι επίσης σπουδαία καθώς μικρότεροι χρόνοι εφαρμογής απαιτούν τη χρησιμοποίηση μεγαλύτερων πεδίων. Αυτό οφείλεται στο ότι (α) η κρίσιμη τάση για τη διάσπαση της μεμβράνης ποικίλει ανάλογα με τη διάρκεια του παλμού και (β) στο ότι δεν υπάρχει αρκετός χρόνος για την ολική φόρτιση των πρωτοπλαστών όταν οι παλμοί είναι μικρότερης διάρκειας. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να εφαρμόζετε μια

μεγαλύτερη δύναμη στο πεδίο ώστε να επιτευχθεί η κρίσιμη τάση (Jones 1998). Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροσυντήξεως επιτυγχάνεται μια μεγαλύτερη βιωσιμότητα και αποδοτικότητα στη καλλιέργεια των πρωτοπλαστών όταν εφαρμόζονται σε αυτούς βραχύς παλμοί σε υψηλές τάσεις (Mehrl 1990).

### **2. 9. 2. Σωματικός υβριδισμός με άγρια είδη.**

Στην πατάτα έχουν πραγματοποιηθεί πολλά πειράματα σωματικού υβριδισμού ώστε να ενσωματωθούν στο *S. tuberosum* γονίδια ανθεκτικότητας που υπάρχουν στα άγρια είδη. Έτσι, έχουν χρησιμοποιηθεί το *S. circaeifolium* που έχει ανθεκτικότητα στον *Phytophthora infestans* και το *Globodera pallida* (Matttheij 1992) και το *S. brevidens* που παρουσιάζει ανθεκτικότητα στον ιό του καρουλιάσματος (PLRV) (Preizner 1991). Το *S. brevidens* έχει το επιπλέον πλεονέκτημα ότι διασταυρώνεται εύκολα με το *S. tuberosum* και για το λόγο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό σε διάφορες συντήξεις. Με τον τρόπο αυτό έχουν αποκτηθεί υβρίδια που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στον PLRV και στον *P. infestans* (Helgesen 1986). Επίσης, έχει μεταφερθεί στο *S. tuberosum* διαμέσου του σωματικού υβριδισμού ανθεκτικότητα στον παγετό από το *S. commersonii*, (Cardi 1993a). Τα άγρια είδη που αναφέρθηκαν προηγούμενα είναι διπλοειδή που βρίσκονται σε πρωτογενή κατάσταση παρουσιάζοντας μια τιμή αριθμού ισορροπίας του ενδοσπερμίου (EBN) ίση με 1. για το λόγο αυτό είναι ανέκιστα να διασταυρωθούν με διπλοειδή του γένους *S. tuberosum* που έχουν τιμή EBN = 2 (Hawkes και Jackson, 1992). Η θεωρία του EBN προτάθηκε για να καθοριστεί αν η πολυπλοειδία του ενδοσπερμίου και του εμβρύου είναι ή όχι ασυμβίβαστες (Johnson 1980). Οι περιπτώσεις ανθεκτικότητας που έχουν μεταφερθεί στην εδώδιμη πατάτα διαμέσου του σωματικού υβριδισμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Ενσωμάτωση ανθεκτικότητας σε ασθένειες στο *S. tuberosum* διαμέσου της τεχνικής του σωματικού υβριδισμού.

| Γονείς  | Ανθεκτικότητα                   | Συγγραφείς              |
|---|---------------------------------|-------------------------|
| <i>S. brevidens</i> + <i>S. tuberosum</i> (2x)          | PLRV                            | Gibson κ. ά. 1988       |
|   | PVY                             | Pehu κ. ά. 1990a        |
| <i>S. brevidens</i> + <i>S. tuberosum</i> (4x)          | <i>Phytophthora infestans</i>   | Austin κ. ά. 1985b      |
|   | PLRV                            | Austin κ. ά. 1988       |
|   | <i>Erwinia sp.</i>              |                         |
| <i>S. tuberosum</i> (2x) + <i>S. tuberosum</i> (2x)     | <i>Globodera pallida</i>        | Cooper-Bland κ. ά. 1993 |
|   | <i>Phytophthora infestans</i>   |                         |
| <i>S. bulbocastanum</i> + <i>S. tuberosum</i> (4x)      | <i>Meloidogyne chitwoodi</i>    | Mojtahedi κ. ά. 1995    |
| <i>S. bulbocastanum</i> + <i>S. tuberosum</i> (4x)      | <i>Meloidogyne chitwoodi</i>    | Brown κ. ά. 1995        |
|   | <i>Meloidogyne hapla</i>        |                         |
| <i>S. tuberosum</i> (2x) + <i>S. circaeifolium</i> (2x) | <i>Globodera pallida</i> Pa 2,3 | Mattheij κ. ά. 1992     |
| <i>S. tuberosum</i> (2x) + <i>S. tuberosum</i> (2x)     | <i>Globodera pallida</i> Pa 2,3 | Rasmussen κ. ά. 1996    |
| <i>S. tuberosum</i> (2x) + <i>S. torvum</i> (2x)        | <i>Verticillium dahliae</i>     | Jadari κ. ά. 1992       |

### **2.9.3. Γνωρίσματα των σωματικών υβριδίων.**

Ένας από τους πρωταρχικούς σκοπούς τού σωματικού υβριδισμού είναι η μεταβίβαση γονιδίων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον ανάμεσα σε είδη που είναι σεξουαλικά ασυμβίβαστα. Η ικανότητα των σωματικών αυτών υβριδίων να αναπτυχθούν κανονικά είναι χαμηλή. Έτσι, σε πολλές περιπτώσεις έχουν αποκτηθεί σειρές υβριδικών κυττάρων από τις οποίες δεν ήταν δυνατή η διαφοροποίηση και η παραγωγή φυτών. Σε άλλες περιπτώσεις έχει επιτευχθεί η αναγέννηση των φυτικών υβριδίων αλλά τα φυτά που δημιουργήθηκαν ήταν στείρα (Harms 1983).

Η δυσκολία στην αναγέννηση των φυτών από κάλους σωματικών υβριδίων και η στειρότητα που χαρακτηρίζει τα παραγόμενα φυτά μπορεί να είναι το αποτέλεσμα πολυπλοειδίας ή ανευπλοειδίας. Η παραγωγή πολυπλοειδών ή ανευπλοειδών ατόμων είναι κάτι που απαντάται συχνά στην ιστοκαλλιέργεια. Ένας εναλλακτικός τρόπος για να βελτιωθεί η γονιμότητα είναι εξάλειψη ενός εκ των δυο γονικών γενωμάτων, μελετώντας τους πρωτοπλάστες πριν την σύντηξη. Φαίνεται ότι αυτά τα ασύμμετρα σωματικά υβρίδια, όπου έχουν ολόκληρο το γένωμα του ενός από τους γονείς και μερικά γονίδια ή κομμάτια χρωμοσωμάτων από τον άλλο, έχουν

καλύτερη γονιμότητα από τα υβρίδια που φέρουν ολόκληρο το πυρηνικό γένωμα και των δυο γονικών ειδών. Ωστόσο ο Rasmussen (1996) αποκατέστησε τη γονιμότητα υβριδίων που προέρχονταν από στείρους γονείς, μεταφέροντας ταυτόχρονα και την πολυγονιδιακή ανθεκτικότητα. Όμως, αναφέρονται περιπτώσεις στις οποίες η γονιμότητα των συμμετρικών υβριδίων ήταν υψηλότερη από αυτή των ασύμμετρων (Melzer και O'Connell 1992).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεταφορά διαμέσου της συντήξεως πρωτοπλαστών γνωρισμάτων, όπως είναι η ανθεκτικότητα σε ασθένειες ή η ανθεκτικότητα σε αβιοτικές συνθήκες καταπόνησης, τα οποία φαίνεται να ελέγχονται από γονίδια του πυρήνα (Bates 1992). Βέβαια τα φυτά έχουν δυο επιπλέον οργανίδια, εκτός από τον πυρήνα, με δικό τους DNA: τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες. Όπως έχει αναφερθεί, τα γονίδια των τελευταίων λαμβάνουν μέρος στη φωτοσύνθεση και στην ευαισθησία έναντι των ζιζανιοκτόνων, όπως η ατραζίνη (Menczel 1986). Ακόμα έχει αποδειχθεί ότι τα γονίδια των μιτοχονδρίων ελέγχουν την αρρενοστεριρότητα (Belliard 1979).

### **2. 9. 3. 1. Οργανιδιακή σύσταση των υβριδίων.**

Ένα πλεονέκτημα της σύντηξης πρωτοπλαστών είναι η απόκτηση εταιροκαρυστικών κυττάρων, όπου η επιλογή των οργανιδίων κατά την κυτταρική διαίρεση και την βλαστογένεση, προκαλεί συχνά καινούργιους συνδυασμούς γενωμάτων στα αναγεννημένα φυτά. Μετά από τη σύντηξη πρωτοπλαστών γίνεται η επιλογή των χλωροπλαστών του ενός εκ των δυο γονικών ειδών, συνήθως με διαχωρισμό στο άγαρ κατά την διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων που ακολουθούν. Έτσι, δημιουργούνται φυτά των οποίων ο πυρήνας είναι υβρίδιο των δύο γονικών, οι χλωροπλάστες όμως ανήκουν σε ένα από τους δυο γονείς (Sundberg και Glimelius 1991, Derks 1992). Έτσι, η σύντηξη του *S. tuberosum* και *S. brevidens* έδωσε 55% σωματικών υβρίδια με χλωροπλάστες του *S. brevidens* και 45% με χλωροπλάστες του *S. tuberosum* (Pehu 1989). Σύμφωνα με τους Thomzik και Hain (1988) η απόκτηση φυτών με μικτούς χλωροπλάστες και των δυο γονέων ή γενετικά ανασυνδυασμένους δε είναι κάτι που συμβαίνει συχνά. Γενικά, σύμφωνα με όσα έχουν δείξει οι διάφοροι συνδυασμοί των ήδη πραγματοποιημένων συντήξεων στο είδος *Brasica*, το είδος του κυττάρου δεν φαίνεται να επηρεάζει τον διαχωρισμό των χλωροπλαστών, (Sundberg 1991).

Όσον αφορά τα μιτοχόνδρια αυτά συχνά φέρουν μετά την σύντηξη γενετικούς ανασυνδυασμούς ή/ και ανακατασκευές. Για το λόγο αυτό τα αναγεννημένα φυτά περιέχουν ένα καινούργιο μιτοχονδριακό γένομα που διαφέρει από τα αντίστοιχα των δυο γονέων (Belliard κ. ά. 1979). Ωστόσο μπορούν να αποκτηθούν υβρίδια με τα μιτοχόνδρια ενός εκ των δυο γονέων, αν και σε μικρότερη συχνότητα. Από την άλλη πλευρά οι Lossl κ. α.. (1994) παρατήρησαν ότι ούτε οι διάφοροι τύποι των πυρηνικών γενομάτων που αποκτήθηκαν διαμέσου RFLPs, ούτε οι διαφορετικοί τύποι των χλωροπλαστών που εντοπίστηκαν σε σωματικά υβρίδια της πατάτας, επηρέαζαν την αποδοτικότητα. Αντίθετα, ο δείκτης του μιτοχονδριακού ανασυνδυασμού φάνηκε να επηρεάζει την παραγωγή, επιτυγχάνοντας μια καλλίτερη αποδοτικότητα παρουσιάζοντας ταυτόχρονα μια μεγαλύτερη ομογένεια ή ένα μικρότερο δείκτη ανασυνδυασμών.

Η μεταβίβαση οργανιδίων έχει χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθούν καινούργιοι συνδυασμοί χωρίς την σύντηξη πυρήνων και για να γίνει δυνατή η μεταβίβαση γνωρισμάτων με τη μέθοδο δότης-δέκτης (Zecler, 1978). Έτσι, έχουν περάσει σε ένα καινούργιο πυρηνικό περιβάλλον, κωδικοποιημένοι χαρακτήρες ως προς τους χλωροπλάστες όπως η ανθεκτικότητα στην ατραζίνη (Barsby 1987) ή ως προς το μιτοχονδριακό DNA όπως η κυτταροπλασματική αρρενοστεριότητα (Perl 1990).

### **2. 9. 3. 2. Πολυγενενοτυπικοί και μονογενενοτυπικοί χαρακτήρες των σωματικών υβριδίων.**

Στη διαδικασία επιλογής των σωματικών υβριδίων έχουν χρησιμοποιηθεί δείκτες που αποτελούνται από πολυγενενοτυπικούς χαρακτήρες. όπως για παράδειγμα είναι η ευρωστία του υβριδίου. Για το σκοπό αυτό, συχνά χρησιμοποιούνται ως κριτήρια χαρακτηρισμού το μέγεθος του φύλλου, το ύψος του φυτού και το πάχος του βλαστού. Ακόμα, η παραγωγικότητα των υβριδίων μπορεί να είναι πιο υψηλή από τους διπλοειδείς προγόνους τους ή από εκείνη των πρώτων κλώνων που παράχθηκαν από διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων τους (Mollers 1991).

Μια άλλη προσέγγιση, που εφαρμόζεται αρκετά συχνά για τη μεταφορά ποσοτικών γνωρισμάτων, είναι τεχνική του μακρινού υβριδισμού (wide hybridization). Για το σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί τα είδη *S. tuberosum* και *S. brevidens* (Helgeson 1986). Λόγω της απόστασης των γονέων, η τεχνική που

εφαρμόζεται για τα υβρίδια αυτά, απαιτεί ακόμα τη βοήθεια της συμβατικής βελτίωσης διαμέσου επαναδιασταυρώσεων.

Σε αρκετές περιπτώσεις και πιο συγκεκριμένα όταν το ενδιαφέρον εστιάζεται στα επίπεδα της ανθεκτικότητας σε ασθένειες, η πλειοψηφία των υβριδίων παρουσιάζουν παραλλαγές στους ποσοτικούς χαρακτήρες. Αυτό δεν οφείλεται αποκλειστικά στη σωμακλωνική παραλλακτικότητα που είναι συνέπεια της αναπτυσσόμενης καλλιέργειας από το στάδιο του κάλου. Είναι επίσης πιθανό, το καινούργιο υβριδικό κυτόπλασμα και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος είναι υπεύθυνα γι αυτό.

Ο Gibson (1988) μετέφερε στο *S. tuberosum* την ανθεκτικότητα στον ιό PVX από το *S. brevidens*. Οι Mollers και Wenzel (1992) σύντηξαν κλώνους ανεκτικούς και ευπαθείς στη μετρίμπουζινα. Από την εργασία αυτή βρέθηκε ότι τα υβρίδια είχαν την ίδια ανθεκτικότητα με τους γονείς. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε επίσης σε συντήξεις μεταξύ κλώνων ανεκτικών και ευπαθών στο *G. rostochiensis* (Ro1). Βεβαίως υπάρχουν και εξαιρέσεις: μετά από την σύντηξη διαπλοειδών σειρών που έφεραν το γονίδιο Rx (PVX) με κλώνους που έφεραν το γονίδιο Ry (PVY), παρατηρήθηκε ο αναμενόμενος συνδυασμός ανθεκτικότητας. Σε ένα όμως από τα υβρίδια έλειπε το γονίδιο Ry και σε ένα άλλο έλειπαν και τα δύο (Thach 1993).

#### **2. 4. 4. Προσδιορισμός και επιλογή των σωματικών υβριδίων.**

Το αιώρημα των πρωτοπλαστών μετά την ηλεκτροσύντηξη αποτελείται από ένα συνδυασμό κυττάρων των γονέων που δεν έχουν συντηχθεί, από ομοκαρυστικά κύτταρα (προϊόν σύντηξης ενός εκ των δυο γονέων) και από ετεροκαρυστικά κύτταρα (προϊόν σύντηξης και των δυο γονέων). Ακόμα τα προϊόντα της σύντηξης μπορεί να προέρχονται από περισσότερους από δυο πρωτοπλάστες. Τα ετεροκαρυστικά κύτταρα μπορεί να αναγνωρίζονται οπτικά διαμέσου ισοενζυματικής ανάλυσης ή διαμέσου μοριακών τεχνικών (Fish 1988, Pehu1989).

Δυστυχώς τα προϊόντα της σύντηξης αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 10% της ολικής μίξεως που πραγματοποιείται κατά την ηλεκτρο-σύντηξη. Για το λόγο αυτό, έχει επενδυθεί πολύς χρόνος και κόπος για να επιτευχθεί μια αποτελεσματική επιλογή, που είναι και το κλειδί της επιτυχίας την τεχνική αυτή. Η περισσότερες έρευνες έχουν γίνει αφορούν την παραγωγή φυτών ήδη αναγεννημένων. Πολύ λιγότερες είναι οι έρευνες που αφορούν αποικίες κυττάρων ή μικροκάλλους, λόγω της αβεβαιότητας αναγέννησης των πρωτοπλαστών τους.

Αρχικά, επιλέγονται τα υβριδικά κύτταρα διαμέσου συμπληρωματικών διαδικασιών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται αυξοτροφικές ανθεκτικές σειρές, που είναι μεταλλαγμένες (με έλλειψη σε χλωροφύλλη). Επίσης, χρησιμοποιούνται και άγριες μη αναγεννημένες σειρές (Schieder 1982). Όμως, η γενική εφαρμογή τέτοιων στρατηγικών επιλογής είναι περιορισμένες. Οι κανονικές σειρές που έχουν αγρονομικό ενδιαφέρον δεν παρουσιάζουν μορφολογικούς ή κυτταρολογικούς δείκτες (Deimling 1988) και αυτό δυσκολεύει την εφαρμογή της τεχνικής. Οι μεταλλαγμένοι γενότυποι που παρουσιάζουν αγρονομικό ενδιαφέρον είναι ελάχιστοι. Επιπλέον, η παραγωγή τους μπορεί να είναι δύσκολη και να έχουν αρνητική επίδραση στη γενετική πιστότητα του φυτικού υλικού. Η όλη διαδικασία επιλογής των υβριδίων μπορεί να βοηθηθεί διαμέσου της εισαγωγής γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά σε ένα ή και στους δυο γονείς. Έτσι, είναι δυνατό να επιλεγούν τα κύτταρα που είναι υβρίδια πιο εύκολα (Masson 1989, Wijbrandt 1990). Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί και άλλοι τρόποι με πιο γενική εφαρμογή. Αυτοί περιλαμβάνουν την απομόνωση διαφορετικών ή τεχνικά αποκτημένων πρωτοπλαστών, που βασίζεται σε οπτικό προσδιορισμό μετά από τη σύντηξη των κυττάρων μορφολογικά. Τα υβριδικά κύτταρα μπορούν να απομονωθούν μηχανικά (Sundberg και Glimelius 1986) ή με ένα κυτταρομετρητή ροής και ένα επιλογέα κυττάρων (Hammat 1990). Έχουν αναφερθεί και άλλες μέθοδοι προσδιορισμού των ετεροκαρυωτικών κυττάρων, μετά από 3 ή 7 μέρες καλλιέργειας με τη χρησιμοποίηση ενός μικροδιαχειριστή που είναι συνδεδεμένος με τη καλλιέργεια πρωτοπλαστών αλβίνων φυτών (Puite 1988) και διαμέσου ενός συστήματος διπλού φθορισμού. Ακόμα έχουν εφαρμοστή φθοριούχα χρώματα για την επιλογή των ετεροκαρυωτικών κυττάρων με τη βοήθεια μικροσκοπίου και κυτταρομετρητή ροής (Kesteren 1993). Τέλος υπάρχει και μια άλλη μέθοδος που βασίζεται στην αδρανοποίηση των οργανιδίων με χημικά μέσα όπως είναι η ιωδοκεταμίνη ή η ροδαμίνη 6-G (Bersby 1987, Terada 1987, Bottcher 1989).

Η έκφραση της ευρωστίας ενός υβριδίου, που παρατηρείται κατά το στάδιο του κάλου, οφείλεται στην καλλίτερη ανάπτυξή του σε σχέση με τις υπόλοιπες υβριδικές αποικιών (Debnath και Wenzel 1987, Polgar 1993). Έτσι, όπως οι μορφολογικές διαφορές ανάμεσα στους ιστούς ενός υβριδίου και σε αυτούς των γονέων του χρησίμευσαν για την αναγνώρισή τους, με τον ίδιο τρόπο χρησιμοποιούνται και για την αναγνώριση του υβριδικού υλικού (Fish 1987, Klimaszewska και Keller 1988). Μια μέθοδος που αποφεύγει ολοκληρωτικά την



επιλογή είναι η σύντηξη μεμονωμένων ζευγαριών πρωτοπλαστών σε ένα σύστημα μικροκαλλιέργειας (Koor και Schweiger 1985). Η εφαρμογή όμως της τεχνικής αυτής είναι περιορισμένη λόγω της δυσκολίας χειρισμού της.

Τα αποτελέσματα της δόσης του γενώματος παρατηρούνται με μορφολογικές δοκιμές, διαμέσου: (α) της ανάλυσης των πολυποίκιλων γονέων και των σωματικών υβριδίων (Preisner 1991) και (β) της μορφολογικής, κυτταρολογικής και μοριακής αναλύσεως των γονέων των υβριδίων. Ο χαρακτηρισμός του αναγεννημένου υβριδικού υλικού μπορεί να πραγματοποιηθεί διαμέσου της ενδιάμεσης μορφολογίας που παρουσιάζει (Austin 1986), ισοενζυματικών δεικτών (Gleba 1984) και δεικτών RFLP (Melzer και O' Connel 1990). Οι δείκτες RFLP έχουν χρησιμοποιηθεί, μαζί με αντίστοιχους του ριβοσωματικού DNA (Pental 1988, Rosen 1988), με επαναλαμβανόμενες ακολουθίες του DNA (Schweizer 1988) και με ειδικές ακολουθίες DNA, για την ανάλυση της σύντηξης του *S. brevidens* και *S. tuberosum* (Rehu 1990). Το κύριο μειονέκτημα όλων αυτών των μεθοδολογιών είναι ότι απαιτούν τη χρησιμοποίηση μιας μεγάλης ποσότητας βλαστικού υλικού. Πρόσφατα, η χρησιμοποίηση μεθόδων βασισμένων στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) όπως είναι οι δείκτες RAPDs (Random Amplified Polimorfisms DNA), επέτρεψαν την αναγνώριση των υβριδίων σε πιο πρώιμο στάδιο (Baird 1992, Xu 1993, Rasmussen και Rasmussen 1995). Άλλες μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για επιλογή είναι οι δείκτες SSR (απλές επαναληπτικές ακολουθίες) (Provan 1996) και ο υβριδισμός slot-blot (Matthews 1997). Διάφοροι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει τη γενετική μετάλλαξη χρησιμοποιώντας δείκτες που διευκολύνουν την επιλογή των υβριδίων σε πιο πρώιμο στάδιο της κυτταρικής καλλιέργειας. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η αναγέννηση ολόκληρων των φυτών (Masson 1989). Για το λόγο αυτό έχουν μετασχηματισθεί διάφορα άγρια είδη στην πατάτα, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα σωματικού υβριδισμού και να διευκολύνουν την επιλογή των υβριδίων (Kumar 1995, Carrasco 1997)

#### **2. 9. 5. Ενσωμάτωση των σωματικών υβριδίων σε προγράμματα βελτίωσης.**

Για να έχουν τα υβρίδια κάποια πρακτική βιωσιμότητα θα πρέπει να επιτευχθεί η σταθερή κληρονομικότητα του ξένου DNA, που φέρει τα επιθυμητά γονίδια. Γι' αυτό λόγο στο μέλλον, θα ήταν χρήσιμη η έρευνα του μηχανισμού ενσωμάτωσης του "ξένου" DNA στα χρωματοσώματα του φυτού δέκτη, γιατί ήδη έχουν ανακαλυφθεί σε υβρίδια δυο ειδών του γένους *Nicotiana*, μετακινήσεις

διαγενοματικών τμημάτων που προέρχονται και από τα δυο είδη (Parokorny κ. ά. 1992).

Η γονιμότητα των σωματικών υβριδίων μεταξύ ειδών εξαρτάται από την γενετική απόσταση των γονέων (Feher κ. ά. 1992). Ωστόσο ορισμένοι συνδυασμοί υβριδίων ήταν γόνιμοι και αναδυσταυρώθηκαν με το *S. tuberosum* (Williams κ. ά. 1990). Η ενσωμάτωση της ανθεκτικότητας στον PLRV του *S. brevidans* στο *S. tuberosum* διαμέσου διασταυρώσεων σωματικών υβριδίων που αποκτήθηκαν από συμβατικές σειρές, αποδείχθηκαν ότι ήταν περίπλοκες εξ αιτίας της μικρής γονιμότητας που παρουσίαζαν και του μη ομαλού ζευγαρώματος των χρωμοσωμάτων τους (Ehlenfeldt και Helgeson 1987). Με αυτό τον τρόπο η μεθοδολογία για την παραγωγή και επιλογή των σωματικών υβριδίων μπορεί να δώσει υλικό που θα ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθεί σε ένα συμβατικό πρόγραμμα βελτίωσης. Τελευταία, αναπτύσσονται παράλληλα προγράμματα σωματικών υβριδίων που συμπεριλαμβάνουν και σχέδια απόκτησης νέων ποικιλιών πατάτας σε χώρες η καλλιέργεια της παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, όπως είναι η Ολλανδία και η Γερμανία (Waara και Glimelius 1995).

### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1. Υλικά.**

##### **3.1.1 Φυτικό υλικό.**

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα του σωματικού υβριδισμού αποτελούνταν από άγρια είδη του γένους *Solanum* και διπλοειδείς κλώνους του *S. tuberosum*. Ως άγρια είδη χρησιμοποιήθηκαν τα: *S. verrucosum* (VER 1340) που είναι ανθεκτικό στον PLRV (Ruiz de Galaretta. 1997) προερχόμενο από το Scottish Crop Research Institute, Dundee Σκωτίας, *S. brevidens* (BRD 218228) ανθεκτικό στους PVY και PLRV, προερχόμενο από το Institute National de Recherche Agronomique, Rennes Γαλλίας και το *S. chacoense* (CHC 17034) με υψηλή περιεκτικότητα σε ξηρό βάρος, του Institut fur Pflanzenbau der Fal, Braunschweig Γερμανίας. Οι διπλοειδείς κλώνοι του *S. tuberosum* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι: H86.5046/10, H82.385/9, H81.2063/10, SR260 και R3064, προερχόμενοι από το Max Planck Institute fur Zuchtungsforshung, Colonia Γερμανίας.

##### **3.1.2. Χρησιμοποιούμενες συσκευές.**

- Οριζόντιος θάλαμος νηματικής ροής, για τον χειρισμό του φυτικού υλικού κατά την ιστοκαλλιέργεια.
- Ph-μετρο.
- Αυτόκαυστο, για την αποστείρωση των στερεών θρεπτικών διαλυμάτων για την καλλιέργεια και των υλικών του εργαστηρίου.
- Κατανεμητής διαλυμάτων, για την πρόσθεση σε ακριβείς ποσότητες του πολλαπλασιαστικού διαλύματος.
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης, κατασκευασμένη σύμφωνα με τις υποδείξεις του Kramer (1987) με ελάχιστες τροποποιήσεις.
- Μικροσκόπιο Zeis Televal, ρυθμισμένο για τον έλεγχο των συντήξεων και κατά ακολουθία των διαιρέσεων και τις καλλιέργειες των πρωτοπλαστών.
- Οπτικό μικροσκόπιο, για τον χρωμοσωματικό έλεγχο, της βιωσιμότητας της γύρης και την καταμέτρηση των χλωροπλαστών.
- Μικροπιπέτες, για την απομόνωση του DNA του γενώματος.
- Φυγόκεντρος, για την απομόνωση των πρωτοπλαστών.

- Θερμοκυκλωτής Robocycler Gradient 96 (Stratagene) και θερμοκυκλωτής FTS-1 του Linus, για την ενίσχυση του πολυμορφισμού στο άγαρ (RAPD).
- Ηλεκτρική πηγή και τριβλία ηλεκτροφόρησης, για την οπτική επαφή με τα τμήματα του DNA.
- Gel Printer και ταινίες Polaroid για τη λήψη φωτογραφιών των gels.
- Vortex.
- Ζυγός ακριβείας.
- Πηγές θερμότητας σε διάφορες θερμοκρασίες.
- Ψυγεία (4°C) και καταψύκτες των -20°C και -80°C.
- Πρέσα εξαγωγής.

### **3.1.3. Εγκαταστάσεις.**

- Θάλαμος ανάπτυξης φυτών, για τη διατήρηση της θερμοκρασίας στους 20°C, τη φωτοπερίοδο στις 16h και την ένταση του φωτός στα 34μE/m<sup>2</sup>/s.
- Επωαστικός κλίβανος θερμοκρασία στους 20°C, 70% σχετική υγρασία και φωτοπερίοδο 16 ωρών, για την ανάπτυξη των αφίδων (*Myzus persicae*).
- Θερμοκήπιο, με ελεγχόμενες συνθήκες όσον αφορά τη θερμοκρασία και την υγρασία.

### **3.1.4. Εξοπλισμός εργαστηρίου.**

- Δοκιμαστικοί σωλήνες διαμέτρου 24mm και ύψους 150mm, για την ιστοκαλλιέργεια.
- Σωλήνες Eppendorf των 1,5ml.
- Σωλήνες Eppendorf με λεπτά τοιχία των 200μl και 500μl, για τον θερμοκυκλωτή.
- Ποικίλο υλικό εργαστηρίου: δοκιμαστικοί σωλήνες, ποτήρια καθιζήσεως, κωνικές φιάλες, ποτήρια ζέσεως, μπουκάλια, πιπέτες, λαβίδες, νυστέρια, ξυράφια, πλαστικές παραλληλόγραμμες θήκες φύτευσης και άλλα.
- Μικροπιπέτες.
- Σωλήνες Falcon των 18 και 50ml.
- Γυάλινα τριβλία Petri 90x60 mm.
- Πλάκες Petri 60x15 mm, για την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών.
- Σώματα και αντισώματα, για την τεχνική ELISA.

- Άκαμπτες πλάκες από πολυαιθυλένιο 96 θέσεων με χωρητικότητα 300ml ανά θέση.
- Φίλτρα των 0,22 μm.

### **3.1.5. Εξοπλισμός θερμοκηπίου.**

- Χώμα με μέγιστη υγρασία 50%, οργανική ουσία 85%, άζωτο 1,7%, φώσφορο 0,2%, ασβέστιο 1% και κάλιο 0,2%.
- Γλάστρες διαφορετικών διαμέτρων.
- Τελάρα.
- Πρόχειρα θερμοκήπια από πλαστικό, για τον εγκλιματισμό των φυτών.

### **3.1.6. Πληροφοριακό υλικό.**

Η παρούσα εργασία επεξεργάστηκε μέσω ενός φορητού ηλεκτρονικού υπολογιστή Pentium-III. Το λογισμικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τα ακόλουθα προγράμματα :

- Microsoft office (Excel 6.0, Access 2.0, Word 6.0).
- JigSaw 32

## **3.2 Μέθοδος.**

### **3.2.1 Εισαγωγή και μικροπολλαπλασιασμός του φυτικού υλικού.**

Απομονώθηκαν μασχάλιαϊοι οφθαλμοί από το ακραίο μερίστωμα φυτών που είχαν αναπτυχθεί στο θερμοκήπιο. Οι οφθαλμοί αποστειρώθηκαν βυθιζόμενοι σε διάλυμα 10%υποχλωρικού νατρίου και Tween 20 για 10' υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, πλύθηκαν το λιγότερο 3 φορές με αποστειρωμένο νερό για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του διαλύματος. Ακολούθως, τοποθετήθηκαν σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα MS-P, που αποτελείται από άλατα του MS (Πίνακας 7, Murashige και Skoog, 1962) και εμπλουτισμένου με τις βιταμίνες, ορμόνες και σακχαρόζη του Πίνακας 8.

Μετά από 3-4 εβδομάδες παραμονής του μεριστωματικού υλικού στο MS-P, σχηματίζονται φυτάρια, που αναπτύσσονται κανονικά. Τα φυτά διατηρούνται θάλαμο ανάπτυξης, στους 22<sup>o</sup> C, φωτοπερίοδο 16h και 34 μE/m<sup>2</sup> /s φωτονικής ροής.

Πίνακας 7. Σύνθεση των χημικών στοιχείων του θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας MS (Murashige και Skoog 1962).

| Σύνθεση   | Συγκέντρωση (mg/l) |
|---|--------------------|
| <b>Μακροστοιχεία</b>                                  |                    |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                       | 1650               |
| KNO <sub>3</sub>                                      | 1900               |
| CaCl <sub>2</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 | 440                |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 | 370                |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 170                |
| <b>Μικροστοιχεία</b>                                  |                    |
| KI  | 0,83               |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 6,2                |
| MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O                | 15,6               |
| Zn SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O               | 8,6                |
| Na <sub>2</sub> MoP <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 0,25               |
| Cu SO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O               | 0,025              |
| CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O                | 0,025              |
| Fe SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O               | 27,8               |
| Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O             | 37,3               |

Πίνακας 8. Διάλυμα πολλαπλασιασμού των φυταρίων, MS-P (τα μακροστοιχεία και τα μικροστοιχεία είναι ίδια με τα αντίστοιχα του MS, pH: 5,7)

| Σύνθεση                    | Συγκέντρωση (mg/l) |
|----------------------------|--------------------|
| Βιταμίνες: Νικοτινικό οξύ  | 1                  |
| Πιριδοξίνη                 | 1                  |
| Θειαμίνη (B <sub>1</sub> ) | 0,2                |
| Ινοσιτόλη                  | 100                |
| Γλυκίνη                    | 0,2                |
| Ορμόνες AIA                | 0,5                |
| Κινιτίνη                   | 0,2                |
| Σακχαρόζη                  | 30000              |

Άγαρ

7000

**3.2.2. Σύνηξη πρωτοπλαστών****3.2.2.1. Απομόνωση και εξυγίανση των πρωτοπλαστών.**

Σε τριβλία Petri των 60/15mm κατανεμήθηκαν 6ml του ενζυματικού διαλύματος που περιέχει τα χημικά στοιχεία CPW (Cell and Protoplast Washing, Frearson 1973), κυτταρίνη R-10 (Yakult, Τόκιο, Ιαπωνία) 1% (m/v), ένζυμο R-10 (Yakult, Τόκιο, Ιαπωνία) 0,2% (m/v), μαννιτόλη 9,1% (m/v) σαν οσμωτικό παράγοντα και το διάλυμα οξέος 2-(N-morfolin) εθανοσουλφονικό (MES) με PH 5,5-5,6 (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Ενζυματικό διάλυμα για την απομόνωση των πρωτοπλαστών (Charut, 1990).

| Σύσταση                         | Συγκέντρωση<br>(mg/l) |
|---------------------------------|-----------------------|
| Χημικές ενώσεις CPW             |                       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 27,2                  |
| KNO <sub>3</sub>                | 101                   |
| MgSO <sub>4</sub>               | 246                   |
| KI                              | 0,16                  |
| CuSO <sub>4</sub>               | 0,025                 |
| CaCl <sub>2</sub>               | 1480                  |
| Ταμρον και ρυθμιστής Όσμωσης    |                       |
| MES                             | 500                   |
| Manitol                         | 9100                  |
| Ένζυμα                          |                       |
| Κυτταρίνη R-10                  | 10000                 |
| Ένζυμο R-10                     | 2000                  |
| Ph (KOH)                        | 5,5-5,6               |

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μικρές τομές στο πίσω μέρος των φύλλων για να διευκολυνθεί η είσοδος και η δράση των λυτικών ενζύμων. Τα φύλλα τοποθετήθηκαν στο τριβλίο με το πίσω μέρος τους να είναι προς τα κάτω, ώστε να εφάπτεται με το διάλυμα, έως ότου αυτό καλύψει την επιφάνεια τους. Η επώαση

διήρκεσε 16 ώρες και ακολουθήθηκε από ανακίνηση της πλάκας για να ελευθερωθούν τελικά όλοι οι πρωτοπλάστες. Τέλος το αιώρημα φιλτράρεται με τη βοήθεια ειδικού ηθμού με διάμετρο πόρων 100mm.

Η απομάκρυνση του ενζυματικού διαλύματος πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση σε διάλυμα μανιτόλης 0,5M + 0,5mM CaCl<sub>2</sub> για 3' σε 120g, απορρίπτοντας το επικείμενο διάλυμα. Οι πρωτοπλάστες απομονώνονται με νέα φυγοκέντρηση σε διάλυμα σακχαρόζης 21% (p/v), για 10' σε 120g. Συλλέγεται το επικείμενο διάλυμα και φυγοκεντρείται δύο ακόμα φορές σε διάλυμα μανιτόλης για 5 και 3 λεπτά, αντιστοίχως.

### **3.2.2.2. Ηλεκτροσύντηξη πρωτοπλαστών.**

Αμέσως μετά την απομόνωση και την εξυγίανση των πρωτοπλαστών, επιτυγχάνεται μια πυκνότητα 350.000 πρωτοπλαστών/ml από κάθε γενότυπο, που αναμειγνύονται σε αναλογία 1:1. Στη συνέχεια, χορηγείται 0,7ml από την πρόσμειξη σε ένα τριβλίο Petri διαμέτρου 60mm και πραγματοποιείται η ηλεκτροσύντηξη.

Η διαδικασία βασίζεται στην παράταξη των πρωτοπλαστών με την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου AC των 160-190 V/cm και 1 MHz συχνότητας για 15 s και την εκπομπή 2 - 4 παλμών DC των 1,2 kV/cm κατά τη διάρκεια 20 μs, για να επιτευχθεί η σύντηξη των κυττάρων. Ο θάλαμος της σύντηξης αποτελείται από ένα πολυηλεκτρόδιο με 12 παράλληλες στήλες που απέχουν 2mm μεταξύ τους. Αφού γίνει η εκπομπή των παλμών, μειώνεται σταδιακά το ηλεκτρικό πεδίο έως ότου φθάσει τα 0 V/cm κατά τη διάρκεια περίπου 1 λεπτού. Η σύντηξη ελέγχεται από ένα μικροσκόπιο ρυθμισμένο στα 200x. Κατά το τέλος της διαδικασίας προστίθενται 4 ml από το διάλυμα της καλλιέργειας και μερικά λεπτά αργότερα 2 ml ακόμα, με το οποίο η πυκνότητα της καλλιέργειας ανέρχεται περίπου στους 40.000 πρωτοπλάστες/ml.

### **3.2.2.3. Καλλιέργεια των πρωτοπλαστών και αναγέννηση των φυτών.**

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών ήταν: (α) το V-KM (Πίνακας 10, Bokelmann και Roest 1983), που αποτελούνταν από τα χημικά στοιχεία του υποστρώματος V-47 (Binding 1974) χωρίς NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> συν τα θρεπτικά στοιχεία του υποστρώματος KM-8p (Kao και Michayluk 1975) και (β) το V-KM τροποποιημένο. Σε αυτό το τελευταίο, είχαν αντικατασταθεί τα μικροστοιχεία του με αυτά του MS. Και τα δύο υποστρώματα συμπληρώθηκαν με



250mg/l PEG, 0,01mg/l βιταμίνης D2, 34,4 g/l γλυκόζης, 32,8 g/l μανιτόλης και 500 mg/l MES (Sherraf 1994).

Τα τριβλία με τους συντηγμένους πρωτοπλάστες διατηρήθηκαν στο σκοτάδι από 7 έως 15 μέρες. Οι πρώτες διαιρέσεις άρχισαν στις 4 με 5 ημέρες. Στις 7 ημέρες εκτιμήθηκε η αποτελεσματικότητα της καλλιέργειας ως προς το ποσοστό των πρωτοπλαστών που βρίσκονταν σε διαίρεση. Μετά από αυτό το διάστημα, άρχισε σταδιακή έκθεση της καλλιέργειας στο φως και οι πρώτους ορατοί μικροκάλοι άρχισαν να εμφανίζονται μετά από 4 εβδομάδες.

Πίνακας 10. Υπόστρωμα V-KM (Bokelmann και Roest, 1983).

| Σύνθεση   | Συγκέντρωση<br>(mg/l) |
|---|-----------------------|
| Μακροστοιχεία V-KM                                  |                       |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 1480                  |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 735                   |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 984                   |
| K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 63                    |
| Μικροστοιχεία V-KM                                  |                       |
| KI  | 0,75                  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 3                     |
| MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O                | 10                    |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 2                     |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0,25                  |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                | 0,025                 |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 0,025                 |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 27,8                  |
| NaEDTA·2H <sub>2</sub> O                            | 37,3                  |
| Βιταμίνες   |                       |
| Φολικό οξύ  | 0,4                   |
| p-αμινοβενζοϊκό                                     | 0,02                  |
| Ριβοφλαβίνη (B2)                                    | 0,2                   |
| Ασκορβικό οξύ                                       | 1                     |
| Χλωρίδιο de colina                                  | 1                     |
| B12   | 0,02                  |

Πίνακας 10. Υπόστρωμα V-KM (συνέχεια).

| Σύνθεση                                   | Συγκέντρωση<br>(mg/l) |
|---|-----------------------|
| <b>Σάκχαρα</b>                            |                       |
| Φρουκτόζη                                 | 250                   |
| Ριβόζη                                    | 250                   |
| Ξυλόζη                                    | 250                   |
| Μαννόζη                                   | 250                   |
| Ραμόζη                                    | 250                   |
| Κυτταρόζη                                 | 250                   |
| Σακχαρόζη                                 | 250                   |
| Sorbitol                                  | 250                   |
| Manitol                                   | 250                   |
| <b>Οργανικά οξέα</b>                      |                       |
| Piruvato de Na                            | 5                     |
| Κιτρικό οξύ                               | 10                    |
| Μαλικό οξύ                                | 10                    |
| Φουμαρικό οξύ                             | 10                    |
| <b>Βιταμίνες (Morel και Wetmore 1951)</b> |                       |
| Νικοτινικό οξύ                            | 1                     |
| Θειαμίνη                                  | 1                     |
| Βιοτίνη                                   | 0,01                  |
| <b>Βιταμίνες υδατοδιαλυτές</b>            |                       |
| Ρετινόλη (A)                              | 0,01                  |
| Εργοκαλσιφερόλη (D2)                      | 0,01                  |
| Χολοκαλσιφερόλη (D3)                      | 0,01                  |
| MES                                       | 500                   |
| Γαλα καρύδας                              | 25ml/l                |
| Γλυκόζη                                   | 32,4                  |
| Manitol                                   | 32,8                  |
| PEG                                       | 250                   |
| Υδρόλυμα καζεΐνης                         |                       |
| <b>Ορμόνες</b>                            |                       |
| 2,4-D                                     | 0,2                   |
| ζεατίνη                                   | 0,5                   |
| ANA                                       | 1                     |
| PH (NaOH)                                 | 5,7                   |

Όταν οι μικροκάλοι σημείωσαν ανάπτυξη κατά 2mm μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα αναγέννησης, για να αναπτυχθεί και να διαφοροποιηθεί το φυτικό υλικό (brotes adventicios). Για την εύρεση του καταλληλότερου υποστρώματος καλλιέργειας δοκιμάστηκαν τα ακόλουθα (Πίνακας 11): MC (Shepard 1982), MC1, MC2 (Sihachakr 1993) και CM (Kein 1989). Ο σχηματισμός των αποικιών υπολογίστηκε μόλις η καλλιέργεια είχε συμπληρώσει ένα μήνα, ως ο αριθμός των μικροκάλων που αποκτήθηκαν προς τον αριθμό των πρωτοπλαστών που είχαν εισαχθεί προς καλλιέργεια.

Πίνακας 11. Χρησιμοποιούμενα θρεπτικά υποστρώματα αναγέννησης.

| Σύνθεση             | Συγκέντρωση (mg/l) |       |       |       |
|---------------------|--------------------|-------|-------|-------|
|                     | MC                 | MC1   | MC2   | CM    |
| Μακροστοιχεία MS    |                    |       |       |       |
| Μικροστοιχεία MS    |                    |       |       |       |
| Γλυκόζη             |                    |       |       | 30000 |
| Σακχαρόζη           | 25000              | 25000 | 25000 |       |
| Μαγνήσιο            | 54660              | 54660 |       |       |
| Inositol            | 100                | 100   | 100   | 100   |
| Γλυκίνη             | 2                  |       |       | 2     |
| Καζεΐνη             | 100                |       |       |       |
| Αδενίνη             | 40                 |       |       |       |
| Βιταμίνες           |                    |       |       |       |
| Πιριδοξίνη          | 0,5                | 1     | 1     | 0,5   |
| Θειαμίνη            | 0,5                | 1     | 1     | 0,5   |
| Νικοτινικό οξύ      | 5                  | 1     | 1     | 0,5   |
| Βιοτίνη             | 0,05               | 0,001 | 0,001 |       |
| Φδβ                 |                    | 1     | 1     |       |
| Φολικό οξύ          | 0,05               |       |       |       |
| MES                 | 976                |       |       |       |
| Ορμόνες             |                    |       |       |       |
| BAP                 | 0,5                |       |       |       |
| Ζεατίνη             |                    | 2     | 2     |       |
| ΑΙΑ                 |                    | 0,1   | 0,1   |       |
| Ριβόζη της ζεατίνης |                    |       |       | 2     |
| ANA                 | 0,1                |       |       | 0,02  |
| GA3                 |                    |       |       | 0,02  |
| Άγαρ                | 7000               | 7000  | 7000  | 7000  |
| PH                  | 5,7                | 5,7   | 5,7   | 5,7   |

Η βλαστική ανάπτυξη και η εκπτώξει ριζών των κάλων πραγματοποιήθηκε στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού MS-P.

#### **3.2.2.4. Εγκλιματισμός των φυταρίων στο θερμοκήπιο.**

Μόλις αποκτήθηκαν τα φυτάρια, απομακρύνθηκε το άγαρ, πλένοντας τις ρίζες τους με νερό. Κατόπι, φυτεύτηκαν σε πλαστικές θήκες με χώμα και καλύφθηκαν με πλαστικό, για να διατηρηθεί η σχετική υγρασία σε υψηλά επίπεδα. Μετά από μια εβδομάδα άρχισε ο εγκλιματισμός των φυτών, ανοίγοντας σταδιακά το θερμοκήπιο από πλαστικό, έως την πλήρη απομάκρυνση του μετά από 10 ημέρες. Στη συνέχεια τα φυτάρια μεταφυτεύθηκαν σε γλάστρες για να πραγματοποιηθεί η ολοκληρωτική ανάπτυξη των φυτών και η απόκτηση των βολβών.

#### **3.2.3. Προσδιορισμός και χαρακτηρισμός των σωματικών υβριδίων.**

Ο προσδιορισμός των αποκτηθέντων σωματικών υβριδίων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή των μοριακών δεικτών RAPD, που ακολουθήθηκε από ένα μορφολογικό και φυσιολογικό χαρακτηρισμό.

##### **3.2.3.1. Μοριακός χαρακτηρισμός.**

###### **3.2.3.1.1. Εξαγωγή του DNA.**

Η αφαίρεση του DNA πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφει ο Edwards (1991). Τα *in-vitro* φύλλα από φυτάρια 3-4 εβδομάδων χωρίστηκαν σε μικρά κομμάτια και εμβαπτίστηκαν σε 400μl του διαλύματος αφαίρεσης (Πίνακας 12). Στη συνέχεια, οι ιστοί θρυμματίστηκαν για 30' σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολούθησε φυγοκέντριση σε 13000 rpm για 1'. Κατόπι, συλλέχθηκε το επικείμενο διάλυμα, που προστέθηκε σε 320 μl ισοπροπανόλης. Ύστερα από 2', ακολούθησε φυγοκέντριση στις 13000 rpm για 5' και αφού το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει, προστέθηκε στο διάλυμα 1 x TE (10mM Tris-HCl, PH8 και EDTA)

Πίνακας 12. Διάλυμα εξαγωγής του DNA του γενώματος.

| Σύνθεση         | Συγκέντρωση |
|-----------------|-------------|
| Tris HCl pH=7,5 | 0,2 M       |
| NaCl            | 0,25 M      |
| EDTA            | 25 mM       |
| SDS             | 0,5%        |

### 3.2.3.1.2. Ενίσχυση του πολυμορφισμού του DNA στο άγαρ (RAPD)

Η τεχνική PCR-RAPD αποτελείται, από την ενίσχυση του πολυμορφισμού του DNA στο άγαρ, που επιτρέπει την εύρεση διαφορών στο επίπεδο του DNA. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν υποκινητές (primers) των 10 pb του Oregon Technologies (Alameda, California). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με μια ποσότητα των 25μl, όπως περιγράφεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Αντίδραση της ενίσχυσης της τεχνικής PCR-RAPD.

| Αντιδραστήρια              | Ποσότητα |
|----------------------------|----------|
| Διάλυμα αντίδρασης (10x)   | 2,5 μl   |
| MgCl <sub>2</sub> (50 mM)  | 1 μl     |
| dNTPs (2,5mM)              | 2 μl     |
| Primer (20 pmol)           | 0,4 μl   |
| Taq polimerasa (5000 u/ml) | 0,2 μl   |
| DNA (125 ng/μl)            | 5 μl     |
| Σύνολο                     | 25 μl    |

Η ενίσχυση πραγματοποιείται σε ένα PCR (Stratagene Robocycler Gradient 96) εφαρμόζοντας τους κύκλους που γράφονται στον Πίνακα 14. Η αρχική μετουσίωση του DNA πραγματοποιήθηκε στους 94<sup>0</sup>C κατά τη διάρκεια 5'. Κάθε κύκλος αρχίζει χωρίζοντας τις συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA στη θερμοκρασία των 94<sup>0</sup> C. Στη συνέχεια, μειώνεται η θερμοκρασία στους 35<sup>0</sup>C για να διευκολυνθεί η προσαρμογή των υποκινητών (primers) στις συμπληρωματικές περιοχές. Αυτή είναι η φάση υβριδισμού των δεικτών ή 'annealing'. Το τελευταίο

στάδιο της επεκτάσεως λαμβάνει χώρα στους 72°C, επαναλαμβάνοντας τον κύκλο για 45 φορές. Η τελική επέκταση πραγματοποιείται στους 72°C για 10'.

Τελικά, διαχωρίζονται τα τμήματα του DNA με ηλεκτροφόρηση σε τζέλ αγαρόζης 1% και 80V για 130' σε διάλυμα TAE (0,04 M Tris-acetato και 0.002 M EDTA).

Τα τμήματα του DNA γίνονται ορατά κάτω από υπεριώδες φως με χρωματισμό με 0,5 μg βρωμιούχου αιθιδίου ανα ml του gel. Τα ενισχυμένα δείγματα χρωματίζονται με κυανούν της βρωμοφαινόλης σε μια αναλογία γλυκερίνης/χρωστικής 2:1, για να ελεγχθεί η αποδημία.

Πίνακας 14. Κύκλος της ενίσχυσης της τεχνικής PCR-RAPD.

| Κύκλοι | Θερμοκρασία<br>(°C) | Χρόνος<br>(min) |
|--------|---------------------|-----------------|
| 1      | 94                  | 5               |
| 45     | 94                  | 1               |
|        | 35                  | 1               |
|        | 72                  | 2               |
| 1      | 72                  | 10              |

### **3.2.3.2. Κυτταρολογικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός.**

#### **3.2.3.2.1. Καθορισμός του επιπέδου πολυπλοειδίας.**

Πραγματοποιείται μέτρηση των στοματίων των χλωροπλαστών των κυττάρων για να καθοριστεί το επίπεδο πλοειδίας των αναγεννημένων φυτών. Για το λόγο αυτό, καταστρέφεται η επιδερμίδα της πλάτης των φύλλων και για καλλίτερη παρατήρηση των χλωροπλαστών χρωματίζονται με lugol, χρωστική του αμύλου. Τα φυτά που παρουσιάζουν από 12 έως 16 χλωροπλάστες θεωρούνται διπλοειδή ενώ αυτά που έχουν μεταξύ 24 έως 28 τετραπλοειδή (Frandsen 1968, Cardí 1993a). Ο χρωμοσωματικός έλεγχος πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ακρορίζια με τη μέθοδο Feulgen (προμεταχείριση του υλικού για 3 h σε διάλυμα 0,002 M 8-hydroxiquinolin, σταθεροποίηση σε διάλυμα 3:1 αλκοόλη /οξικό οξύ για 24 h και στη συνέχεια υδρόλυση σε HCl 1N σε 60°C για 10'.

### **3.2.3.2.2. Βιωσιμότητα της γύρης.**

Για να είναι δυνατή η χρησιμοποίηση των γενοτύπων που θα αποκτηθούν από τις διάφορες συντήξεις, από ένα πρόγραμμα δημιουργίας νέων ποικιλιών, θα πρέπει η γύρη τους να είναι βιώσιμη. Η βιωσιμότητα της γύρης καθορίζεται με βαφή των γυρεοκόκκων με διάλυμα 1% οξικής καρμίνης. Τελικά μετά από δύο ώρες, εκτιμάται το ποσοστό της γύρης που άλλαξε χρώμα.

### **3.2.3.2.3. Εκτίμηση των σωματικών υβριδίων και των συμβατικών υβριδίων.**

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιείται μια σύγκριση των σωματικών υβριδίων της συντήξεως H86.5046/10+CHC17034 και των γονιμοποιημένων υβριδίων διαμέσου διασταύρωσης με τους ίδιους γονείς. Οι τελευταίοι αποκτώνται από κονδύλους που έχουν φυτευτεί σε τούβλα, αποφεύγοντας το σχηματισμό στολόνων και ευνοώντας τη βλάστηση. Οι διασταυρώσεις πραγματοποιούνται σε κλαδεμένο άνθος, τοποθετώντας τους βλαστούς σε δοχεία με νερό και 80 ppm στρεπτομυκίνης για να αποφευχθούν οι μολύνσεις. Η θερμοκρασία διατηρείται στους 20°C η φωτοπερίοδος στις 16h καθώς και η σχετική υγρασία το περισσότερο στο 80%. Η γύρη των δύο γονέων αφού συλλεχθεί από ανοιχτά άνθη με δόνηση, παραμένει αποθηκευμένη σε ξηρό περιβάλλον στους 4°C για 3 εβδομάδες.

Ένα μήνα μετά την επικονίαση, οι καρποί βρίσκονται τυλιγμένοι σε πλαστικά κιβώτια για να αποφευχθούν τυχών σήψεις. Μετέπειτα, γίνεται η συγκομιδή τους και αποθηκεύονται σε ξηρό περιβάλλον έως την ωρίμανση τους. Στη συνέχεια, συλλέγονται τα σπόρια, πλένονται, ξηραίνονται και αποθηκεύονται σε φύλλα χαρτιού. Αυτά φυτεύονται στο θερμοκήπιο για την απόκτηση φυτών και ακολουθεί η μεταφύτευση τους στον αγρό.

Οι κόνδυλοι που αποκτήθηκαν ταξινομούνται βάση των ακόλουθων χαρακτήρων: μήκος, πλάτος, σχήμα των βολβών, παραγωγικότητα, αριθμό κονδύλων ανά φυτό, μέσο βάρος των κονδύλων και αριθμό βολβών με μέγεθος μικρότερο των 30mm, 30-45mm, 45-60mm, μεγαλύτερο των 60mm. Υπολογίζονται τα κύρια στοιχεία από τον συσχετισμό των πρωτότυπων χαρακτήρων που αξιολογούνται, με την επεξεργασία διαγραμμάτων της διασποράς σε καθορισμένα πλάνα από τα τρία πρώτα στοιχεία, πραγματοποιώντας τελικά μια γραφική παράσταση της ειδικής σχέσης του συνόλου των γενοτύπων.

### 3.2.4. Εκτίμηση της ανθεκτικότητας της πατάτας σε ιούς.

#### 3.2.4.1. Ιός X (PVX) και ιός Y (PVY).

Η εκκόλαψη των ιών PVX-C και PVY(N) πραγματοποιείται με την εφαρμογή στα φύλλα μίας λεπτής καυστικής σκόνης (Carborundo 600 Mesh) για προκληθούν τραύματα στην επιφάνεια τους και να διευκολυνθεί η είσοδος του ιού. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται ο ιός επάνω στα φύλλα του φυτού και ακολουθεί ξέπλυμα τους με νερό για να υποχωρήσει το πλεόνασμα της καυστικής σκόνης και του εμβολίου. Τα φυτά διατηρούνται στο θερμοκήπιο σε θερμοκρασία 20-22<sup>o</sup> C και σχετική υγρασία 70%.

Η διαπίστωση της μόλυνσης γίνεται με τη δοκιμή ELISA-DAS (Clark και Adams, 1977) όπου πραγματοποιείται το διάβασμα των πλακών με τη βοήθεια σπεκτοφωτόμετρου με μήκος κύματος 280nm.

Πίνακας 15. Τιμές από τη δοκιμή ELISA υβριδίων μολυσμένων από τους ιούς PLRV και PVY της συντήξεως SR260+BRD218228 και των γονέων της.

| Φυτό       | PLRV  | PVY   |
|------------|-------|-------|
| SR260      | 0,452 | 0,648 |
| BRD218228  | 0,145 | 0,132 |
| SB1        | 0,181 | 0,335 |
| SB2        | 0,255 | 0,125 |
| Μάρτυρας+  | 0,629 | 1,276 |
| μάρτυρας - | 0,159 | 0,144 |

#### 3.2.4.2. Ιός του καρουλιάσματος (PLRV).

Ο ιός του καρουλιάσματος μεταφέρεται με τις αφίδες (*Myzus persicae*) που έχουν αναπτυχθεί σε μολυσμένα φυτά. Με αυτές προσβάλλονται τα φυτά που πρόκειται να αξιολογηθούν, διατηρούνται οι αφίδες σε αυτά για μια εβδομάδα και στη συνέχεια εξοντώνονται.

Όπως και με τους προηγούμενους ιούς, η διαπίστωση της μόλυνσης γίνεται με τη δοκιμή ELISA-DAS 3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση.



### 3.2.5. Καθορισμός της περιεκτικότητας αμύλου και του ξηρού βάρους.

Οι εκτιμώμενοι παράγοντες είναι το ποσοστό σε ξηρό βάρος και η περιεκτικότητα σε άμυλο. Και τα δυο υπολογίζονται σύμφωνα με το ειδικό βάρος, με το οποίο έχουν άμεση σχέση (Gravouelle 1990). Ο υπολογισμός πραγματοποιείται με τη μέθοδο των Fong και Redshaw (1973) σύμφωνα με την ακόλουθη ισότητα:

$$\text{Ειδικό βάρος} = (\text{βάρος στον αέρα} - \text{βάρος στο νερό}) / \text{βάρος στον αέρα}$$

Μόλις υπολογιστεί το ειδικό βάρος, εφαρμόζονται οι ακόλουθες εξισώσεις που ισχύουν για το ξηρό βάρος και το άμυλο.

$$\text{Ξηρό βάρος} = 210,89 \times \text{ειδικό βάρος} - 206,62$$

$$\text{Άμυλο} = 216,61 \times \text{ειδικό βάρος} - 219,81$$

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται 3 επαναλήψεις και στη συνέχεια υπολογίζεται ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων. Για να γίνουν οι μετρήσεις θα πρέπει οι κόνδυλοι να είναι εντελώς καθαροί από χώμα και να μην εμφανίζουν "κούφια" καρδιά.

#### **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.**

##### **4.1. Σύντηξη πρωτοπλαστών.**

##### **4.1.1. Κατευθυνόμενες συντήξεις.**

##### **4.1.1.1. Απομόνωση και εξυγίανση των πρωτοπλαστών.**

Οι πρωτοπλάστες που απομονώθηκαν από το μεσόφυλλο των γενοτύπων που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία καταγράφηκαν ως αριθμός πρωτοπλαστών ανά g ιστού του χρησιμοποιούμενου γενοτύπου. Έγινε ανάλυση της παραλλακτικότητας σε σχέδιο πλήρων ομάδων σε ελεύθερη διάταξη με δύο επαναλήψεις. Οι μέσοι όροι κατατάχθηκαν με τη μέθοδο του Duncan και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16. Κατάταξη κατά Duncan (0,05) του αριθμού πρωτοπλαστών ανά g ιστού των χρησιμοποιουμένων γενοτύπων στις κατευθυνόμενες συντήξεις.

| Γενότυπος   | Αποδοτικότητα<br>(πρω/g x 10 <sup>6</sup> ) |
|-------------|---|
| H82.385/9   | 13,0 σ                                      |
| BRD 218228  | 11,8 αβ                                     |
| CHC 17034   | 9,3 αβ                                      |
| H86.5046/10 | 6,7 αβ                                      |
| R3034       | 5,7 αβ                                      |
| VER 1340    | 4,9 βγ                                      |
| SR260       | 4,2 βγ                                      |
| H81.2063/10 | 3,9 γ                                       |

Οι τιμές κυμάνθηκαν από 13 πρωτοπλάστες / g για τον γενότυπο H82.385/9 έως 3,9 για τον γενότυπο H81.2063/10.

##### **4.1.1.2. Καλλιέργεια πρωτοπλαστών και αναγέννηση των φυτών.**

Μετά την απομόνωση των πρωτοπλαστών, δοκιμάστηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας V-KM και V-KM τροποποιημένο για τις συντήξεις H82.385/9+H86.5046/10 και H86.5046/10+CHC 17034.

Για να καθορισθεί η αποτελεσματικότητα του κάθε διαλύματος, πραγματοποιήθηκε ύστερα από επτά ημέρες μια καταμέτρηση των κυττάρων που

βρίσκονταν σε κατάσταση διαίρεσης για κάθε εκατό πρωτοπλάστες. Κυτταρικές διαιρέσεις παρατηρήθηκαν και στα δύο διαλύματα και η μικρότερη αναλογία βρέθηκε στο διάλυμα V-KM για τη σύντηξη H82.385/9+H86.5046/10. Η σύντηξη H86.5046/10+CHC 17034 δε παρουσίασε διαφορές στα δύο διαλύματα (Πίνακας 17).

Πίνακας 17. Κυτταρικές διαιρέσεις ανά γενότυπο και διάλυμα καλλιέργειας.

| Σύντηξη               | Διάλυμα καλλιέργειας | Κυτταρική διαίρεση (%) |
|-----------------------|----------------------|------------------------|
| H82.385/9+H86.5046/10 | V-KM                 | 27,5                   |
|                       | V-KM τροποποιημένο   | 41,5                   |
| H86.5046/10+CHC 17034 | V-KM                 | 60,7                   |
|                       | V-KM τροποποιημένο   | 61,8                   |

Στο θρεπτικό διάλυμα V-KM, δε παρατηρήθηκε σχηματισμός μικροσποικιών για καμία από τις δύο συντήξεις. Για το λόγο αυτό για την καλλιέργεια των πρωτοπλαστών και την πραγματοποίηση των ακολουθούμενων συντήξεων, χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα V-KM τροποποιημένο (Πίνακας 18).

Πίνακας 18. Τιμές των κυτταρικών διαιρέσεων χρησιμοποιώντας το τροποποιημένο διάλυμα V-KM.

| Σύντηξη              | Κυτταρική διαίρεση (%) |
|----------------------|------------------------|
| H81.2063/10+VER 1340 | 59,9                   |
| R3064+VER 1340       | 62,3                   |
| CHC 17034+R3064      | 53,4                   |
| H86.5046/10+SR260    | 32,1                   |
| SR260+BRD 218228     | 31,8                   |

Οι πιο υψηλές αναλογίες βρέθηκαν στις δύο σύντηξεις που είχαν τον κοινό γονέα VER 1340, ενώ αποικίες αποκτήθηκαν και στις δύο από αυτές. Από την άλλη πλευρά, οι πιο χαμηλές αναλογίες παρατηρήθηκαν με τον κλώνο SR260 (Πίνακας 18).

Επιπλέον, έγινε ανάλυση της ικανότητας σχηματισμού αποικιών από τις σύντηξεις H82.385/9+H86.5046/10 και H86.5046/10+CHC 17034, δοκιμάζοντας διαφορετικά στέρεα θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας. Ο σχηματισμός των αποικιών υπολογίστηκε ως ο αριθμός των αποκτηθέντων μικροκάλων προς τους καλλιεργούμενους πρωτοπλάστες επί εκατό. Οι πρώτες αποικίες που παρατηρήθηκαν προήλθαν από τη σύντηξη H82.385/9+H86.5046/10. Οι αποικίες αυτές μεταφέρθηκαν σε τρία διαλύματα καλλιέργειας, MC, MC1 και MC2 για να διευκρινισθεί η επίδραση των τελευταίων στο σχηματισμό αποικιών και την αναγέννηση (Πίνακας 19) Η αναγέννηση των φυτών έγινε δυνατή μόνο με τη χρησιμοποίηση του διαλύματος MC2.

Πίνακας 19. Σχηματισμός αποικιών και αναγέννηση της σύντηξης H82.385/9+H86.5046/10 στα διαλύματα καλλιέργειας MC, MC1 και MC2.

| Σύντηξη               | Διάλυμα<br>Καλλιέργειας | Σχηματισμός<br>αποικιών (x10 <sup>-2</sup> ) | Αναγέννηση |
|-----------------------|-------------------------|--|------------|
| H82.385/9+H86.5046/10 | MC                      | 3,0  | -          |
|                       | MC1                     | 0,0  | -          |
|                       | MC2                     | 2,0  | +          |

Η επόμενη σύντηξη από την οποία αποκτήθηκαν ορατές μικροαποικίες ήταν η H86.5046/10+CHC 17034. Οι αποικίες αυτές μεταφέρθηκαν στα διαλύματα καλλιέργειας MC και MC2, τα οποία είχαν προάγει το σχηματισμό μικροκάλων στη προηγούμενη σύντηξη, σε αντίθεση με το MC1 το οποίο αντικαταστάθηκε με το καινούργιο θρεπτικό διάλυμα καλλιέργειας CM. Οι τιμές εμφάνισης μικροαποικιών στο διάλυμα MC2, στη συγκεκριμένη περίπτωση, ήταν μικρότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες της προηγούμενης σύντηξης. Τα άλλα δύο διαλύματα καλλιέργειας έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα, όπως αυτό φαίνεται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20. Σχηματισμός αποικιών και αναγέννηση της σύντηξης H86.5046/10+CHC 17034 στα διαλύματα καλλιέργειας MC, CM και MC2.

| Σύντηξη               | Διάλυμα<br>Καλλιέργεια | Σχηματισμός<br>αποικιών (x10 <sup>-2</sup> ) | Αναγέννηση |
|-----------------------|------------------------|--|------------|
| H86.5046/10+CHC 17034 | MC                     | 5,8  | -          |
|                       | CM                     | 3,4  | +          |
|                       | MC2                    | 0,6  | -          |

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύματος καλλιέργειας βασίζεται, όχι μόνο στο σχηματισμό των αποικιών αλλά και στην αναγέννησή των φυτών. Όπως προκύπτει από τους προηγούμενους πίνακες τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν στη σύντηξη H82.385/9+H86.5046/10 όταν χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα MC2 και στη σύντηξη H86.5046/10+CHC 17034 όταν χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα CM. Για το λόγο αυτό, στις συντήξεις που ακολουθούν δοκιμάζονται αυτά τα δύο θρεπτικά διαλύματα καλλιέργειας.

Στον Πίνακα 21 παρουσιάζονται τα δεδομένα που αποκτήθηκαν από τις συντήξεις R3064+VER1340 και H81.2063/10+VER1340 όταν αυτές καλλιεργήθηκαν στα διαλύματα καλλιέργειας CM και MC2.

Πίνακας 21. Σχηματισμός αποικιών και αναγέννηση των συντήξεων R3064+VER1340 και H81.2063/10+VER1340 στα διαλύματα καλλιέργειας CM και MC2.

| Σύντηξη             | Διάλυμα<br>Καλλιέργειας | Σχηματισμός<br>αποικιών (x10 <sup>-2</sup> ) | Αναγέννηση |
|---------------------|-------------------------|--|------------|
| H81.2063/10+VER1340 | CM                      | 8,0  | +          |
|                     | MC2                     | 8,0  | -          |
| R3064+VER1340       | CM                      | 5,6  | +          |
|                     | MC2                     | 5,1  | -          |

Όπως είναι φανερό από τον Πίνακα 21, αναγέννηση του φυτικού υλικού επιτεύχθηκε και στις δύο συντήξεις όταν χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα CM. Για το

λόγο αυτό καλλιέργειας για τις υπόλοιπες κατευθυνόμενες συντήξεις επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε το παραπάνω διάλυμα (Πίνακας 22).

Πίνακας 22. Σχηματισμός αποικιών και αναγέννηση των συντήξεων H86.5046/10+SR260, SR260+BRD218228 και CHC17034+R3064 στο διάλυμα καλλιέργειας CM.

| Σύντηξη           | Διάλυμα<br>καλλιέργειας | Σχηματισμός<br>αποικιών (x10 <sup>-2</sup> ) | Αναγέννηση |
|-------------------|-------------------------|--|------------|
| H86.5046/10+SR260 | CM                      | 5,5  | +          |
| SR260+BRD218228   | CM                      | 3,1  | +          |
| CHC17034+R3064    | CM                      | 0,4  | +          |

Πίνακας 23. Σχηματισμός αποικιών και αναγέννηση των κατευθυνόμενων συντήξεων στα διαλύματα MC, MC1, MC2 και CM.

| Σύντηξη               | Διάλυμα<br>Καλλιέργειας | Σχηματισμός<br>αποικιών (x10 <sup>-2</sup> ) | Αναγέννηση |
|-----------------------|-------------------------|--|------------|
| H82.385/9+H86.5046/10 | MC                      | +  | -          |
|                       | MC1                     | -  | -          |
|                       | MC2                     | +  | +          |
| H86.5046/10+CHC17034  | MC                      | +  | -          |
|                       | MC2                     | +  | -          |
|                       | CM                      | +  | +          |
| H81.2063/10+VER1340   | MC2                     | +  | -          |
|                       | CM                      | +  | -          |
| R3064+VER1340         | MC2                     | +  | -          |
|                       | CM                      | +  | +          |
| H86.5046/10+SR260     | CM                      | +  | +          |
| SR260+BRD218228       | CM                      | +  | +          |
| CHC17034+R3064        | CM                      | +  | +          |

Στον Πίνακα 23 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του σχηματισμού των αποικιών και της αναγέννησής τους στο σύνολο των πραγματοποιούμενων

συντήξεων στα διάφορα θρεπτικά διαλύματα που δοκιμάστηκαν. Ο σχηματισμός αποικιών επιτεύχθηκε από την πλειοψηφία των χρησιμοποιούμενων διαλυμάτων με μοναδική εξαίρεση το διάλυμα MC1. Επίσης, το διάλυμα MC2 έδειξε την πλέον εξειδικευμένη δράση, επιτρέποντας την αναγέννηση μόνο μιας σύντηξης. Αντίθετα, το διάλυμα CM είχε την πλέον ευρεία δράση, επιτρέποντας την αναγέννηση όλων των συντήξεων στις οποίες εφαρμόστηκε.

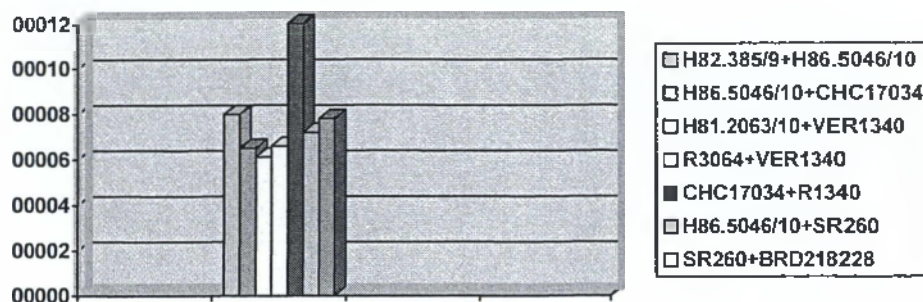
Οι τιμές των κάλων που αναγεννήθηκαν και ο αριθμός των βλαστών που αποκτήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 24. Οι πιο υψηλές τιμές της πρώτης παραμέτρου αντιστοιχούν στη σύντηξη H86.5046/10+SR260. Κατά τη μέτρηση του μέσου αριθμού βλαστών για κάθε εκατό κάλους, τις υψηλότερες τιμές έδωσαν οι κλώνοι στους οποίους ο ένας εκ των δυο γονέων ήταν ο H86.5046/10.

Πίνακας 24. Σχηματισμός αναγεννημένων κάλων και αριθμός βλαστών των κατευθυνόμενων συντήξεων.

| Σύντηξη               | Μεταφερόμενοι κάλοι | Αναγεννημένοι κάλοι (%) | Συνολικός αο. βλαστών | Μ.ορ.βλαστών /αναγ.κλων |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| H82.385/9+H86.5046/10 | 18                  | 38,0                    | 64                    | 9,4                     |
| H86.5046/10+CHC17034  | 35                  | 5,7                     | 15                    | 7,5                     |
| H81.2063/10+VER1340   | 203                 | 17,5                    | 92                    | 2,6                     |
| CHC17034+R3064        | 14                  | 25,4                    | 31                    | 7,6                     |
| H86.5046/10+SR260     | 206                 | 45,0                    | 499                   | 8,6                     |
| SR260+BRD218228       | 184                 | 10,0                    | 422                   | 5,4                     |
| R3064+VER1340         | 143                 | 18,7                    | 202                   | 23,0                    |

Μια άλλη βασική παράμετρος ήταν ο χρόνος εμφάνισης των πρώτων βλαστών από τη στιγμή που οι συντηγμένοι πρωτοπλάστες μεταφέρθηκαν στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Ο χρόνος αυτός ήταν μεγάλης σημασίας, καθώς αύξανε η πιθανότητα εμφάνισης σωμακλωνικής παραλλακτικότητας και δείχνει την αποτελεσματικότητα του υποστρώματος αναγέννησης. Στην Εικόνα 5 παρουσιάζεται διαγραμματικά ο χρόνος αναγέννησης για το σύνολο των συντήξεων. Με εξαίρεση τη σύντηξη CHC17034+R3064 όπου ο χρόνος αναγέννησης ήταν 12 εβδομάδες, οι υπόλοιπες παρουσίασαν παρόμοιους χρόνους, με ένα μέσο όρο των 7,8 εβδομάδων.

## ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ



## ΣΥΝΤΗΞΗ

Εικόνα 5. Απαιτούμενος χρόνος αναγέννησης για το σύνολο των συντήξεων.

Μόλις οι βλαστοί αποκτήσουν μέγεθος ενός εκατοστού, περίπου, μεταφέρονται στο πολλαπλασιαστικό διάλυμα MS-P για την ριζοποίηση τους. παρατηρώντας μια ανάλογη σχέση ανάμεσα στο μέγεθος των βλαστών και την ικανότητα αυτών για ριζογένεση.

#### 4.2. Προσδιορισμός και χαρακτηρισμός των σωματικών υβριδίων των κατευθυνόμενων συντήξεων.

##### 4.2.1. Μοριακός χαρακτηρισμός.

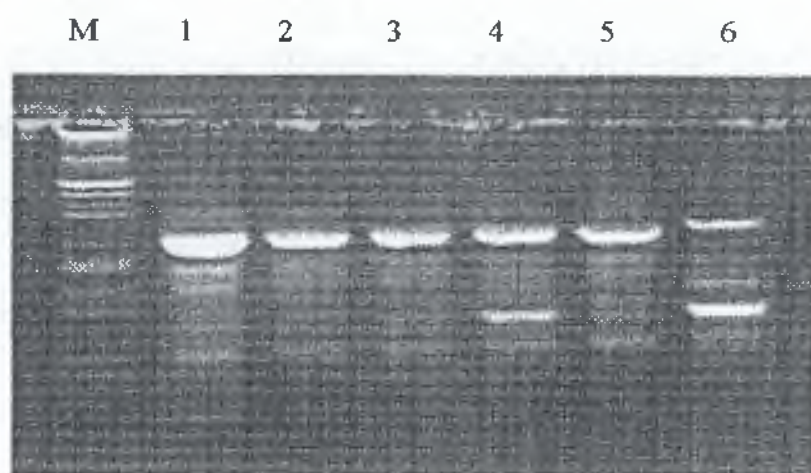
Με τη μέθοδο εξαγωγής του χρησιμοποιούμενου DNA, δεν ήταν αναγκαία η εφαρμογή μεγάλης ποσότητας ιστών, αφού από 10mg φύλλων φυταρίων που μεγάλωσαν σε *in-vitro* συνθήκες, εξάχθηκε αρκετό DNA για να υλοποιηθούν οι αντιδράσεις στο PCR. Από το σύνολο των υποκινητών (primers) που δοκιμάστηκαν, αυτοί που τελικά επιλέχθηκαν για τον προσδιορισμό των υβριδίων για κάθε μια από τις συντήξεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 25.



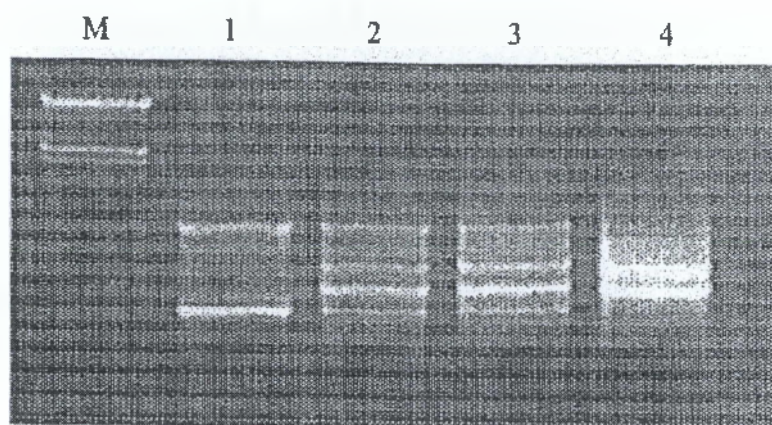
Πίνακας 25. Επιλεγμένοι υποκινητές (primers) για το χαρακτηρισμό των υβριδίων για κάθε μια από τις συντήξεις.

| Primer | Ακολουθία  | Σύντηξη                                 |
|--------|------------|---|
| AL10   | AAGGCCCTG  | R3064+VER1340;R3064+CHC17034            |
| AU20   | GTCGAAACCC | H86.5046/10+CHC17034;R3064+CHC17034     |
| AV20   | TCATGCGCAC | SR260+BRD218228                         |
| B20    | GGACCCTTAC | H81.2063/10+VER1340;R3064+VER1340       |
| K10    | GTGCAACGTG | H82.385/9+H86.5046/10;H86.5046/10+SR260 |

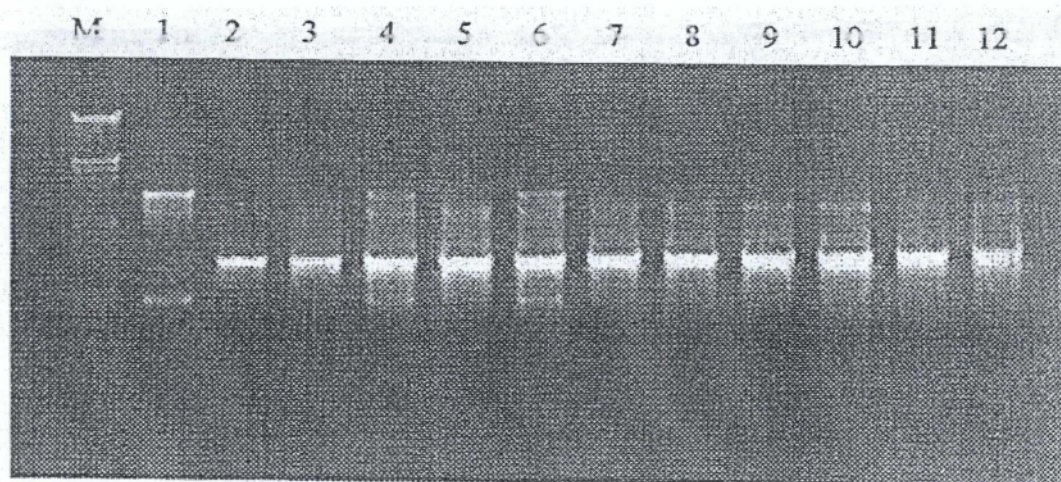
Τα ηλεκτροφορέματα των στηλών που αποκτήθηκαν χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης παρουσιάζονται στις Εικόνες 7 έως 12.



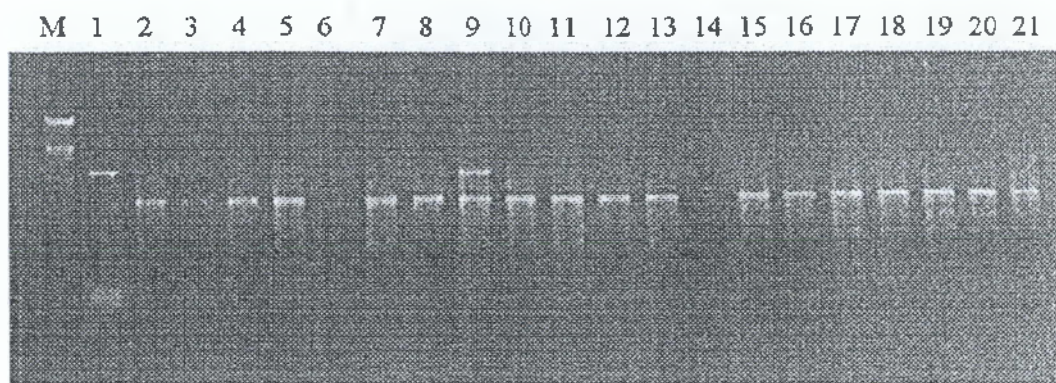
Εικόνα 6. Προϊόντα ενίσχυσης που δημιουργήθηκαν με τον υποκινητή K10 για τη σύντηξη H86.5046/10+H82.385/9. M: μοριακός δείκτης των 21kb. Στήλη 1: H86.5046/10. Στήλη 4 υβρίδιο. Στήλες 2,3,5 : αναγεννήσεις του H86.5046/10. Στήλη 6: H82.385/9.



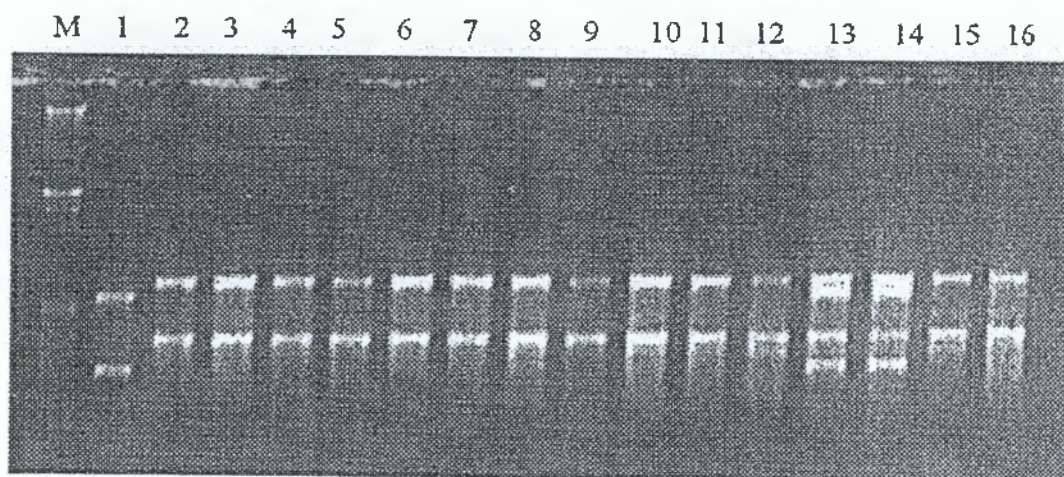
Εικόνα 7. Προϊόντα ενίσχυσης που αναγεννήθηκαν από τον υποκινητή AU20 τη σύντηξη H81.5046/10+CHC17034. M: μοριακός δείκτης των 21kb. Στήλη 1: CHC17034. Στήλες 2 και 3: υβρίδια. Στήλη 4:H81.5046/10.



Εικόνα 8. Προϊόντα ενίσχυσης που αναγεννήθηκαν από τον υποκινητή B20 για τη σύντηξη H81.2063/10+VER1340. M: μοριακός δείκτης των 21 kb. Στήλη 1: VER1340. Στήλες 4 και 6 υβρίδια. Στήλες 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10 και 11 αναγεννήσεις του H81.2063/10. Στήλη 12: H81.2063/10.

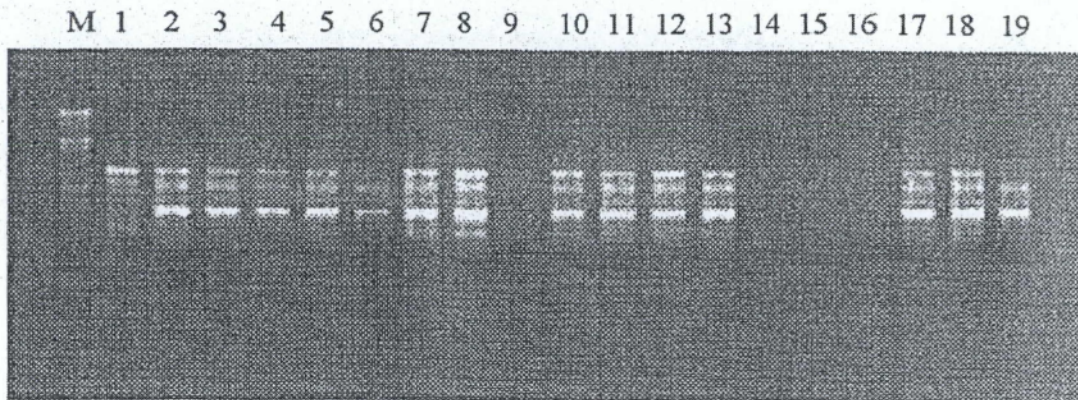


Εικόνα 9. Προϊόντα ενίσχυσης που αναγεννήθηκαν από τον υποκινητή K10 για τη σύντηξη H86.5046/10+SR260. M: μοριακός δείκτης των 21kb. Στήλη 1: H86.5046/10. Στήλη 9: υβρίδιο. Στήλες 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20: αναγεννήσεις του SR260. Στήλη 21: SR260. Στήλες 6 και 14: δεν ενισχύθηκαν.



Εικόνα 10. Προϊόντα ενίσχυσης που αναγεννήθηκαν από τον υποκινητή K10 για τη σύντηξη SR260+BRD218228. M: μοριακός δείκτης των 21 kb. Στήλη 1:BRD218228. Στήλες 13 και 14: υβρίδια. Στήλες: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 αναγεννήσεις του SR260. Στήλη 16: SR260

A)

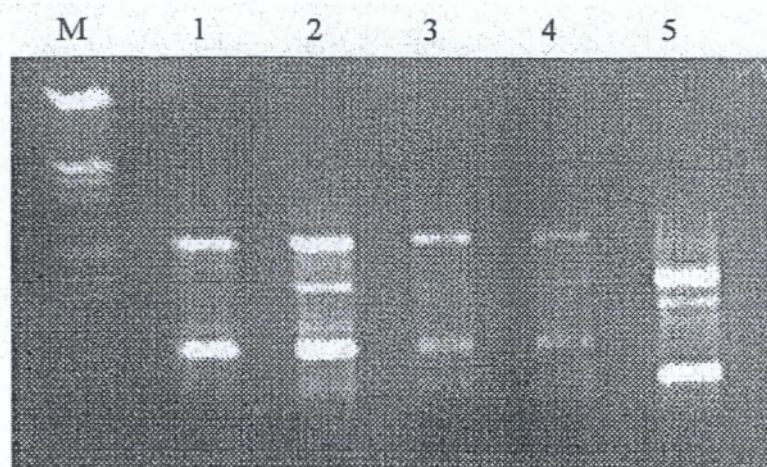


B)

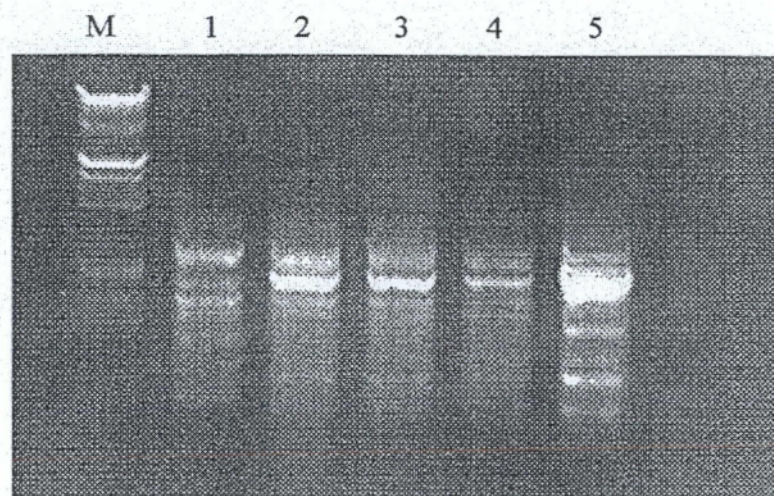


Εικόνα 11. Προϊόντα ενίσχυσης που αναγεννήθηκαν από τους υποκινητές B20 (A) και AL10 (B) για τη σύντηξη R3064+VER1340. M: μοριακός δείκτης των 21 kb. Στήλη 1: VER1340. Στήλες 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17 και 18: υβρίδια. Στήλη 6: αναγέννηση του R3064. Στήλη 19: R3064. Στήλες 13 και 15: δεν ενισχύθηκαν.

A)



B)



Εικόνα 12. Προϊόντα ενίσχυσης που αναγεννήθηκαν από τους υποκινητές AU20 (A) και AL10 (B) για τη σύντηξη CHC17034+R3064. M: μοριακός δείκτης των 21 kb. Στήλη1: CHC17034. Στήλες 2, 3, και 4: υβρίδια. Στήλη 5: R3064.

Στον Πίνακα 26 παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών σειρών που αποκτήθηκαν από κάθε γονέα, καθώς και το ποσοστό των υβριδικών γραμμών. Πρέπει να υπογραμμισθεί ότι όλα τα μη υβριδικά φυτά παρουσιάζονται στο ηλεκτροφόρεμα του ενός εκ των δυο γονέων και σε καμία περίπτωση δεν αναγεννούν φυτά και των δυο γονέων.

Πίνακας 26. Αριθμός των συνολικών σειρών που αποκτήθηκαν από κάθε γονέα, καθώς και το ποσοστό των υβριδικών γραμμών.

| Γονέας 1    | Γονέας 2    | Νο γραμμών<br>γονέας 1 | Νο γραμμών<br>γονέας 2 | Συν.υβριδ.<br>γραμ. | Υβριδικές<br>γραμ.(%) |
|-------------|-------------|------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|
| H82.385/9   | H86.5046/10 | 0                      | 3                      | 1                   | 25,0                  |
| H86.5046/10 | CHC17034    | 0                      | 0                      | 2                   | 100,0                 |
| H81.2063/10 | VER1340     | 8                      | 0                      | 2                   | 20,0                  |
| R3064       | VER1340     | 1                      | 0                      | 15                  | 88,2                  |
| CHC17034    | R3064       | 0                      | 0                      | 3                   | 100,0                 |
| H86.5046/10 | SR260       | 0                      | 64                     | 1                   | 1,5                   |
| SR260       | BRD218228   | 0                      | 12                     | 2                   | 14,3                  |

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.**

### **5.1. Σύντηξη πρωτοπλαστών.**

#### **5.1.1 Κατευθυνόμενες συντήξεις.**

##### **5.1.1.1. Απομόνωση και εξυγίανση πρωτοπλαστών.**

Για την απομόνωση των πρωτοπλαστών χρησιμοποιήθηκαν φυτά που αποκτήθηκαν *in-vitro* γιατί προσφέρουν μια σειρά από πλεονεκτήματα σε σχέση με τα φυτά που καλλιεργούνται στο θερμοκήπιο. Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα ξεχωρίζει η διαθεσιμότητα ιστού που είναι απαλλαγμένος από παθογόνα γιατί έχει παραχθεί σε ασηπτικές συνθήκες. Αυτό εξασφαλίζει ότι το φυτικό υλικό πριν την απομόνωση του είναι ελεύθερο παθογόνων μικροοργανισμών. Ένα άλλο πλεονέκτημα των *in vitro* φυτών είναι ότι από αυτά αποκτώνται περισσότεροι πρωτοπλάστες από ό,τι με τα φυτά *in vivo*. Ακόμα, η βιωσιμότητα και η ποιότητα των πρωτοπλαστών επηρεάζονται άμεσα από τις φυσικές συνθήκες όπως την ένταση του φωτός, τη φωτοπερίοδο και τη θερμοκρασία (Ferreira και Zecler 1989). Έτσι, με την εξασφάλιση σταθερών συνθηκών καλλιέργειας κάτι που επιτυγχάνεται με την ιστοκαλλιέργεια, λύνετε και το πρόβλημα της αναπαραγωγής κατά την απομόνωση. Περαιτέρω, η υφιστάμενη ιστού που προέρχεται από καλλιέργεια *in-vitro* έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας των πρωτοπλαστών, και αυτό εξασφαλίζει εν)κ των προτέρων τη διαίρεση τους (Davey και Kumar 1983). Επιπλέον, τα φυτά που προέρχονται από πρωτοπλάστες που έχουν απομονωθεί κάτω από τις συνθήκες αυτές, είναι μεταξύ τους πιο ομοιόμορφα (Binding κ. ά. 1981).

Η πηγή του ιστού που χρησιμοποιείται είναι το μεσόφυλλο του φύλλου. Ο ιστός αυτός είναι ο πιο χρησιμοποιούμενος κατά την απομόνωση πρωτοπλαστών στο γένος *Solanum*, γιατί εξασφαλίζει μια καλύτερη αποδοτικότητα απόκτησης πρωτοπλαστών και επιτυγχάνονται υψηλές τιμές αναγέννησης (Ferreira και Zecler 1989).

Η μέθοδος της απομόνωσης αρχίζει με την πραγματοποίηση μικρών τομών (κοψιμάτων) στη πλάτη των φύλλων και τοποθέτηση τους στη συνέχεια σε ένα ενζυματικό διάλυμα για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνονται υψηλές τιμές απόκτησης πρωτοπλαστών με ένα τρόπο εύκολο και απλό στο χειρισμό του. Υπάρχουν συγγραφείς που εξαλείφουν την επιδερμίδα των φύλλων (Bhatt και Fassuliotis 1981), τα κόβουν σε πολύ μικρά κομμάτια (Carlberg κ. ά. 1983) ή σε πολύ μικρούς τομείς (Jacobsen κ. ά. 1983). Φθάνουν δηλαδή στο συμπέρασμα ότι ο τραυματισμός του φυτικού υλικού είναι αναγκαία για

να εξασφαλισθεί η αποτελεσματικότητα της πλασμόλυσης και κατά συνέπεια η απελευθέρωση των πρωτοπλαστών. Όμως, κόβοντας το φυτικό υλικό σε πολύ μικρά τεμάχια, καταστρέφονται πολλά κύτταρα και αυτό μεταφράζεται σε μείωση της αποτελεσματικότητας της απομόνωσης.

Η επιτυχία απόκτησης πρωτοπλαστών δεν εξαρτάται μόνο από την πηγή, αλλά και από τη σύνθεση των ενζύμων που διασπούν το κυτταρικό τοίχωμα, των ιονικών και μη-ιονικών πρόσθετων, του pH και της διάρκειας της διάσπασης. Τα ένζυμα που προτιμήθηκαν σε αυτή την εργασία είναι το ένζυμο-μουλιάσματος R10, που είναι πλούσιο σε πηκτίνες, και η κυτταράση 'Opozuca R10', που υδρολύουν το κυτταρικό τοίχωμα. Και τα δύο αυτά ένζυμα είναι τα πιο χρησιμοποιούμενα στο *Solanum*, εξασφαλίζοντας τις καλύτερες τιμές απομόνωσης σε σύγκριση με άλλους ενζυματικούς συνδυασμούς που παρουσιάζουν ίδιου τύπου δραστηριότητες (Oratny κ. ά. 1988). Τα ένζυμα αυτά που διασπούν το κυτταρικό τοίχωμα είναι ρυθμιστικοί παράγοντες της καταπόνησης παράγοντας ενεργό οξυγόνο. Αυτό προκαλεί την υπεροξειδωση των λιπιδίων της μεμβράνης, η οποία συνεπάγεται τη δραστηριοποίηση ενζύμων, όπως είναι οι υπεροξειδάσες (Ciriqi κ. ά. 1991).

Ο άριστος (optimum) χρόνος εκκόλαψης στο ενζυματικό διάλυμα καθορίζεται στις 16 ώρες, ενώ παρατηρείται και επίδραση του γενότυπου στις τιμές απόκτησης των πρωτοπλαστών. Έτσι, για κλώνους του *S. tuberosum* παρατηρούνται διαφορές της τάξης των  $9 \cdot 10^6$  πρωτοπλαστών/g ανάμεσα σε γενότυπους με μεγαλύτερη και μικρότερη αποδοτικότητα (Radke και Grun 1986).

Η διαδικασία απομόνωσης των πρωτοπλαστών πραγματοποιήθηκε σε ένα βήμα. Το διάλυμα εκκόλαψης ετοιμάστηκε με ένζυμα που διέλυναν το κυτταρικό τοίχωμα, ανόργανα χημικά στοιχεία, μανιτόλη ως οσμωτικό παράγοντα και διάλυμα MES. Η αποδοτικότητα στην απομόνωση πρωτοπλαστών που επιτεύχθηκε με τη διαδικασία αυτή ήταν ανεβασμένη, υπερβαίνοντας για όλους τους γενότυπους, συμπεριλαμβανομένων των άγριων ειδών, την τιμή  $1 \cdot 10^6$  πρωτοπλάστες/g. Οι Xu κ. ά. (1991) χρησιμοποιώντας 3 άγρια είδη του γένους *Solanum*, αναφέρουν τιμές μικρότερες από τα  $1 \cdot 10^6$  ενώ οι Nelson κ. ά. (1983) με το *S. brevidens* απέκτησαν, αναλόγως του υποστρώματος πολλαπλασιασμού που χρησιμοποίησαν κάθε φορά 2 με  $6 \cdot 10^6$  πρωτοπλάστες/g. Με αυτό το είδος, οι Jacobsen κ. ά. (1993) απέκτησαν  $7 \cdot 10^6$  πρωτοπλάστες/g. Όλες αυτές οι τιμές είναι μικρότερες από αυτή που αποκτήθηκε με το διάλυμα που περιγράφει η παρούσα εργασία, που άγγιξε τους  $11,8 \cdot 10^6$  πρωτοπλάστες/g. Ωστόσο οι Haberlach κ. ά. (1985) χρησιμοποιώντας ιστό οφθαλμού



*S. brevidens* πέτυχαν να απομονώσουν 20.106 πρωτοπλάστες/g. Οι μεγαλύτερες και οι μικρότερες αποδοτικότητες ήταν ανώτερες από αυτές που απέκτησαν οι Carputo κ.α. (1995) οι οποίες ήταν  $0,3 \cdot 10^6$  στο *S. lycopersicoides* και  $8,4 \cdot 10^6$  πρωτοπλάστες/g με τον κλώνο UA1110 του *S. tuberosum*.

Τα αποτελέσματα λοιπόν που αποκτήθηκαν μετά την διαδικασία απομόνωσης των πρωτοπλαστών δείχνουν ότι η μέθοδος που εφαρμόστηκε είναι κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα γενοτύπων, συμπεριλαμβανομένων κλώνων του *tuberosum* και άγριων ειδών του γένους *Solanum*.

#### **5.1.1.2. Ηλεκτροσύντηξη πρωτοπλαστών.**

Η απόκτηση των σωματικών υβριδίων έγινε δυνατή με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου AC 160-190 V/cm, 1 Mhz για 15' και 2 με 4 παλμούς των 1,2 kV/cm ηλεκτρικού πεδίου DC με διάρκεια 20μs. Το εφαρμοζόμενο εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο ήταν ελαφρώς μεγαλύτερο από αυτό που χρησιμοποιήθηκε από τους Charut κ. ά. (1990) αλλά μικρότερο από αυτό που χρησιμοποιήθηκε από τους Jacobsen κ. ά. (1993) και Serraf κ. ά. (1994) που πραγματοποίησαν συντήξεις ανάμεσα στα *S. tuberosum* και *S. brevidans*. Το συνεχές ηλεκτρικό πεδίο ήταν παρόμοιο με το εφαρμοζόμενο από άλλους συγγραφείς. Ωστόσο, άλλες εργασίες περιγράφουν πεδία DC μεγαλύτερης τάσης. Εξαιτίας όμως της αντιστρόφως ανάλογης σχέσης που υπάρχει μεταξύ του συνεχούς ηλεκτρικού πεδίου με το σχηματισμό των αποικιών (Cardi κ. ά. 1993b), δε συνίσταται η αύξηση τάσης του πρώτου.

Το θρεπτικό διάλυμα της σύντηξης περιείχε 0,5 M μανιτόλης και 0,5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Το διάλυμα αυτό παρουσίαζε μια κατάλληλη αγωγιμότητα για την διαδικασία της ευθυγράμμισης αποφεύγοντας την υπερβολική θέρμανση και τις πιθανές διαταραχές, οι οποίες μπορούν να σπάσουν τους πρωτοπλάστες. Η πρόσθεση μικρών ποσοτήτων ιόντων  $\text{Ca}_2+$  βελτιώνει την συχνότητα διπύρηνων συντήξεων. Αυτό φαίνεται να οφείλεται στην σταθερότητα της μεμβράνης παρουσία  $\text{Ca}_2+$  και σε μια περιορισμένη απελευθέρωση χημικών στοιχείων (Fish κ. ά. 1988, Sihachkr κ. ά. 1988). Οι Bates κ. ά. (1983) έδειξαν ότι εφαρμόζοντας μία συγκέντρωση  $\text{Ca}_2+$  μεγαλύτερη από 5mM δεν παράγονταν συντήξεις. Επίσης και όταν η εφαρμοζόμενη συγκέντρωση ήταν 2mM οι συντήξεις μειώνονταν έως και 50%.

### 5.1.1.3. Καλλιέργεια πρωτοπλαστών και αναγέννηση των φυτών.

Η πυκνότητα της καλλιέργειας των πρωτοπλαστών μπορεί να επηρεάζει ουσιαστικά την κυτταρική διαίρεση. Οι χρησιμοποιούμενες πυκνότητες στο γένος *Solanum* κυμαίνονται από  $10^3$  με  $10^5$  πρωτοπλαστών/ml. Οι τιμές αυτές ποικίλλουν ανάμεσα στα διαφορετικά είδη και καλλιέργειες. Έτσι οι Carlberg κ. ά. (1983) παρατήρησαν ότι πρωτοπλάστες του *S. tuberosum* σε μια πυκνότητα μικρότερη από  $2 \cdot 10^4$  πρωτοπλάστες/ml δεν παρουσίαζαν διαίρεση ενώ σε μια πυκνότητα 8.104, παράγονταν συνδεδεμένοι και εκφυλίζονταν. Κατά τον ίδιο τρόπο, ούτε οι Haberlach κ. ά. (1985) κατάφεραν τον σχηματισμό αποικιών όταν η ένταση καλλιέργειας ήταν της τάξης των  $2 \cdot 10^4$ . Αυτό έγινε δυνατό μόνο όταν η ένταση ήταν  $4,8 \cdot 10^4$  πρωτοπλάστες/ml.

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την απομόνωση των πρωτοπλαστών είναι τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα. Επειδή ανάμεσα στα ένζυμα που διασπούν το κυτταρικό τοίχωμα περιλαμβάνονται και πρωτεολυτικά, είναι δυνατόν να μετουσιωθούν μερικώς ή πλήρως, τα συμπλέγματα των πρωτεϊνών της μεμβράνης (Morris 1985). Επιπλέον, η απουσία κυτταρικού τοιχώματος προκαλεί αλλαγές στον προστανοσολισμό και την οργάνωση διαφόρων στοιχείων του σκελετού των πρωτοπλαστών (Simmonds 1991). Για το λόγο αυτό, η επιτυχία της μετέπειτα βιωσιμότητας των πρωτοπλαστών καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα αποκατάστασης της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και των πρωτεϊνικών στοιχείων της, του σκελετού του κυττάρου και του κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία τροποποιούνται κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών (Roest και Glissen 1993). Επίσης, προκαλείται απελευθέρωση αιθυλενίου, το οποίο επιταχύνει τη μείωση της βιωσιμότητας των πρωτοπλαστών της πατάτας.

Η ανάπτυξη του θρεπτικού διαλύματος KM8p (Kao και Michayluk 1975) αποδείχθηκε ένα πολύ σημαντικό βήμα για την αναγέννηση των πρωτοπλαστών, μειώνοντας την επίδραση του γενοτύπου και των συνθηκών ανάπτυξης (Binding κ. ά. 1981). Το παραπάνω διάλυμα δοκιμάστηκε σε πειράματα αναγέννησης πρωτοπλαστών από διπλοειδείς και τετραπλοειδείς κλώνους στην πατάτα (Carrasco κ. ά. 1994). Όμως, τα χαμηλά αποτελέσματα στο σχηματισμό μικροκάλων που αποκτήθηκαν, οδήγησαν στη χρησιμοποίηση άλλων διαλυμάτων. Έτσι, επιλέχθηκε το διάλυμα V-KM, που είχαν ήδη χρησιμοποιήσει διάφοροι άλλοι ερευνητές (Deimling κ. ά. 1988, Preiszner κ. ά. 1991, Thach κ. ά. 1993). Αυτό το διάλυμα καλλιέργειας ανήκει στα διαλύματα αόριστου τύπου, γιατί περιέχει στη σύνθεσή του γάλα καρύδας

και υδρολυμένη καζεΐνη. Ακόμα, τα οργανικά οξέα που περιέχει βελτιώνουν την ανάπτυξη των πρωτοπλαστών, ενώ η συμμετοχή και άλλων σακχάρων εκτός από την σακχαρόζη και τη γλυκόζη δικαιολογεί τη βοήθεια που προσφέρει στη σύνθεση των στοιχείων του τοιχώματος, όπως είναι οι κυτταρίνες, οι ημικυτταρίνες και οι πηκτίνες (Shahin και Shepard 1980).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πρωτοπλάστες που προέρχονταν από τις σύντηξεις H82.385/9+H86.5046/10 και H86.5046/10+CHC17034. Ως θρεπτικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε το V-KM τροποποιημένο, αφού με το V-KM δεν πραγματοποιήθηκε σχηματισμός μικροαποικιών. Το διάλυμα V-KM τροποποιήθηκε αντικαθιστώντας τα μικροστοιχεία του με τα αντίστοιχα του διαλύματος καλλιέργειας MS. Η πρόσθεση των μικροστοιχείων στις κατάλληλες ποσότητες φαίνεται να είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για το σχηματισμό των μικροαποικιών. Επίσης, η απάλειψη του  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  από τα μακροστοιχεία, που περιέχονταν στο θρεπτικό διάλυμα των Bokelmann και Roest (1983), ευνοεί την κυτταρική διαίρεση. Οι Upadhya (1975), και οι Shepard και Totten (1977) ήταν αυτοί που πιστοποίησαν ότι το αμμώνιο επηρέαζε αρνητικά την βιωσιμότητα των πρωτοπλαστών της πατάτας.

Η πρόσθεση 0,18 M γλυκόζης, εκτός από τη μανιτόλη, ως ρυθμιστές όσμωσης, αποδείχθηκε ωφέλιμη για τη διαίρεση των πρωτοπλαστών (Bhatt και Fasuliotis 1981). Προστέθηκαν επίσης 250 mg/l PEG 6000 και στα δύο χρησιμοποιούμενα διαλύματα, γιατί αυτό βελτιώνει τη βιωσιμότητα των πρωτοπλαστών πιθανά λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης (Sihachk κ. ά. 1992). Η γλυκίνη επίσης φαίνεται να παρουσιάζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Ochatt 1991). Η πλειοψηφία των διαλυμάτων καλλιέργειας περιέχουν μια ή περισσότερες αυξίνες ή κυτοκινίνες για να διεγείρουν τη διαίρεση και την ανάπτυξη (Eriksson 1985). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι αυξίνες 2,4-D και ANA και η κυτοκινίνη ζεατίνη.

Όλη αυτή η διαδικασία της καλλιέργειας των πρωτοπλαστών πραγματοποιείται στο σκοτάδι, ενώ η καλλιέργεια αρχίζει να εκτίθεται σταδιακά στο φως ύστερα από 15 με 21 μέρες από την απομόνωση. Αυτό είναι αναγκαίο γιατί η υψηλή ένταση φωτός παρεμποδίζει την ανάπτυξη των πρωτοπλαστών (Serrano και Pinol 1991).

Το ποσοστό των κυτταρικών διαιρέσεων κυμάνθηκε από 62% για τη σύντηξη R3064+ VER 1340 έως 27% για τη σύντηξη H82.385/9+H86.5046/10, παρουσιάζοντας ένα μέσο όρο 47%. Η διαφορά αυτή δεν ήταν τόσο μεγάλη όσο οι διαφορές που αποκτήθηκαν σε άλλες εργασίες στις οποίες οι κυτταρικές διαιρέσεις

κυμάνθηκαν από 1 έως 72% (Haberlach κ. ά. 1975). Ο μέσος των διαιρέσεων ήταν παρόμοιος με αυτόν που αποκτήθηκε από τους Nelson κ. ά. (1983) κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών του *S. brevidens*.

Το διάλυμα CM βρέθηκε να είναι το πιο αποτελεσματικό για την διαδικασία της αναγέννησης, γιατί αυτή πραγματοποιήθηκε σε όλες τις συνθήξεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκε το προκείμενο διάλυμα. Μια βασική διαφορά του θρεπτικού διαλύματος CM σε σχέση με τα υπόλοιπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι η περιεκτικότητά του σε γλυκόζη, αντί για σακχαρόζη, ως πηγή άνθρακα. Η γλυκόζη, εκτός από πηγή μεταβολιζόμενου άνθρακα έχει και οσμωτικές ιδιότητες. Αυτό μεταφράζεται ως μια μείωση του μέσου οσμωτικού δυναμικού του υποστρώματος. Η μείωση του οσμωτικού δυναμικού έχει θετική συνέπεια στην κυτταρική διαίρεση και την αναγέννηση, όμως μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στο σχηματισμό του κάλου (Shepard 1982). Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σακχαρόζης του 1% στο θρεπτικό διάλυμα της καλλιέργειας μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των κάλων, ενώ για τις κυτταρικές διαιρέσεις είναι αναγκαίος ο συνδυασμός σακχαρόζης και γλυκόζης στο διάλυμα της καλλιέργειας.

Επίσης είναι θεμελιώδεις σημασίας η συγκέντρωση και ο τύπος των ρυθμιστών ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται. Το υπόστρωμα αναγέννησης CM εκτός από την αυξίνη NAA και την κυτοκινίνη ριβόζη της ζεατίνης περιείχε και γυββερίλικό οξύ στη σύνθεσή του. Η γυββερίλη ενδείκνυται συγκεκριμένα για την αναγέννηση πρωτοπλαστών στη πατάτα (Bokelmann και Roest 1983). Αυτή η αλλαγή των ορμονών του διαλύματος καλλιέργειας πρωτοπλαστών στο διάλυμα αναγέννησης είναι επίσης προτεινόμενη.

Ο σχηματισμός των αποικιών κυμάνθηκε ανάμεσα στο 0,005% για τη σύντηξη R3064+CHC 17034 και 0,08% για τη σύντηξη H81.2063/10+ VER 1340. Τα ποσοστά αυτά ήταν παρόμοια με τα αντίστοιχα που αναφέρονται από τους Austin κ. ά. (1985b), ήταν όμως μικρότερα από αυτά που αναφέρονται από τους Carputo κ. ά. (1995).

Τα ποσοστά των αναγεννημένων κάλων κυμάνθηκαν από 5,7 έως 45%, με ένα μέσο όρο 22,9%. Αυτό διαφέρει πολύ σε σχέση με τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από άλλους ερευνητές. Πιο συγκεκριμένα το ποσοστό των αναγεννημένων κάλων στη σύντηξη ανάμεσα στο *S. brevidens* και το SR260 έφθασε το 10% και ήταν χαμηλότερο από αυτό που επιτεύχθηκε από τους Rokka κ. ά. (1994) με τα ίδια είδη. Οι τελευταίοι πέτυχαν ποσοστά από 32 έως 62%. Στις συνθήξεις όπου

χρησιμοποιήθηκε το VER 1340, τα ποσοστά που αποκτήθηκαν ήταν 17,5 και 18,5%, ενώ στις συντήξεις με το CHC 17034 ήταν 5,7 και 25,4%. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν καλύτερα από αυτά που αποκτήθηκαν από τους Cardí κ. ά. (1993b). Οι ερευνητές αυτοί σε συντήξεις ανάμεσα στο *S. tuberosum* και το *S. commersonii* ανέφεραν ποσοστό 1,25%. Τα ποσοστά που αποκτήθηκαν στην παρούσα διατριβής ανάμεσα στα H82.385/9+H86.5046/10 και H86.5046/10+SR260 ήταν 38 και 45% αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές ήταν καλύτερες από το 2-7% που έχει αναφερθεί από τους Charut κ. ά. (1990) και το 30% που έχει επιτευχθεί από τους Cooper-Bland κ. ά. (1996), επίσης σε συντήξεις με διπλοειδείς γενότυπους του *S. tuberosum*. Η παραγωγή των αναγεννημένων κλώνων ποικίλει πολύ, λόγω της επίδρασης του γενοτύπου στη διαίρεση και αναγέννηση των πρωτοπλαστών της πατάτας (Foulger και Jones 1986).

Όσον αφορά το μέσο χρόνο αναγέννησης αυτός ήταν 7,8 εβδομάδες. Η σύντηξη H81.2063/10+VER 1340, με 6,5 εβδομάδες ήταν η πιο πρόωμη, ενώ η σύντηξη R3064+CHC 17034 ήταν πιο όψιμη. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι έχουν επιτευχθεί χρόνοι αναγέννησης των 10 εβδομάδων (Bokelmann και Roest 1983), των 14 εβδομάδων (Nelson κ. ά. 1983), των 15-25 εβδομάδων (Haberlach κ. ά. 1985), των 12-18 εβδομάδων (Novy κ. ά. 1994a) και των 32-40 εβδομάδων (Rokka κ. ά. 1994). Ωστόσο, οι Menke κ. ά. (1996) κατάφεραν μια πολύ πρόωμη διαφοροποίηση του φυτικού υλικού, μέσα σε 6-14 εβδομάδες μετά από την σύντηξη ανάμεσα στα *S. tuberosum* και *S. pinnatisectum*. Η γρήγορη διαφοροποίηση των οφθαλμών είναι καθοριστικής σημασίας για να αποφευχθεί η εμφάνιση της δυνητικής σωματικής παραλλακτικότητας (Karp 1995).

## **5.2. Προσδιορισμός και χαρακτηρισμός των σωματικών υβριδίων των κατευθυνόμενων συντήξεων.**

### **5.2.1. Μοριακός χαρακτηρισμός των κατευθυνόμενων συντήξεων.**

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των υβριδίων ήταν διαμέσου των μοριακών δεικτών RAPD. Άλλοι ερευνητές έχουν εφαρμόσει διαφορετικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των σωματικών υβριδίων. Τέτοιες τεχνικές είναι η μορφολογική ανάλυση (Austin κ. ά. 1985b), η ισοενζυματική ανάλυση (Serraf κ. ά. 1994, Horsamn κ. ά. 1997), οι δείκτες RLFP (Mattheij κ. ά. 1992, Novy και Helgeson, 1994a), οι δείκτες SSR (Stadler κ. ά. 1995, Menke κ. ά. 1996) και, τέλος, ένα ειδικό ολιγονουκλεοτίδιο συγκεκριμένης περιοχής του 5S

rDNA. Οι δείκτες RAPD βασίζονται στο DNA και αντικατοπτρίζουν τον υβριδικό χαρακτήρα του πυρηνικού γενώματος. Είναι τμήματα του DNA που έχουν ενισχυθεί από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), με τη χρησιμοποίηση μικρών (γενικά 10pd) συνθετικών υποκινητών (primers) τυχαίας ακολουθίας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά χρησιμεύουν ως υποκινητές δυο δρόμων (εμπρός και πίσω) και συνήθως είναι ικανά να ενισχύσουν τμήματα από 3 έως 10 γενωμικές περιοχές τις οποίες αυξομειώνουν. Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν οι δείκτες RAPD σε σχέση με άλλες μεθόδους είναι πολλά. Ένα από αυτά είναι ότι η απαιτούμενη ποσότητα του φυτικού υλικού που είναι αναγκαία για την απομόνωση του DNA είναι πολύ μικρή, αφού χρειάζονται χαμηλές συγκεντρώσεις DNA για την αντίδραση της ενίσχυσης. Έτσι, 10mg φύλλων από φυτά *in-vitro*, είναι αρκετά για να συλλεχθεί DNA και να αποκτηθούν οι δείκτες RAPD. Οι Thach κ. ά. (1993) χρησιμοποίησαν επίσης φυτά από ιστοκαλλιέργεια για να τον χαρακτηρισμό των υβριδίων με τη χρησιμοποίηση ισοενζύμων. Όμως, αν και καταβλήθηκε προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν μικρές ποσότητες ιστού, βρέθηκε ότι ήταν αναγκαία το λιγότερο 100mg. Οι ίδιοι συγγραφείς χρησιμοποίησαν 300mg ιστού για τον χαρακτηρισμό των υβριδίων δείκτες RFLP, όμως η αναγκαία ποσότητα ιστού, που θεωρείται σχετικά μικρή, είναι αρκετά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη που απαιτούν οι δείκτες RAPD. Ένα δεύτερο πλεονέκτημα των δεικτών RAPD είναι ότι δε χρειάζεται να περιμένει κανείς την ολοκληρωτική ανάπτυξη του φυτού γιατί είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί η εξαγωγή του DNA στα φυτά *in-vitro*, μια διαδικασία που απαιτεί μόνο 15' και έτσι μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα πολύ μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Η εφαρμοζόμενη τεχνική στην παρούσα εργασία έχει χρησιμοποιηθεί από διάφορους συγγραφείς (Edwards κ. ά. 1991, Xu κ. ά. 1993). Οι δείκτες RAPD είναι πιο απλοί στο χειρισμό και δίνουν αποτελέσματα πιο γρήγορα σε σύγκριση με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Επιπλέον είναι μια διαδικασία χρησιμοποίησης είναι οικονομικότερη και τα ειδικά πρωτόκολλα RAPD για κάθε είδος μπορούν εύκολα να αποκτηθούν. Από την άλλη πλευρά, η ανάλυση με τη χρησιμοποίηση ισοενζύμων είναι περιορισμένη σε μερικούς πολυμορφισμούς, έχοντας ένα σχετικά μικρό αριθμό γονιδιακών θέσεων και αλληλόμορφων που είναι διαθέσιμα για την ανάλυση (Bernatsky και Tanksley 1989). Για το λόγο αυτό δεν είναι πάντα δυνατός ο προσδιορισμός των υβριδίων με τη χρησιμοποίηση της τεχνικής αυτής (Rokka κ. ά. 1994). Οι RLFP, οι mini και οι microsatellites του DNA απαιτούν μεγάλες ποσότητες DNA, περισσότερο κόπο και χρόνο κατά το χειρισμό τους, είναι πιο ακριβοί και

εγκυμονούν περισσότερους κινδύνους λόγω της ραδιενέργειας που χρησιμοποιείται, κατά την εφαρμογή τους.

Η εύρεση των κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδίων που μπορούν να παράγουν το άθροισμα των στηλών και των δύο γονέων στις συμμετρικές σωματικές υβριδοποιήσεις (Xu κ. ά. 1993) είναι ουσιαστική. Αυτό συμβαίνει γιατί υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες απουσιάζει από τις στήλες του ηλεκτροφορέματος ο ένας από τους δύο γονείς. Κύρια αιτία για την απουσία αυτή είναι κάποιος πιθανός συναγωνισμός των ολιγονουκλεοτιδίων στα σημεία προσάρτησης. Επίσης, θα πρέπει να αποφευχθούν οι πιθανές μολύνσεις, λόγω της υψηλής ευαισθησίας που παρουσιάζει αυτή η τεχνική (Innis κ. ά. 1990). Αυτό επιτυγχάνεται εύκολα με την αποστείρωση του χρησιμοποιημένου υλικού και γιατί οι πραγματοποιούμενες αντιδράσεις της ενίσχυσης γίνονται σε ασηπτικό περιβάλλον. Οι δείκτες RAPD είναι μια μέθοδος γρήγορη και αξιόπιστη για την ανάλυση σωματικών υβριδίων στη πατάτα και έχουν χρησιμοποιηθεί από διάφορους συγγραφείς όπως οι Baird κ. ά. (1992), Xu κ. ά. (1993) και Rasmussen και Rasmussen (1995). Οι Kaendler κ. ά. (1996) χρησιμοποίησαν δείκτες RAPD και RFLP για τον χαρακτηρισμό υβριδίων που προέρχονταν από τη διασταύρωση των ειδών *S. perfoliatum* και *S. tuberosum*. Το τελευταίο ήταν τροποποιημένο με το γονίδιο rolC, που μειώνει την κυριαρχία της κορυφής και παράγει φύλλα χρώματος πράσινου ανοιχτού.

## **6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.**

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν και συζητήθηκαν προκύπτουν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

1. Η μέθοδος απομόνωσης και εξυγίανσης των πρωτοπλαστών, που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται κατάλληλη λαμβάνοντας υπόψη την αποδοτικότητα που αποκτήθηκε από τους χρησιμοποιούμενους γενότυπους, η οποία κυμάνθηκε ανάμεσα σε  $3,86 \cdot 10^6$  πρωτοπλάστες/ml για το H81.2063/10 και  $13 \cdot 10^6$  για το H82.385/9.
2. Οι τιμές της διαίρεσης των πρωτοπλαστών και η αναγέννηση των φυτών ήταν ποικίλες εξαρτώμενες από τον γενότυπο και από τα διαλύματα αναγέννησης που χρησιμοποιήθηκαν. Το διάλυμα CM φαίνεται να είναι το πιο κατάλληλο γιατί αναγέννησε όλες τις συντήξεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκε.
3. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των αποκτηθέντων σωματικών υβριδίων με τη χρησιμοποίηση δεικτών RAPD, έκαναν δυνατό τον προσδιορισμό ενός μεγάλου

αριθμού δειγμάτων σε μειωμένο χρόνο με χαμηλές ποσότητες DNA και σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης των φυτών, όπως σε είναι τα φυτάρια ιστοκαλλιέργειας.

## **7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.**

Η παρούσα διατριβή πραγματεύεται τη βελτίωση της πατάτας διαμέσου της σύντηξης πρωτοπλαστών, την αναγέννηση των νέων πρωτοπλαστών με την καλλιέργεια τους σε θρεπτικά διαλύματα (ιστοκαλλιέργεια) και το προσδιορισμό και χαρακτηρισμό των αποτελεσμάτων διαμέσου μοριακών τεχνικών και πιο συγκεκριμένα με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και των μοριακών δεικτών RAPD. Η τεχνική αυτή, επεμβαίνει σε πρώιμα στάδια της φυτικής ανάπτυξης και μειώνει τον απαιτούμενο χρόνο για τη δημιουργία ποικιλιών, σε σχέση με τα συμβατικά προγράμματα βελτίωσης. Ακόμα, παρέχει τη δυνατότητα επεξεργασίας και χειρισμού πολύ περισσότερων φυτών σε σχέση με αυτά που μπορούν να γίνουν με την συμβατική βελτίωση.

Το σχέδιο βελτίωσης που ακολουθήθηκε παρουσιάζει την καινοτομία ότι εισάγει άγρια διπλοειδή είδη στο πρόγραμμα της βελτίωσης, ως μια συμπληρωματική πηγή παραλλακτικότητας. Αυτό είναι ευεργετικό, ειδικά όσον αφορά την παραγωγή κλώνων ανθεκτικών στους ιούς. Η σύντηξη πρωτοπλαστών χρησιμοποιείται ως μια μέθοδος υπέρβασης των δυσκολιών που υπάρχουν για τη διασταύρωση τετραπλοειδών και διπλοειδών φυτών. Στη συνέχεια, παρουσιάζεται ολόκληρη η μεθοδολογία του πειράματος καθώς και πειραματικά δεδομένα για τη απομόνωση, εξυγίανση και αναγέννηση των πρωτοπλαστών καθώς και αποτελέσματα από τον μοριακό προσδιορισμό και το χαρακτηρισμό των συντήξεων.

Συμπερασματικά, μπορεί να αναφερθεί ότι η μέθοδος απομόνωσης και εξυγίανσης των πρωτοπλαστών, που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται κατάλληλη λαμβάνοντας υπόψη την αποδοτικότητα που αποκτήθηκε. Οι τιμές της διαίρεσης των πρωτοπλαστών και της αναγέννηση των φυτών ήταν ποικίλες, εξαρτώμενες από τον γενότυπο και από τα διαλύματα αναγέννησης που χρησιμοποιήθηκαν. Το διάλυμα CM φαίνεται να είναι το πιο κατάλληλο, γιατί ήταν αποτελεσματικό σε όλες τις συντήξεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκε. Τέλος, επιβεβαιώθηκαν τα πλεονεκτήματα του μοριακού χαρακτηρισμού των αποκτηθέντων σωματικών υβριδίων με τη χρησιμοποίηση δεικτών RAPD.



## 8.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ALONSO F. 1996. El cultivo de patata. Ed. Mundi-Prensa, Madrid-Balcelona-Maxico. 272 p.
- AUSTIN S.; BAER M.A.; HELGESON J.P. 1985b. Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. *Plant Sci.* 39: 75-82.
- AUSTIN S.; EHLENFELDT M.K.; BAER M.A.; HELGESON J.P. 1986. Somatic hybrids produced by protoplast fusion between *S. tuberosum* and *S. brevidens*: phenotypic variation under field conditions. *Theor. Appl. Genet.* 71: 628.
- BAIRD E.; COOPER-BLAND S.; WAUGH R.; DEMAINE M.; POWELL W. 1992. Molecular characterization of inter- and intra-specific hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol. Gen. Genet.* 233: 469-475.
- BARR S.N.R.; PAYNE L.A.; DALE M.F.B.; WILKISON M.J. 1996. Predictive correlates of shoot regeneration from potato protoplast culture. *Plant Cell Rep.* 15: 350-354.
- BARSBY T.L.; YARROW S.A.; KEMBLE R.L.; GRANT I. 1987. The transfer of cytoplasmic male sterility to winter-type oil-seed rape (*Brassica napus L.*) by protoplast fusion. *Plant Sci.* 53: 243-248.
- BATES G.W. 1985. Electrical fusion for the optimal formation of protoplast heterokaryons in *Nicotiana*. *Planta* 165: 217-241.
- BATES G.W. 1992. Electrofusion of plant protoplasts and the production of somatic hybrids. En D.C. Chang ; B.M. Chassy ; J.A. Sanders ; A.E. Sowers (eds.). *Guide to electroporation and electrofusion*. Academic Press, Inc. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. Pp: 249-264.
- BATES G.W.; GAYNOR J.J.; SHEKHAWAT N.S. 1983. The fusion of plant protoplasts by electric fields. *Plant Physiol.* 72: 1110-1113.
- BATES G.W.; SAUNDERS J.A.; SOWERS A.E. 1989. Electrofusion: principles and application. In E. Newmann; A.E. Sowers; C.A. Jordan (eds.). *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. Plenum Press, New York. Pp. 387-395.
- BEHNKE M. 1979. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistance plants. *Theor. Appl. Genet.* 55: 69-71.
- BEHNKE M. 1980. Selection of dihaploid potato callus for resistance to culture filtrate fusarium oxysporum. *Z. Pflanzenzucht.* 85: 254-258.
- BELLIARD G.F.; VEDEL F.; PELLETIER G. 1979. Mitochondrial in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Nature* 281: 401-403.
- BERNATSKY R.; TANKSLEY S.D. 1989. Restriction fragments as molecular markers for germplasm analysis and utilization. A.D.H. Brown; D.R. Marshall; O.H. Frankel; J.T. Williams (eds.). *The use of plant genetic resources*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pp 353-362.
- BHATT D.P.; FASSULIOTIS G. 1981. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of eggplant. *Z. Pflanzenphysiol.* 104: 81-89.
- BINDING H. NEHLS R.; KOCK R.; FINGER J.; MORDHORST G. 1981. Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of the Dicotyledoneae class. *Z. Pflanzenphysiol.* 101: 119-130.

- BOKELMANN G.S.; ROEST S. 1983. Plant regeneration from protoplast of potato (*Solanum tuberosum* cv. Bintje) Z. Pflanzenphysiol. 109: 259-265.
- BROWN P.T.H.; LORZ H. 1986. Molecular changes and possible origins of somaclonal variation. En j. Semal (ed.). *Somaclonal variation and crop improvement* : Nihjoff, Dordrecht. Pp.148-159.
- BUKASOV S.M.; KAMERAZ A.Y. 1973. Genetics of potato. Izdatelstvo 'Nauka', Moscow.
- BURTON W.G. 1989. The origin and spread of the potato. En *The Potato*. 3<sup>rd</sup> ed. Longman Group, UK. Pp. 1-34.
- BUTKIEWICZ H. 1978. Intolerance to potato leaf roll virus (PLRV) occurring in potato plants. *Ziemniak- the potato*. Bonin. Pp. 5-37.
- CALDERON A. 1987. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y la produccion de semilla de papa. In *El cultivo de papa con emfasis en produccion de semilla*. Universidad Nacional Agraria, La Molina, Peru. pp. 105-120.
- CARDI T. ; D'AMBROSSIO F. ; CONSOLI D. ; PUITE K.J. ;RAMULU K.S. 1993a. Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrids plants. *Theor. Appl. Genet.* 87: 193-200.
- CARDI T.; PUITE K.J.; RAMULU K.S.; D'AMBROSIO F.; FRUSCIANTE L. 1993b. Production of somatic hybrids between frost tolerant *Solanum Commersonii* and *S.tuberosum* : protoplast fusion regeneration and isozyme analysis. *Am. Potato J.* 70: 753-764.
- CARLBERG I.; GLIMELIUS K.; ERIKSSON T. 1983. Improved culture ability of potato protoplasts by use of activated charcoal. *Plant Cell Rep.* 2: 223-229.
- CARLSON P.S.; SMITH H.H.; DEARING R.D. 1972. Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2292-2294.
- CARPUTO D.; CARDI T.;FERRAILOLO G. 1995. Tissue culture response in various wild and cultivated *Solanum* germplasm accessions for exploitation in potato breeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41: 151-158.
- CARRASCO A.; RUIZ DE GALARRETA J.I.; RITTER E. 1994. Aislamiento, cultivo y regeneracion de plantas a partir de protoplastos de *Solanum tuberosum* y *Solanum phureja*. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* 9: 347-357.
- CLARK M.F.; ADAMS A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzymed-linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34 : 475-483.
- CLULOW S.A.; WILDISON M.J. WAUGH R.; BAIRD E.; DE MAINE M.J.; POWELL W. 1991. Cytological and molecular observations on *Solanum phureja* induced dihaploid potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 82: 545-551.
- COCKERHAM G. 1970. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity* 25: 309-348.
- COLE K.S. 1968. Membranes, ions and impulses. *A chapter of clasical biophysics*. University of California Press, Berkeley, USA.
- COLON L.T. ; SIJPKES L. ; HARTMANS K.J. 1989. The cold stability of *Solanum goniocalyx* and *S. phureja* can be transferred to adapted diploid and tetraploid *S. tuberosum* germplasm. En K.M. Louwes; H.A.J.M. Toussaint; L.M.W. Dellaert (eds.). *Parental Line Breeding and Selection in Potato Breeding*. PUDOC, Wageningen, Holland. Pp. 76-80.
- COOPER J.I.; JONES A.T. 1983. Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. *Phytopathology* 73: 127-128.
- COOPER- BLAND S.; DE MAIN M.J.; STEWART H.E.; FLEMING M.L.M.H.; PHILLIPS M.S.; KUMAR A. 1996. Intraspecific somatic and sexual hybridization

between dihaploid lines of *Solanum tuberosum* L.: evaluation of morphological traits and resistance to late blight *Phytophthora infestans* in the foliage. *Euphytica* 90: 209-216.

CRIQUI M.C.; DURR A.; GENSHIK P.; JAMET E.; MARBACH J. ;  
PARMENTIER Y. ; PLESSE B. ; FLECK J. 1991. In search of genes involved in the re-entry of mesophyll cells into the cell cycle. *Physiol. Plant.* 82: A35.

CHAPUT M.H.; SIHACHAKR D.; DUCREUX G.,MARIE D. ;BARGHI N. 1990. Somatic hybrids plants produced by electrofusion: between dihaploid potatos, BF15 (H1), Amnica (H6) and Cardinal (H3). *Plant Cell Rep.* 9: 411-414.

CHAVEZ R.; BROWN C.R.; IWANAGA M. 1988. Transfer of resistance to PLRV titre buildup from *Solanum etuberosum* to a tuber-bearing *Solanum* gene pool. *Theor. Appl. Genet.* 76: 129-135.

CHU C.C. 1982. Haploids in plant improvements. En I.K. Vasil ; W.R. Scowcroft ; K.J. Frey (eds.). *Plant Improvements and Somatic Cell Genetics*. Academic Press, New York. Pp. 128-158.

DAVEY M.R.; KUMAR A. 1983. Higher plant protoplast – retrospect and prospect. K.L. Gilles (ed.). *Plant protoplasts*. Academic Press, New York. Pp.219-299.

DAVIDSON T.M.V. 1980. Breeding for resistance to virus disease of the potato (*Solanum tuberosum*) at the Scottish Plant Breeding Station. *Fifty-ninth Annual Report 1979-80*. pp. 100-108.

DAVIES H.V. ; VIOLA R. 1992. Regulation of hexose accumulation in potato tubers : possibilities for molecular multiplication. *Post Harvest News and information* 3: 97-100.

DE MAIN M.G. ; FANTES J.A. 1983. The results of colchicine treatment of dihaploids and their implication regarding efficiency of chromosomes doubling and potato histogeny. *Potato Res.* 26: 289-294.

DEBNATH S.C.; WENZEL G. 1987. Selection of somatic fusion products in potato by hybrid vigor. *Potato Res.* 30: 371-380.

DEIMLING S.; ZITZLSPERGER J.; WENZEL G. 1988. Somatic fusion for breeding of tetraploid potatoes. *Plant Breeding.* 101: 181-189.

DERKS F.H.M.; HAKKERT J.C.; VERBEEK W.H.J.; COLIJN-HOUMANS C.M. 1992. Genome composition of asymmetric hybrids in relation to the phylogenetic distance between the parents nucleus-chloroplasts interaction. *Theor. Appl. Genet.* 84: 930-940.

DUHOUX E. 1988. La facundation in vitro chez les vegetaux. *Cultures de Cellules, Tissus et Organes Vegetaux*. J.P. Zryd (ed.). *Presses Polytechniques Romandes*, Lausanne. Pp. 99-104.

EDWARDS K.; JOHNSTONE C.; THOMPSON C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid. Res.* 19: 1349.

EHLENFELDT M.K.; HELGESON J.P. 1987. Fertility of somatic hybrids from protoplast fusion of *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 73: 395-402.

ERIKSSON T.R. 1985. Protoplast isolation and culture. L.C.Fowke; F. Constabel (eds.). *Plant Protoplasts*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp. 1-20.

EVERDINK W.J. van; PIJNACKER L.P. 1994. Initial acytokinesis during leaf protoplast culture of dihaploid and tetraploid *Solanum tuberosum* and diploid *S. bulbocastanum*. *Potato Res.* 37: 413-421.

F.A.O. 2002. Food and Agricultural Organization of the United Nations.

- FEHER A.; PREISZNER Z.; LITKEY J.; CSANADI G.; DUDITS D. 1992. Characterization of chromosome instability in interspecific somatic hybrids obtained by x-ray fusion between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens*. *Theor. Appl. Genet.* 84:880-890.
- FERREIRA D.I.; ZELCER A. 1989. Advances in protoplast research on *Solanum*. *Int. Rev. of Citol.* 115: 1-61.
- FISH N.; KARP A.; JONES M.G.K. 1987. Improved isolation of dihaploid *Solanum tuberosum* protoplasts and the production of somatic hybrids between dihaploid *S. tuberosum* and *S. brevidens*. *In vitro* 23: 575-580.
- FONG S.F.; REDSHAW E.S. 1973. A simple device for the determination of potato tuber specific gravity. *Am. Potato J.* 50: 254-256.
- FOULGER D.; JONES M.G.K. 1986. Improved efficiency of genotype-dependent regeneration from protoplasts of important potato cultivars. *Plant Cell Rep.* 5: 72-76.
- FRANSEN N.O. 1968. Die plastidenzahl als merkmal bei der kartoffel. *Theor. Appl. Genet.* 38: 153-167.
- FREARSON E.M.; POWER J.B.; COCKING E.C. 1973. The isolation: culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev. Biol.* 33: 130-137.
- GIBSON R.W.; JONES M.G.K.; FISH N. 1988. Resistance to potato leaf roll virus and potato virus Y in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. *Theor. Appl. Genet.* 76: 113-117.
- GILL B.S.; KAM-MORGAN L.N.W.; SHEPARD J.F. 1986. Origin of chromosomal and phenotypic variation in potato protoclonal. *J. Hered.* 77: 13-16.
- GLEBA Y.; KOLESNIK N.N.; MESHKENE I.V.; CHEREP N.N.; PAROKONNY A.S. 1984. Transmission genetics of somatic hybridization process in *Nicotiana*. *Theor. Appl. Genet.* 69: 121-128.
- GLENNDINNING D.R. 1985. The genetic pool of modern potato varieties. *Eucarpia-EAPR*. Cambridge, England.
- GOTTSCHALK W. 1984. The origin of the potato. An open problem. *Nucleus* 27: 37-44.
- GRAVOUEILLE J.M. 1990. La qualité de la pomme de terre de consommation et son contrôle a la réception. *La pomme de terre française* 430 : 261-268.
- HABERLACH G.T.; COHEN B.A.; REICHERT N.A.; BAER M.A.; TOWILL L.E.; HELGESON J.P. 1985. Isolation, culture and regeneration of protoplasts from potato and several related *Solanum* species. *Plant Sci.* 39: 67-74.
- HAMILL J.D.; WATTS J.W.; KING J.M. 1987. Somatic hybridization between *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana plumbaginifolia* by electrofusion of mesophyll protoplasts. *J. Plant physiol.* 129: 111-118.
- HAMMATT N.; LISTER A.; BLACKHALL N.W.; GARTLAND J.; GHOSE T.K.; GILMOUR D.M.; POWER J.B.; DAVEY M.R.; COCKING E.C. 1990. Selection of plant heterokaryons from diverse origins by flow cytometry. *Protoplasma* 154: 34-44.
- HARMS C.T. 1983. Somatic hybridization by plant protoplasts fusion. *Experientia* 46: 69-84.
- HAWKES J.G. 1981. Recent concepts in the evolution of tuber bearing *Solanums*. *Rep. Plann. Conf. Exploration, Taxonomy and Maintenance of potato Germoplasm. III Intern. Pot. Center Lima.* Pp.40-59.
- HAWKES J.G.; HJERTING J.P. 1989. The potatoes of Bolivia: Their breeding value and Evolutionary Relationships. Oxford University Press, Oxford.
- HAWKES J.G.; JACKSON M.T. 1992. Taxonomy and evolutionary implications of the endosperm balance hypothesis in potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 84: 180-185.

- HELGESON J.P.; HABERLACH G.T.; AUSTIN S. 1986. Somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*: Expression of a late blight resistant gene and potato leaf roll. *Plant Cell Rep.* 3: 212-214.
- HIBI R.; KANO H.; SUGIURA M.; KAZAMI T.; KIKURA S. 1988. High-speed electrofusion and electro-transfection of plant protoplasts by continuous electro-manipulator. *Plant Cell Rep.* 7: 153-157.
- HORSMAN K.; BERGERVOET J.E.M.; JACOBSEN E. 1997. Somatic hybridization between *Solanum tuberosum* and species of the *S. nigrum* complex: Selection of vigorously growing and flowering plants. *Euphytica* 96: 345-352.
- HOSAKA K. 1986. Who is the mother of potato? Restriction endonuclease analysis of chloroplasts DNA of cultivated potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 72: 606-618.
- HOUGAS R.W.; POLOQUIN S.J.; ROSS R.W. 1958. Haploids of the common potato. *J. Hered.* 49: 103-106.
- HOVENKAMP-HERMELINK J.H.M.; JACOBSEN E.; PONSTEIN A.S.; VISSER R.G.F.; VOS-SCHERPERKEUTER G.H.; BIJMOLT E.W.; VRIES J.N.; WITHOLT B.; FEENSTRA W.J. 1987. Cytological studies on adventitious shoots and microtubers of a monohaploid potato clone. *Euphytica* 39: 213-219.
- HOWARD H.W. 1970. Genetics of the potato, *Solanum tuberosum*. Logos Press Ltd. 126p.
- INNIS M.A.; GELFAND D.A.; SNINSKY J.J.; WHITE T.J. 1990. PCR protocols. Academic Press Inc. San Diego, New York, London, Tokio.
- IWANAGA M.; SCHMIEDICHE P. 1989. Χρήση των άγριων ειδών για τη βελτίωση της καλλιεργούμενης πατάτας.
- IWANAKA M.; PELOQUIN S.J. 1982. Προέλευση και εξέλιξη των καλλιεργούμενων τετραπλοειδών πατάτων μέσω των γεμετών 2n.
- JACOBSEN E.; MALVAR R.; HUIGEN D.J.; BERGERVOET J.E.M.; RAMANA M.S. 1993. Isolation and characterization of somatic hybrids of diploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens* and the use of amylose-free starch mutation for detection of introgression. *Euphytica* 69: 191-201.
- JACOBSEN E.; RAMANNA M.S.; HUIGEN D.J.; SAWOR Z. 1991. Introduction of an amylose-free mutant into breeding of cultivate potato: *Solanum tuberosum* L. *Euphytica*: 69:191-201.
- JACOBSEN E.; TEMPELAAR M.J.; BIJMOLT E.W. 1983. Ploidy levels in leaf callus and regenerated plants of *Solanum tuberosum* determined by cytophotometric measurement of protoplast. *Theor. Appl. Genet.* 65: 113-118.
- JOHNSTON S.A.; DER NIJS T.P.M.; PELOQUIN S.J.; HANNEMAN R.E. Jr. 1980. The significance of genetic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor. Appl. Genet.* 57: 5-9.
- JONES H.; KARP A.; JONES M.G.K. 1989. Isolation and regeneration of plants from potato protoplasts. *Plant Cell Rep.* 8: 307-311.
- JONES M.G.K. 1985. Developments in the culture of plant protoplasts and cells and their regeneration to plants. *Symp. Biotechnol and Crop Improvement and Protection, British Crop Protection Council monograph* 34: 3-11.
- JONES M.G.K. 1988. Fusing plant protoplasts. *Trends in biotechnol.* 6: 153-158.
- KAENDLER C.; FLADUNG M.; UHRIG H. 1996. Production and identification of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. papita* by using the rolC gene as a morphological selectable marker. *Theor. Appl. Genet.* 92: 455-462.
- KAO K.N.; MICHAYLUK M.R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126: 105-110.

- KARP A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85: 295-302.
- KEIL M.; SANCHEZ-SERRANO J.J. ; WILMILZER L. 1989. Both wound-inducible and tuber-specific are mediated by promoter of a single number of the potato proteinase inhibitor II gene family. *EMBO J.* 8: 1923-1930.
- KESTEREN W.J.P. van; TEMPELAAR M.J.; VAN-KESTEREN W.J.P. 1993. Surface labelling of plant protoplasts with fluorochromes for discrimination of heterokaryons by microscopy and flow cytometry. *Cell Biology International* 17: 235-243.
- KLIMASZEWSKA K.; KELLER W.A. 1988. Regeneration and characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Diplotaxis harra*. *Plant Sci.* 58: 211-222.
- KOHN H.; SCIEDER R.; SCHIEDER O. 1985. Somatic hybrids in tobacco mediated by electrofusion. *Plant Sci.* 38: 121-128.
- KOOP H.U.; SCHWEIGER H.G. 1985. Regeneration of plants after electrofusion of selected pairs of protoplasts. *Eur. J. Cell Biol.* 39: 46-49.
- KUMAR A.; MILLER M.; WHITTY P.; LYON J.; DAVIE P. 1995. Agrobacterium mediated transformation of five wild *Solanum* species using *in vitro* microtubers. *Plant Cell Rep.* 14: 324-328.
- LARKING P.J.; SCOWCROFT W.R. 1981. Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
- LOSSL A.; FREI U.; WENZEL G. 1994. Interaction between cytoplasmatic composition and yield parameters in somatic hybrids of *S. tuberosum* L. *Theor. Appl. Genet.* 89: 873-878.
- MAGNIEN E.; DALSCHAERT X.; FARAONI-SCIAMANNA P. 1982. Transmission of a cytological heterogeneity from the leaf to the protoplasts in culture. *Plant Sci.* 25: 291-303.
- MASSON J.; LANCELIN D. ; BELLINI C. ; LACERF M. ; GUERCHE P. ; PELLETIER G. 1989. Selection of somatic hybrids between diploids clones of potato population derived from mesophyll protoplasts. *Proc. of the Natl. Acad. Of Sci USA*: 75: 4935-4939.
- MATTHEIJ W.M.; EIJLANDER R.; DE KONING J.R.A.; LOUWES K.M. 1992. Interspecific hybridization between the cultivated potato *Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* L. and the wild species *S. circaeifolium* subsp. *circaeifolium*. Bitter exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Montd) from Bary and *Globodera pallida*. *Theor. Appl. Genet.* 83: 466.
- MATTHEWS D.; HARDING K.; WILKINSON M.J.; MILLAM S.; 1997. A slot-blot hybridization method for screening somatic hybrids. *Plant Mol. Bio. Rep.* 15: 62-70.
- MEHRLE W.; NATON B.; HAMPP R. 1990. Determination of physical membrane properties of plant cell protoplasts via the electrofusion technique: prediction of optimum fusion yields and protoplast viability. *Plant Cell Rep.* 8: 687-691.
- MELZER J.M.; O'CONNELL M.A. 1990. Molecular analysis of the extent of asymmetry in two asymmetric somatic hybrids of tomato.
- MELZER J.M.; O'CONNELL M.A.. 1992. Effect of radiation dose for the production and the extent of asymmetry in tomato asymmetric tomato hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 83: 337-344.
- MENCZEL L.; POLSBY L.S. ; STEINBACK. ; MALIGA P. 1986. Fusion mediated transfer of triazine resistance chloroplast: characterization of *Nicotiana tabacum* hybrid plants. *Mol. Gen. Genet.* 205: 201-205.

- MENDOZA H.A.; HAYNES F.L. 1974. Genetic relationships among potato cultivars grown in the United States. *Hortscience*: 9: 4: 328-330.
- MENKE U.; SCHILDE-RENTSCHLER L.; RUOSS B.; ZANKE C.; HEMLEBEN V.; NINNIMANN H. 1996. Somatic hybrids between the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. and the 1EBN wild species *Solanum pinnatisectum* Dun.: morphological and molecular characterization. *Theor. Appl. Genet.* 92: 617-626.
- MOLLERS C.; WENZEL G. 1992. Somatic hybridization of dihaploid potato protoplasts as a tool for the potato breeding. *Bot. Acta* 105: 133-139.
- MONTELONGO-ESCOBEDO H.; ROWE P.R. 1969. Haploid induction in potato: Cytological basis for pollinator effect. *Euphytica* 18: 116-123.
- MORIKAWA H.; KUMASHIRO T.; KUSAKARI K.; IIDA A.; HIRAI A. YAMADA Y. 1987. Interspecific plant hybrid formation by electrofusion in *Nicotiana*. *Theor. Appl. Genet.* 75: 1-4.
- MORRIS P. 1985. Membrane transport in protoplasts. *The Physiological Properties of Plant Protoplast*. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 54-67.
- MUASHIGE T.; SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NELSON R.S.; CREISSEN G.P.; BRIGHT W.J. 1983. Plant regeneration from protoplasts of *Solanum brevidens*. *Plant Sci. Letters* 30: 355-362.
- NOVY R.G.; HELGESON J.P. 1994a. Somatic hybrids between *Solanum etuberosum* and diploid tuber bearing *Solanum* clones. *Theor. Appl. Genet.* 89: 775-782.
- OCHATT S.J. 1991. Strategies for plant regeneration from mesophyll protoplasts of the recalcitrant fruit and farmwoodland species *Prunus avium* L. *Plant Physiol.* 139: 155-160.
- OPATRNY Z.; SCHUMANN U.; PAKOUSKY S.; KOBLITZ H. 1980. The role of some exogenous and endogenous factors in the isolation of protoplasts from potato cell cultures and their recovery in the cell colonies. *Biol. Plant* 22: 107-116.
- PARAKONNY A.S.; KENTON A.Y.; GLEBA Y.Y.; BENNETT M.D. 1992. Genome reorganization in *Nicotiana* asymmetric somatic hybrids analysed by *in situ* hybridization. *Plant J.* 2: 863-874.
- PEHU E.; KERP A.; MOORE K.; STEEL S.; DUCKLEY R.; JONES M.G.K. 1989. Molecular: cytogenetic and morphological characterization of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* and diploid *S. brevidens*. *Theor. Appl. Genet.* 78: 696-704.
- PENTAL D.; MUKHOPADHYAY A.; GROVER A.; PRADHAM A.K. 1988. A selection method for the synthesis of triploid hybrids by microspore (n) with somatic cell protoplasts (2n). *theor. Appl. Genet.* 76: 237-243.
- PERL A.; AVIN D.; GALUN E. 1988. Ethylene and *in vitro* culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield: plating efficiency and transient expression of an alien gene. *Plant Cell Reportes* 7: 403-406.
- PERL A.; AVIN D.; GALUN E. 1990. Protoplast-fusion-derived CMS potato cybrids: Potential seed-parents for hybrid, true potato seeds. *J. Hered.* 81: 438-442.
- PESCHKE V.M.; PHILLIPS R.L. 1992. Genetic variations of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics* 30: 41-75.
- PREISZNER J.; FEHER A.; VEISZ O.; SUTKA J.; DUDITS D. 1991. Characterization of morphological variation and cold resistance in inter-specific somatic hybrid between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. *Euphytica* 57: 37-49.

- PROVAN J.; KUMAR A.; SHEPARD L.; POWELL W.; WAUGH R. 1996. Analysis of intra-specific somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum*) using simple sequence repeats. *Plant Cell Rep.* 16: 196-199.
- PUITE K.J. ; BROECHE W.T. ; SCHAART J. 1988. Inhibition of cell wall synthesis improves flow cytometric sorting of potato heterofusions resulting in hybrids plants. *Plant Sci.* 56: 61-68.
- PUITE K.J. ; ROEST S. ; PIJNACKER L.P. 1986. Somatic hybrid potato plants after of electrofusion of diploid *Solanum tuberosum* and *S. phureja*. *Plant Cell Rep.* 5: 262-265.
- RADKE S.; GRUN P. 1986. Isolation, culture and regeneration of leaf mesophyll protoplasts of selected clones of *Solanum*. *Potato Res.* 29: 451-462.
- RASMUSSEN J.O.; NEPPER J.P.; RASMUSSEN O.S. 1996. Analysis of somatic hybrids between two sterile dihaploid *Solanum tuberosum* L. breeding lines. Restoration of fertility and complementation of *G. pallida* Pa2 and Pa3 resistance. *Theor. Appl. Genet.* 92: 403-410.
- RASMUSSEN J.O.; RASMUSSEN O.S. 1995. Characterization of somatic hybrids of potato by use of RAPD markers and isozyme analysis. *Physiol. Plant.* 93: 357-364.
- ROEST S.; GILISSEN L.J.W. 1993. Regeneration from plants- a supplementary literature review. *Acta Bot. Neerl.* 43: 1-23.
- ROKKA V.M.; XU Y.S.; KANKILA J.; KUUSELA A.; PULLI S.; PEHU E. 1994. Identification of solanum hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* lines and *S. brevidens* by species specific RAPD patterns and assessment of disease resistance of the hybrids. *Euphytica* 80: 207-217.
- ROSS H. 1986 Potato breeding – problems and perspectives. *Journal of plant breeding Suppl.* 13. W. Horn; G. Robbeln (eds.). Berlin. Hamburgo >>>>>
- ROUSSELLE P.; ROUSSELLE F.; FRANCOIS J. 1989. Application de la culture *in vitro* au doublement chromosomique chez ;a Pomme de terre. *Colloques de l'INRA* 51 : 321.
- ROUSSELLE O.; ROUSSELLE-BOURGEOIS F. 1994. Curso Superior de Mejora Genetica Vegetal. Instituto Agronomico Mediterraneo de Zaragoza. (C.I.H.E.A.M.), Zaragoza.
- ROUSSELLE-BOURGEOIS F.; ROUSSELLE P. 1992. Création et sélection de populations diploïdes de pomme de terre. *Agronomie* 12 : 59-67.
- ROUSSELL G.E. 1978. *Plant breeding for Pest and Disease Resistance*. Butterworths. London. Boston.
- SCHALLENBERG R.S.; SMITH O.; TREADAWAY R.H. 1959. Role of sugars in the browning reaction in potato chips. *J. of Agric. and Food Chem.* 7: 274-277.
- SCHIEDER O. 1978. Somatic hybridization: a new method for plant improvement. En I.K. Vasil ; W.R. Scowcroft ; K.J. Frey (eds.). Academic Press, New York.
- SCHWEIZER G.; GANAL M.; MINNEMANN; HEMLEBEN V. 1988. Species-specific DNA sequence for identification of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum acaule*. *Theor. Appl. Genet.* 75: 679-674.
- SENDA M.; TEKEDA J. ; ABE S.; NAKAMURA T. 1979. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical manipulation. *Plant Cell Physiol.* 20: 1441-1443.
- SERRAF I.; TIZROUTINE S.; CHAPUT M.H. ; ALLOT M. ; MUSSIO I. ; SIHACHAKR D.; ROSSIGNOL L.; DUCREUX G. 1994. Production and characterization of intergeneric somatic hybrids through protoplast electrofusion between potato (*Solanum tuberosum*) and *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37: 137-144.



- SERRANO M.; PINOL M.T. 1991. *Biotechnology Vegetal* Ed. Sintesis, Madrid. p.285.
- SHAHIN E.A.; SHEPARD J.F. 1980. Cassava mesophyll protoplast: isolation, proliferation and shoot formation. *Plant Sci. Lett.* 17: 459-465.
- SHEPARD J.F. 1982. Cultivar dependent cultural refinements in potato protoplast regeneration. *Plant Sci. Lett* 26: 127-132.
- SHEPARD J.F.; BIDNEY D.; SHAHIN E. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. *Science* 208: 17-24.
- SHEPARD J.F.; TOTTEN R.E. 1977. Mesophyll cell protoplast of potato: isolation, proliferation and plant regeneration. *Plant Physiol.* 60: 313-316.
- SIHACHAKR D.; CHAPUT M.H.; SERRAF I.; DUCREUX G. 1992. Regeneration of plants from protoplasts of eggplant (*Solanum melongena L.*) Y.P.S Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- SIHACHAKR D.; DAUNAY M.C.; SERRAF I.; CHAPUT M.H.; HAICOUR R.; ROSSIGNOL L.; DUCREUX G. 1993. Somatic Hybridization in eggplant (*Solanum melongena L.*) Y.P.S. Bajaj (eds.). *Biotechnology in Agriculture and forestry*. Springer-Verlag, Berlin, Heideberg, New York.
- SIHACHAKR D. H. 1991. Microtubules in cultured plant protoplasts. *Acta Bot. Neerl.* 40: 183-195.
- SINGH K.B. 1969. Inheritance of specific gravity in potato tuber. *Indian J. of Genet and Plant Breeding* 29: 433-437.
- SOLOMON R.M. 1978. Methods of screening for resistance to potato virus X and Y Abstracts of the Seventh Triennial Conference of EAPR, Warsaw.
- SPOONER D.M.; CASTILLO R.; LOPEZ L.; PINEDA J.R.; LEON R.; VARGAS A.; GARCIA M.L.; BAMBERG J.B. 1995. Columbia and Venezuela 1992 wild potato (*Solanum sect. Petota*) germplasm collecting expedition: taxonomy and new germplasm resources. *Euphytica* 81: 45-56.
- STADLER M.; STELZER T.; BORISJUK N.; ZANKE C.; SCHILDERNTSCHLER L.; HEMLEBEN V. 1995. Distribution of novel and known repeated elements of *Solanum* and application for the identification of somatic hybrids among *Solanum* species. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1271-1278.
- STOREY R.M.J.; DAVIES H.V. 1992. Tuber quality. P.M. HARRIS (eds.). *The Potato Crop: 2<sup>nd</sup> ed.* Chapman and Hall, London. Pp.507-569.
- SUNDBERG E.; GLIMELIUS K. 1986. A method for production of interspecific hybrids within *Brassicaceae* via somatic hybridization using resynthesis of *Brassica napus* as a model. *Plant Sci.* 43: 155-162.
- SUNDBERG E.; GLIMELIUS K. 1991. Effects of parental ploidy level genetic divergence on chromosome elimination and protoplast segregation in somatic hybrids within *Brassicaceae*. *Theor. Appl. Genet.* 83: 81-88.
- SWIEZYNSKI K.M. 1994. Inheritance of resistance to viruses. En J.E. Bradshaw; G.R. Mackay (eds.). *Potato Genetics*. CAB International, Wallingford, Grate Britain.
- TAI G.C.C. 1994. Use of 2n gametes En J.A. Bradshaw; G.R. Mackay (eds.). *Potato Genetics*. CAB International, Wallingford, Grate Britain.
- TEMPELAAR M.J.; JONES M.J.K. 1985. Fusion characteristics of plant protoplast in electric fields. *Planta* 165: 205-216.
- THACH N.Q.; FREI U.; WENZEL G. 1993. Somatic fusion for combining virus resistance in *Solanum tuberosum L.* *Theor. Appl. Genet.* 73: 379-384.

- TINGEY M.W. 1991. Potato glandular trichomes. P.A. Hedin (ed.) *Naturally Occurring Pest Regulations*. American Chemical Society Symposium Series 449: 126-135.
- TOXOPEUS H.J. 1952. Over de mogelijke betekenis van *Solanum demissum* voor de veredeling gericht op verhoging van de knolopbrengst. *Euphytica* 1: 133-139.
- UHRIG H. 1985. Breeding potatoes with dihaploids. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*: 15: 185-191.
- UHRIG H.; SALAMINI F. 1987. Dihaploid plant production from 4x genotypes of potato by the use of efficient anther plant producing tetraploid strains (4x EAPP – clones) proposal of a breeding methodology. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 98: 228-235.
- UPADHYA M.D. 1975. Isolation and culture of mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Potato Res.* 18: 438-445.
- VON WAGENHEIM K.H.; PELOQUIN S.J.; HOUGAS R.W. 1960. Embryonal investigations on the formation of haploids in the potato (*Solanum tuberosum*). *Z. Induk Abstamm. Vererbungsl.* 91: 391-399.
- WAARA S.; PIJNACKER L.; FERWADA A.; WALLIN A.; ERIKSONN T. 1992. A cytogenetic and phenotypic characterization of somatic hybrid plant obtained after fusion of two different dihaploid clones of potato (*Solanum tuberosum*). *Theor Appl. Genet.* 85: 470-479.
- WIJBRANDI J.; VAN CAPELLE W. ; HANHART C.J. ; LOENEN E.P. ; MARTINET-SCHURINGA ; KOORNNEEF M. 1990. Selection and characterization of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Sci.* 70: 199-208.
- WILLIAMS C.E. ; HUNT G.J.; HELGESON J.P. 1990. Fertile somatic hybrids of *Solanum* species: RFLP analysis of a hybrid and its sexual progeny from crosses with potato. *Theor. Appl. Genet.* 80: 545-550.
- XU Y. –S.; PEHU E. ; MALONE R. ; JONES M.G.K. 1991. Plant regeneration from protoplasts of *Solanum* species with potential agricultural value (*S. polyadenium*, *S. capsicibaccatum*, *S. hjertingii* ). *Plant Cell Rep.* 9: 520-522.
- ZADINA J.; NOVAK F. 1983. The inheritance of extreme intolerance to potato leaf roll virus (PLRV). *Genetika a Slechteni* 19: 189-198.
- ZELCER A.; AVIV D. ; GALUN E. 1978. Interspecific transfer of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts of normal *Nicotiana glauca* and x-ray irradiated protoplasts of male sterile *N. tabacum*. *Z. Pflanzenphysiol.* 90: 397-407.
- ZIMMERMANN U. 1982. Electric field mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochem. Biophys. Acta* 694: 227-257.
- ZIMMERMANN U.; SCHEURICH 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* 151: 26-30.