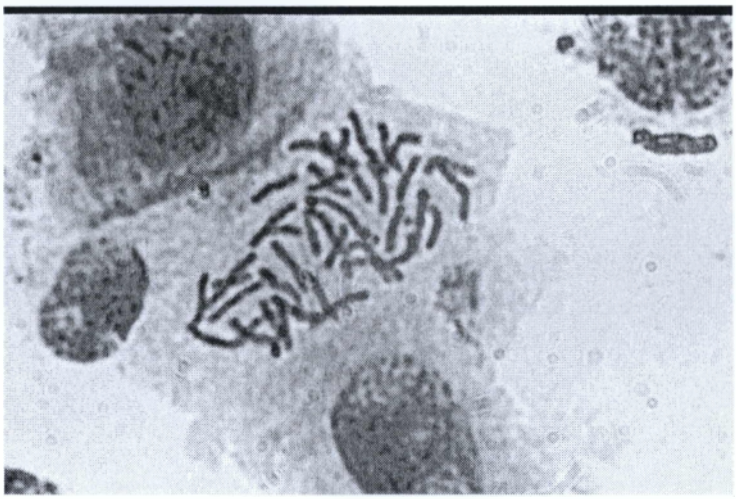
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

# ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΑΣ ΝΕΩΝ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΕΞΑΠΛΟΕΙΔΟΥΣ ΣΙΤΑΡΟΒΡΙΖΑΣ(X *Triticosecale* WITTMACK).



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΗΣ ΜΑΡΓΑΡΗ ΓΕΩΡΓΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ
Δρ. Ι. Ν. ΞΥΝΙΑΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής

2007

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, κ. Ιωάννη Ν. Ξυνιά για την πολύτιμη βοήθειά του. Για τις γνώσεις και τις πληροφορίες που μου προσέφερε και με οδήγησαν στην ολοκλήρωση της εργασίας, αλλά και για την διάθεση του, να μου διδάξει την υπομονή και επιμονή που χρειάζονται, με σκοπό την επιτυχία ενός πειράματος. Επίσης θα ήταν παράληψή μου να μην αναφέρω, την πολύ σημαντική βοήθεια του συναδέρφου μου Δημήτρη Καταγίδα, όσον αφορά στο πρακτικό μέρος της εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ


| | ΣΕΛΙΔΕΣ |
|---|---|
| I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 5 |
| II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ | 7 |
| 1. Δημιουργία πρωτογενών σειρών σιταρόβριζας. | 7 |
| 1.1 Η σιταρόβριζα (X *Triticosecale* Wittmack). | 7 |
| 1.2 Η διάρκεια της μείωσης και πως αυτή επηρεάζει την δημιουργία σταθερών σειρών. | 9 |
| 1.3 Η τελομερική ετεοχρωματίνη των χρωμοσώμων της βρίζας και η επίδρασή της στα φυτά της σιταρόβριζας. | 10 |
| 1.4 Νεότερες εργασίες για την βελτίωση των σειρών σιταρόβριζας. | 10 |
| 1.5 Δημιουργία πρωτογενών σειρών εξαπλοειδούς σιταρόβριζας. | 13 |
| 2. Κυτταρογενετική ανάλυση. | 15 |
| 2.1 Γενικά | 15 |
| 2.2 Εύρεση αριθμού χρωμοσωμάτων. | 16 |
| 2.2.1 Μέθοδος χρωστικής Fulgen. | 16 |
| 2.2.2 Μέθοδος Cambridge | 17 |
| 2.2.3 Μέθοδος Winthtrop | 17 |
| 2.2.4 Μέθοδος οξικής ορχείνης των Mujeeb-Kazi και Mirandu | 18 |
| 2.2.5 Μέθοδος του Ramanna-Abdalla. | 18 |
| 2.2.6 Μέθοδος μικτή. | 18 |
| 2.2.7 Μέθοδος των Eupen και Ruo | 19 |
| 2.3 Οι τεχνικές ζώνωσης. | 19 |
| 2.3.1 Η C-ζώνωση. | 19 |
| 2.3.2 Η G-ζώνωση. | 20 |
| 2.3.3 Η Q-ζώνωση. | 20 |
| 2.3.4 Η R- και T-ζώνωση. | 20 |
| 2.3.5 Η N-ζώνωση. | 20 |
| 2.4 Στάδια δημιουργίας χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων. | 21 |
| III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 23 |
| 1. Οι πρωτογενείς σειρές της σιταρόβριζας. | 23 |
| 2. Η τροποποιημένη τεχνική της οξικής ορχείνης | 24 |
| 2.1 Παρασκευή των απαιτούμενων διαλυμάτων | 24 |

2.2 Η τεχνική της δημιουργίας χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων 24
V. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 27
1. Αριθμός χρωμοσωμάτων ανά σειρά σιταρόβριζας 27
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 29
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 30
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 36
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 37

# Ι.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σιταρόβριζα ( x *Triticosecale* Wittmack) είναι ένα μικρόκοκκο δημητριακό, που αντιπροσωπεύει την πρώτη επιτυχημένη προσπάθεια δημιουργίας ενός νέου καλλιεργητικού είδους, με υβριδισμό μεταξύ γενών (Larter 1976). Τα δύο γένη που συμμετέχουν στο υβρίδιο είναι το σιτάρι και η βρίζα, για αυτό και του δόθηκε το όνομα σιταρόβριζα. Με την επιτυχή αυτή διασταύρωση ο άνθρωπος κατάφερε μέσα σε 100 χρόνια να δημιουργήσει ένα νέο φυτικό γένος, που να συνδυάζει ευνοϊκά αγρονομικά γνωρίσματα από δύο διαφορετικά γένη.

Η πρώτη μαζική παραγωγή συνέβη το 1928. Έως τότε είχαν γίνει αρκετές προσπάθειες για να διασταυρωθεί το σιτάρι με τη βρίζα, αλλά καμία δεν ήταν ιδιαίτερα επιτυχής. Ο Meister λοιπόν το 1918 παρατήρησε την πρώτη τυχαία, αλλά μαζική παραγωγή φυτών σιταρόβριζας στο Saratov της Ν. Α. Ρωσίας. Σύμφωνα με τον Muntzing (1974,1979), το ονόμασε το νέο φυτό *Triticum secalotricum seratoviense* Meister.

Κατά τη δεκαετία του 1930 έγινε κυτταρολογική μελέτη των σειρών σιταρόβριζας του Saratov και άρχισαν να ερευνώνται τα αίτια της δυσκολίας της διασταύρωσης μεταξύ σιταριού και βρίζας. Αργότερα, αφού βρέθηκαν τα αίτια, η έρευνα συνεχίστηκε με σκοπό την επίλυση των προβλημάτων που παρουσίαζε το φυτό. Μερικά από αυτά αντιμετωπίστηκαν σχετικά εύκολα. Με την πάροδο του χρόνου και την ταυτόχρονη ανάπτυξη διαφόρων τεχνικών (τεχνική χρωμοσωμικού διπλασιασμού και της εμβρυοκαλλιέργειας κατά την διετία 1937-1938) πολλά προβλήματα ξεπεράστηκαν. Το 1969 δόθηκε η πρώτη ποικιλία σιταρόβριζας (από πρόγραμμα που ξεκίνησε το 1954 στο πανεπιστήμιο Manitoba του Καναδά), η εξαπλοειδής Rosner, που ήταν πρώιμη, ανθεκτική στο πλάγιασμα και γόνιμη, αλλά χωρίς ικανοποιητική προσαρμοστικότητα και αποδοτικότητα (Ξυνιάς 1991). Το 1971 οι Borlaug και Zillinsky δημιούργησαν δευτερογενής εξαπλοειδείς σειρές Armadillo, με τις οποίες λύθηκαν τα περισσότερα από τα προβλήματα του φυτού. Οι τύποι Armadillo έχουν τα ακόλουθα γνωρίσματα : α) πολύ υψηλό επίπεδο γονιμότητας, β) βελτιωμένο μέγεθος και βάρος σπόρου, γ) υψηλή απόδοση σε σπόρο ανά μονάδα επιφάνειας, δ) έλλειψη ευαισθησίας στο μήκος της ημέρας, ε) πρωιμότητα, στ) ένα γονίδιο νανισμού και ζ) μεγάλη θρεπτική αξία (Munzing 1979). Από τότε έως σήμερα έχουν γίνει αρκετές έρευνες, με σκοπό την παραγωγή σειρών σιταρόβριζας που να φέρουν γνωρίσματα με γεωργικό ενδιαφέρον.

Σήμερα η σιταρόβριζα δίνει καλής ποιότητας προϊόντα ακόμα και αν αναπτυχθεί σε λιγότερο ευνοϊκά περιβάλλοντα. Όμως η επικονίαση του σιταριού από τη γύρη της βρίζας είναι δύσκολη (Kaltsikes 1974b, Shao και Taira 1990). Το ποσοστό των εμβρύων που προκύπτουν είναι μικρό, αλλά και από αυτά τα περισσότερα δεν έχουν ομαλή ανάπτυξη (Taira κ.α. 1991). Επιπλέον, και τα λίγα κανονικά έμβρυα που δημιουργούνται αποβάλλονται 14-20 ημέρες από την γονιμοποίηση (Taira κ. α 1991). Έτσι, για να δημιουργηθούν νέα πρωτογενή αμφιδιπλοειδή θα πρέπει να απομονωθούν αρχικά τα ανώριμα έμβρυα μετά από διασταύρωση του σιταριού με τη βρίζα και κατόπιν να καλλιεργηθούν σε ειδικά για το σκοπό αυτό θρεπτικά υποστρώματα. Τέλος, επειδή τα φυτά που αποκτώνται είναι τριαπλοειδή και επομένως στείρα, θα πρέπει να ακολουθήσει χρωμοσωματικός διπλασιασμός (Kaltsikes 1974b, Ξυνιάς 1991). Οι σειρές που δημιουργούνται με τον τρόπο που περιγράφηκε ονομάζονται πρωτογενείς εξαπλοειδείς.

Η παρούσα εργασία, πραγματεύεται τη μελέτη του βαθμού ανευπλοειδίας σε πρωτογενείς σειρές εξαπλοειδούς σιταρόβριζας. Οι σειρές αυτές δημιουργήθηκαν με σκοπό τη δημιουργία νέων ποικιλιών χρησιμοποιώντας ελληνικό γενετικό υλικό (Ξυνιάς 1997). Η μελέτη έγινε με την τροποποιημένη τεχνική της οξικής ορχείνης με την οποία βάφονται τα χρωμοσώματα με οξική ορχείνη και στη συνέχεια καταμετρώνται με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου. Τα χρωμοσώματα των ευκαρυωτικών οργανισμών έχουν τη μοναδική ιδιότητα να χρωματίζονται με βασικές χρωστικές (Ξυνιάς 1994) καθιστώντας δυνατή την παρατήρησή τους κατά το στάδιο της μιτωτικής μετάφασης.

# ΙΙ. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

## 1. Δημιουργία πρωτογενών σειρών σιταρόβριζας.

### 1.1 Η σιταρόβριζα (X *Triticosecale* Wittmack).

Αρχικός στόχος των βελτιωτών ήταν η δημιουργία ενός νέου φυτού που να συνδυάζει την αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες της βρίζας και τα αγρονομικά χαρακτηριστικά του σιταριού (Larter 1976).

Μορφολογικά η σιταρόβριζα, μοιάζει περισσότερο με το σιτάρι. Οι διαφορές της από αυτό είναι ότι, η σιταρόβριζα είναι πιο εύρωστη με μεγαλύτερο μέγεθος στάχεως αλλά και σπόρου. Η σιταρόβριζα, ανάλογα με τις ποικιλίες που θα χρησιμοποιηθούν ως γονείς, μπορεί να είναι ανοιξιάτικη αλλά και χειμερινή καλλιέργεια. Επίσης είναι αυτογονιμοποιούμενο φυτό, μπορεί όμως το ποσοστό σταυρογονιμοποίησης , κάποιες φορές να είναι υψηλό (1,1 έως 10,5 % κατά τους Sowa και Krysiak 1996).

Οι καλλιεργούμενες σειρές σιταρόβριζας από κυτοταξονομικής πλευράς μπορεί να διακριθούν σε εξαπλοειδείς (2n=6x=42) ή σε οκταπλοειδείς (2n=8x=42). Οι εξαπλοειδείς σειρές προέρχονται από υβριδισμό μεταξύ σκληρού σιταριού (*Triticum turgidum var. durum,* 2n=4x=28) και βρίζας (*Secale cereale* L., 2n=2x=14) με ακολουθούμενο χρωμοσωματικό διπλασιασμό. Οι οκταπλοειδείς σειρές προέρχονται από υβριδισμό μεταξύ μαλακού σιταριού (*Triticum aestivum* (L) *em* Thell, 2n=6x=42) και βρίζας, με ακολουθούμενο χρωμοσωματικό διπλασιασμό (Ξυνιάς 1990).

Οι σειρές σιταρόβριζας μπορεί να διακριθούν (Gupta και Priyadarshan 1982) σε **πλήρεις**, όταν περιέχουν και τα 14 χρωμοσώματα της βρίζας και σε **υποκατάστασης**, όταν κάποιο (A) από τα χρωμοσώματα της βρίζας έχουν υποκατασταθεί από χρωμοσώματα του D γονιδιώματος (μαλακό σιτάρι). Επίσης μπορεί να διακριθούν (Gupta και Priyadarshan 1982) σε πρωτογενείς (το άμεσο προϊόν της διασταύρωσης του σκληρού ή του μαλακού σιταριού με τη βρίζα) και σε δευτερογενείς (το προϊόν της διασταύρωσης πρωτογενών, με άλλες πρωτογενείς ή στην περίπτωση των πρωτογενών εξαπλοειδών, με μαλακό σιτάρι).

Η σιταρόβριζα έχει ορισμένες μοναδικές ιδιότητες, λόγω συνύπαρξης γονιδιωμάτων από δύο διαφορετικά γένη. Έτσι, συνδυάζει την αντοχή της βρίζας στις

αντίξοες εδαφοκλιματικές συνθήκες, με την παραγωγικότητα του μαλακού σιταριού. Είναι ανθεκτικότερη, σε σχέση με τα υπόλοιπα σιτηρά, στις προσβολές από ασθένειες και έντομα. Ακόμα μπορεί να αξιοποιήσει επιτυχώς άγονα, όξινα και αλατούχα εδάφη, με χαμηλή περιεκτικότητα σε ιόντα Cu, που είναι απαγορευτική για άλλα σιτηρά (Zillinsky 1974, Gupta και Priyadarshan 1982, Varughese κ.α. 1987, Qualset και Guedes-Pinlo 1996). Ειδικά για τα όξινα εδάφη και για αυτά που περιέχουν τοξικές συγκεντρώσεις Al, θεωρείται ως η καλύτερη προσαρμοσμένη καλλιέργεια (Baier και Guastafson 1996)

Η σπουδαιότητα των σειρών της σιταρόβριζας δεν βρίσκεται μόνο στο γεγονός ότι αποδίδει στα λιγότερο ευνοϊκά περιβάλλοντα, αλλά και στο γεγονός ότι, λόγω της ταχείας ανάπτυξής τους και της ικανότητάς του να καλύπτουν και να συγκρατούν το έδαφος, είναι πολύ αποτελεσματικές στην προστασία του εδάφους από τη διάβρωση που προκαλείται από τον άνεμο.

Πειράματα έδειξαν ότι οι σπόροι της σιταρόβριζας έχουν μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεϊνών από το σιτάρι. Οι δευτερογενείς εξαπλοειδείς σειρές περιέχουν 8-10% περισσότερη λυσίνη, συγκρινόμενο με τα υπόλοιπα σιτηρά (Gupta και Priyadarshan 1982) είναι πλούσιες σε απαραίτητα αμινοξέα (θρεονίνη, τυροσίνη, θρυπτοφάνη, μεθειονίνη και κυστεΐνη) (Mosse κ.α. 1988). Επιπλέον, περιέχει μεγάλες ποσότητες μακροστοιχείων (K, P), ιχνοστοιχείων (Na, Mg, Fe, Zn) μετάλλων και είναι πλούσια σε βιταμίνη B (Muntzing 1979, Gupta και Priyadarshan 1982, Achremowicz κ. ά 1987).

Και όμως η σιταρόβριζα παρά τα πλεονεκτήματα που διαθέτει, δεν καλλιεργείται σε μεγάλη κλίμακα. Σύμφωνα με τον Lelley και την εργασία του "Triticale still a promise?" κύρια αιτία της απαξίωσης της καλλιέργειας της σιταρόβριζας είναι η έλλειψη τιμής συγκέντρωσης, που καθιστά τη διάδοσή της προβληματική. Το μέλλον όμως της καλλιέργειας της σιταρόβριζας προβλέπεται ευοίωνο διότι όπως έχει επισημάνει και ο Pfeiffer (1996), οι σειρές της σιταρόβριζας, λόγω των χαμηλών εισροών ενέργειας που απαιτούν είναι η ιδανική καλλιέργεια για αειφορική και οργανική γεωργία.

## 1.2 Η διάρκεια της μείωσης και πως αυτή επηρεάζει την δημιουργία σταθερών σειρών.

Κατά τους Gupta και Priyadarshan (1982) η μελέτη της διάρκειας της μείωσης, θα μπορούσε να εξηγήσει τις αιτίες των μειωτικών διαταραχών που χαρακτηρίζουν τις οκταπλοειδείς και εξαπλοειδείς σειρές. Η διάρκεια της μείωσης στις οκταπλοειδείς σειρές μελετήθηκε από τους Bennett και Smith το 1972 (αναφορά από τους Gupta και Priyadarshan 1982). Η αντίστοιχη μελέτη στις εξαπλοειδείς σειρές έγινε από τους Bennett και Kaltsikes (1973 και των τετραπλοειδών σειρών έγινε από τους Roupakias κ.α. 1979. Έτσι λοιπόν βρέθηκε ότι στις εξαπλοειδείς σειρές η διάρκεια της μείωσης ήταν μικρότερη από την αντίστοιχη της βρίζας, αλλά μεγαλύτερη από το σκληρό σιτάρι. Στις οκταπλοειδείς σειρές η διάρκεια της μείωσης είναι μικρότερη από την αντίστοιχη και στους δύο γονείς. Κατά τον Bennett οι μειωτικές διαταραχές των οκταπλοειδών σειρών, αλλά και η ασύναψη που παρατηρείται, οφείλονται στη διαφορετική διάρκεια της μείωσης (Gupta και Priyadarshan 1982). Όμως, οι διαφορές στη διάρκεια της μείωσης όπως πιστεύεται, δεν είναι η μοναδική αιτία σχηματισμού μονοσθενών στις εξαπλοειδείς σειρές (Roupakias και Kaltsikes 1977a,b)

Η διάρκεια της μείωσης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, που είναι σύμφωνα με τον Bennett (Gupta και Priyadarshan 1982) :

1) Το περιεχόμενο DNA στον πυρήνα και το επίπεδο πλοειδίας. Η αύξηση του DNA, σημαίνει αύξηση της διάρκειας μείωσης, ενώ η αύξηση του επιπέδου πλοειδίας συνεπάγεται με την μείωση της διάρκειας της μείωσης.
2) Τη γενετική σύσταση και το περιβάλλον. Η διάρκεια της μείωσης επηρεάζεται από τη θερμοκρασία αλλά και το είδος του χρωμοσώματος και των γονιδίων που τα αποτελούν.

Έτσι λοιπόν συμπεραίνεται πως η σχετική σταθερότητα που χαρακτηρίζει τις εξαπλοειδείς σειρές οφείλεται στη μεγαλύτερη διάρκεια της μείωσης (37 ώρες, σε αντίθεση με τις οκταπλοειδείς που είναι 20 ώρες). Η μείωση δηλαδή των εξαπλοειδών σειρών σιταρόβριζας είναι περισσότερο συμβατή με την αντίστοιχη της βρίζας, που διαρκεί 51 ώρες (Jouve και Soler 1996).

## 1.3 Η τελομερική ετεροχρωματίνη των χρωμοσωμάτων της βρίζας και η επίδρασή της στα φυτά της σιταρόβριζας.

Μετά τη δεκαετία 1960 η σιταρόβριζα άρχισε να αποκτά μεγάλη σημασία και ήταν πιο απαραίτητος ο εντοπισμός αλλά και η επίλυση των μειονεκτημάτων που παρουσίαζε.

Ένα τέτοιο σπουδαίο μειονέκτημα θεωρήθηκε ότι ήταν η *τελομερική ετεροχρωματίνη* (η ετεροχρωματίνη των άκρων), χαρακτηριστική των χρωμοσωμάτων της βρίζας. Η τελομερική ετεροχρωματίνη αποτελείται από υψηλά επαναληπτικό DNA και διπλασιάζεται πιο αργά από την ευχρωματίνη. Η παρουσία της τελομερικής ετεροχρωματίνης στις σειρές της σιταρόβριζας, θεωρήθηκε ότι ήταν η κύρια αιτία δημιουργίας μειωτικής αστάθειας και λισβών σπόρων (Kaltsikes και Gustafson 1985).

Διάφορες έρευνες και πειράματα έγιναν προκειμένου να διαπιστωθούν τα προβλήματα που δημιουργούσε η τελομερική ετεροχρωματίνη.

## 1.4 Νεότερες εργασίες για την βελτίωση των σειρών σιταρόβριζας.

Σύμφωνα με τον Varughese (1996), αν και το D γονιδίωμα ήταν ο λόγος που το μαλακό σιτάρι επικράτησε των υπολοίπων δημητριακών, εντούτοις το R φαίνεται να είναι ανώτερο. Το R γονιδίωμα έχει μεγάλη αποδοτικότητα, ανθεκτικότητα σε ασθένειες, ελλείψεις ή τοξικές συγκεντρώσεις σε μικροστοιχεία, απορροφά φώσφορο και μοναδικό μειονέκτημα ότι έχει μειωμένη αρτοποιητική ικανότητα. Επίσης, όπως αναφέρεται από τους Limin και Fowler (1982), πολλές έρευνες έδειξαν ότι υπάρχει γονίδιο(α) του σιταριού, που καταστέλλει το δυναμικό της βρίζας για αντοχή στο κρύο. Σημαντικό ρόλο στην καταστολή αυτή, πιθανόν να παίζει και η πολυπλοειδία που μειώνει την έκφραση των γονιδίων της διπλοειδούς βρίζας (Limin κ.α. 1985). Προκειμένου λοιπόν να δημιουργηθούν νέες σειρές με ανθεκτικότητα στο κρύο, επιλέγονται και χρησιμοποιούνται στις διασταυρώσεις ποικιλίες σιταριού, που είναι κι αυτές ανθεκτικές στο κρύο (Limin κ.α. 1985). Η καλή επιλογή των γονέων σιταριού παίζουν σημαντικό ρόλο και σε πολλά άλλα γνωρίσματα του φυτού, όπως στην ανθεκτικότητα στο Al, η οποία επίσης εξαρτάται από την ύπαρξη γονιδίου ανθεκτικότητας στο σιτάρι (Aniol και Gustafson 1984). Επίσης, και η ποσοτική έκφραση της βριζίνης (secalin), που είναι η κύρια αποθηκευτική πρωτεΐνη της βρίζας

(Owen και Larter 1988), επηρεάζεται από τον γενότυπο του σιταριού (Gunther κ.α. 1996).

Μια άλλη έρευνα που έγινε, αφορούσε τη συμπεριφορά φυτών ομοζύγωτων ή ετεροζύγωτων ως προς κάποιο από τα γενώματα του σιταριού ή της βρίζας. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής: τα αμφιδιπλοειδή που ήταν ετεροζύγωτα μόνο ως προς το γονιδίωμα της βρίζας ήταν πιο εύρωστα (ύψος, αδέλφια / φυτό). Φυτά που ήταν ετεροζύγωτα μόνο ως προς το γονιδίωμα του σιταριού, εμφάνιζαν υψηλή ετέρωση στον αριθμό των σπόρων/στάχυ και στο βάρος 1000 κόκκων. Τέλος, φυτά που ήταν ετεροζύγωτα ως προς και τα δύο γενώματα, εμφάνιζαν υπεροχή ως προς το μήκος του στάχεως, τον αριθμό σταχυδίων / στάχυ και στον αριθμό αδελφιών / φυτό ( Joung και Lelley 1985). Η σιταρόβριζα λόγω του ότι ξεσταχυάζει νωρίτερα από το σιτάρι, είναι πιο αποδοτική από αυτό.

Ένα ακόμα θέμα που μελετήθηκε ήταν η σύγκριση των πλήρων σειρών σιταρόβριζας, με τις σειρές τύπου υποκατάστασης (2R/2D). Από τη σχετική έρευνα προέκυψε ότι οι πλήρεις σειρές πλεονεκτούν ως προς την ανθεκτικότητα τόσο στους βιοτικούς όσο και στους αβιοτικούς παράγοντες (CYMMIT 1990). Επίσης, οι νεότερες πλήρεις σειρές έχουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε τοξικές συγκεντρώσεις Al (Baier και Gustafson 1996). Οι σειρές τύπου υποκατάστασης (2R/2D) δείχνουν να υπερτερούν μόνο ως προς την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, την τιμή καθίζησης και τον όγκο του ψωμιού (CYMMIT 1990). Οι πλήρεις σειρές οφείλουν την υπεροχή τους στο γεγονός ότι σε αυτές εκφράζεται όλο το γονιδίωμα της βρίζας. Για παράδειγμα, όπως το ριζικό σύστημα της βρίζας είναι μεγαλύτερο από του σιταριού έτσι και στις πλήρεις σειρές σιταρόβριζας είναι σαφώς μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των τύπου υποκατάστασης (2R/2D) (Baier κ.α. 1996).

Η έρευνα όμως δεν σταματάει εδώ. Στο άμεσο μέλλον προβλέπεται να επικεντρωθεί το ενδιαφέρον των βελτιωτών σε διάφορα καθοριστικά σημεία, μερικά από τα οποία αναφέρονται παρακάτω.

Ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα τη σιταρόβριζας είναι η προβλάστηση του σπόρου επάνω στο στάχυ (sprouting) όταν ο καιρός είναι βροχερός (Haesaert και de Baets 1996). Έτσι, με την επιλογή για υψηλή περιεκτικότητα σε πεντοζάνες, που είναι ο κύριος πολυσακχαρίτης της βρίζας και που είναι στενά συνδεδεμένος με την ανθεκτικότητά της στην προβλάστηση των σπόρων (αλλά και στη βελτίωση της αρτοποιητικής ικανότητας, Weipert 1996) θα μπορούσε να μειωθεί η προβλάστηση αυτή.

Μερικά άλλα θέματα που θα πρέπει να μελετηθούν διεξοδικά είναι η βελτίωση της προσαρμοστικότητας του φυτού, η δημιουργία σειρών στους οποίους ο σπόρος να μην λισβώνει όταν τα φυτά καταπονούνται και τέλος η ανθεκτικότητα σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες για να μειωθεί ο κίνδυνος από τους όψιμους παγετούς (Baier και Gustafson 1996). Δύο άλλα σημεία που θα πρέπει να βελτιωθούν είναι η αρτοποιητική και αλευροποιητική ικανότητα (Baier και Gustafson 1996).

Η Oettler (1996) πρότεινε τη χρησιμοποίηση χαμηλοπαραγωγικών περιβαλλόντων κατά την διαδικασία της επιλογής των νέων σειρών. Αυτή η πρόταση θα πρέπει να εξεταστεί μιας και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Η μείωση της κυτταρολογικής αστάθειας, είναι ένα άλλο πολύ σημαντικό θέμα. Το πρόβλημα αυτό θα μπορούσε να αντιμετωπισθεί με τη βοήθεια μεγάλου αριθμού διασταυρώσεων. Για καλύτερα αποτελέσματα θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν μεγάλοι πληθυσμοί στις $F_3$ και $F_4$ γενεές (Lelley 1992).

Μια άλλη σπουδαία προσέγγιση είναι η χρήση της κυτοπλασματικής αρρενοστειρότητας, που μπορεί να συμβάλλει στην δημιουργία νέων σειρών (Warzecha και Salak-Warzecha 1996).

Επιπλέον, η χρήση κάποιων ευνοϊκών μεταλλάξεων (μεταλλάξεις των γονιδίων *ph lb* και *ph lc* στο μαλακό σιτάρι) με σκοπό την αύξηση του ζευγαρώματος μεταξύ ομολόγων χρωμοσωμάτων του γονιδιώματος του σιταριού και γονιδιωμάτων συγγενικών ειδών (Jouve και Soler 1996) μπορεί να παίξει σπουδαίο ρόλο.

Η *in vitro* καλλιέργεια ανθήρων δίνει μεγάλη δυνατότητα απόκτησης απλοειδών φυτών. Τα απλοειδή φυτά βοηθούν στην απόκτηση, σε σύντομο χρονικό διάστημα, ομοζύγωτων (διαπλοειδών) σειρών, με τεχνητό ή αυτόματο χρωμοσωματικό διπλασιασμό. Αξίζει να αναφερθεί ότι η ανταπόκριση στην *in vitro* καλλιέργεια ανθήρων εξαρτάται από το μητρικό φυτό του σιταριού (Jouve και Soler 1996).

Μια άλλη προσέγγιση θα ήταν η δημιουργία τετραπλοειδών σειρών, στις οποίες το ποσοστό συμμετοχής του γενετικού δυναμικού της βρίζας θα είναι υψηλότερο. Αυτό θα μπορούσε να ευνοήσει την καλύτερη έκφραση των γονιδίων της προσαρμοστικότητας της βρίζας, ειδικά στις χαμηλές θερμοκρασίες και στα όξινα και αμμώδη εδάφη (Jouve και Soler 1996).

Τέλος, καθοριστική συμβολή στην επίτευξη όλων όσων αναφέρθηκαν προηγούμενα, μπορεί να έχει και η χρησιμοποίηση νέων βελτιωμένων γενοτύπων βρίζας, όσον αφορά την αναλογία των αμινοξέων, του τύπου του φυτού, την ανθεκτικότητα του σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, την ικανότητα

προσρόφησης N, την προσαρμοστικότητα και το μικρότερο ποσοστό βριζίνης (Baier και Gustafson 1996).

## 1.5 Δημιουργία πρωτογενών σειρών εξαπλοειδούς σιταρόβριζας.

Η δημιουργία πρωτογενών σειρών εξαπλοειδούς σιταρόβριζας είναι αρκετά δύσκολη. Όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια, θα πρέπει τα ανώριμα έμβρυα να διασωθούν, να καλλιεργηθούν και έπειτα να γίνει χρωμοσωματικός διπλασιασμός των τριαπλοειδών που θα έχουν προκύψει. Τα φυτά αυτά όμως που θα παραχθούν είναι προβληματικά και δύσκολα στον χειρισμό (Ξυνιάς 1997). Το γεγονός αυτό αλλά και το ότι όλα αυτά τα χρόνια έχουν δημιουργηθεί χιλιάδες πρωτογενείς σειρές, κάνουν τους βελτιωτές να αποφεύγουν να εμπλακούν με τη δημιουργία νέων πρωτογενών σειρών. Η δημιουργία όμως νέων πρωτογενών σειρών είναι ο μόνος τρόπος για αξιοποίηση του υπάρχοντος γενετικού υλικού κάθε χώρας.

Ο αριθμός των σπόρων που θα παραχθούν από τα στάχυα του σιταριού, όταν αυτό επικονιασθεί από γύρη βρίζας, ελέγχεται από τα γονίδια ικανότητας για διασταύρωση (crossability genes, Cooper και Driscoll 1985). Δύο κυρίαρχα γονίδια, τα *kr1* και *kr2* που βρίσκονται στα χρωμοσώματα 5A και 5B (Rilley και Chapman 1967, Cooper και Driscoll 1985) μειώνουν το ποσοστό σχηματισμού των σπόρων, αναστέλλοντας την βλάστηση της γύρης (Lange και Wojciechowska 1976, Jalani και Moss 1980). Τα γονίδια δεν συναντώνται συχνά στα τετραπλοειδή σιτάρια, τα οποία εμφανίζουν ενδιάμεση ικανότητα διασταύρωσης (Cooper και Driscoll 1985). Όμως υπάρχουν διαφοροποιήσεις και στο σκληρό σιτάρι. Γενικά οι ανοιξιάτικοι τύποι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα διασταύρωσης από τους χειμωνιάτικους (Afanasena 1985). Ο γενότυπος της βρίζας παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του σπόρου (Tanner και Falk 1981).

Επειδή η βλαστικότητα των σπόρων των αμφιπλοειδών εξαρτάται κατά πολύ από το ποσοστό πλοειδίας, του σιταριού-γονέα, σε διασταυρώσεις που παίρνει μέρος το σκληρό σιτάρι, πολύ λίγοι σπόροι βλαστάνουν και οι *in vitro* καλλιέργειες με ανώριμα υβρίδια είναι απαραίτητες για την παραγωγή $F_1$ υβριδίων (Cooper και Driscoll 1985). Η ικανότητα διασταύρωσης μεταξύ του σιταριού και της βρίζας επηρεάζεται επίσης και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρούνται σε μεσαίες θερμοκρασίες (χαμηλές όπως και υψηλές θερμοκρασίες, επηρεάζουν αρνητικά

την παραγωγή γύρης, Cooper και Driscoll 1985). Το ποσοστό των εμβρύων με κανονική ανάπτυξη που προκύπτουν από τις διασταυρώσεις αυτές είναι κι αυτό χαμηλό (κάτω του 10%, Shao και Taira 1990). Έτσι, οι Shao και Taira (1990) πρότειναν να χρησιμοποιούνται και έμβρυα που δεν έχουν κανονική ανάπτυξη, για τη δημιουργία των πρωτογενών σειρών σιταρόβριζας. Για να επιτευχθεί όμως αυτό, θα πρέπει τα έμβρυα αυτά να καλλιεργηθούν σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν ορμόνες που να επάγουν την καλογένεση (συνήθως 2,4 D). Τέλος, βρέθηκε ότι ο ρυθμιστής της ανάπτυξης dicampa είναι σημαντικά αποτελεσματικότερος από το 2,4 D (Immonen, 1996). Από τα τριαπλοειδή φυτά που θα παραχθούν τελικά, κάποια θα είναι κανονικά (πράσινα), ενώ θα υπάρξει και κάποιος αριθμός αλβίνων φυτών (οι αιτίες που τα προκαλούν δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί).

Στη συνέχεια θα πρέπει να γίνει χρωμοσωματικός διπλασιασμός τεχνητά. Η πιο διαδεδομένη τεχνική, είναι αυτή με το αλκαλοειδές κολχικίνη, η οποία αναστέλλει τον σχηματισμό των ινών της ατράκτου (Ceoloni κ.α. 1984, Καλτσίκης 1985) με αποτέλεσμα τα χρωμοσώματα να μην οδηγούνται στους πόλους (Καλτσίκης 1985). Έτσι, μετά την καρυοκίνηση σχηματίζονται κύτταρα με διαφορετικό αριθμό χρωμοσωμάτων το καθένα. Κάποια από αυτά έχουν 42 χρωμοσώματα, ενώ άλλα, έχουν μικρότερο αριθμό χρωμοσωμάτων με αποτέλεσμα να προκύπτουν ανευπλοειδή κύτταρα (Καλτσίκης 1985). Τα ευπλοειδή κύτταρα είναι πιο σταθερά από τα ανευπλοειδή και έτσι είναι απαραίτητη η γνώση του βαθμού ανευπλοειδίας των πρωτογενών σιταροβριζών. Κατά καιρούς έχουν προταθεί και άλλες μέθοδοι για τεχνητό χρωμοσωματικό διπλασιασμό, όπως η εφαρμογή $N_2O$, η επίδραση του ψύχους ή υψηλών θερμοκρασιών (38° έως 45° C) και η ακτινοβολία X (Gupta 1995), χωρίς όμως ιδιαίτερη επιτυχία.

Και η κολχικίνη όμως παρουσιάζει κάποια προβλήματα στην εφαρμογή της. Τα κύτταρα των φυτών δεν επιτρέπουν την είσοδό της. Έτσι έχει προταθεί να χρησιμοποιείται το διμεθυλοθειοξείδιο (DMSO). Το DMSO προστίθεται στο διάλυμα της κολχικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (1-3 %) και έχει την ικανότητα να μπαινοβγαίνει ελεύθερα στα κύτταρα βοηθώντας την είσοδο της κολχικίνης στο κύτταρο (Winkle και Kimber 1976, Καλτσίκης 1985). Γενικά τα ποσοστά επιτυχίας του τεχνητού χρωμοσωμικού διπλασιασμού είναι αρκετά χαμηλά και η επιτυχία του φαίνεται να εξαρτάται από τον γενότυπο (Cooper και Driscoll 1985, Shilko κ.α. 1994) αλλά και από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού (Καλτσίκης 1985, Taira κ.α. 1991).

Επίσης, το αν ο σπόρος από τον οποίο θα αφαιρεθεί το έμβρυο, είναι καλοσχηματισμένος ή όχι φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο (Kleiger και Fossati 1996).

Η Afanaseva (1985) σύγκρινε διάφορες μεθόδους εφαρμογής κολχικίνης και βρήκε ότι τα υψηλότερα ποσοστά χρωμοσωμικού διπλασιασμού επιτεύχθηκαν (α) με ένεση 0,05% διαλύματος κολχικίνης, όταν τα φυτά βρίσκονταν στην έναρξη του σταδίου επιμήκυνσης των στελεχών (επιτυχία 100%) και (β) τοποθετώντας νεαρά φυτάρια σε άγαρ, στο οποίο είχε προστεθεί 0,2% διάλυμά κολχικίνης (επιτυχία 75%). Λίγο αργότερα οι Gordei και Khodortsova (1986) βρήκαν ότι η μεταχείριση του στίγματος του σκληρού σιταριού με 0,005% υδατικό διάλυμα του αντιοξειδωτικού tomatosidae, 2-3 ημέρες μετά την αποστημόνωση, είχε ευνοϊκή επίδραση στο να ξεπεραστεί η ασυμβατότητα σιταριού – βρίζας και να αυξηθεί η συχνότητα αμφιδιπλοειδών. Επίσης, οι ίδιοι ερευνητές βρήκαν ότι η μεταχείριση των αποσπώμενων εμβρύων με ακτίνες Helium-neon Laser, αύξησε σημαντικά τον αριθμό των αναγεννώμενων φυτών. Καθώς επίσης και ότι τη μεγαλύτερη επίδραση στο χρωμοσωματικό αριθμό είχε η εφαρμογή 0,15% διαλύματος κολχικίνης στις ρίζες των φυτών που βρίσκονταν στο στάδιο του αδερφώματος. Με τον τρόπο αυτό αποκτήθηκαν εξαπλοειδείς σειρές σιταρόβριζας από 11 διασταυρώσεις τετραπλοειδούς σιταριού με τη διπλοειδή βρίζα. Τέλος, πολλές νέες ουσίες έχουν προταθεί για αντικατάσταση της κολχικίνης (οριζαλίνη, AMP κ.α.) χωρίς όμως να αποδείξουν ότι είναι αποτελεσματικότερες από την κολχικίνη.

## 2. Κυτταρογενετική ανάλυση.

### 2.1 Γενικά.

Σε διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου μπορούν να μελετηθούν τα χρωμοσώματα. Το στάδιο όμως εκείνο κατά το οποίο τα χρωμοσώματα είναι πιο ευδιάκριτα από όλα τα στάδια είναι η μιτωτική μετάφαση (Schulz-Schaeffer 1980). Στο παρελθόν στα χρωμοσώματα της μιτωτικής μετάφασης, δεν μπορούσε εύκολα κανείς να διακρίνει πολλά χαρακτηριστικά λόγω έλλειψης κατάλληλων μεθόδων προετοιμασίας. Έτσι οι κυτταρολόγοι άρχισαν να μελετούν άλλους τύπους χρωμοσωμάτων, όπως τα χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων των εντόμων και άλλων οργανισμών που ήταν ορατά στο στάδιο της πρόφασης. Τα χρωμοσώματα

αυτά αποκάλυπταν πολλές λεπτομέρειες λόγω της αύξησης του DNA από πλευρικό πολλαπλασιασμό (πολυταινία), που ήταν αδύνατον να κάνουν σε κανονικές προφάσεις (Schulz-Schaeffer 1980).

Η μελέτη κατά το στάδιο της πρόφασης δίνει επίσης την δυνατότητα να διακριθεί η ετεροχρωματίνη από την ευχρωματίνη. Τα χρωμομερή είναι ορατά και οι πυρηνίσκοι ευδιάκριτα εμφανείς.

Η ταυτοποίηση των χρωμοσωμάτων κατά την μιτωτική μετάφαση πραγματοποιήθηκε με την ανάπτυξη νέων τεχνικών αναγνώρισης. Έτσι η μιτωτική μετάφαση έγινε το ευκολότερο στάδιο μελέτης των χρωμοσωμάτων. Οι νέες αυτές τεχνικές ονομάστηκαν *τεχνικές ζώνωσης* (banding techniques).

## 2.2. Εύρεση αριθμού χρωμοσωμάτων.

Για τη μέτρηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων έχουν προταθεί διάφορες τεχνικές. Όλες οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν ένα στάδιο για το φύτρωμα των σπόρων, ένα στάδιο προμεταχείρισης του υλικού που ακολουθείται από ένα στάδιο σταθεροποίησης. Ακολουθεί ένα στάδιο υδρόλυσης του υλικού και στη συνέχεια γίνεται η παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Παρακάτω περιγράφονται οι κυριότερες από τις τεχνικές αυτές.

### 2.2.1 Μέθοδος χρωστικής Fulgen (Ξυνιάς 1990).

1. Φύτρωμα σπόρων: Σε τριβλία petri τοποθετούνται οι σπόροι για να φυτρώσουν. Στην κάτω επιφάνεια του τρυβλίου τοποθετείται ένα κομμάτι χοντρού απορροφητικού ηθμού, που είναι κορεσμένο από νερό. Οι σπόροι τοποθετούνται στον ηθμό και καλύπτονται με ηθμό που είναι επίσης κεκορεσμένος με υγρασία. Το τρυβλίο καλύπτεται αεροστεγώς κατά το δυνατόν με μια πλαστική σακούλα ώστε να μην υπάρξουν μεγάλες απώλειες υγρασίας και τοποθετείται σε σκοτεινό χώρο θερμοκρασίας 21±2 °C.
2. Προμεταχείριση: Μετά δύο περίπου μέρες κόβονται ρίζες μήκους 1-2 cm.
3. Οι ρίζες τοποθετούνται για 3-5 περίπου ώρες σε κεκορεσμένο διάλυμα 1-bromonaphthalene σε θερμοκρασία 20 °C. Η θερμοκρασία αυτή είναι το πιο κριτικό στάδιο από το οποίο εξαρτάται η παρουσία μεταφάσεων στο υλικό. Αντί 1-bromonaphthalene μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικό διάλυμα 1-

bromonaphthalene, 8-υδροξυκοινόλη ή 0,05 % κολχικίνη ή ακόμα και πάγος. Τα καλύτερα πάντως αποτελέσματα παρατηρούνται με το κεκορεσμένο διάλυμα 1-bromonaphthalene

4. Σταθεροποίηση: Αφού περάσουν οι 3-5 ώρες στο κεκορεσμένο διάλυμα 1-bromonaphthalene οι ρίζες μεταφέρονται σε διάλυμα 3:1 (αλκοόλη 95% προς οξικό οξύ), όπου διατηρούνται στο ψυγείο (4 °C) για 24 ώρες.
5. Υδρόλυση: Οι ρίζες υδρολύονται σε 1N HCl στους 60 °C για 10 min.
6. Βαφή: Οι ρίζες παραμένουν για μισή ώρα σε χρωστική Fulgen.
7. Παρατήρηση: Αποκόπτεται το 1 mm του άκρου της ρίζας και τοποθετείται στο κέντρο μιας αντικειμενοφόρου πλάκας. Στη συνέχεια, προστίθεται μια σταγόνα ακετοκαρμίνης, τοποθετείται επάνω στο ακρορρίζιο μια καλυπτρίδα, θερμαίνεται η κάτω πλευρά της αντικειμενοφόρου ελαφρά, πιέζεται η καλυπτρίδα και ακολουθεί η παρατήρηση στο μικροσκόπιο. **Προσοχή :** όταν θερμαίνεται η αντικειμενοφόρος πλάκα θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην καεί το υλικό.

2.2.2 Μέθοδος Cambridge (Bennett 1977).

Οι σπόροι μουσκεύονται για 24h σε αποσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου (21°C), αφού προηγούμενα η επιφάνεια τους αποστειρώθηκε σε 1% διάλυμα sodium hypochlorite για 10 min. Στη συνέχεια οι σπόροι τοποθετούνται σε χάρτινους ηθμούς που είναι κεκορεσμένοι με νερό σε τριβλία petri και αποθηκεύονται στους 4 °C για 1 έως 3 εβδομάδες. Τα τριβλία μεταφέρονται σε ένα ειδικό προβλαστήριο στους 24 °C για 24h για να διεγερθεί η βλάστηση και να αυξηθεί ο αριθμός κυττάρων στη μίτωση. Οι ρίζες κόβονται και τοποθετούνται σε κεκορεσμένο διάλυμα 1-bromonaphthalene για 4-5h στους 21 °C. Στη συνέχεια οι ρίζες μεταφέρονται σε 45% οξικό οξύ και παραμένουν στο ψυγείο, για όλη την νύχτα. Κατόπιν οι ρίζες υδρολύονται σε 1N HCl στους 60 °C για 12 min και χρωματίζονται σε λευκοβασική (leucobasic) φουξίνη για 1-4h σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τα ακρορίζια συνθλίβονται σε 45% οξικό οξύ.

2.2.3. Μέθοδος Winthtrop (Dille και Gustafson 1990 ).

Οι σπόροι προετοιμάζονται για μεταχείριση όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Cambridge), ενώ οι ρίζες τοποθετούνται σε φιαλίδια που περιέχουν αποσταγμένο νερό και κατόπιν σε δοχεία που περιέχουν θριψαλισμένο πάγο στους 1 °C για 20h. Κατόπιν τοποθετούνται σε 1-bromonaphthalene για 3,5 h στους 21 °C. Η σταθεροποίηση γίνεται σε 45% οξικό οξύ και είναι ολονύκτια στους 5 °C. Το διάλυμα

σταθεροποίησης αντικαταθίσταται με 0,2 N HCl όπου οι ρίζες παραμένον στους 21 °C για 1h. Η βαφή γίνεται σε διάλυμα 4% οξικής ορχεΐνης για 30 min στους 21 °C. Η χρωστική αντικαθίσταται με αποσταγμένο νερό και οι ρίζες αποθηκεύονται για διάστημα έως 5 εβδομάδων στο ψυγείο στους 5 °C. Οι ρίζες διαβρέχονται με 45% οξικό οξύ, για τουλάχιστον 5 min προ της σύνθλιψης.

2.2.4 Μέθοδος οξικής ορχεΐνης (Mujeeb-Kazi και Miranda, 1985).

1. Το φύτρωμα των σπόρων γίνεται όπως και στην προηγούμενη τεχνική.
2. Τα ακρορίζια κατεργάζονται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει 0,05% κολχικίνη, 0,25% 8-hydroxyquinoline και 25 σταγόνες (ανά 100ml) διμεθυλοθειοξείδιο (dimethylsulfoxide DMSO), για 2-3h σε θερμοκρασία δωματίου (21±1 °C).
3. Η σταθεροποίηση και στερέωση του υλικού γίνεται σε 2% οξική ορχεΐνη στους 4 °C για 3 ημέρες ή και περισσότερο.
4. Το μεριστωματικό τμήμα του ακροριζίου συνθλίβεται σε 45% οξικό οξύ.

2.2.5 Μέθοδος Ramanna-Abdalla (1970).

Η μέθοδος αυτή είναι παραλλαγή της 1ης μεθόδου. Ακρορίζια που κατεργάστηκαν με 8-υδροξυκοΐνολινη για 24h, σταθεροποιούνται σε διάλυμα Carroy 2 (απόλυτη αλκοόλη : χλωροφόρμιο : οξικό οξύ) σε αναλογία 6:3:1 για 24h, υδρολύονται σε 1N HCl στους 60 °C σε υδατόλουτρο για 8 min, βάφονται σε χρωστική fulgen και συνθλίβονται σε 1% οξική καρμίνη.

2.2.6 Μέθοδος μικτή.

1. Η φύτρωση των σπόρων γίνεται κατά τα γνωστά.
2. Το υλικό τοποθετείται σε ένα φιαλίδιο όπου έχουν προστεθεί 20ml αποσταγμένου νερού. Το φιαλίδιο τοποθετείται στο κέντρο ενός δοχείου όπου έχει προστεθεί πάγος. Στη συνέχεια, το δοχείο με τον πάγο και το υλικό τοποθετείται στο ψυγείο για 24h.
3. Η σταθεροποίηση κι στερέωση γίνεται σε διάλυμα 3:1 όπου παραμένουν τα ακρορίζιά για 10 ημέρες.
4. Αφού περάσει το 10ήμερο, οι ρίζες τοποθετούνται σε 1,5% οξικής ορχεΐνης για 20 ώρες.
5. Οι ρίζες τοποθετούνται σε διάλυμα 1:9 (2N HCl : 1,5% οξικής ορχεΐνης) για 2 ώρες.
6. Τα παρασκευάσματα γίνονται σε μια σταγόνα οξικής καρμίνης κατά τα γνωστά.

Αντί της οξικής καρμίνης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί μια σταγόνα 45% οξικού οξέος.

2.2.7 Μέθοδος Eupen και Ruo (1985).

Η μέθοδος αυτή είναι επίσης παραλλαγή της 1ης μεθόδου. Οι ρίζες αφήνονται για 18-20h σε 1-bromonaphthalene, η σταθεροποίηση γίνεται σε 3:1 για 24h ή υδρόλυση σε 1N HCl στους 60 °C για 12 min. Το βάψιμο γίνεται με βασική φουξίνη. Η μέθοδος επίσης περιλαμβάνει προμεταχείριση σε 2% διάλυμα πεκτινάσης (Sigma) και σύνθλιψη σε μια σταγόνα οξικής καρμίνης.

## 2.3 Οι τεχνικές ζώνωσης (Ξυνιάς 1994).

Οι τεχνικές ζώνωσης (banding techniques) είναι οι εξής : η C-ζώνωση, η G-ζώνωση, η R-ζώνωση και η N-ζώνωση. Ζώνη καλείται ένα τμήμα του χρωμοσώματος που είναι σαφώς αναγνωρίσιμο από τα διπλανά του τμήματα, έχοντας είτε πιο σκοτεινό, είτε πιο ανοιχτό χρώμα.

### 2.3.1 C-ζώνωση.

Με τη C-ζώνωση γίνεται εκλεκτική βαφή της δομικής ετεροχρωματίνης (constitutive heterochromatin) που είναι η κοινή μορφή της ετεροχρωματίνης και βρίσκεται άφθονη κοντά στο κεντρομερές, στα τελομερή και στην περιοχή του οργανωτή του πυρηνίσκου (Schulz-Schaeffer 1980). Είναι ορατή κατά την μεσόφαση και πρόφαση αλλά όχι στην μετάφαση, όπου γίνεται ορατή μόνο μετά από ειδική επεξεργασία.

Έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες που προσπαθούν να εξηγήσουν τι συμβαίνει και εμφανίζονται οι C-ζώνες, αλλά δεν έχουν ξεκαθαριστεί ακόμα οι ακριβής λόγοι.

Η ειδική ζώνωση κάθε ζευγαριού ομόλογων χρωμοσωμάτων, κατά την τεχνική της C-ζώνωσης, είναι πολύ σταθερή και επιτρέπει την ταυτοποίηση των χρωμοσωμάτων και την αναγνώρισή τους (Darvey και Gustafson 1975, Bebeli και Kaltsikes 1985). Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση

μετατοπίσεων (Lukaszewezki και Gustafson 1983) ελλείψεων (Gustafson κ.α. 1983) και χρωμοσωματικών αντικαταστάσεων (Badaev κ.α. 1985). Η τεχνική της C-ζώνωσης έχει εφαρμοστεί σε πολλά γένη και είδη της οικογένειας *Poaceae* (Weimark 1975, Gustafson κ.α. 1976, Bennett κ.α. 1977, Seal 1982, Seal και Benett 1982, Hutchinson κ.α. 1983, Endo και Gill 1984, Owen και Larter 1988 κ.α.).

2.3.2 Η G-ζώνωση.

Η G-ζώνωση είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική ζώνωσης. Και στην G-ζώνωση βάφονται τα χρωμομερή (ονομάστηκε G από το αρχικό της χρωστικής Giemsa που χρησιμοποιεί). Εφαρμόζεται σε ζωικά χρωμοσώματα κυρίως και μέχρι πρόσφατα δεν αποκάλυπτε ζώνες σε όλα τα φυτά. Όμως οι Wang και Kao (1988), κατάφεραν να αναπτύξουν G-ζώνες σε φυτικά χρωμοσώματα.

2.3.3 Η Q-ζώνωση.

Πρόκειται για την πιο παλιά τεχνική ζώνωσης. Κατά τον Coming (1978) η Q-ζώνωση αναπτύχθηκε από τον Caspersson και την ομάδα του το 1968, που χρησιμοποίησαν την quinacrine mustard (Q=quinacrine), για να βάψουν χρωμοσώματα. Μετά από *in vitro* πειράματα, δείχθηκε ότι DNA πλούσιο σε αδενίνη, θυμίνη αύξησε το φθορισμό της quinacrine. Για το λόγο αυτό, η τεχνική της Q-ζώνωσης χρησιμοποιείται για ανίχνευση περιοχών πλούσιων σε αδενίνη και θυμίνη.

2.3.4 Η R- και η T-ζώνωση.

Ονομάζεται αντίστροφη ζώνωση (R=reverse). Οι Dutrillaux και Lejeune (Coming 1978) ανέπτυξαν αυτή την τεχνική στην οποία χρησιμοποιούταν η χρωστική Giemsa. Κατά την R-ζώνωση, βάφονται περιοχές που είναι πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσύνη. Η T- ζώνωση είναι μια παραλλαγή της R-ζώνωσης με την οποία βάφονται μόνο τα τελομερή (T = telomers).

2.3.5 Η N-ζώνωση.

Η τεχνική της Ν-ζώνωσης αναπτύχθηκε το 1973 από τους Matsui και Sakaki. Με σκοπό να βαφτεί η περιοχή του οργανωτή του πυρηνίσκου. Η Ν-ζώνωση και η C-ζώνωση είναι οι καλύτερες μέθοδοι, όσον αφορά στα φυτικά υλικά (Gerlach 1977). Η χρήση τους γίνεται για την αναγνώριση χρωμοσωμάτων, την ανίχνευση μετατοπίσεων και την απομόνωση σειρών με αντικατάσταση ενός χρωμοσώματος με ένα άλλο (Islam 1980). Ύστερα από έρευνα αποδείχθηκε ότι οι Ν-ζώνες δεν ανταποκρίνονται σε περιοχές του οργανωτή του πυρηνίσκου αλλά σε θέσεις δορυφορικού DNA, που περιέχει πολυπυριμιδικά ίχνη (Gerlach 1977).

## 2.4 Στάδια δημιουργίας χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων.

Η διαδικασία που ακολουθείται για το σκοπό αυτό περιλαμβάνει τα παρακάτω τέσσερα στάδια.

(α) Στάδιο δημιουργίας μεριστωματικού υλικού: σπόρου του προς μελέτη φυτού τοποθετούνται στο ειδικό προβλαστήριο ή αν αυτό δεν είναι δυνατόν σε τρυβλία Petri, για να φυτρώσουν. Μόλις οι ρίζες αποκτήσουν μήκος 1-2cm αποκόπτονται και αρχίζει το επόμενο στάδιο.

(β) Στάδιο αρχικής μεταχείρισης του υλικού: το στάδιο αυτό αποσκοπεί στο σταμάτημα της κυτταρικής διαίρεσης και στην καταστροφή των ινών της πυρηνικής ατράκτου. Το τελευταίο είναι απαραίτητο για να μπορέσουν τα χρωμοσώματα να διασκορπιστούν και να είναι δυνατή η μελέτη τους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η κύρια δύναμη που συγκρατεί τα χρωμοσώματα στο ισημερινό επίπεδο προέρχεται από τις ίνες της πυρηνικής ατράκτου. Για να γίνουν δυνατά το σταμάτημα των κυτταρικών διαιρέσεων και η καταστροφή των ινών της ατράκτου, χρησιμοποιούνται διάφορες ουσίες, συνήθως με την μορφή διαλυμάτων. Οι πιο κοινές από τις ουσίες αυτές είναι : η κολχικίνη (χρησιμοποιείται σε διάφορες συγκεντρώσεις), η υδροξυκοϊνολίνη (χρησιμοποιείται ως υδατικό ή κεκορεσμένο διάλυμα), το 1-bromonaphthalene και το παγωμένο νερό (ένα φιαλίδιο με αποσταγμένο νερό, τοποθετείται σε δοχείο που είναι γεμάτο με μικρά κομμάτια πάγου και όλα αυτά μπαίνουν στο ψυγείο).

(γ) Στάδιο σταθεροποίησης του υλικού: σταθεροποίηση είναι μια προσπάθεια γρήγορης θανάτωσης του υλικού κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να διατηρηθούν οι εσωτερικές τους δομές σαν να ήταν κύτταρα ζωντανά. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για το σκοπό αυτό είναι: 45% οξικό οξύ, οξική αλκοόλη (3

μέρη αλκοόλης σε 1 μέρος οξικό οξύ), διάλυμα 3:1:1 (3 μέρη αλκοόλης: 1 μέρος οξικό οξύ: 1 μέρος χλωροφόρμιο) και 1,5% οξικής ορχεΐνης.

# III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 1. Οι πρωτογενείς σειρές της σιταρόβριζας.

Για το σκοπό της παρούσης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι σπόροι από 20 πρωτογενείς σειρές εξαπλοειδούς σιταρόβριζας (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Οι σειρές της σιταρόβριζας και η γενεολογία τους.

| Σειρά σιταρόβριζας | Γενεολογία |
|---|---|
| 1. | Λήμνος x 1η διαλογή βρίζας |
| 2. | Λήμνος x 2η διαλογή βρίζας |
| 3. | Λήμνος x 2η διαλογή βρίζας |
| 4. | Λήμνος x 2η διαλογή βρίζας |
| 5. | Λήμνος x 5η διαλογή βρίζας |
| 6 | Λήμνος x 6η διαλογή βρίζας |
| 7. | Λήμνος x 6η διαλογή βρίζας |
| 8. | Λήμνος x 8η διαλογή βρίζας |
| 9. | Λήμνος x 8η διαλογή βρίζας |
| 10. | Λήμνος x 10η διαλογή βρίζας |
| 11. | Λήμνος x 12η διαλογή βρίζας |
| 12. | Λήμνος x 12η διαλογή βρίζας |
| 13. | Λήμνος x 13η διαλογή βρίζας |
| 14. | Λήμνος x 16η διαλογή βρίζας |
| 15. | Λήμνος x 18η διαλογή βρίζας |
| 16. | Λήμνος x 18η διαλογή βρίζας |
| 17. | Λήμνος x 18η διαλογή βρίζας |
| 18. | Λήμνος x 18η διαλογή βρίζας |
| 19.α. | Πληθυσμός Αιγαίου x 17η διαλογή βρίζας |
| 19.β. | Πληθυσμός Αιγαίου x 17η διαλογή βρίζας |
| 20.α. | Πληθυσμός Αιγαίου x 17η διαλογή βρίζας |
| 20.β. | Πληθυσμός Αιγαίου x 17η διαλογή βρίζας |

Οι σειρές αυτές δημιουργήθηκαν από Ελληνικό γενετικό υλικό κατά το παρελθόν (Ξυνιάς 1997). Ως γονείς των σειρών αυτών χρησιμοποιήθηκαν δυο ποικιλίες σκληρού σιταριού (η ποικιλία Λήμνος και ο πληθυσμός του Αιγαίου) και 20 διαλογές βρίζας. Η

ποικιλία Λήμνος έχει δημιουργηθεί στο Ινστιτούτο Σιτηρών Θεσσαλονίκης και χρησιμοποιήθηκε λόγω της ανθεκτικότητας που έχει στις χαμηλές θερμοκρασίες. Ο πληθυσμός του Αιγαίου έχει χαρακτηριστικά μαύρα άγανα και είναι πολύ κοντός. Οι 20 διαλογές της βρίζας που χρησιμοποιήθηκαν στις διασταυρώσεις, περιελάμβαναν τα 5 αποδοτικότερα και 5 ολιγότερο αποδοτικά φυτά δυο κύκλων επιλογής απουσία ανταγωνισμού.

## 2. Η τροποποιημένη τεχνική της οξικής ορχείνης (Ξυνιάς 1997).

### 2.1 Παρασκευή των απαιτούμενων διαλυμάτων.

(α) 45% οξικό οξύ: σε 55ml αποσταγμένου νερού προστίθενται 45%ml οξικού οξέος ().

(β) 1,5% οξικής ορχείνης: 1,5g ορχείνης προστίθεται σε μια κωνική φιάλη, όπου έχουν θερμανθεί 45ml οξικού οξέος (για να διαλυθεί καλύτερα η ορχείνη). Η κωνική τοποθετείται σε υδατόλουτρο (water bath), όπου θα παραμένει για βρασμό για 3 ώρες. Κατά τη διάρκεια των 3 ωρών θα πρέπει κατά διαστήματα να ανακινείται η κωνική για να διαλυθεί καλύτερα η ορχείνη. Κατόπιν προστίθενται σταδιακά 55ml αποσταγμένου νερού, οπότε το διάλυμα 1,5% οξικής ορχείνης είναι έτοιμο.

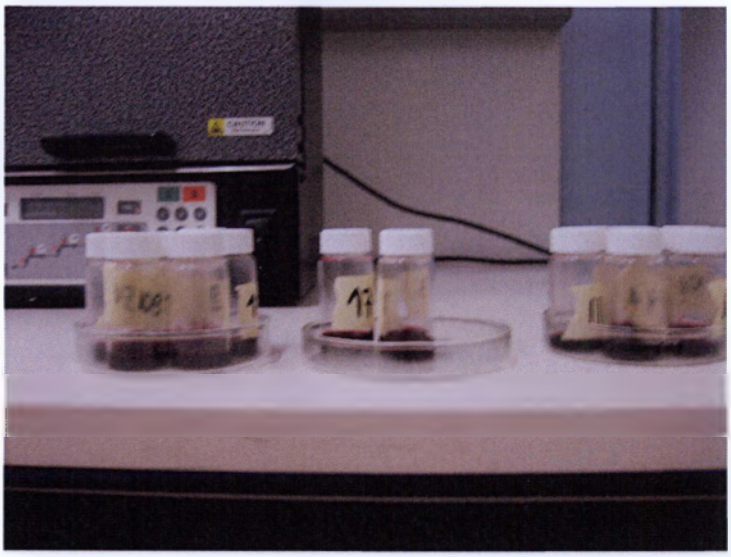
(γ) κεκορεσμένο διάλυμα 1-βρωμοναφθαλινίου: μια σταγόνα 1-βρωμοναφθαλινίου τοποθετείται σε φιαλίδιο που περιέχει 20ml αποσταγμένο νερό. Το διάλυμα αναταράσσεται φυσώντας αέρα με μια πιπέτα. Χρησιμοποιείται αμέσως το υπερκείμενο διάλυμα (στον πυθμένα έχει κατακαθίσει ίζημα).

### 2.2 Η τεχνική της δημιουργίας χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων.

(α) Δημιουργία μεριστωματικού υλικού: σε ένα τρυβλίο Petri τοποθετούνται σπόροι του προς μελέτη φυτού, επάνω σε βρεγμένο χάρτινο ηθμό, από το οποίο έχει αφαιρεθεί η περίσσεια του νερού. Κατόπιν οι σπόροι καλύπτονται από επίσης βρεγμένο ηθμό, που τοποθετούνται έτσι ώστε να ακουμπά όλους τους σπόρους. Το τρυβλίο σκεπάζεται με το καπάκι του και κλείνεται αεροστεγώς με ειδική χαρτοταινία, για να αποφευχθεί η απώλεια της υγρασίας (Εικόνα 1). Τα τρυβλία με τους σπόρους τοποθετούνται για δυο μέρες σε θερμοκρασία 24°C.

Εικόνα 1. Φύτρωμα σπόρων πρωτογενών σειρών

(β) Αρχική μεταχείριση του υλικού: κόβονται ρίζες μήκους 1-2cm και τοποθετούνται στο κεκορεσμένο διάλυμα το 1-βρωμοναφθαλινίου, όπου παραμένουν 5 ώρες στους 18-20°C.



Εικόνα 2. Ρίζες σε διάλυμα1,5% οξικής ορχείνης

(γ) Σταθεροποίηση: οι ρίζες μεταφέρονται από το κεκορεσμένο διάλυμα του 1-βρωμοναφθαλινίου σε ένα άλλο φιαλίδιο που περιέχει διάλυμα 1,5% οξικής ορχείνης (Εικόνα 2), όπου οι ρίζες παραμένουν για τουλάχιστον 20 ώρες στους 4°C. Το διάλυμα 1,5% οξικής ορχείνης έχει το πλεονέκτημα να βάφει το υλικό. Αν χρειαστεί οι ρίζες να μελετηθούν μετά από κάποιο διάστημα θα ήταν καλύτερο να αποθηκευτούν σε

διάλυμα οξικής αλκοόλης και όταν ετοιμαστούν τα παρασκευάσματα τότε να μπουν στο διάλυμα 1,5% οξικής ορχείνης.

(δ)χρωμοσωμικά παρασκευάσματα: με το ειδικό ανατομικό μαχαιρίδιο κόπτεται ένα μικρό τμήμα του ακροριζίου [μήκους 1mm] και τοποθετείται στο κέντρο μιας αντικειμενοφόρου πλάκας. Επάνω στο ακρορίζιο προστίθεται μια σταγόνα 45% οξικού οξέος και κατόπιν καλύπτεται με μια καλυπτρίδα. Αφού απομακρυνθεί η περίσσεια του οξέος με την βοήθεια του απορροφητικού χάρτινου ηθμού, η καλυπτρίδα χτυπιέται με το αντίθετο άκρο ενός μολυβιού ώστε να ανοίξουν τα χρωμοσώματα. Το σημείο αυτό είναι πολύ λεπτό και το χτύπημα θα πρέπει να είναι τόσο ώστε να μην σπάσει η καλυπτρίδα και να μην σκορπίσουν υπερβολικά τα χρωμοσώματα. Κατόπιν, η καλυπτρίδα πιέζεται με τον αντίχειρα με αρκετή δύναμη. Και το σημείο αυτό είναι πολύ λεπτό και θα πρέπει να μην μετακινηθεί η καλυπτρίδα με το πάτημα, για να μην καταστραφεί το υλικό. Η πίεση που θα ασκηθεί θα πρέπει να είναι κάθετη και το υλικό πιέζεται για να δημιουργηθεί ένα επίπεδο κυττάρων. Αφού γίνουν όλα αυτά, το παρασκεύασμα είναι έτοιμο για παρατήρηση και μελέτη στο μικροσκόπιο.

Για τη μελέτη κάθε μιας σειράς σιταρόβριζας χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστο 10 μεταφασικά κύτταρα.

# V. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## 1.Αριθμός χρωμοσωμάτων ανά σειρά.

Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων που καταμετρήθηκε στις πρωτογενείς σειρές της σιταρόβριζας κυμάνθηκε από 11 (σε δυο κύτταρα της σειράς Νο8) έως 42 στις σειρές 5 και 12 (Πίνακας 2). Σε 5 σειρές (Νο 1, 3, 5, 6, 7, 12, 13, 16 και ) δεν κατέστη δυνατή η καταμέτρηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων, γιατί οι ρίζες είχαν ξεφύγει από το κριτικό μήκος των 1-2cm. Τέλος, τα φυτά των σειρών 18, 19 και 20 δεν επιβίωσαν.

Πίνακας 2. Αριθμός χρωμοσωμάτων που καταμετρήθηκαν στις πρωτογενείς σειρές σιταρόβριζας.

| Πρωτογενής σειρά | Γενεολογία | ΑΡΙΘΜΟΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ |
|---|---|---|
| 1. | Λ x 1 | - |
| 2. | Λ x 2 | 16 / 25 |
| 3. | Λ x 2 | - |
| 4. | Λ x 2 | 36 / 28 / 16 / 9 |
| 5. | Λ x 5 | - |
| 6. | Λ x 6 | - |
| 7. | Λ x 6 | - |
| 8. | Λ x 8 | 36 / 11 / 12 / 11 |
| 9. | Λ x 8 | 37 / 42 / 22 / 18 |
| 10. | Λ x 10 | 35 / 29 / 20 / 21 |
| 11. | Λ x 12 | 28 / 26 / 16 |
| 12. | Λ x 12 | - |
| 13. | Λ x 13 | - |
| 14. | Λ x 16 | 20 / 19 / 28 / 34 / 15 / 16 |
| 15. | Λ x 18 | 42 |
| 16. | Λ x 18 | - |
| 17. | Λ x 18 | 40 / 29 / 28 /12 |
| 18. | Λ x 18 | - |
| 19. | Αιγ x 17 | - |
| 20. | Αιγ x 17 | - |

Η ύπαρξη μικρών αριθμών χρωμοσωμάτων είναι αναμενόμενη στην κυτταρογενετική ανάλυση (Ξυνιάς 1990) και απαιτείται πολύ καλή στερεοποίηση του υλικού για τη διατήρηση ολόκληρων των κυττάρων. Καθώς επίσης και η εμπειρία του ατόμου που φτιάχνει τα παρασκευάσματα παίζει σπουδαίο ρόλο. Οι σειρές 9 και 15 θα πρέπει να είναι ευπλοειδείς (αριθμός χρωμοσωμάτων ακέραιο πολλαπλάσιο του βασικού χρωμοσωματικού αριθμού που για τα σιτηρά είναι 7) γιατί ο αριθμός χρωμοσωμάτων που καταμετρήθηκε σε αυτές ήταν 42. Οι σειρές λοιπόν αυτές παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα διασταυρώσεων με μαλακό σιτάρι, ώστε να δημιουργηθούν νέες δευτερογενείς σειρές σιταρόβριζας. Οι δευτερογενείς σειρές είναι αυτές που έχουν γεωργικό ενδιαφέρον (Muntzing 1979). Επίσης, και η σειρά No17 στην οποία καταμετρήθηκαν 40 χρωμοσώματα θα πρέπει να είναι ευπλοειδής και το ζευγάρι που λείπει θα πρέπει να χάθηκε κατά το στάδιο δημιουργίας παρασκευασμάτων. Από τις υπόλοιπες σειρές οι No 4, 10 και 17 θα πρέπει να μελετηθούν εκ νέου, δεδομένου ότι ο αριθμός χρωμοσωμάτων που καταμετρήθηκε σε αυτές ήταν επίσης αρκετά υψηλός. Το προβληματικό στοιχείο στην εργασία αυτή ήταν η έλλειψη δυνατότητας να μελετηθούν και σειρές που να προέρχονται από τον πληθυσμό του Αιγαίου.

# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά θα μπορούσε να αναφερθεί ότι από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι δύο τουλάχιστον από τις πρωτογενείς σιταρόβριζας που μελετήθηκαν ήταν ευπλοειδείς. Μια τρίτη σειρά είχε επίσης πολύ μικρό ποσοστό ανευπλοειδίας και πιθανά να ήταν και αυτή ευπλοειδής και ένα ζευγάρι χρωμοσωμάτων να χάθηκε κατά το στάδιο δημιουργίας παρασκευασμάτων. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη ώστε να βρεθεί μετά πάσης βεβαιότητας το ποσοστό ανευπλοειδίας των Ελληνικών σειρών σιταρόβριζας.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Achremowicz, B., C. Tarkowski and E. Podgorska. 1987. Triticale grain during grinding and baking processes. *Cereal Res. Comun.* **15**: 301-307.

Afanaseva, N. I. 1985. The effectiveness of methods of colchicine treatment of $F_1$ wheat-rye hybrids in southern Dagestan. *Wheat, Barley and Triticale Abs.* **5**: 78.

Aniol, A. and J. P. Gustafson. 1984. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye and triticale. *Can. J. Genet. Cytol.* **26**: 701-705.

Badaev, N.S. , E.D. Badaeva, N.L. Bolsheva, N.G. Maximov, and A.V. Zelenin. 1985. Cytogenetic analysis of forms produced by crossing hexaploid triticale with common wheat. Theor. Appl. Genet. 70:536-541.

Baier, A. C., and J. P. Gustafson. 1996. Breeding strategies for triticale. p. p 563-569. In H. Guedes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (eds.) *Triticale: today and tomorrow.* Kluwer Academic Publishers, London.

Baier, A. C., D. J. Somers and J. P. Gustafson. 1996. Aluminum tolerance in triticale, wheat and rye. p. p. 437-444. In H. Guedes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (eds.) *Triticale: today and tomorrow.* Kluwer Academic Publishers, London.

Bebeli, P. J. and P. J. Kaltsikes. 1985. Karyotypic analysis of two durum wheat varieties. Can. J. Genet. Cytol. 27: 617-621.

Bennett, M. D. 1977. Heterochromatin, aberrant endosperm nuclei and grain shrivelling in wheat-rye genotypes. *Heredity* **39**: 411-419.

Bennett, M. D. and P. J. Kaltsikes. 1973. The duration of meiosis in a diploid rye, a hexaploid wheat and the hexaploid triticale derived from them. *Can. J. Genet. Cytol.* **15**: 671-679.

Ceoloni, C., L. Avivi and M. Feldman. 1984. Spindle sensitivity to colchicine of the *Ph1* mutant in common wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* **26**: 111-118.

CIMMYT. 1990. Results of the 1987-1988 triticale nurseries. Mexico, D. F.

Coming, D.E. 1978. Mechanism of chromosome banding and implications for chromosome structure. Anu. Rev. Genet. 12:25-46.

Cooper, K. V. and C. J. Driscoll. 1985. The production of primary triticales and the concept of adaptation to marginal conditions. p. p. 591-599. *Proceedings of*

*the 3rd Eucarpia Meeting of the cereal section on triticale*. Clermont-Ferrant, France, 2-5 July 1984.

Darvey, N. L. and J. P. Gustafson. 1975. Identification of rye chromosomes in wheat-rye lines and triticale by heterochromatin bands. *Crop Sci.* **15**: 239-243.

Endo, T.R. and B.S. Gill. 1984. The heterochromatin distribution and genome evolution in diploid species of Elymus and agropyron. Can. J. Genet. Cytol. 26:669-678.

Gerlach, W.L., 1977. N-banded karyotypes of wheat species. Chromosoma, 62:49-56.

Gordei, I. A. and L. F. Khodortsova. 1986. Genetic basis for the production of triticale. IV. Embryo culture method in producing primary hexaploid triticales. *Wheat, Barley and Triticale Abs.* **4**: 93.

Gunther, T., C.-U. Hesemann and G. Oettler. 1996. Gelelectophoretic gliadin patterns of euplasmic and alloplasmic primary triticale and the corresponding wheat parents. p. p.211-216. In H. Guedes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (eds.) *Triticale: today and tomorrow*. Kluwer Academic Publishers, London.

Gupta, P. K. 1995. Cytogenetics. Rastogi and Company Publishers, India, 417pp.

Gupta, P. K. and P. M. Priyadarshan. 1982. Triticale: present status and future prospects. *Adv. In Genet.* **21**: 255-345.

Gustafson, J. P., A. Lukaszewski and M. D. Bennett. 1983. Somatic delation and redistribution of telomeric heterochromatin in the genus *Secale* and in triticale. *Chromosoma* **88**:293-298.

Gustafson, J. P., L.E. Evans, and K. Josifek. 1976. Identification of chromosomes in *Secale* montanum and individual *S.* Montanum chromosome additions to "Kharkow" wheat by heterochromatin bands and chromosome morphology. Can. J. Genet. Cytol. 18:334-343.

Haesaert, G. and A. De Baets. 1996. Preharvest sprouting resistance in triticale: preliminary results. p. p.627-634. In H. Guedes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (eds.) *Triticale: today and tomorrow*. Kluwer Academic Publishers, London.

Hutchinson, J., T.E. Miller, and S.M. Reader. 1983. C-banding at meiosis as a means of assessing chromosome affinities in the triticeae . Can. J. Genet. Cytol. 25:314-323.

Immonen, A. S. T. 1996. Influence of media and growth regulators on somatic embryogenesis and plant regeneration for production of primary triticales. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **44**: 45-52.

Islam, A.K.M.R., 1980. Identification of wheat-barley additions lines with N-Banding of chromosomes. Chromosoma, 76:365-373.

Jouve, N. And C. Soler. 1996. Triticale genomic and chromosome's history. p. p. 91-118. In H. Guedes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (eds.) *Triticale: today and tomorrow.* Kluwer Academic Publishers, London.

Jung, C. and T. Lelley. 1985. Genetic interactions between wheat and rye genomes in triticale. 2. Morphological and yield characters. *Theor. Appl. Genet.* **70**: 427-432.

Kaltsikes, P. J. 1974b. Methods for triticale production. *Z. Pflanzenzüchtg.***71**: 264-286.

Kaltsikes, P. J. and J. P. Gustafson. 1985. The heterochromatin story in triticale. In Genetics and Breeding of triticale. p. p.5-13. *Proceedings of the 3rd Eucarpia Meeting of the cereal section on triticale.* Clermont-Ferrant, France, 2-5 July 1984.

Kleiger, G. and A. Fossati. 1996. Production and fertility of hexaploid primary triticales. p. p. 165-171. In H. Guedes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (eds.) *Triticale: today and tomorrow.* Kluwer Academic Publishers, London.

Lange, W. and B. Wojciechowska. 1976. The crossing of common wheat (*Triticum aestivum* L.) with cultivated rye (*Secale cereale* L.). I. Crossability, pollen grain germination and pollen tube growth. *Euphytica* **25**: 609-620.

Larter, E. N. 1976. Triticale. P. P. 117-120. In N. W. Simmonds (ed.) *Evolution of crop plants.* Longman Publisher, London.

Lelley, T. 1992. Triticale; still a promise? (A review). *Plant Breeding* **109**: 1-17.

Limin, A. E. and D.B. Flower. 1982. The effect of cytoplasm on cold hardiness in alloplasmic rye (*Secale cereale* L.) and triticale. *Can. J. Genet. Cytol.* **26**: 405-408.

Limin, A. E., J. Dvorak and D. B. Flower.1985. Cold hardiness in hexaploid triticale. *Can. J. Pl. Sci.* **65**: 487-490.

Lukaszewski, A. J. and J. P. Gustafson. 1983. Translocations and modifications of chromosomes in triticale X wheat hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **65**: 239-248.

Matsui, S. And Sakaki, M., 1973. differential staining of nucleolus organisers in mammalian chromosomes. Nature, 246:148-150.

Mosse, J., J. C. Heuet and J. Baudet. 1988. The amino acid composition of triticale grain as a function of Nitrogen content: comparison with wheat and rye. *J. of Cereal Sciences* **7**: 49-60.

Mujeeb-Kazi, A. and J. L. Miranda. 1985. Enhanced resolution of somatic chromosome constrictions as an aid to identifying intergeneric hybrids among some *Triticeae*. *Cytologia* **50**: 701-709.

Muntzing, A. 1974. Historical review of the development of triticale. p. p. 13-30. *Proc. Int. Symp.*, El Batan Mexico, 1993.

Muntzing, A. 1979. Triticale, results and problems. In Advances in Plant Breeding, Z. *Pflanzenzuecht Suppl.* **10**, 103p.

Oettler, G. 1996. Effect of low nitrogen output on agronomic traits in triticale. p. p. 603-608. In H. Guedes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (eds.) *Triticale: today and tomorrow*. Kluwer Academic Publishers, London.

Owen, M. R. L. And E. N. Larter. 1988. The quantitative relationship between telomeric heterochromatin and secalin synthesis in *Secale cereale* L. *Euphytica* **39**: 279-284.

Pfieffer, W. H. 1996. Triticale: potential and research status of man-made cereal crop. p. p.571-580. In H. Guedes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (eds.) *Triticale: today and tomorrow*. Kluwer Academic Publishers, London.

Qualset, C. O. and H. Guedes-Pinto. 1996. Triticale: Milestones, Millstones and World Food. p. p.5-9. In H. Guedes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (eds.) *Triticale: today and tomorrow*. Kluwer Academic Publishers, London.

Ramanna M.S and Abdalla M.M.F. 1970._Fertility, late βlight resistance and genome relutionship in an interspecific hybrid, solanum polytrichon RVOBXS Phurejn Juz, et Buk. Euphitica, 19 317-326

Riley, R. and V. Chapman. 1967. The inheritance in wheat of crossability with rye. *Genet. Res. Camb.* **5**: 259-267.

Roupakias, D. G. and P. J. Kaltsikes. 1977a. Genomic effects on the duration of meiosis in triticale and its parental species. *Can. J. Genet. Cytol.* **19**: 331-343.

Roupakias, D. G. and P. J. Kaltsikes. 1977b. Independence of duration of meiosis and chromosome pairing in hexaploid triticale. *Can. J. Genet. Cytol.* **19**: 345-354.

Roupakias, D. G., P. J. Kaltsikes and K. D. Krolow. 1979. The meiotic cycle of tetraploid triticale. p. p. 1218-1227. *Proc. Int. Wheat Genet. Symp.* , 5th 1978 New Delhi.

Schulz-Schaeffer, J. 1980. Cytogenetics: plants, animals, humans. Springer-Verlag, N.York, Heidelberg, Berlin. 446pp.

Seal, A.G. 1982. C-banded wheat chromosomes in wheat and triticale. Theor. Appl. Genet. 63:39-47.

Shao, Z. Z. and T. Taira. 1990. Production of Primary Triticale from Calluses of Immature Abnormal Hybrid Embryos Between *Triticum durum* and *Secale cereale*. *Plant Breeding* **105**: 81-88.

Shilko, T. S., I. V. Kul'minskaya, T. V. Podunova and V.E. Shimko.1994. Results of the colchicine treatment of $F_1$ wheat- rye hybrids obtained using self-fertile winter lines. *Wheat Barley and Triticale Abs.* **12**:401.

Sowa, W. And H. Krysiak. 1996. Outcrossing in winter triticale, measured by occurrence of tall plants. p. p. 593-596. In H. Guedes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (eds.) *Triticale: today and tomorrow*. Kluwer Academic Publishers, London.

Taira, T., Z. Z. Shao and E. N. Larter. 1991. The effect of colchicine as a chromosome doubling agent for wheat-rye hybrids as influenced by *pH*, method of application and post-treatment environment. *Plant Breeding* **106**: 329-333.

Tanner, D. G. and D. E. Falk. 1981. The interaction of genetically controlled crossability in wheat and rye. *Can. J. Genet. Cytol.* **23**: 27-32.

Varughese, G. 1996. Triticale: present status and challenges ahead. p. p.13-20. In H. Guedes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (eds.) *Triticale: today and tomorrow*. Kluwer Academic Publishers, London.

Varughese, G., T. Barker and E. Saari. 1987. Triticale. CIMMYT, Mexico D. F. 32p.

Wang, H.C. and K.N. Kao. 1988. G-banding in plant chromosomes. Genome 30:48-51.

Warzecha, R. and K. Salak-Warzecha. 1996. Comparative studies on CMS sources in rye. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* **35**: 39-49.

Weimarck, A. 1975. Heterochromatin polymorphism in the rye karyotype as detected by the Giemsa C-banding technique. Heteditas 79:293-300.

Weipert, D. 1996. Pentosans as selection traits in rye breeding. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* **35**: 109-119.

Winkle, M. E. and G. Kimber. 1976. Colchicine treatment of hybrids in the *Triticinae*. *Cereal Res. Comm.* **4**: 317-319.

Zillinsky, F. J. 1974. The development of triticale . *Adv. in Agron.* **26**: 315-348.

Ελληνική Επιστημονική Εταιρεία Γενετικής Βελτίωσης Φυτών. 1994. Αγγλοελληνικό Λεξικό. 96 σελ.

Καλτσίκης, Π. Ι. 1985. Βελτίωση Φυτών. Καραμπελόπουλος Αθήνα 474 σελ.

Ξυνιάς, Ι. Ν. 1990. Αριθμός χρωμοσωμάτων σίκαλης σε τέσσερις ελληνικές ποικιλίες τριτικάλε (X *Triticosecale* Wittmack). Θεσσαλονίκη, 67 σελίδες.

Ξυνιάς, Ι. Ν. 1991. Τάσεις δημιουργίας ποικιλιών τριτικάλε: χθες και σήμερα. *Βελτιωτικά* **7**: 25-30.

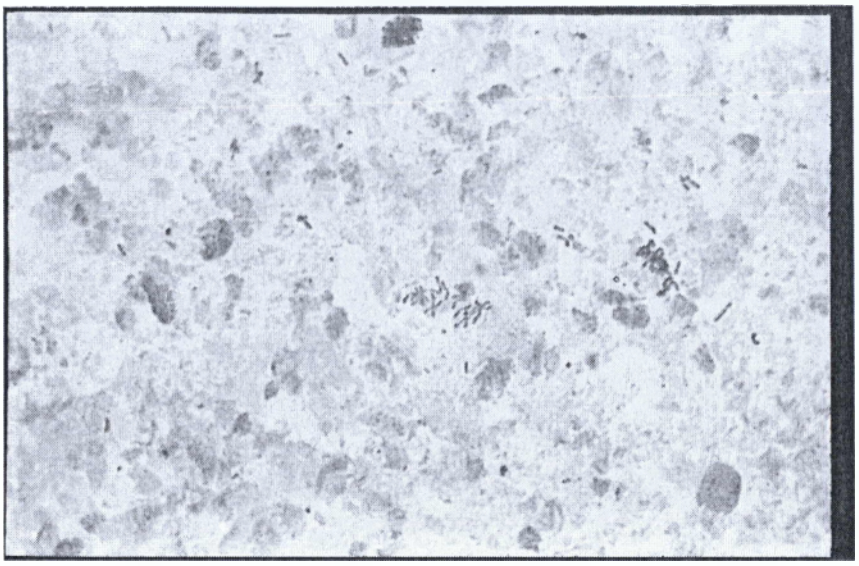
Ξυνιάς, Ι. Ν. 1994. Τεχνικές ζώνωσης για την αναγνώριση των χρωμοσωμάτων των φυτών. *Γεωργική Έρευνα* **18**:32-37.

Ξυνιάς, Ι. Ν. 1997. Παραλλακτικότητα ενός ελληνικού πληθυσμού σίκαλης και χρησιμοποίησή του στη δημιουργία πρωτογενών σειρών εξαπλοειδούς τριτικάλε (X *Triticosecale* Wittmack). Διδακτορική Διατριβή. Θεσσαλονίκη, 149 σελ.

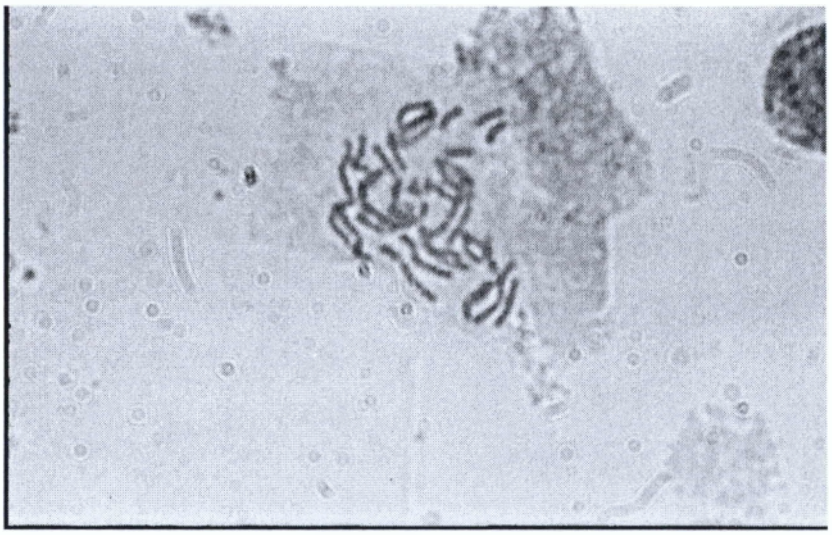
# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκαν νέες πρωτογενείς σειρές σιταρόβριζας, με σκοπό να προσδιοριστεί ο αριθμός χρωμοσώμων και κατ' επέκτασιν το ποσοστό της ανευπλοειδίας των πρωτογενών αυτών σειρών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη μέθοδος της οξικής ορχεΐνης. Από τα αποτελέσματα της έρευνας προέκυψε ότι υπάρχει ένα μεγάλο ποσοστό ανευπλοειδίας στις πρωτογενείς σειρές σιταρόβριζας. Δυο από τις σειρές βρέθηκαν να είναι ευπλοειδείς, να έχουν δηλαδή 42 χρωμοσώματα. Μια τρίτη σειρά είχε επίσης πολύ μικρό ποσοστό ανευπλοειδίας και πιθανά να είναι και αυτή ευπλοειδής και ένα ζευγάρι χρωμοσωμάτων να χάθηκε κατά το στάδιο δημιουργίας παρασκευασμάτων. Οι υπόλοιπες σειρές της σιταρόβριζας βρέθηκαν να είναι ανευπλοειδείς, με διάφορο αριθμό χρωματοσωμάτων. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη ώστε να βρεθεί μετά πάσης βεβαιότητας το ποσοστό ανευπλοειδίας των Ελληνικών σειρών σιταρόβριζας.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



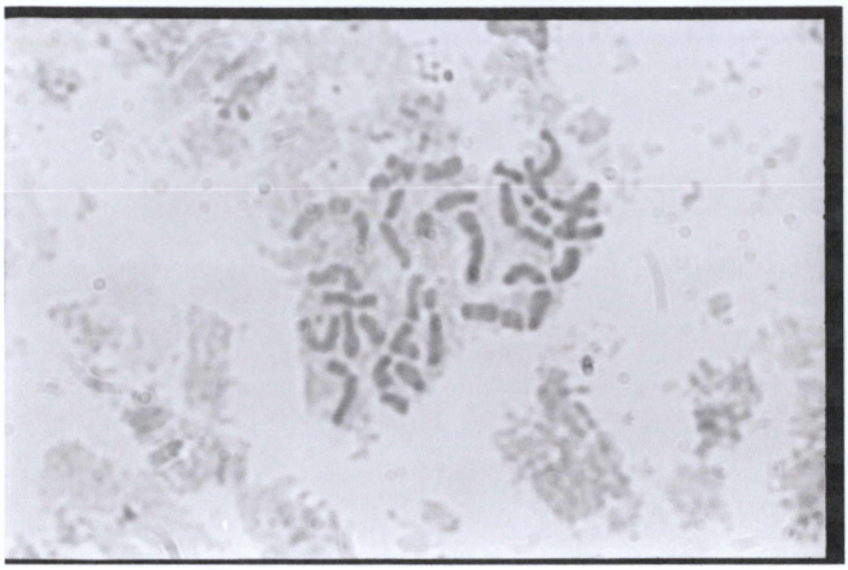
Εικόνα 3. Ομάδες χρωμοσωμάτων της πρωτογενούς σειράς Νο 17 (Λήμνος Χ 18η διαλογή της βρίζας).



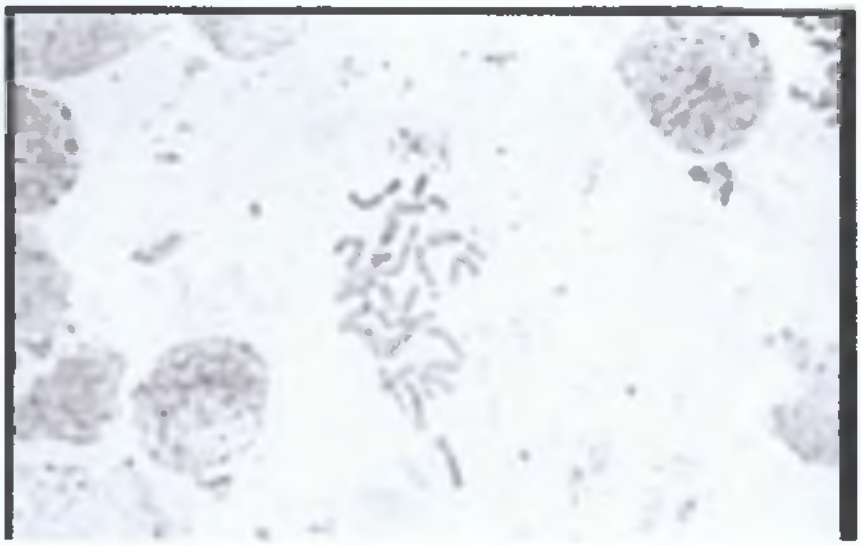
Εικόνα 4. Γονιδίωμα της πρωτογενούς σειράς Νο 11 (Λήμνος Χ 12η διαλογή της βρίζας).

Εικόνα 5. Γονιδίωμα της πρωτογενούς σειράς Νο 11 (Λήμνος Χ 12$^{η}$ διαλογή της βρίζας).

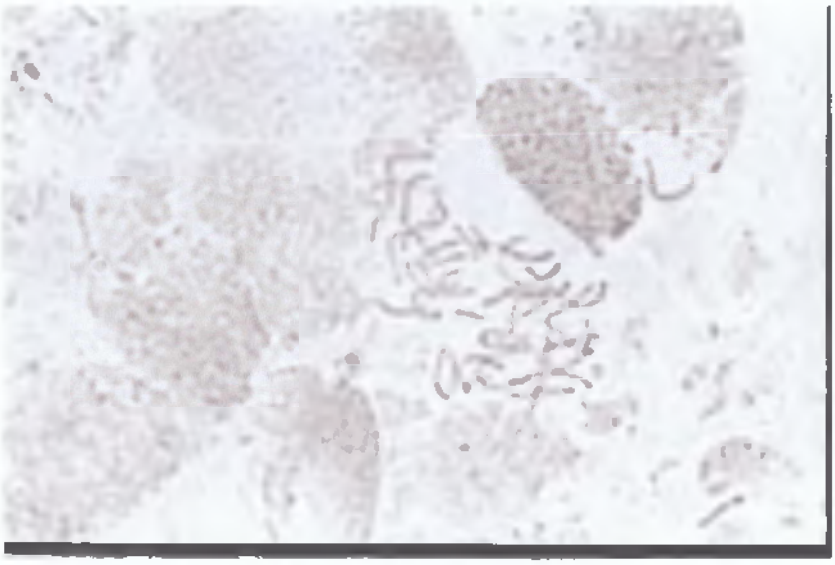
Εικόνα 6. Γονιδίωμα της πρωτογενούς σειράς Νο15 (Λήμνος Χ 18$^{η}$ διαλογή της βρίζας).



Εικόνα 7. Γονιδίωμα της πρωτογενούς σειράς Νο 10 (Λήμνος x $10^{η}$ διαλογή της βρίζας).

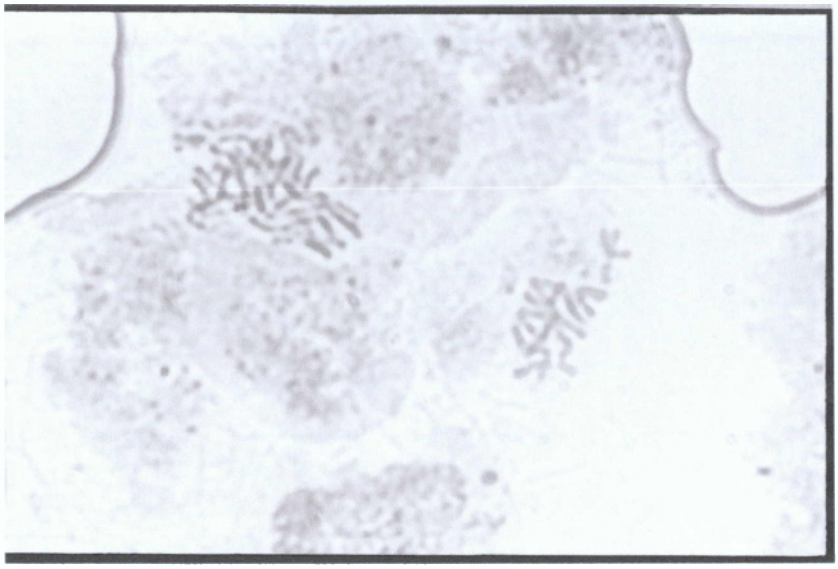


Εικόνα 8. Γονιδίωμα της πρωτογενούς σειράς Νο 10 (Λήμνος x $10^{η}$ διαλογή της βρίζας).

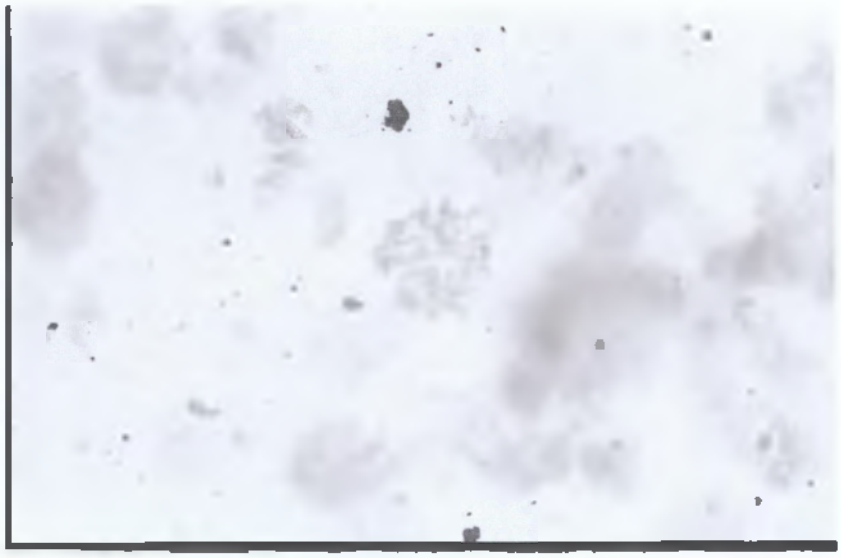


Εικόνα 9. Γονιδίωμα της πρωτογενούς σειράς Νο 10 (Λήμνος x $10^{η}$ διαλογή της βρίζας).

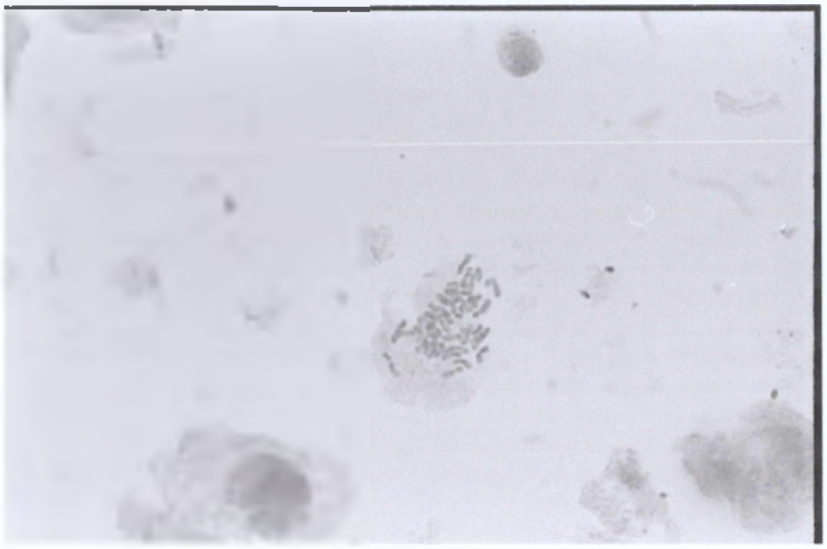
Εικόνα 10. Γονιδίωμα της πρωτογενούς σειράς Νο 10 (Λήμνος x $16^{η}$ διαλογή της βρίζας)



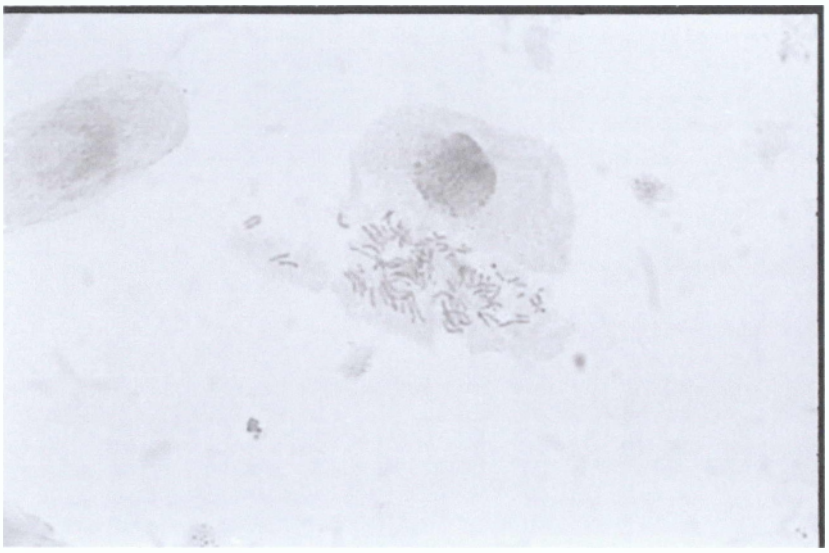
Εικόνα 11. Γονιδίωμα της πρωτογενούς σειράς Νο 14 (Λήμνος x 16η διαλογή της βρίζας).



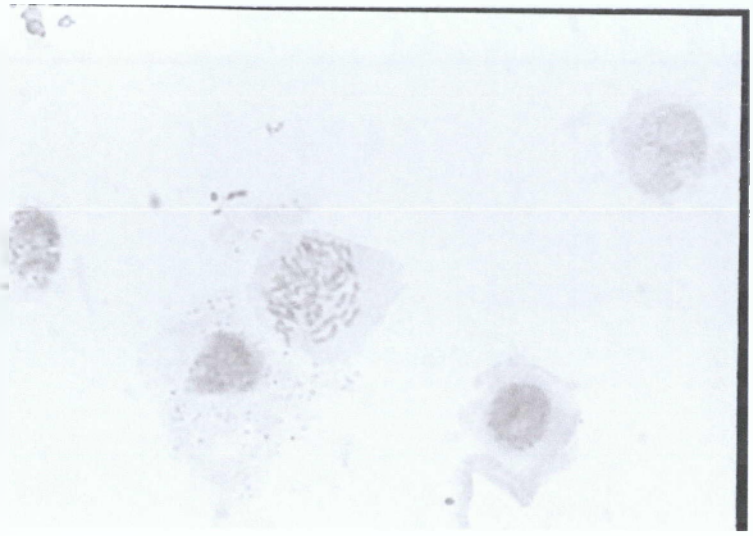
Εικόνα 12. Γονιδίωμα της πρωτογενούς σειράς Νο 8 (Λήμνος x 8η διαλογή της βρίζας).



Εικόνα 13. Γονιδίωμα της πρωτογενούς σειράς Νο 4 (Λήμνος x $2^η$ διαλογή της βρίζας).



Εικόνα 14. Γονιδίωμα της πρωτογενούς σειράς Νο 4 (Λήμνος x $2^η$ διαλογή της βρίζας).



Εικόνα 15. Γονιδίωμα της πρωτογενούς σειράς Νο 4 (Λήμνος x $2^{η}$ διαλογή της βρίζας).