

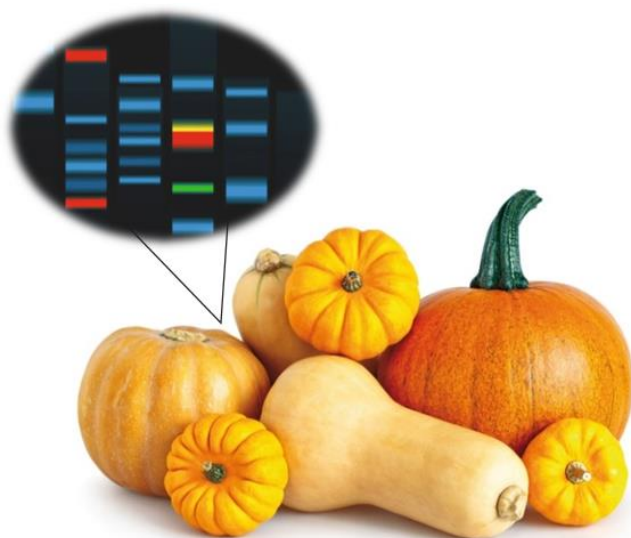


ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Εκτίμηση γενετικής παραλλακτικότητας σε γενετικό υλικό κολοκύθας (*Cucurbita pepo*)
μέσω μοριακών δεικτών»**



ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ (02312)

Επιβλέπουσα: Ουρανία Παυλή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Π.Θ

ΒΟΛΟΣ 2024

**Εκτίμηση γενετικής παραλλακτικότητας σε γενετικό υλικό κολοκύθας (*Cucurbita pepo*)
μέσω μοριακών δεικτών**

Genetic diversity in pumpkin (*Cucurbita pepo*) germplasm using molecular markers

Καραγιάννη Αικατερίνη

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παυλή Ουρανία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας
Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πετρόπουλος Σπυρίδων, Αναπληρωτής Καθηγητής, Λαχανοκομία, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής
Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαδέσης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής, Κυτταρική και Μοριακή Βιολογία, Τμήμα
Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω την κα. Ουρανία Παυλή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής Βελτίωσης Φυτών στο Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, για την ευκαιρία να διεκπεραιώσω την πτυχιακή μου διατριβή στο Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, για την εξαιρετική επικοινωνία και συνεργασία, καθώς και για τη βοήθεια στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και στη συγγραφή της πτυχιακής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ευαγγελία Παναγιωτάκη, μέλος ΕΔΙΠ, για τις υποδείξεις της, την βοήθειά της στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την εξίσου άψογη συνεργασία και επικοινωνία που είχαμε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Σπυρίδωνα Πετρόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή Λαχανοκομίας, για τη χορήγηση του γενετικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, την καλή συνεργασία καθώς και τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαδέση Παναγιώτη, Επίκουρο Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας, για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την υποστήριξή της στις αποφάσεις μου καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	vi
Abstract.....	vii
1.Εισαγωγή.....	2
1.1 Γενικά.....	2
1.2 Ταξινόμηση- Εξάπλωση.....	5
1.3 Βοτανική περιγραφή.....	6
1.3.1 Ριζικό σύστημα.....	6
1.3.2 Βλαστός.....	6
1.3.3 Φύλλα.....	6
1.3.4 Άνθη.....	7
1.3.5 Καρπός.....	9
1.3.6 Σπόρος.....	9
1.4 Αναπτυξιακά στάδια- Βιολογικός κύκλος.....	10
1.5 Θρεπτική αξία.....	11
1.6 Μέθοδοι ταυτοποίησης ποικιλιών.....	13
1.6.1 Βιομηχανικοί δείκτες.....	14
1.6.2 Μορφολογικοί δείκτες.....	14
1.6.3 Μοριακοί δείκτες.....	15
1.7 Εφαρμογή μοριακών δεικτών στη Βελτίωση Φυτών.....	18
Σκοπός.....	20
2. Υλικά και μέθοδοι.....	21
2.1 Γενετικό υλικό.....	21
2.2 Μοριακοί δείκτες.....	22
2.3 Εξοπλισμός.....	23
2.4 Απομόνωση DNA.....	24
2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA.....	25
2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	26
2.7 Ηλεκτροφόρηση.....	27
2.8 Ανάλυση μοριακών δεδομένων.....	28
3. Αποτελέσματα.....	30
3.1 Αξιολόγηση των απομονώσεων γονιδιωματικού DNA.....	30

3.2 Πολυμορφισμός των μοριακών δεικτών RAPD.....	31
3.3 Ανάλυση της γενετικής παραλλακτικότητας με τη χρήση μοριακών δεικτών RAPD...	39
4. Συζήτηση.....	48
5. Βιβλιογραφία.....	51
Παράρτημα.....	57

Περίληψη

Το είδος *Cucurbita pepo* είναι το πιο ποικιλόμορφο είδος, συγκριτικά με άλλα είδη της οικογένειας Cucurbitaceae. Αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας σε γενετικό υλικό κολοκύθας μέσω μοριακών δεικτών. Το γενετικό υλικό αποτέλεσαν συνολικά δέκα (10) ποικιλίες, εκ των οποίων οι δύο (2) είναι εμπορικές (FYTRO FS 2432, Big Max) και οι οκτώ (8) ελληνικές τοπικές ποικιλίες που προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές της χώρας. Η μοριακή γενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συνολικά έντεκα (11) πολυμορφικών δεικτών RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), εφαρμόζοντας τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Για το σκοπό αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη φυτών των υπό μελέτη γονοτύπων και ακολούθησε συλλογή ιστού φύλλων από 4 ατομικά φυτά ανά γονότυπο, εφαρμόζοντας τυχαία δειγματοληψία. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γονιδιωματικού DNA, με τη μέθοδο CTAB, και φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της ποιότητας και ποσότητας των απομονώσεων με τη χρήση NanoDrop. Ακολούθησε η διεξαγωγή αντιδράσεων PCR και ο διαχωρισμός των προϊόντων ενίσχυση σε πηκτή αгарόζης 1,5 % με στόχο τον προσδιορισμό των RAPD προφίλ των υπό μελέτη γονοτύπων.

Η ανάλυση με τη χρήση των επιλεγμένων τυχαίων εκκινητών RAPD επέτρεψε την παραγωγή επαναλήψιμων προϊόντων ενίσχυσης, ενώ παράλληλα ανέδειξε τη γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των υπό μελέτη πληθυσμών του είδους *C. pepo*. Συγκεκριμένα, η χρήση των επιλεγμένων 11 εκκινητών RAPD οδήγησε σε ενίσχυση συνολικά 203 προϊόντων. Το μέσο ποσοστό πολυμορφισμού (PBP) κυμάνθηκε μεταξύ 20,20 % και 35,96 % μεταξύ των πληθυσμών. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της ανάλυσης ανέδειξαν ότι το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης κατανεμήθηκε μεταξύ των πληθυσμών, σε ποσοστό 60 % της συνολικής γενετικής διακύμανσης, ενώ το υπόλοιπο 40 % της γενετικής διακύμανσης αφορά σε διαφορές που απαντώνται εντός των πληθυσμών. Το σύνολο των ευρημάτων της μελέτης υπογραμμίζει την καταλληλότητα των μοριακών δεικτών RAPD για την ανάδειξη της γενετικής παραλλακτικότητας σε τοπικές ποικιλίες που προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές στο είδος *C. pepo*.

Λέξεις κλειδιά: κολοκυθιά, *Cucurbita pepo*, γενετική παραλλακτικότητα, μοριακοί δείκτες, RAPD

Abstract

Cucurbita pepo is the most diverse species, compared to other species of the Cucurbitaceae family. This study aimed at determining the genetic diversity in pumpkin germplasm through the use of molecular markers. The genetic material under study involved in total ten (10) cultivars, of which two (2) were commercial (FYTRO FS 2432, Big Max) and eight (8) were local landraces originating from geographically distinct regions in Greece. The genetic analysis, conducted through the use of eleven (11) RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) markers, was based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. To this purpose, plants of the genotypes under study were initially grown and leaf tissue was collected from 4 individual, randomly sampled, plants per genotype. Subsequently, genomic DNA was extracted, using the CTAB method, and isolations were photometrically assessed in terms of quality and quantity, using NanoDrop. PCR reactions were performed and amplification products were separated on agarose gels 1,5 % in order to determine the RAPD profiles of genotypes under study.

The molecular genetic analysis, using the selected random RAPD primers, allowed for the amplification of reproducible products, while also revealing the existing genetic diversity between *C. pepo* populations under study. Specifically, the use of the selected 11 RAPD primers yielded in total 203 amplification products. The average polymorphic bands percentage (PBP) ranged from 20.20 % and 35.96 % among *C. pepo* populations. Further, the data revealed that the highest portion of genetic variation was distributed among populations (60 %), while the remaining 40 % of genetic variation was attributed to differences within populations. Total findings underline the suitability of RAPD markers for revealing the genetic variability existing in local landraces of *C. pepo*, originating from different geographic regions.

Key words: pumpkin, *Cucurbita pepo*, genetic variability, molecular markers, RAPD

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά

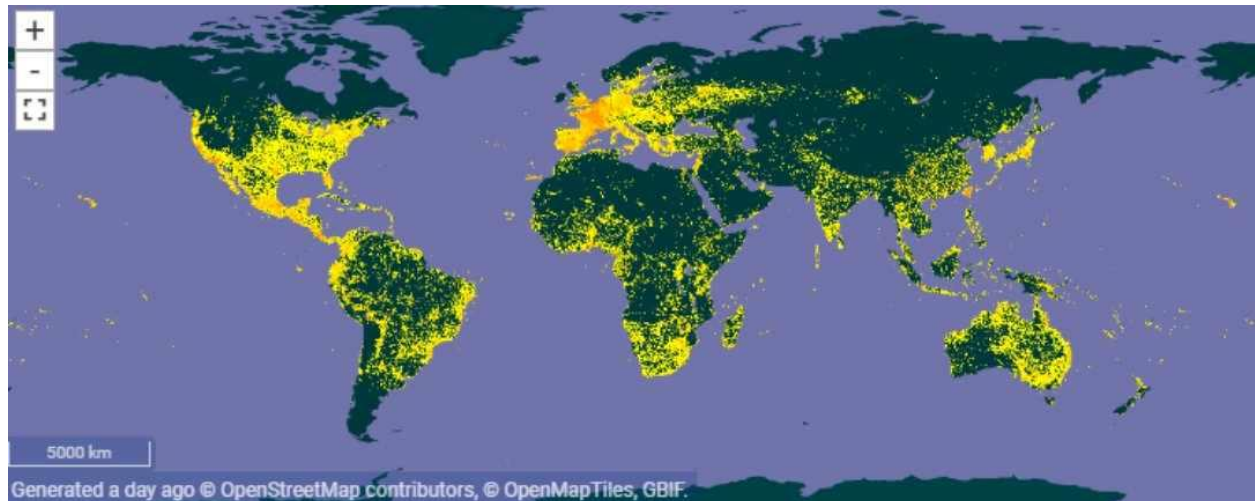
Το επιστημονικό όνομα της κολοκύθας ορίζεται ως *Cucurbita pepo*. Το είδος *Cucurbita pepo* ανήκει στην οικογένεια Cucurbitaceae (οικογένεια των κολοκυνθοειδών), η οποία περιλαμβάνει μείζονος σημασίας κηπευτικά που καλλιεργούνται τόσο σε ψυχρές όσο και σε τροπικές περιοχές. Τα τρία κυριότερα και οικονομικά σημαντικά είδη του γένους *Cucurbita*, είναι τα είδη *Cucurbita pepo*, *C. maxima* και *C. moschata*. Τα προαναφερθέντα είδη καλλιεργούνται σε διακριτές γεωγραφικά περιοχές, καθώς απαιτούν διαφορετικές αγροκλιματικές συνθήκες (Andres & Robinson, 2002).

Το είδος *Cucurbita pepo*, συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη της οικογένειας Cucurbitaceae, είναι το πιο ποικιλόμορφο και περιλαμβάνει δύο υποείδη, το *C. pepo* και το *C. ovifera* (Decker, 1988). Το υποείδος *C. pepo* προέρχεται από το Μεξικό, ενώ το υποείδος *C. ovifera* προέρχεται από την Νοτιοανατολική περιοχή των Ηνωμένων Πολιτειών. Η ποικιλομορφία του γένους σχετίζεται με τις λειτουργίες του φυτού, το στάδιο της άνθησης, τα χαρακτηριστικά των καρπών - όπως μέγεθος, σχήμα, χρώμα, τοπογραφία της επιφάνειας και ποιότητα της σάρκας - καθώς και το μέγεθος και χρώμα των σπόρων (Gong et al., 2012).

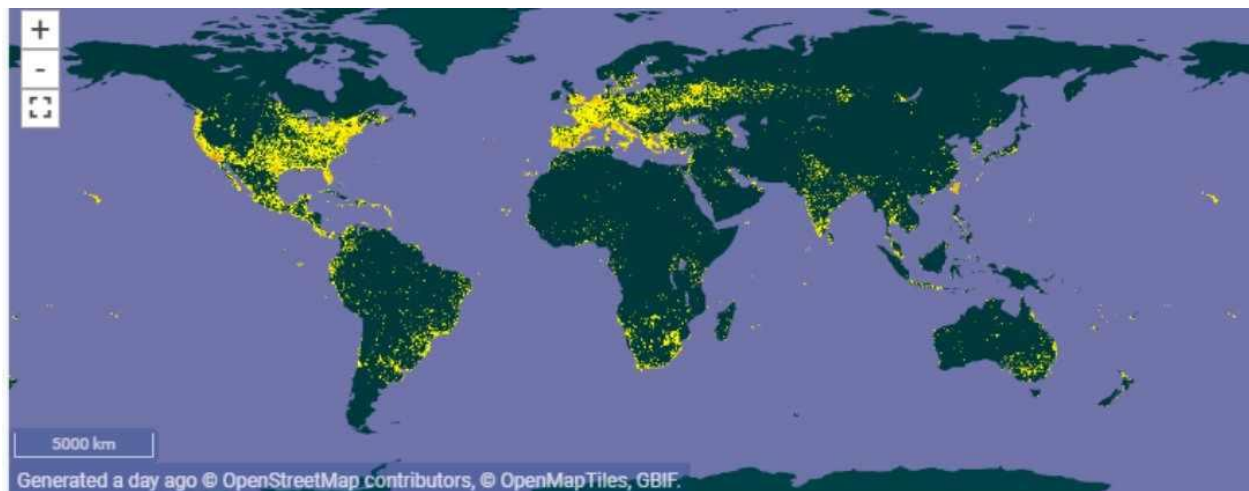
Αναφορικά με την εξημέρωση του είδους *Cucurbita pepo*, ανακαλύφθηκε μέσω αρχαιολογικών ερευνών πως ξεκίνησε στη Μεσοαμερική και χρονολογείται στα 10.000-7.000 π.Χ.. Η αρχική διαφοροποίηση αφορούσε στη μορφολογία των καρπών του είδους *C. pepo*, η οποία περιλάμβανε αύξηση του μεγέθους τους, οδηγώντας στη διαμόρφωση δύο διακριτών υποειδών, τα *Cucurbita pepo ssp. ovifera* και *Cucurbita pepo ssp. Pepo*. Στη συνέχεια, οι διαδικασίες της εξημέρωσης οδήγησαν σε πρόσθετες μορφολογικές τροποποιήσεις, κυρίως στο σχήμα και το χρώμα των καρπών (Smith, 1997). Είναι δε χαρακτηριστικό ότι η καλλιέργεια του είδους *C. pepo* εξαπλώθηκε στα ευρωπαϊκά εδάφη τον 16^ο αιώνα (Χα και Πετρόπουλος, 2014).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), το 2022 η έκταση της καλλιέργειας κολοκυθιάς στον ελλαδικό χώρο ήταν 1.860 εκτάρια, ενώ παγκοσμίως ήταν 1.521.943 εκτάρια. Η παραγωγή στην Ελλάδα απέδωσε 53.950 τόνους, ενώ η καλλιέργεια σε παγκόσμιο επίπεδο οδήγησε σε συνολική παραγωγή 22.806.320,54 τόνων (FAO, 2022). Στις Εικόνες 1.1 έως 1.6 παρουσιάζονται οι χάρτες κατανομής των καλλιεργειών που ανήκουν στην

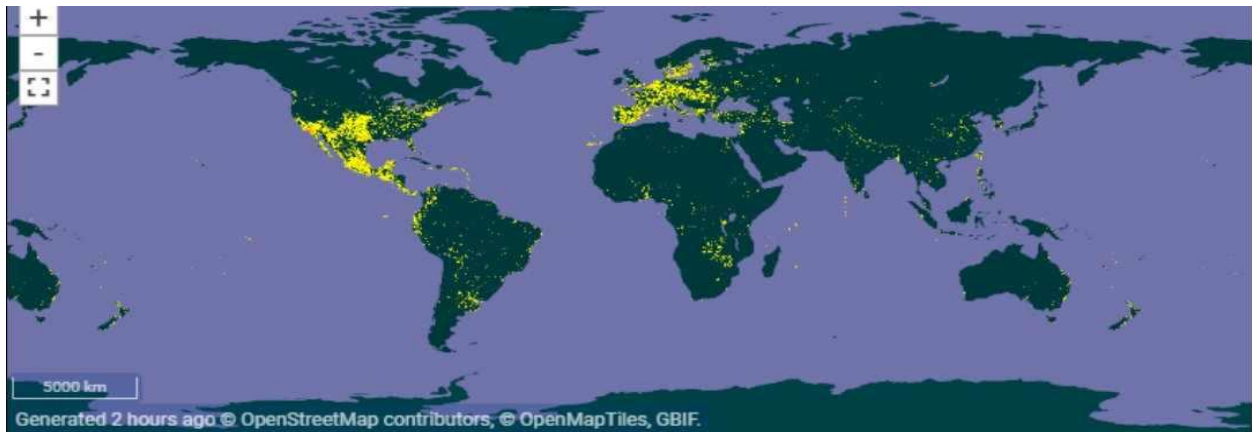
οικογένεια Cucurbitaceae, στο γένος *Cucurbita* και του είδους *Cucurbita pepo* σε παγκόσμιο επίπεδο.



Εικόνα 1.1. Χάρτης κατανομής της οικογένειας Cucurbitaceae σε παγκόσμιο επίπεδο από το έτος 1600-2024 μ.Χ. (www.gbif.org)



Εικόνα 1.2. Χάρτης κατανομής της οικογένειας Cucurbitaceae σε παγκόσμιο επίπεδο από το έτος 2021-2024 μ.Χ. (www.gbif.org)



Εικόνα 1.3. Χάρτης κατανομής του γένους *Cucurbita* σε παγκόσμιο επίπεδο από το έτος 1575-2024 μ.Χ. (www.gbif.org)



Εικόνα 1.4. Χάρτης κατανομής του γένους *Cucurbita* σε παγκόσμιο επίπεδο από το έτος 2021-2024 μ.Χ. (www.gbif.org)



Εικόνα 1.5. Χάρτης κατανομής του είδους *Cucurbita pepo* σε παγκόσμιο επίπεδο από το έτος 1635-2024 μ.Χ. (www.gbif.org)



Εικόνα 1.6. Χάρτης κατανομής του είδους *Cucurbita pepo* σε παγκόσμιο επίπεδο από το έτος 2021-2024 μ.Χ. (www.gbif.org)

1.2 Ταξινόμηση- Εξάπλωση

Η κολοκυθιά, με επιστημονική ονομασία *Cucurbita pepo*, ανήκει στην οικογένεια Cucurbitaceae (Πίνακας 1.1). Η οικογένεια αυτή καταλαμβάνει το 2,6 % της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής κηπευτικών (Xin, 2022). Μεταξύ των φυτικών ειδών που ανήκουν στην οικογένεια Cucurbitaceae, τέσσερα κηπευτικά, η κολοκύθα (*Cucurbita spp.*), το καρπούζι (*Citrullus lanatus*), το πεπόνι (*Cucumis melo*) και το αγγούρι (*Cucumis sativus*), αναφέρονται ως εξέχουσας σημασίας σε παγκόσμιο επίπεδο, σύμφωνα με στατιστικές του FAO. Η αξία των εν λόγω ειδών έγκειται στην έκταση φύτευσης, την ποσότητα παραγωγής και την οικονομική σημασία τους. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα είδη θεωρείται ότι παρέχουν πολύτιμα θρεπτικά συστατικά, καθώς είναι πλούσια σε βιταμίνες, μέταλλα, αντιοξειδωτικά και φυτικές ίνες, συμβάλλοντας σε μια ισορροπημένη διατροφή σε παγκόσμιο επίπεδο (Paris, 2016).

Ένα από τα σημαντικότερα γένη της οικογένειας Cucurbitaceae είναι το γένος *Cucurbita*, το οποίο συνολικά περιλαμβάνει 12 ή 13 φυτικά είδη (Nee, 1990) που περιέχουν στον πυρήνα τους 20 ζεύγη χρωμοσωμάτων ($2n = 40$) (Heather et al., 2017). Μεταξύ των ειδών που ανήκουν στο γένος *Cucurbita*, το είδος *Cucurbita pepo ssp. pepo* αποτελεί το περισσότερο ευρέως καλλιεργούμενο είδος, γεγονός που εν μέρει αποδίδεται και στην ευρεία προσαρμοστικότητά του σε φάσμα διαφορετικών ενδιαιτημάτων (Nee, 1990).

Πίνακας 1.1. Συστηματική κατάταξη του είδους *Cucurbita pepo*, με κοινή ονομασία κολοκυθιά.

Βασίλειο	Plantae
Συνομοταξία	Magnoliophyta
Ομοταξία	Magnoliopsida
Υφομοταξία	Dilleniidae
Τάξη	Violales
Οικογένεια	Cucurbitaceae
Γένος	<i>Cucurbita</i>
Είδος	<i>C.pepo</i>

1.3 Βοτανική περιγραφή

Η κολοκυθιά είναι ένα μονοετές, ποώδες φυτό. Η ανάπτυξή της πραγματοποιείται κυρίως με έρποντα τρόπο, ενώ η κατοχή των χαρακτηριστικών φερόμενων ελίκων προσδίδει στο φυτό τη δυνατότητα αναρρίχησης (Ολύμπιος, 2001).

Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή των επιμέρους βοτανικών χαρακτηριστικών της κολοκυθιάς:

1.3.1 Ριζικό σύστημα

Η ρίζα είναι πασσαλώδης και η ανάπτυξή της φτάνει σε βάθος έως και 120 εκ. (Ολύμπιος, 2001). Το κυρίως ριζόστρωμα αναπτύσσεται σε βάθος έως και 40-50 εκ. και απαρτίζεται από πλάγιες και δευτερογενείς ρίζες (Κανάκης, 2004).

1.3.2 Βλαστός

Η κολοκυθιά είναι ένα φυτό που σχηματίζει μικρού μήκους, κοίλους εσωτερικά βλαστούς με μικρά μεσογονάτια διαστήματα, που καλύπτονται από τρίχες. Η διατομή των βλαστών είναι κυλινδρική ή γωνιώδης. Επίσης, οι κόμβοι που έρχονται σε επαφή με το έδαφος φέρουν ριζίδια (Χα και Πετρόπουλος, 2014).

1.3.3 Φύλλα

Τα φύλλα της κολοκυθιάς, ανάλογα με το είδος ή/και την ποικιλία, εμφανίζουν αξιοσημείωτη παραλλακτικότητα. Ειδικότερα, τα φύλλα μπορεί να είναι απλά, εναλλασσόμενα πάνω στον βλαστό και με διάμετρο της τάξης των 15 εκ. - 25 εκ.. Το σχήμα των φύλλων είναι τριγωνικό ή ωοειδές και φέρει λοβούς, σε αριθμό που κυμαίνεται μεταξύ των 5-7. Οι κόλποι είναι περισσότερο

ή λιγότερο εμφανείς, ενώ στη βάση του ελάσματος σχηματίζεται βαθιά εγκόλπωση (Εικόνα 1.7). Χαρακτηριστικό των ελασμάτων είναι ότι εμφανίζουν οδοντωτή περιφέρεια, φέρουν έντονες νευρώσεις, τριχίδια και παρουσιάζουν λευκά στίγματα (Κανάκης, 2004). Τέλος, το φύλλο στηρίζεται σε μακρύ, κυλινδρικό μίσχο που είναι κοίλος στο εσωτερικό του (Χα και Πετρόπουλος, 2014).



Εικόνα 1.7. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων του είδους *Cucurbita pepo*.

1.3.4 Άνθη

Τα αρσενικά και θηλυκά άνθη της κολοκυθιάς βρίσκονται σε ξεχωριστές θέσεις πάνω στο ίδιο φυτό, το οποίο χαρακτηρίζεται ωςμόνικο και δικλινές (Δημητράκης, 1998). Γενικά, τα άνθη είναι μεγάλου μεγέθους και έχουν έντονο κίτρινο χρώμα. Επίσης, τα άνθη είναι μασχαλιαία, πενταμερή και φέρουν στεφάνη σχήματος χοάνης (Ολύμπιος, 2001) (Εικόνα 1.8).

Αναλυτικότερα, τα αρσενικά άνθη αναπτύσσονται αρχικά στη βάση του βλαστού και στην συνέχεια σε όλο το μήκος του. Φέρουν ποδίσκο, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως λεπτός και επιμήκης. Τέλος, διαθέτουν 5 ελεύθερους στήμονες με τους ανθήρες να είναι ενωμένοι (Κανάκης, 2004). Ακολουθεί ο σχηματισμός των θηλυκών ανθέων, οι οποίοι φέρουν, σε αντίθεση με τα αρσενικά, μικρού μήκους ποδίσκο. Η ωοθήκη των θηλυκών είναι υποφυής, τρίχωρη και φέρει στύλο με 3

στίγματα, τα οποία είναι δίοβα. Υπάρχει η δυνατότητα γονιμοποίησης 24 ώρες αφού ανοίξουν τα θηλυκά άνθη.

Η αναλογία μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών ανθέων αποτελεί γνώρισμα που καθορίζεται από την ποικιλία αλλά, ταυτόχρονα, εμφανίζει εξάρτηση και από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και την αζωτούχο λίπανση. Ενδεικτικά, η υψηλή αζωτούχος λίπανση, σε συνδυασμό με την επικράτηση χαμηλών θερμοκρασιών, συμβάλλουν στο σχηματισμό θηλυκών ανθέων (Χα και Πετρόπουλος, 2014).

Προκειμένου να επιτευχθεί υψηλό ποσοστό επικονίασης κρίνεται απαραίτητη η παρουσία κυψελών σε κοντινές αποστάσεις από την φυτεία, καθώς το φυτό είναι εντομόφιλο. Η εξασφάλιση υψηλών ποσοστών επικονίασης συμβάλλει στην αύξηση της απόδοσης και στη βελτίωση της ποιότητας των καρπών (Χα και Πετρόπουλος, 2014).



Εικόνα 1.8. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των ανθέων του είδους *Cucurbita pepo*.

1.3.5 Καρπός

Ο καρπός της κολοκυθιάς είναι ράγα και παρουσιάζει ποικιλία στα χρώματα (κίτρινο, πορτοκαλί, πράσινο, λευκό) και σχήματα (ελλειψοειδής, κυλινδρικός) (Εικόνα 1.9). Επίσης, η σάρκα εμφανίζει αντίστοιχη ποικιλία με αυτήν των καρπών. Στο εσωτερικό της σάρκας υπάρχουν τα σπέρματα, τα οποία είναι μεγάλα σε μέγεθος, έχουν σχήμα πεπλατυσμένο, ελλειψοειδές και λεία επιφάνεια. Η επιφάνεια του καρπού μπορεί να χαρακτηριστεί ως λεία και μπορεί να φέρει ραβδώσεις ή/και εξογκώματα (Χα και Πετρόπουλος, 2014).



Εικόνα 1.9. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των καρπών του είδους *Cucurbita pepo*.

1.3.6 Σπόρος

Ο σπόρος έχει μεγάλο μέγεθος, το σχήμα του είναι ελλειψοειδές και πεπλατυσμένο και η επιφάνεια του είναι λεία (Ολύμπιος, 2001) (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των σπόρων του είδους *Cucurbita pepo*.

1.4 Αναπτυξιακά στάδια- Βιολογικός κύκλος

Ο πολλαπλασιασμός του φυτού της κολοκυθιάς πραγματοποιείται με σπόρους. Η σπορά εφαρμόζεται με δύο τρόπους, είτε κατευθείαν στον αγρό είτε σε σπορείο και έπειτα ακολουθεί η μεταφύτευση. Λόγω της δυσκολίας που προκύπτει κατά την μεταφύτευση, η σπορά προτιμάται να γίνεται κατευθείαν στον αγρό (Ολύμπιος, 2001). Η σπορά ξεκινά τον Μάρτιο για την θερινή παραγωγή, ενώ για την εξασφάλιση της φθινοπωρινής παραγωγής αρχίζει τον Αύγουστο (Χα και Πετρόπουλος, 2014).

Η διαδικασία της σποράς απευθείας στον αγρό περιλαμβάνει αρχικά τοποθέτηση των σπόρων σε βάθος περίπου 2,5 εκ., όταν πρόκειται για βαριάς σύστασης έδαφος, ενώ σε ελαφριάς σύστασης εδάφη το βέλτιστο βάθος σποράς είναι 5,0 εκ. (Ολύμπιος, 2001). Σε κάθε θέση εφαρμόζονται 2 - 3 σπόροι, ενώ για την αποφυγή προβλημάτων στην ανάδυση των φυταρίων τοποθετούνται οι σπόροι σε παράλληλη θέση με το έδαφος (Χα και Πετρόπουλος, 2014). Μετά από 8-10 μέρες, εμφανίζονται τα σπορόφυτα (Κανάκης, 2004). Η βλάστηση των σπόρων μπορεί να επιτευχθεί σε θερμοκρασιακό εύρος 14-38 °C, ενώ ως ιδανικές θεωρούνται οι θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 30 °C. Ωστόσο, η επιτάχυνση της διαδικασίας της βλάστησης, εντός 5 ημερών, προϋποθέτει τη διαβροχή των σπόρων και την επικράτηση θερμοκρασιών που κυμαίνονται μεταξύ 18 και 25 °C. Σχετικά με τις αποστάσεις των φυτών, συνήθως κυμαίνονται μεταξύ 60 και 80 εκ. επί της γραμμής

και 1-1,8 μ. μεταξύ των γραμμών. Οι εν λόγω αποστάσεις εξασφαλίζουν πυκνότητα της τάξης των 1.000-1.500 φυτών ανά στρέμμα (Χα και Πετρόπουλος, 2014).

Η διαδικασία της αρχικής σποράς σε σπορείο περιλαμβάνει αρχική τοποθέτηση των σπόρων σε κύβους εδάφους ή σε ατομικά γλαστράκια, προκειμένου να εξασφαλιστεί αφενός μεν η προστασία του ριζικού συστήματος και αφετέρου η διευκόλυνση στη μεταφύτευση (Ολύμπιος, 2001). Το βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος για το φύτευμα των σπόρων κυμαίνεται από 21 °C έως 27 °C και 18 °C έως 22 °C κατά τη διάρκεια της ημέρας και νύχτας, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, στο σπορείο χρειάζεται να αποφεύγεται η πτώση της θερμοκρασίας κάτω από 11-13 °C, καθώς η διαδικασία βλάστησης αναστέλλεται. Η παραμονή των φυτών στο σπορείο είναι για χρονικό διάστημα 3-5 εβδομάδων, ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες και την εποχή ανάπτυξης (Χα και Πετρόπουλος, 2014). Πριν την μεταφύτευση, εφαρμόζεται στο υπόστρωμα μείωση υγρασίας, ώστε να επιτευχθεί η σκληραγώγηση των φυτών προ της μεταφοράς τους στο τελικό σημείο εγκατάστασης (Ολύμπιος, 2001). Η πρώτη τεχνική καλλιέργειας που ακολουθεί μετά τη φύτευση είναι η άρδευση, με αποφυγή ωστόσο υπερβολικής ποσότητας νερού προς αποφυγή συνθηκών ανοξίας στην περιοχή της ριζόσφαιρας, κατάσταση η οποία οδηγεί σε σκίσσιμο ή/και σπάσιμο των βλαστών. Η πρώτη συγκομιδή πραγματοποιείται 30-60 μέρες μετά τη φύτευση και η διάρκειά της είναι 2-3 μήνες. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρονικό διάστημα της πρώτης συγκομιδής είναι η ποικιλία, οι κλιματικές συνθήκες που επικρατούν στην καλλιέργεια και το ιδανικό εμπορεύσιμο μέγεθος του καρπού (Χα και Πετρόπουλος, 2014).

1.5 Θρεπτική αξία

Το φυτό έχει πλούσια θρεπτική αξία, η οποία εξαρτάται από την περιεκτικότητά του σε νερό καθώς και την περιεκτικότητά σε βιταμίνες, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια και ανόργανα άλατα (Γιαννούλης, 2020). Σχετικά με τα μακροστοιχεία, σε μεγαλύτερες ποσότητες βρίσκονται κυρίως το κάλιο, το ασβέστιο και το μαγνήσιο (Γιαννούλης, 2020). Έκτος από θρεπτική αξία, το φυτό έχει και φαρμακευτική αξία για τον άνθρωπο στην πρόληψη και στην αντιμετώπιση προβλημάτων υγείας. Στους Πίνακες 1.2 και 1.3 περιγράφεται αναλυτικά η σύσταση των καρπών κολοκύθας.

Πίνακας 1.2. Σύσταση εμπορικά ώριμου καρπού καλοκαιρινού κολοκυθίου (summer squash) ανά 100 γραμμάρια νωπού προϊόντος.

Συστατικό	Περιεκτικότητα	Συστατικό	Περιεκτικότητα
Νερό	94,64%	Λουτεΐνη-ζεαξανθίνη	2.125 µg
Θερμίδες	16 Kcal	Βιταμίνη E	0,12 mg
Υδατάνθρακες	3,35%	Βιταμίνη K	3,0 µg
Λίπη	0,18%	Ca	15 mg
Πρωτεΐνες	1,21%	Fe	0,35 mg
Βιταμίνη A	200 IU	Mg	17 mg
Βιταμίνη B1	0,048 mg	P	38 mg
Βιταμίνη B2	0,142 mg	K	262 mg
Βιταμίνη B3	0,487 mg	Na	2 mg
Βιταμίνη B5	0,2 mg	Zn	0,29 mg
Βιταμίνη B6	0,2 mg	Cu	0,1 mg
Βιταμίνη B9	29 µg	Mn	0,1 mg
Βιταμίνη C	17,0 mg	F	-
β-καροτένιο	120 µg	Se	0,2 µg

(Πηγή: USDA)

Πίνακας 1.3. Σύσταση εμπορικά ώριμου καρπού χειμερινού κολοκυθίου (winter squash) ανά 100 γραμμάρια νωπού προϊόντος.

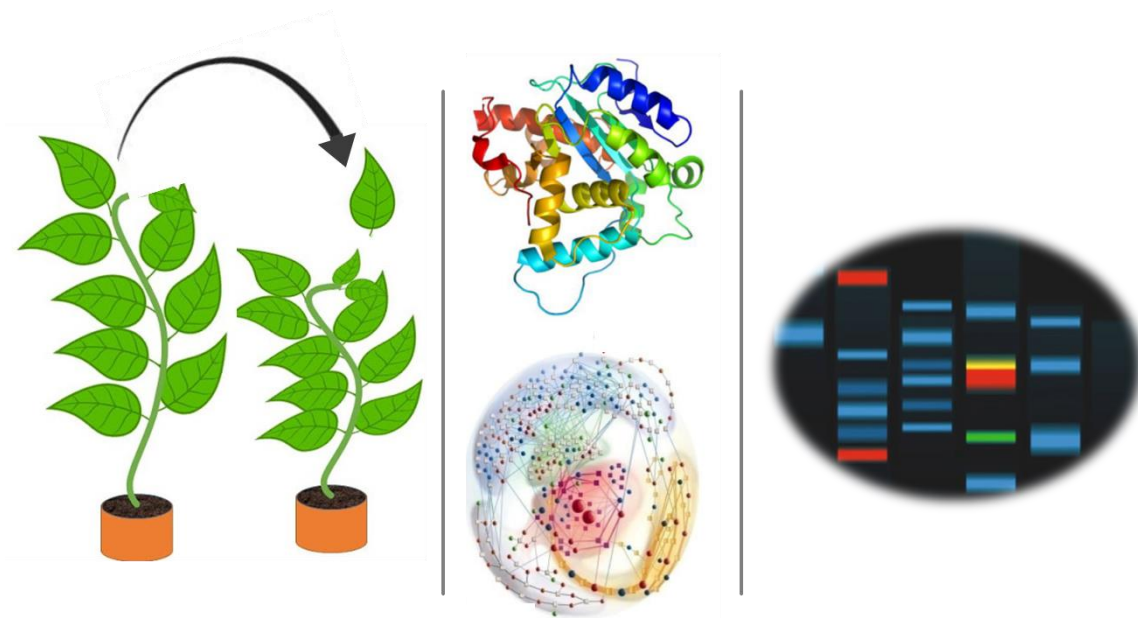
Συστατικό	Περιεκτικότητα	Συστατικό	Περιεκτικότητα
Νερό	89,76%	Λουτεΐνη-ζεαξανθίνη	38 µg
Θερμίδες	34 Kcal	Βιταμίνη E	0,12 mg
Υδατάνθρακες	8,59%	Βιταμίνη K	1,1 µg
Λίπη	0,13%	Ca	28 mg
Πρωτεΐνες	0,95%	Fe	0,58 mg
Βιταμίνη A	1.367 IU	Mg	14 mg
Βιταμίνη B1	0,030 mg	P	23 mg
Βιταμίνη B2	0,062 mg	K	350 mg

Βιταμίνη B3	0,500 mg	Na	4 mg
Βιταμίνη B5	0,2 mg	Zn	0,21 mg
Βιταμίνη B6	0,156 mg	Cu	0,1 mg
Βιταμίνη B9	24 µg	Mn	0,2 mg
Βιταμίνη C	12,3 mg	F	-
β-καροτένιο	820 µg	Se	0,4 µg

(Πηγή: USDA)

1.6 Μέθοδοι ταυτοποίησης ποικιλιών

Η ταξινόμηση και ο καθορισμός των φυλογενετικών σχέσεων στην κολοκυθιά πραγματοποιείται με τη χρήση διαφόρων ειδών δεικτών, όπως οι μορφολογικοί, βιοχημικοί και μοριακοί δείκτες, που παρέχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης πολυμορφισμών σε φαινοτυπικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο, αντίστοιχα (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.10. Μορφολογικοί, βιοχημικοί και μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας.

1.6.1 Μορφολογικοί δείκτες

Οι μορφολογικοί δείκτες χρησιμοποιούνται ευρέως στην πλειοψηφία των φυτικών ειδών καθώς αποτελούν το πρώτο βήμα για την περιγραφή και την ταξινόμηση των ειδών (Hamdi et al., 2017). Οι μορφολογικοί δείκτες στηρίζονται κυρίως στο χρώμα, την υφή, την σκληρότητα του καρπού, το σχήμα του μίσχου και των σπόρων (Liu et al., 2013). Μεταξύ των πλεονεκτημάτων που σχετίζονται με τη χρήση των μορφολογικών δεικτών είναι η ευκολία στην εφαρμογή, καθώς δεν απαιτούνται εξειδικευμένες γνώσεις και ειδικός εξοπλισμός ή αναλώσιμα. Επιπρόσθετα, η χρήση των μορφολογικών δεικτών ως μέσο μελέτης της παραλλακτικότητας αποτελεί μια γρήγορη και οικονομική μέθοδος. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των μορφολογικών δεικτών περιορίζεται σημαντικά από το γεγονός ότι υπάρχουν ποικίλοι παράγοντες που επηρεάζουν την έκφρασή τους. Ειδικότερα, η έκφραση των μορφολογικών δεικτών επηρεάζεται πρωτίστως από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Radwan, 2014), με αποτέλεσμα να τίθεται υπό σημαντική αμφισβήτηση η εγκυρότητά τους. Επιπλέον, παρά την γενικευμένη ευκολία που σχετίζεται με τους λόγους που προαναφέρθηκαν, η χρήση των μορφολογικών ενέχει περιορισμούς που σχετίζονται με την προσπάθεια που απαιτείται για τον εκτεταμένο χαρακτηρισμό των φυτών καθώς και το χρόνο όταν απαιτείται η ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου των φυτών.

1.6.2 Βιοχημικοί δείκτες

Οι βιοχημικοί δείκτες διακρίνονται σε δευτερογενείς μεταβολίτες και πρωτεΐνες. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού και οργανικές ενώσεις, ενώ οι κυριότεροι πρωτεϊνικοί δείκτες είναι τα ισοένζυμα, τα οποία αξιοποιούνται ευρέως σε μελέτες στους τομείς της ταξινόμησης, εξέλιξης και οικολογίας. Μια πρόσθετη κατηγορία πρωτεϊνικών δεικτών αφορά στις πρωτεΐνες αποθήκευσης που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή των γενετικής δομής του φυτού (Mohamed, 2018), συνιστώντας παράλληλα εργαλείο για τη σύγκριση μεταξύ των γενών της οικογένειας Cucurbitaceae (Castro et al., 2006). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η πρώτη γενετική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των υποειδών του *Cucurbita pepo* ήταν μέσω ενός συστήματος αλλοενζύμων, σύμφωνα με τους Ignart και Weeden (1984), Decker (1985) και Decker Walters et al. (1990).

Αναφορικά με την αποτελεσματικότητα των βιοχημικών δεικτών σε μελέτες που σχετίζονται με την αποτύπωση της παραλλακτικότητας, ως βασικό μειονέκτημά τους αναφέρεται η εξάρτηση από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως εξάλλου ισχύει και για τους μορφολογικούς δείκτες. Επιπλέον, οι βιοχημικοί εμφανίζουν περιορισμένη αφθονία, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπουν πάντα την ευχερή διάκριση των διαφορετικών γονοτύπων.

1.6.3 Μοριακοί δείκτες

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι μοριακοί δείκτες κερδίζουν ολοένα και περισσότερο το ερευνητικό ενδιαφέρον για τη διεξαγωγή των γενετικών αναλύσεων και ειδικότερα αυτών που σχετίζονται με την εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας. Η βάση της αξιοποίησής τους προκύπτει από τις διαφορές στην αλληλουχία DNA μεταξύ των διαφορετικών αλληλομόρφων. Από την αρχική ανάπτυξη των δεικτών και τις πρώτες εφαρμογές τους σε μελέτες εκτίμησης της γενετικής παραλλακτικότητας, έχει αναπτυχθεί πλέον μία πληθώρα μοριακών δεικτών που επιτρέπουν την αξιόπιστη εκτίμηση των πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο.

Μεταξύ των βασικών πλεονεκτημάτων των μοριακών δεικτών είναι ότι είναι ιδιαίτερα πολυμορφικοί και η ανίχνευσή τους γίνεται με εύκολο και γρήγορο τρόπο. Συνάμα, δεν εξαρτώνται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος ή από τα αναπτυξιακά στάδια του φυτού και μπορούν να συμβάλλουν σε ανίχνευση πολυμορφισμών που δεν εντοπίζονται σε φαινοτυπικό επίπεδο. Επιπλέον, προσφέρουν δυνατότητες ταχείας μελέτης ενός μεγάλου αριθμού γονοτύπων για πολυμορφικούς τόπους (Williams et al., 1990). Η κατηγοριοποίηση των μοριακών δεικτών με βάση το γενετικό υλικό, βασίζεται στον υβριδισμό ή στην αντίδραση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Στο γένος *Cucurbita*, οι μοριακοί δείκτες, σε συνδυασμό με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, έχουν συμβάλει στην αποσαφήνιση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των διαφορετικών ειδών του γένους (Barzegar et al., 2013). Μάλιστα, σε σχέση με τους μορφολογικούς δείκτες, οι οποίοι είναι πεπερασμένοι σε αριθμό (Staub et al., 2000), αναφέρεται πως οι μοριακοί δείκτες μπορούν να συμβάλλουν στην ακριβέστερη ανάλυση της γενετικής παραλλακτικότητας. Στο είδος *Cucurbita pepo*, η εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας προσεγγίστηκε αρχικά με τη χρήση αλλοενζύμων, ενώ ακολούθησε η εφαρμογή ποικίλων τύπων δεικτών DNA (Mohamed, 2018).

Ειδικότερα σε μελέτες που εστιάζουν στις γενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών *Cucurbita* έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι μοριακοί δείκτες, όπως οι ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats - Πολυμορφισμοί Εντός Απλών Επαναλαμβανόμενων Αλληλουχιών), SSR (Simple Sequence Repeats - Πολυμορφισμοί Απλών Επαναλαμβανόμενων Αλληλουχιών), SCoT (Start Codon Targeted Polymorphism - Στοχευμένο Κωδικόνιο Έναρξης) και RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA - Τυχαία Ενισχυόμενο Πολυμορφικό DNA).

Οι δείκτες ISSRs βασίζονται στην ενίσχυση αλληλουχιών μέσω της αντίδρασης PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης). Η χρήση των ISSRs χαρακτηρίζεται ως εύκολη, με αποτέλεσμα από την αρχική τους ανακάλυψη (Zietkiewicz et al. 1994) να έχουν αξιοποιηθεί σε πληθώρα φυτικών ειδών και εφαρμογών. Η βάση της μεθόδου βρίσκεται στην ενίσχυση προϊόντων που απαντώνται μεταξύ παρακείμενων και αντίθετα προσανατολισμένων μικροδορυφορικών περιοχών που περιέχουν επαναλήψεις δινουκλεοτιδίων, τρινουκλεοτιδίων, τετρανουκλεοτιδίων και πεντανουκλεοτιδίων (Zietkiewicz et al., 1994). Στα πλεονεκτήματα της χρήσης τους συγκαταλέγεται το γεγονός ότι δεν απαιτείται η γνώση πληροφοριών αλληλουχίας για την κατασκευή των εκκινήτων και ότι κατανέμονται σε όλο το γονιδίωμα. Οι δείκτες ISSRs είναι εξαιρετικά πολυμορφικοί, μπορούν να αντιγραφούν και χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του γενετικού αποτυπώματος, σε μελέτες εκτίμησης της ποικιλότητας και στη χαρτογράφηση γονιδιωμάτων, όπου αξιοποιείται μεγάλος αριθμός δεικτών για την πλήρη κάλυψη του φυτικού γονιδιώματος (Mohamed, 2018).

Οι δείκτες SSRs στηρίζονται στην ανίχνευση απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA, γνωστών ως μικροδορυφόροι, που απαντώνται στο γονιδίωμα των περισσότερων φυτών. Οι εν λόγω επαναλήψεις αποτελούν αστείρευτη πηγή παραλλακτικότητας καθώς οι οργανισμοί εμφανίζουν υψηλή παραλλακτικότητα ως προς τον αριθμό των επαναλήψεων, προσφέροντας δυνατότητες εντοπισμού των γενετικών διαφορών μεταξύ των διαφορετικών ατόμων και πληθυσμών. Ειδικότερα, οι δείκτες SSRs αφορούν σε μοτίβα επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών 1 - 6 νουκλεοτιδίων. Μπορούν να εντοπιστούν σε κωδικές και μη κωδικές περιοχές και είναι περιστασιακά μεταγραφόμενες. Μέσω της PCR και της οπτικοποίησης των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης, παρατηρείται ενίσχυση των αλληλουχιών SSRs. Τα πλεονεκτήματα των συγκεκριμένων δεικτών είναι το υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού, η μεγάλη αφθονία, η τυχαία κατανομή τους σε όλο το φυτικό γονιδίωμα και η ευκολία στην εφαρμογή. Τα ανωτέρω

πλεονεκτήματα έχουν συμβάλλει στην εδραίωση των SSRs ως οι πλέον χρησιμοποιούμενοι δείκτες σε μελέτες εκτίμησης της γενετικής παραλλακτικότητας (Mason, 2014). Επίσης, οι δείκτες SSR βρίσκουν εκτεταμένη εφαρμογή στην ταυτοποίηση ποικιλιών λόγω της αφθονίας τους αλλά και της ευκολίας στη χρήση τους.

Ένα νέο σύστημα δεικτών οι SCoTs, όπως σχεδιάστηκε από τους Collard & Mackill (2009), συμβάλλει στην αξιολόγηση των γενετικών σχέσεων της κολοκυθιάς (Mohamed, 2018). Οι εν λόγω δείκτες εντοπίζονται σε κωδικές περιοχές και η ενίσχυση των προϊόντων απαιτεί τη χρήση ενός μόνο εκκινητή γύρω από το κωδικόνιο έναρξης ATG και στις δύο αλυσίδες DNA (Collard and Mackill 2009). Η χρήση των δεικτών SCoT είναι απλή, γρήγορη και οικονομική (Rathore et al., 2014). Οι συγκεκριμένοι δείκτες χρησιμοποιούνται ευρέως σε φυλογενετικές αναλύσεις, την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας και σε μελέτες γενετικής δομής πληθυσμών. Οι δείκτες SCoTs είναι καθολικοί στα φυτά, όπως επιβεβαιώθηκε και σε μελέτες που εστίασαν στον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλότητας στο γένος *Cucurbita* (Bhawna et al., 2017). Οι αναφερόμενοι δείκτες αποτελούν εξαιρετική επιλογή για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας και της διάκρισης διαφορετικών ποικιλιών που προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές σύμφωνα με τους Xanthopoulou et al. (2015).

Περαιτέρω, στους πλέον διαδομένους τύπους μοριακών δεικτών για την εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας συγκαταλέγονται οι δείκτες RAPD, οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την εύρεση της ποικιλότητας που απαντάται σε ενδοπληθυσμιακό, διαπληθυσμιακό αλλά και διεϊδικό επίπεδο στο γένος *Cucurbita* (Radwan, 2014). Οι μοριακοί δείκτες RAPDs βασίζονται στη μέθοδο της PCR, όπου γίνεται ενίσχυση τυχαία ενισχυόμενων αλληλουχιών DNA. Η ανάπτυξη των εν λόγω δεικτών περιγράφηκε από τους Williams et al. και Welsh and McClelland (1990). Η εφαρμογή των δεικτών RAPDs απαιτεί τη χρήση τυχαίων δεκαμερών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία βρίσκουν συμπληρωματικές θέσεις για υβριδισμό στην αλυσίδα DNA, οδηγώντας στην ενίσχυση των θραυσμάτων DNA. Οι αντιδράσεις RAPD-PCR κατά κανόνα επιτρέπουν την ενίσχυση μεγάλου αριθμού θραυσμάτων (Deragon and Landry, 1992). Οι δείκτες RAPD είναι κατά βάση κυρίαρχοι, καθώς γίνεται ενίσχυση ενός μόνο αλληλομόρφου που εμφανίζεται ως μία ζώνη τόσο σε ομόζυγη όσο και σε ετερόζυγη κατάσταση, οδηγώντας σε αδυναμία ανίχνευσης του αλληλομόρφου που δεν ενισχύεται. Παράλληλα, η διάκριση μεταξύ ομόζυγης και ετερόζυγης κατάστασης είναι πρακτικά αδύνατη καθώς η ένταση του φθορισμού

συγκεκριμένης ζώνης δεν παρέχει αξιόπιστη εκτίμηση, εξαιτίας του ανταγωνισμού μεταξύ των θέσεων υβριδισμού του εκκινητή (Hallden et al., 1996) ή του πολλαπλασιασμού επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του γονιδιώματος (Thormann et al., 1994).

Παρά το μειονέκτημα που σχετίζεται με το γεγονός ότι συνιστούν κυρίαρχους δείκτες, οι RAPD εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως γιατί η χρήση τους συνοδεύεται από μία σειρά πλεονεκτημάτων. Καταρχάς, η εφαρμογή τους χαρακτηρίζεται ως μια χαμηλού κόστους, γρήγορη και σχετικά απλή μοριακή τεχνική (Belaj et al., 2001), που ταυτόχρονα δεν απαιτεί εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό (Deragon and Landry, 1992) ή προκαταρκτικές εργασίες, όπως η απομόνωση των κλωνοποιημένων ανιχνευτών DNA ή η προετοιμασία των φίλτρων για υβριδισμό. Επιπρόσθετα, οι δείκτες RAPDs σε σχέση με άλλες μεθόδους περιλαμβάνουν ένα καθολικό σύνολο εκκινητών, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση γονιδιώματος για μια μεγάλη ποικιλία ειδών. Σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί επίσης το γεγονός ότι η χρήση τους δεν απαιτεί την ύπαρξη γνωστών αλληλουχιών, καθώς πρόκειται για τυχαίους εκκινητές, και ότι προσφέρονται για μελέτες γενετικής χαρτογράφησης σε περιπτώσεις αδυναμίας κάλυψης γονιδιωματικών περιοχών από άλλους δείκτες (Williams et al., 1990; Welsh and McClelland, 1990). Βασικότατο μειονέκτημα ωστόσο των RAPD είναι το γεγονός ότι παρουσιάζουν προβλήματα επαναληψιμότητας (Schierwater and Ender, 1993; Jones et al., 1997). Με δεδομένη την υψηλή ευαισθησία των RAPD στις συνθήκες αντίδρασης, προτείνεται η χρήση καθαρού, υψηλού μοριακού βάρους DNA (Spooner et al., 2005). Επιπλέον, στα τεχνικά προβλήματα που απαντώνται κατά τη χρήση των δεικτών RAPD είναι η χαμηλή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων, γεγονός που μειώνει την αξιοπιστία τους (Martins-Lopes et al., 2007), αλλά και η χαμηλή διακριτική τους ικανότητα σε σύγκριση με άλλους δείκτες, όπως οι SSRs.

1.7 Εφαρμογή μοριακών δεικτών στη Βελτίωση Φυτών

Τις τελευταίες δεκαετίες, η ταχεία εξέλιξη και τα επιτεύγματα στους κλάδους της γενετικής και της μοριακής βιολογίας προσφέρουν απεριόριστες δυνατότητες κατά τη διεξαγωγή γενετικών αναλύσεων. Μεταξύ άλλων μοριακών προσεγγίσεων, η ενσωμάτωση των μοριακών δεικτών στη βελτίωση των φυτών έχει συμβάλει ποικιλοτρόπως στην αναβάθμιση αλλά και στην επιτάχυνση

της βελτιωτικής διαδικασίας. Μία από τις πλέον διαδεδομένες εφαρμογές των μοριακών δεικτών στη βελτίωση είναι η χρήση τους για την έμμεση επιλογή επιθυμητών γνωρισμάτων, όπως η ανθεκτικότητα έναντι ασθενειών, η αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες και στην αλατότητα, κ.α.. Η διαδικασία της υποβοηθούμενης από δείκτες επιλογή (Marker-Assisted Selection, MAS) έγκειται στη χρήση δεικτών που εμφανίζουν στενή σύνδεση με γονίδια που ελέγχουν γνωρίσματα ενδιαφέροντος. Η διαδικασία της επιλογής μέσω μοριακών δεικτών λειτουργεί συμπληρωματικά ή σε αντικατάσταση της φαινοτυπικής επιλογής. Σε τεχνικό επίπεδο, η διαδικασία περιλαμβάνει εξαγωγή DNA από τους επιλεγμένους πληθυσμούς και ακολουθεί η συσχέτιση του δείκτη με το γνώρισμα ενδιαφέροντος ώστε να καταστεί εφικτή η επιλογή των επιθυμητών γονοτύπων έμμεσα, μέσω του δείκτη. Μια άλλη εφαρμογή των δεικτών είναι η αξιολόγηση της παρουσίας ενός γονιδίου, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που η έκφρασή του δεν είναι ορατή στο φαινότυπο ή ο έλεγχος της παρουσίας του αποτελεί δαπανηρή διαδικασία ή απαιτείται χρόνος για την έκφρασή του σε προχωρημένα αναπτυξιακά στάδια του φυτού.

Η σήμανση μέσω δεικτών συμβάλλει επίσης στον προσδιορισμό των γενετικών τόπων που ελέγχουν ποσοτικά γνωρίσματα (QTLs), διαδικασία η οποία ενέχει σαφώς περισσότερες δυσκολίες εν συγκρίσει με τα μονογονιδιακά γνωρίσματα. Η δυσκολία, μεταξύ άλλων, έγκειται στο γεγονός ότι τα ποσοτικά γνωρίσματα εμφανίζουν περιβαλλοντική εξάρτηση, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η συσχέτιση μεταξύ φαινοτύπου και γονοτύπου. Επιπλέον, οι μοριακοί δείκτες βρίσκουν εφαρμογή στην ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας καθώς και στην ανίχνευση γονιδίων κυτταροπλασματικής αρρενοστεριότητας (CMS) που οδηγούν σε αδυναμία παραγωγής βιώσιμης γύρης, χωρίς να επηρεάζεται η γονιμότητα των θηλυκών. Η γονοτυπική ανάλυση με βάση τους μοριακούς δείκτες περιλαμβάνει επίσης την ανάπτυξη του "Δακτυλικού αποτυπώματος DNA", το οποίο αναφέρεται σε ένα σύνολο μοναδικών δεικτών ενός ατόμου. Τέλος, μια άλλη σημαντική εφαρμογή των μοριακών δεικτών, είναι η ενσωμάτωση στο φυτικό γονιδίωμα πολλαπλών γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε ένα παθογόνο ή παράσιτο, διαδικασία γνωστή ως «πυραμίδωση», η οποία συμβάλλει θετικά στη διάρκεια και στη σταθερότητα της ανθεκτικότητας (Datta et al., 2011).

Σκοπός της μελέτης

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας σε γενετικό υλικό του είδους *C. pero* με τη χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPD. Συγκεκριμένα, το γενετικό υλικό περιλάμβανε δύο (2) εμπορικές ποικιλίες [Fytro FS 243 και Big Max] και οκτώ (8) ελληνικές τοπικές ποικιλίες που προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές της χώρας. Η μοριακή γενετική ανάλυση αφορούσε σε χρήση συνολικά έντεκα (11) δεικτών RAPD με στόχο την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας σε διαπληθυσμιακό και ενδοπληθυσμιακό επίπεδο.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Γενετικό Υλικό

Η παρούσα μελέτη αφορά στην εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας σε γενετικό υλικό κολοκύθας (*Cucurbita pepo*) με τη χρήση μοριακών δεικτών. Συγκεκριμένα, το γενετικό υλικό που εξετάστηκε περιλάμβανε δέκα (10) ποικιλίες, εκ των οποίων η FYTRO FS 243 και η BIG MAX είναι εμπορικές ποικιλίες, ενώ οι υπόλοιπες οκτώ (8) είναι ελληνικές τοπικές ποικιλίες που προέρχονται από διακριτές γεωγραφικά περιοχές της χώρας. Οι ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1 Το γενετικό υλικό του είδους *Cucurbita pepo* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Νο ποικιλίας	Ονομασία	Τύπος ποικιλίας	Πληθυσμός
1	FYTRO FS 243	Εμπορική 1	P1
2	BIG MAX	Εμπορική 2	P2
3	Κολοκύθα για πίτα	Τοπική 1 (ΤΠ 1)	P3
4	Νυχάκι	Τοπική 2 (ΤΠ 2)	P4
5	Λευκά Μελίτης- ΒΙ	Τοπική 3 (ΤΠ 3)	P5
6	Στρόγγυλο Πορτοκαλί	Τοπική 4 (ΤΠ 4)	P6
7	Οβαλ μικρές Νεάπολη	Τοπική 5 (ΤΠ 5)	P7
8	Μπουκάλα Λακωνίας	Τοπική 6 (ΤΠ 6)	P8
9	Μακεδονικά πράσινα	Τοπική 7 (ΤΠ 7)	P9
10	K-7	Τοπική 8 (ΤΠ 8)	P10

Με στόχο τη συλλογή γενετικού υλικού που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί στις μοριακές αναλύσεις, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη φυτών σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών. Για το σκοπό αυτό, έγινε σπορά σε φυτοδοχεία που περιείχαν μίγμα χώματος - περλίτη, σε αναλογία 3:1 (Εικόνα 2.1). Η συλλογή του ιστού πραγματοποιήθηκε σε φυτά ηλικίας 3 εβδομάδων και αφορούσε σε συλλογή 4 ιστού φύλλων από 4 ατομικά φυτά ανά γονότυπο, εφαρμόζοντας τυχαία δειγματοληψία. Συνολικά, δημιουργήθηκαν 40 δείγματα, 4 ανά πληθυσμό.



Εικόνα 2.1 Το γενετικό υλικό του είδους *Cucurbita pepo* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

2.2 Μοριακοί Δείκτες

Για τη μοριακή γενετική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν συνολικά έντεκα (11) πολυμορφικοί δείκτες RAPD [OPA-04, OPB-01, OPB-02, OPB-04, OPG-02, OPZ-03, CB-09, CB-12, CB-13, CB-15 και CB-19]. Η καταλληλότητα των επιλεγμένων δεικτών για την ανάδειξη της γενετικής παραλλακτικότητας στο είδος *Cucurbita pepo* έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Radwan, 2014; Ntuli et al., 2015).

Οι αντιδράσεις PCR με τον δείκτη RAPD OPB-02 δεν οδήγησαν σε ενίσχυση διακριτών και επαναλήψιμων ζωνών και, συνεπώς, το πρότυπο ζωνών για το συγκεκριμένο δείκτη εξαιρέθηκε από την ανάλυση των μοριακών δεδομένων. Τα ονόματα και οι αλληλουχίες των εκκινητών περιγράφονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2. Ο τύπος, τα ονόματα και οι αντίστοιχες αλληλουχίες των μοριακών δεικτών.

N.	Type	Primer Name	Sequence 5' → 3'
1	RAPD	OPA-04	AATCGGGCTG
2	RAPD	OPB-01	GTTTCGCTCC
3	RAPD	OPB-02	TGATCCCTGG
4	RAPD	OPB-04	GGACTGGAGT
5	RAPD	OPG-02	GGCACTGAGG
6	RAPD	OPZ-03	CAGCACCGCA
7	RAPD	CB-09	GGTGACGCAG
8	RAPD	CB-12	AGTCGACGCC
9	RAPD	CB-13	ACGCATCGGA
10	RAPD	CB-15	GGCTGGTTCC
11	RAPD	CB-17	GTAACCAGCC

2.3 Εξοπλισμός

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων εκτίμησης της γενετικής παραλλακτικότητας σε γενετικό υλικό του είδους *C. pero*, χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος εξοπλισμός:

- Κλίβανο Αποστείρωσης
- Ζυγαριά ακριβείας
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή ανακίνησης (Vortex)
- Φυγόκεντρο
- Τράπεζα νηματικής ροής
- NanoDrop
- Συσκευή PCR
- Συσκευή Ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό ρεύματος
- Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UPV)
- pH meter
- Θερμικός Αναδευτήρας

2.4 Απομόνωση DNA

Με στόχο την εξαγωγή καθαρού DNA, χωρίς προσμίξεις, που ταυτόχρονα χαρακτηρίζεται από υψηλό μοριακό βάρος ώστε να είναι κατάλληλο για τις RAPD-PCR αντιδράσεις, πραγματοποιήθηκε απομόνωση με τη μέθοδο CTAB (Doley & Doley, 1987). Ακολούθησε η εκτίμηση για την ποιότητα - καθαρότητα του DNA καθώς και για την συγκέντρωσή του μέσω της συσκευής NanoDrop.

Διαδικασία απομόνωσης DNA

- Ρύθμιση του υδατόλουτρου στους 65 °C.
- Συλλογή του φυτικού ιστού από 4 ατομικά φυτά από κάθε γονότυπο (10 γονότυποι συνολικά), με τυχαία δειγματοληψία.
- Τοποθέτηση σε falcon υπερκάθαρης αιθανόλης 95 % και 70 %, και αποθήκευση στους -20 °C.
- Προσθήκη σε αποστειρωμένο erpendorf 200 mg φυλλικού ιστού (Εικόνα 2.2).
- Ομογενοποίηση σε αποστειρωμένο γουδί του ιστού με προσθήκη 400 μl CTAB και 25 mg PVP.
- Τοποθέτηση του αιωρήματος σε υδατόλουτρο, με θερμοκρασία 65 °C, και επώαση για 25 min.
- Ανακίνηση των δειγμάτων σε συσκευή Vortex.
- Προσθήκη 200 μl φαινόλης και 200 μl χλωροφορμίου.
- Ανάδευση με αναστροφή, προκειμένου να δημιουργηθεί γαλάκτωμα.
- Φυγοκέντρηση στις 1300 rpm για 5 min.
- Σε αυτό το σημείο, επιτυγχάνεται διαχωρισμός δύο φάσεων, όπου η μία περιέχει το DNA και η άλλη τις πρωτεΐνες και τα οργανικά μόρια. Πραγματοποιείται προσεκτική λήψη της άνω φάσης που είναι το DNA και η μεταφορά του σε νέο tube.
- Προσθήκη στο νέο tube 200 μl NaCl 5M και ανάδευση.
- Προσθήκη 800 μl αιθυλικής αλκοόλης 95 % και ανάδευση.
- Επώαση των δειγμάτων στους -20 °C για 1 ώρα.
- Φυγοκέντρηση στις 1300 rpm για 10 min.
- Διατήρηση του συσσωματώματος DNA με απόρριψη αλκοόλης.

- Προσθήκη 1 ml αιθυλικής αλκοόλης 70 %.
- Φυγοκέντρηση της 1300 rpm για 5 min.
- Απόρριψη της της αλκοόλης.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στο θάλαμο νηματικής ροής προς απομάκρυνση της υγρασίας.
- Προσθήκη 50 μ l ddH₂O για έκλωση του DNA.



Εικόνα 2.2 Διαδικασία απομόνωσης DNA.

2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Για την εκτίμηση της ποιότητας - καθαρότητας του DNA και της συγκέντρωσης του, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή NanoDrop (Εικόνα 2.3). Συγκεκριμένα, ο λόγος A_{260}/A_{280} είναι ενδεικτικός της ποιότητας και καθαρότητα των απομονώσεων, όπου A_{260} η μέγιστη απορρόφηση νουκλεϊκών οξέων και A_{280} η μέγιστη απορρόφηση πρωτεϊνών. Η απορρόφηση στα 260 nm παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη συγκέντρωση του DNA (ng/ μ l). Μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό των απομονώσεων, ακολούθησαν κατάλληλες αραιώσεις με ddH₂O ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση DNA της τάξης των 20 ng/ μ l για όλα τα δείγματα.



Εικόνα 2.3 Συσκευή NanoDrop όπου πραγματοποιήθηκε ποσοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των απομονώσεων γονιδιωματικού DNA.

2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για τους μοριακούς δείκτες RAPDs, το σύνολο των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μ l. Το μίγμα της PCR περιείχε 2,5 μ l DNA (50 ng), 5 μ l ρυθμιστικό διάλυμα (5 x), 1,5 μ l $MgCl_2$ (1.5 mM), 1 μ l RAPD εκκινητή (10 pmole), 0,5 μ l dNTPs (200 μ M each), 0,2 μ l *Taq* πολυμεράση (0.5 u) και ddH₂O έως τελικού όγκου 25 μ l.

Ο πολλαπλασιασμός του DNA με τους εκκινητές OPA-04, OPB-01, OPB-02, OPB-04, OPG-02, OPZ-03, πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (Εικόνα 2.4) που είχε προηγουμένως ρυθμιστεί, σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα PCR: αποδιάταξη στους 95 °C για 3 min, 45 κύκλους αποτελούμενους από 95 °C για 2 min, 37 °C για 1 min για τον υβριδισμό του εκκινητή και 72 °C για 2 min για την επιμήκυνση των προϊόντων ενίσχυσης. Μετά το πέρας των 45 κύκλων, ακολούθησε ένας κύκλος τελικής επιμήκυνσης στους 72 °C για 10 min. Τέλος, τα προϊόντα ενίσχυσης διατηρήθηκαν στους 4 °C.

Ο πολλαπλασιασμός DNA με τους εκκινητές CB-09, CB-12, CB-13, CB-15, CB-17 πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή που είχε προηγουμένως ρυθμιστεί, σύμφωνα με το

ακόλουθο πρόγραμμα PCR: αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 5 min, και 40 κύκλους αποτελούμενοι από 95 °C για 30 sec, 36°C για 30 sec και 72 °C για 1 min. Μετά το πέρας των 40 κύκλων, ακολούθησε ένας κύκλος τελικής επιμήκυνσης στους 72 °C για 4 min και τα προϊόντα ενίσχυσης διατηρήθηκαν στους 4 °C.



Εικόνα 2.4 Ο θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις RAPD-PCR.

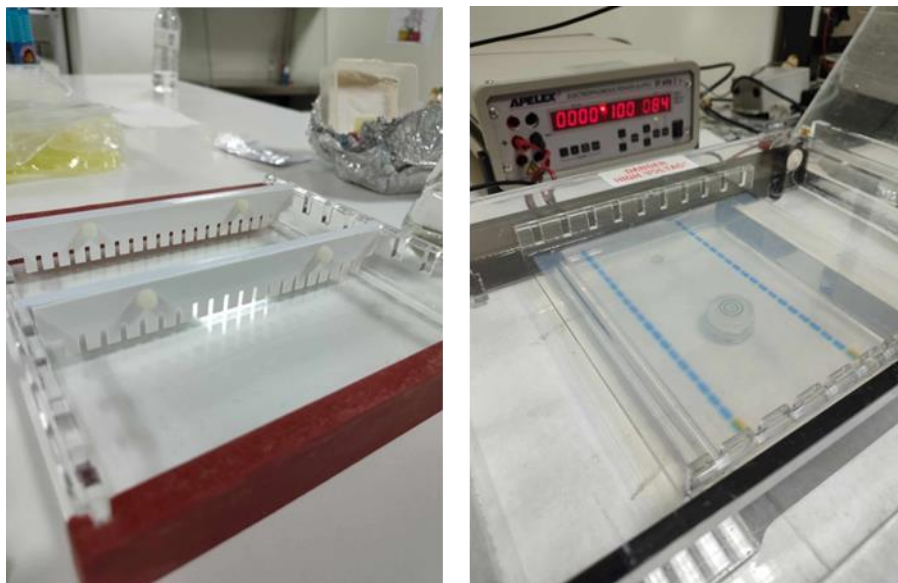
2.7 Ηλεκτροφόρηση

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης των αντιδράσεων RAPD-PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή αгарόζης 1,5 %. Για την παρασκευή της πηκτής έγινε ζύγιση 2,7gr αгарόζης και προσθήκη 180 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1x TBE σε κωνική φιάλη. Ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος με συνεχή ανακίνηση, έως ότου διαλυθεί πλήρως η αгарόζη. Εν συνεχεία, έγινε προσθήκη 9 μl της χρωστικής Midori Green Advance DNA προκειμένου να καταστεί εφικτή η χρώση νουκλεϊκών οξέων στο πήκτωμα αгарόζης. Τέλος, το διάλυμα αгарόζης τοποθετήθηκε στο εκμαγείο και ακολούθως στο λουτρό που περιείχε 2500 ml 1x TBE (Εικόνα 2.5).

Για τη φόρτωση των προϊόντων της PCR στην πηκτή αгарόζης, αρχικά έγινε προετοιμασία των δειγμάτων μέσω προσθήκης 2 μl Loading Buffer (6x). Ακολούθησε η φόρτωση των δειγμάτων

και ηλεκτροφόρηση για χρονικό διάστημα 3 ωρών (100 Volt). Τέλος, έγινε τοποθέτηση της πηκτής αγαρόζης στην τράπεζα υπερϊώδους ακτινοβολίας και λήψη φωτογραφίας.

Το μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης καθορίστηκε με τη χρήση του δείκτη 100 bp DNA Ladder (NEB).



Εικόνα 2.5 Προετοιμασία για την ηλεκτροφόρηση.

2.8 Ανάλυση μοριακών δεδομένων

Κατά την επεξεργασία των δεδομένων, αρχικά πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα ώστε να συμπεριληφθούν στην ανάλυση μόνο διακριτές και επαναλήψιμες ζώνες. Η ανάλυση των εικόνων ηλεκτροφόρησης των πηκτωμάτων (RAPDgelimages) έγινε με τη χρήση του λογισμικού GelAnalyzer 23.1 (<http://www.gelanalyzer.com/>). Το μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης καθορίστηκε με τη χρήση του δείκτη 100 bp DNA Ladder (NEB).

Ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων που αφορούσε σε κατασκευή δυαδικής μήτρας με βάση τα πρότυπα ζωνών RAPD. Για κάθε εκκινητή, κατασκευάζεται δυαδική μήτρα, όπου ως “1” δηλώθηκε η παρουσία και ως “0” η απουσία του προϊόντος ενίσχυσης. Οι μήτρες κατασκευάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού πακέτου MSExcel. Ένα παράδειγμα μήτρας δεδομένων, που κατασκευάστηκε με βάση τα πρότυπα ζωνών για το δείκτη RAPD OPA-04 παρουσιάζεται στο Παράρτημα (Πίνακας Π1).

Ακολούθησε ανάλυση των μοριακών δεδομένων που αφορούσε σε προσδιορισμό του συνολικού αριθμού ζωνών, του αριθμού των πολυμορφικών ζωνών και του ποσοστού πολυμορφικών ζωνών. Το σύνολο των γενετικών παραμέτρων υπολογίστηκαν με τη χρήση του λογισμικού πακέτου GenAlEx 6.5. Η ανάλυση αφορούσε σε προσδιορισμό του αριθμού αλληλομόρφων (N), του αριθμού διαφορετικών αλληλομόρφων (Na), του αριθμού δραστικών αλληλομόρφων (Ne), του δείκτη Shannon (I), του συντελεστή γενετικής ποικιλότητας (h) και αμερόληπτης γενετικής ποικιλότητας (uh). Επίσης, υπολογίστηκε η γενετική απόσταση (D) και γενετική ομοιότητα (IN) κατά Nei. Οι μαθηματικοί τύποι για το σύνολο των γενετικών παραμέτρων παρουσιάζονται στο Παράρτημα (Πίνακας Π2).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοριακής διακύμανσης (AMOVA) προκειμένου να προσδιοριστεί η ιεραρχική κατανομή της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ και εντός των πληθυσμών. Η ιεραρχική AMOVA έγινε με τη χρήση του λογισμικού πακέτου GenAlEx 6.5. Οι δοκιμές εκτελέστηκαν με τη χρήση εκτιμήσεων που βασίστηκαν σε αποστάσεις PhiPT. Για τον στατιστικό έλεγχο, πραγματοποιήθηκαν 999 μεταθέσεις στο σύνολο των δεδομένων ($N = 999$). Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCoA) με τη χρήση του λογισμικού πακέτου GenAlEx 6.5 και κατασκευή δενδρογράμματος ιεραρχικής ταξινόμησης με χρήση της ομαδοποίησης UPGMA (Nei, 1978).

3. Αποτελέσματα

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας σε γενετικό υλικό του είδους *C. pepo* με χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPD. Συγκεκριμένα, το γενετικό υλικό περιλάμβανε δύο (2) εμπορικές ποικιλίες [FytroFS 243 και Big Max] και οκτώ (8) ελληνικές τοπικές ποικιλίες που προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές της χώρας. Η μοριακή γενετική ανάλυση αφορούσε σε χρήση συνολικά έντεκα (11) δεικτών RAPD. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή γονιδιωματικού DNA από συνολικά σαράντα (40) δείγματα, 4 ανά πληθυσμό, και ακολούθησαν αντιδράσεις RAPD-PCR με στόχο την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας σε διαπληθυσμιακό και ενδοπληθυσμιακό επίπεδο.

3.1 Αξιολόγηση των απομονώσεων γονιδιωματικού DNA

Η συγκέντρωση DNA, σε ng/μL, μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά με τη χρήση του Nanodrop στα 260 nm. Η καθαρότητα των δειγμάτων εκτιμήθηκε μέσω της λόγου 260/280, που αντιστοιχεί στην απορρόφηση σε μήκος κύματος 260 και 280 nm (Πίνακας 3.1). Ο λόγος 260/280 παρέχει πληροφορίες σχετικά με την καθαρότητα των απομονώσεων, σχέση με την πρόσμιξη με πρωτεΐνες, ενώ ως βέλτιστη αναλογία 260/280 θεωρείται το 1.80.

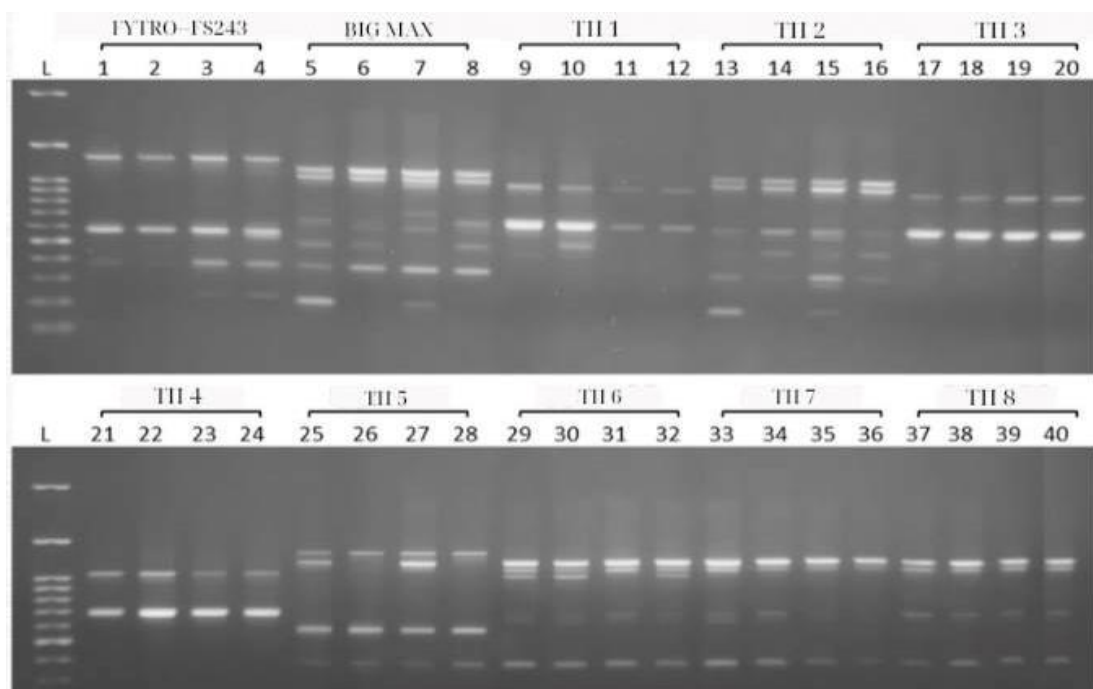
Table 3.1. Nanodrop readings for genomic DNA of pumpkin samples under study.

Δείγμα	Ποικιλία	Απορρόφηση στα 260 nm	Αναλογία 260/280
1		96,7	2,16
2	Εμπορική ποικιλία	176,7	2,1
3	FYTRO FS 243	83,4	2,07
4		190,1	2,02
5		2.173,2	2,05
6	Εμπορική ποικιλία	1.717,2	2,02
7	BIG MAX	1.379,1	2,08
8		2.923,2	2,07
9		10,9	1,18
10	Τοπική ποικιλία 1	33,8	2,06
11	"Κολοκύθι για πίτα"	11	2,17
12		10,6	2,14

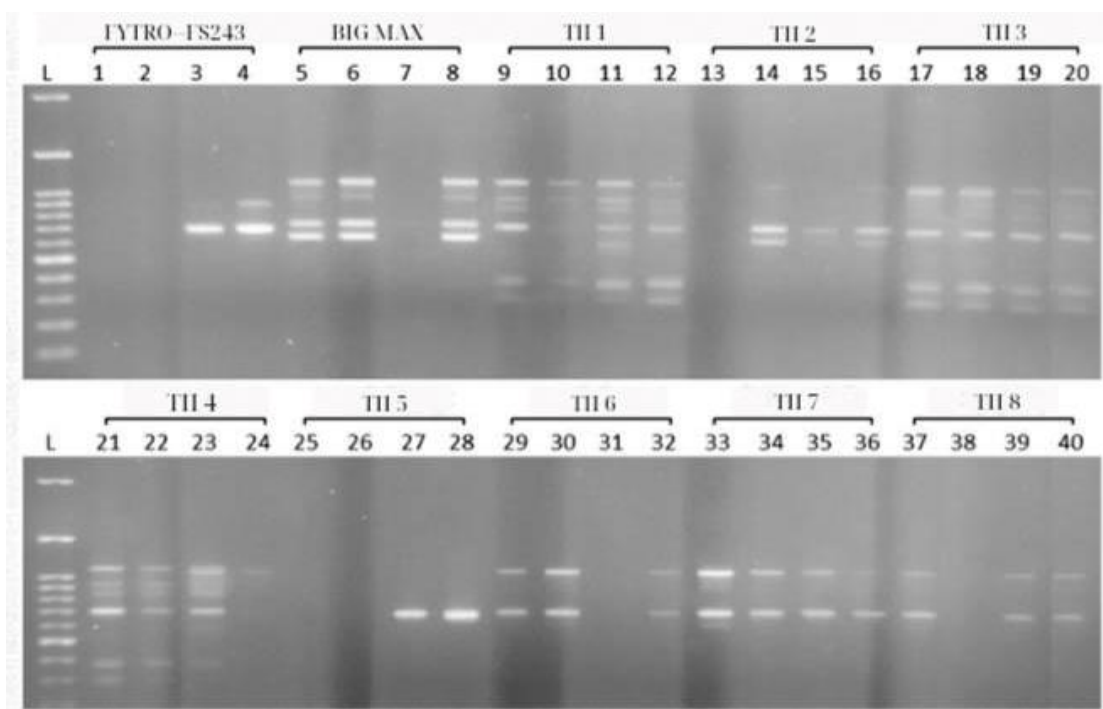
13		2.943,2	2,09
14	Τοπική ποικιλία 2	2.005	2,07
15	"Νυχάκι"	2.171,2	2,09
16		1.266,4	2,12
17		409	2,08
18	Τοπική ποικιλία 3	217,4	2,14
19	"Λευκά Μελίτης-BI"	331,2	2,03
20		184,2	1,84
21		317,4	2,04
22	Τοπική ποικιλία 4	98,4	1,99
23	"Στρόγγυλο πορτοκαλί"	773,7	1,88
24		243,8	2,14
25		66	2,16
26	Τοπική ποικιλία 5	231,4	2,11
27	"Οβάλ/μικρές Νεάπολης"	290,3	2,11
28		241,7	2,01
29		99,5	2,07
30	Τοπική ποικιλία 6	87,6	2,13
31	"Μπουκάλα Λακωνίας"	86,5	2,02
32		96,4	2,17
33		92,4	2,16
34	Τοπική ποικιλία 7	112,8	1,83
35	"Μακεδονικά πράσινα"	105,6	2,07
36		142,1	2,01
37		3.972,2	2,03
38	Τοπική ποικιλία 8	3.553,9	2,05
39	"Κ-7"	3.016,9	2,08
40		3.642,2	2,06

3.2 Πολυμορφισμός των μοριακών δεικτών RAPD

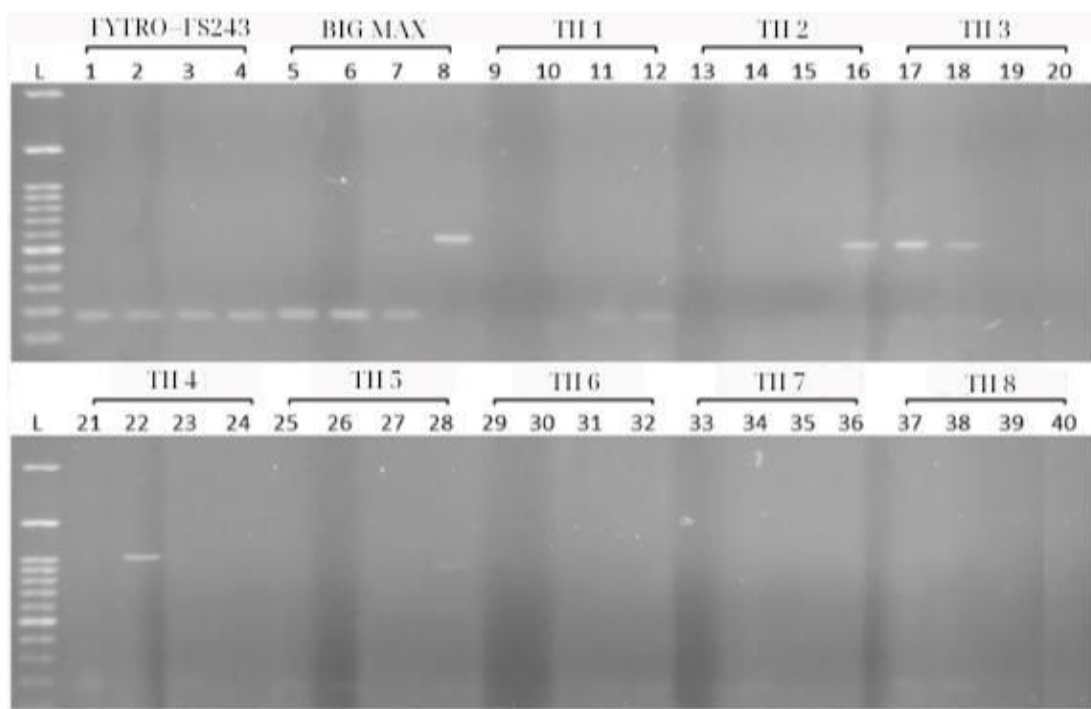
Τα μοριακά προφίλ που προέκυψαν από τις RAPD-PCR αναλύσεις για τους έντεκα RAPD δείκτες [OPA-04, OPB-01, OPB-02, OPB-04, OPG-02, OPZ-03, CB-09, CB-12, CB-13, CB-15 και CB-19] παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.1 – 3.11, αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις PCR με τον δείκτη RAPD B-02 δεν οδήγησαν σε ενίσχυση διακριτών και επαναλήψιμων ζωνών και, συνεπώς, το πρότυπο ζωνών για το συγκεκριμένο δείκτη εξαιρέθηκε από την ανάλυση των μοριακών δεδομένων.



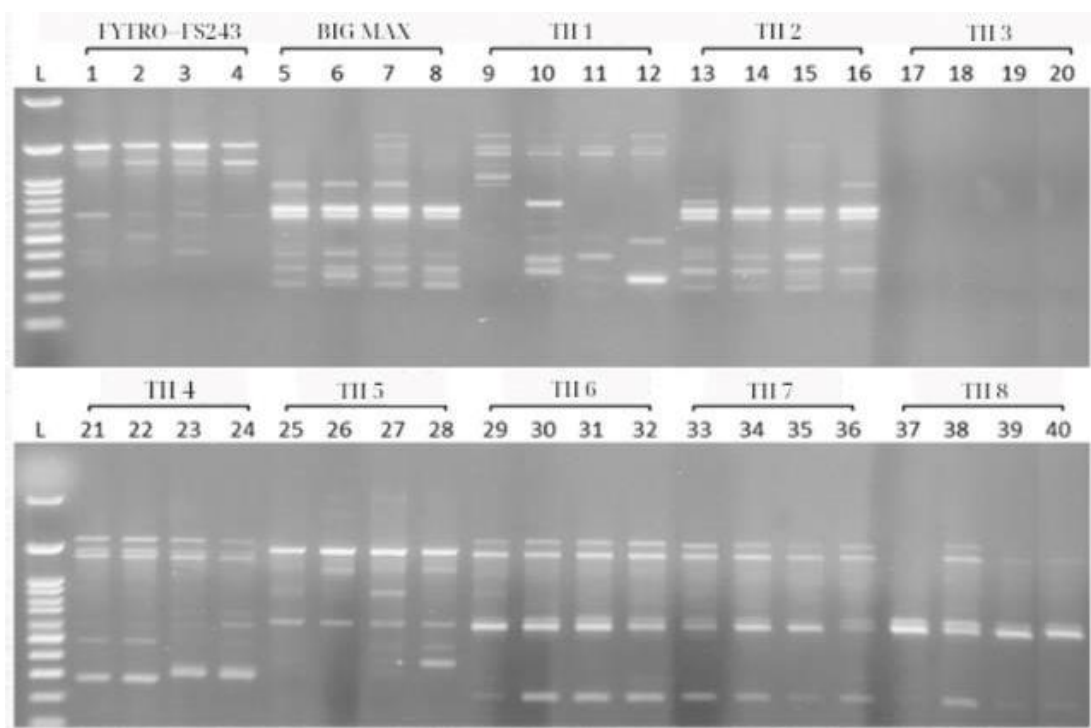
Εικόνα 3.1 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RAPD-PCR με τη χρήση του δείκτη OPA-04 σε πηκτή αгарόζης 1,5 % στο υπό μελέτη γενετικού υλικό του είδους *C. pero*. L: 100 bp DNA Ladder (NEB).



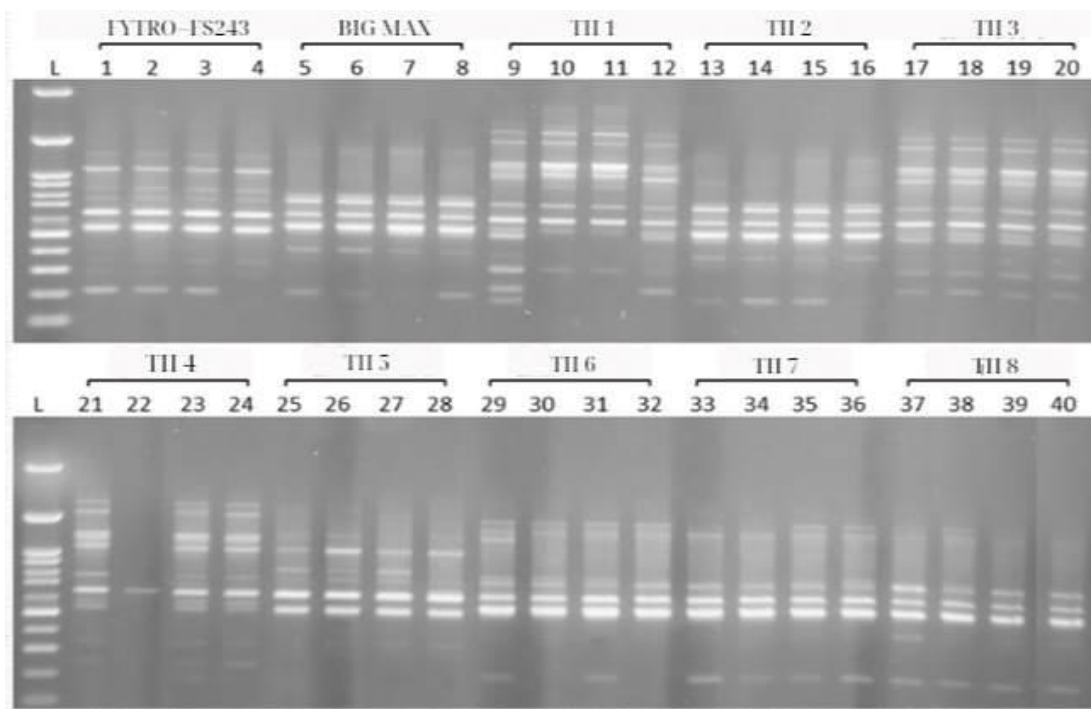
Εικόνα 3.2 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RAPD-PCR με τη χρήση του δείκτη OPB-01 σε πηκτή αгарόζης 1,5 % στο υπό μελέτη γενετικού υλικό του είδους *C. pero*. L: 100 bp DNA Ladder (NEB).



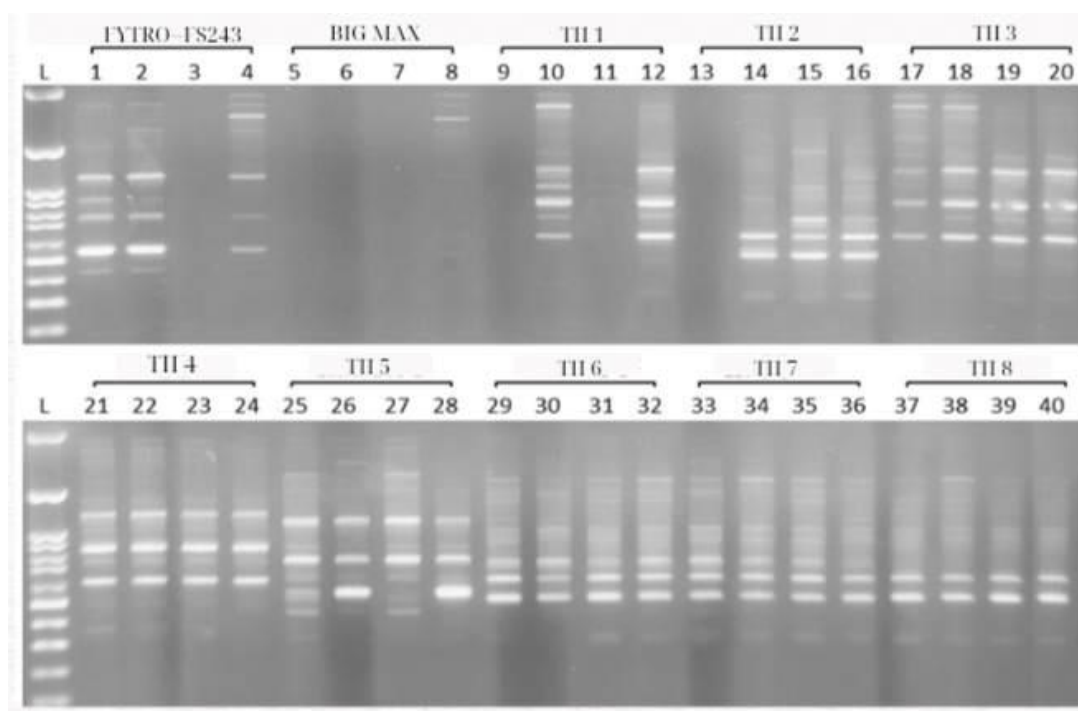
Εικόνα 3.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RAPD-PCR με τη χρήση του δείκτη OPB-02 σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % στο υπό μελέτη γενετικού υλικό του είδους *C. pero*. L: 100 bp DNA Ladder (NEB).



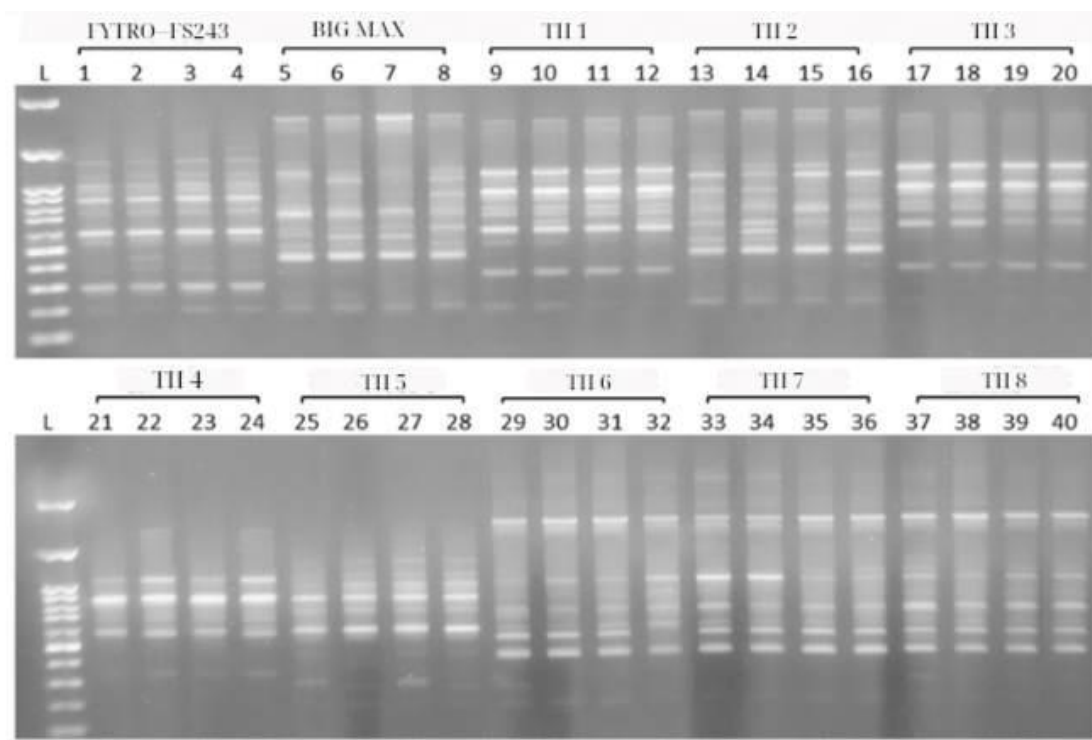
Εικόνα 3.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RAPD-PCR με τη χρήση του δείκτη OPB-04 σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % στο υπό μελέτη γενετικού υλικό του είδους *C. pero*. L: 100 bp DNA Ladder (NEB).



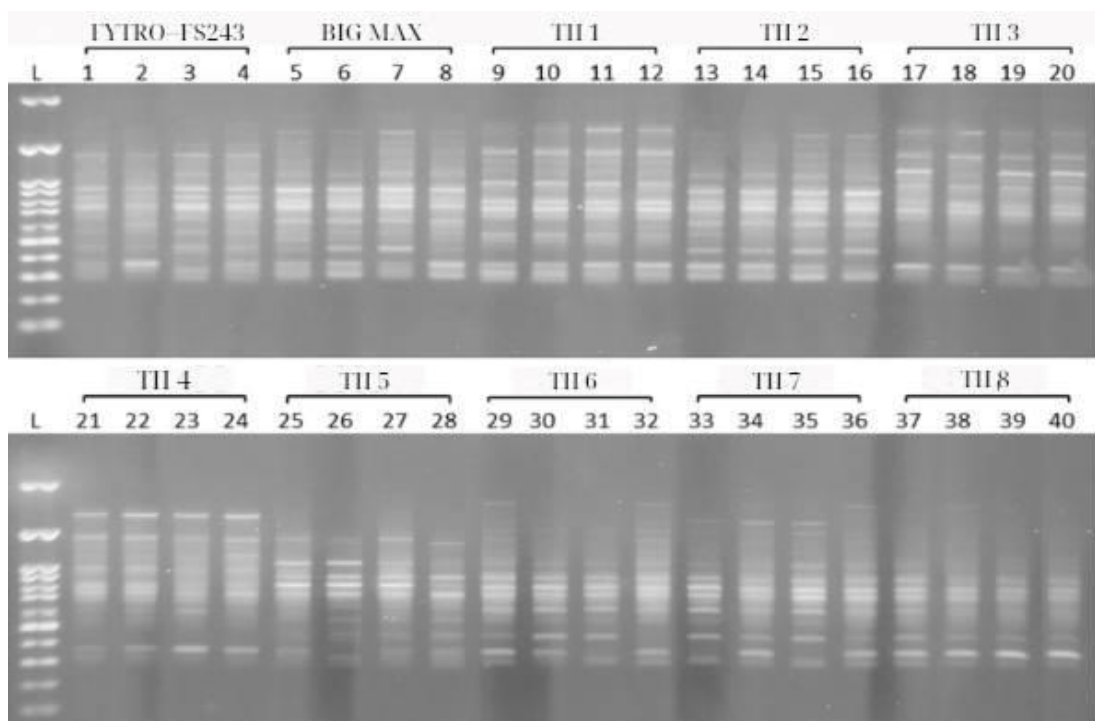
Εικόνα 3.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RAPD-PCR με τη χρήση του δείκτη OPG-02 σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % στο υπό μελέτη γενετικού υλικό του είδους *C. perfr.* L: 100 bp DNA Ladder (NEB).



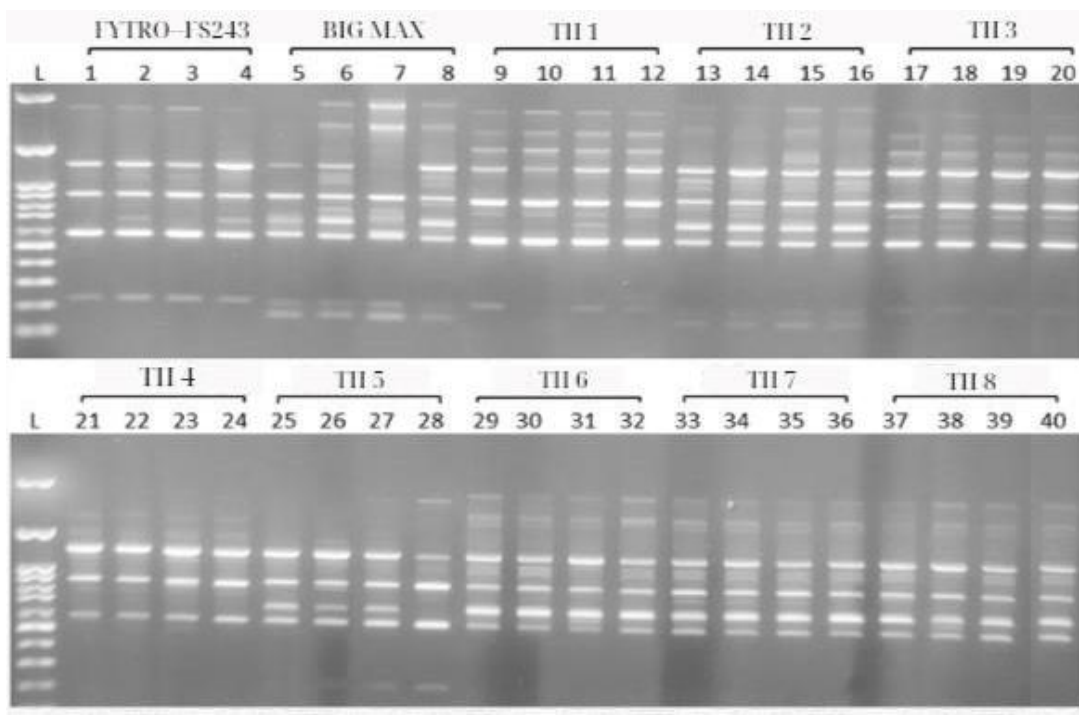
Εικόνα 3.6 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RAPD-PCR με τη χρήση του δείκτη OPZ-03 σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % στο υπό μελέτη γενετικού υλικό του είδους *C. perfr.* L: 100 bp DNA Ladder (NEB).



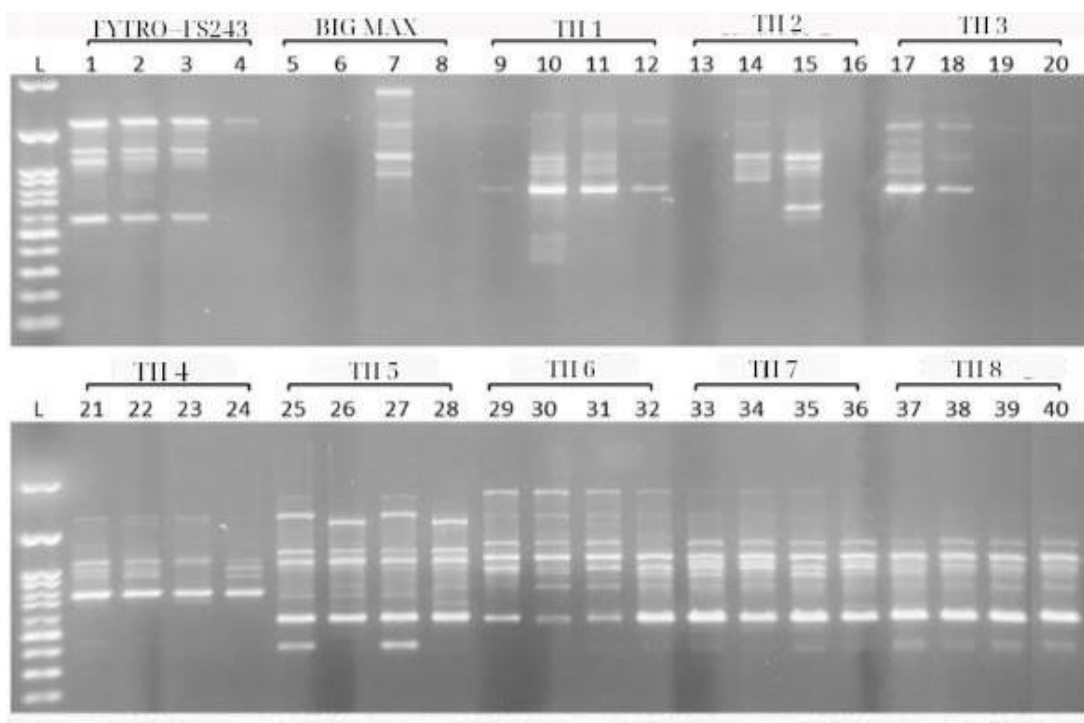
Εικόνα 3.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RAPD-PCR με τη χρήση του δείκτη CB-09 σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % στο υπό μελέτη γενετικού υλικό του είδους *C. perfr.* L: 100 bp DNA Ladder (NEB).



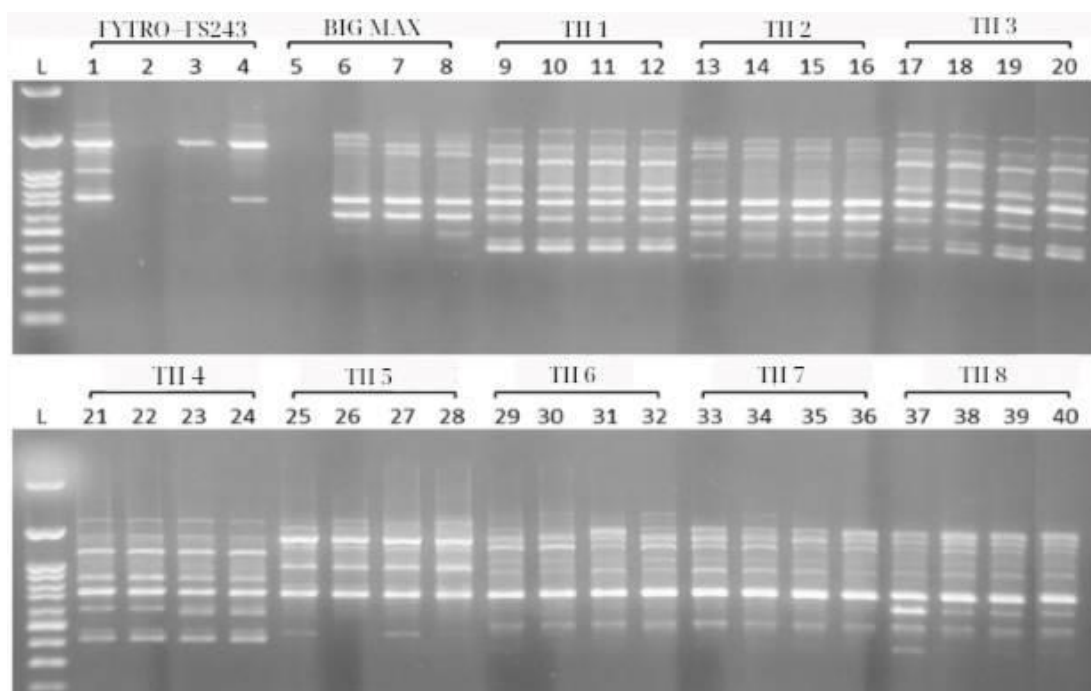
Εικόνα 3.8 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RAPD-PCR με τη χρήση του δείκτη CB-12 σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % στο υπό μελέτη γενετικού υλικό του είδους *C. perfr.* L: 100 bp DNA Ladder (NEB).



Εικόνα 3.9 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RAPD-PCR με τη χρήση του δείκτη CB-13 σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % στο υπό μελέτη γενετικού υλικό του είδους *C. pepo*. L: 100 bp DNA Ladder (NEB).



Εικόνα 3.10 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RAPD-PCR με τη χρήση του δείκτη CB-15 σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % στο υπό μελέτη γενετικού υλικό του είδους *C. pepo*. L: 100 bp DNA Ladder (NEB).



Εικόνα 3.11 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RAPD-PCR με τη χρήση του δείκτη CB-17 σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % στο υπό μελέτη γενετικού υλικό του είδους *C. pero*. L: 100 bp DNA Ladder (NEB).

Η ανάλυση με τη χρήση των επιλεγμένων τυχαίων εκκινητών RAPD επέτρεψε την παραγωγή επαναλήψιμων προϊόντων ενίσχυσης, ενώ παράλληλα ανέδειξε τη γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των υπό μελέτη πληθυσμών του είδους *C. pero*. Συγκεκριμένα, η χρήση των επιλεγμένων 11 RAPD εκκινητών οδήγησε σε ενίσχυση συνολικά 203 προϊόντων. Ο συνολικός αριθμός ζωνών ανά δείκτη, ο αριθμός των πολυμορφικών ζωνών ανά δείκτη καθώς και το μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης που προέκυψαν έπειτα από ανάλυση με τη χρήση των RAPD δεικτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Τα προϊόντα ενίσχυσης κυμάνθηκαν σε μέγεθος από 176 έως 2925 bp. Ο μεγαλύτερος αριθμός ζωνών καταγράφηκε στην ανάλυση με το δείκτη RAPD CB-13 (42 ζώνες), ακολουθούμενης από την ανάλυση με τους δείκτες CB-12, CB-09 και OPG-02 (26, 23 και 22 ζώνες, αντίστοιχα). Αντίθετα, ο μικρότερος αριθμός ζωνών καταγράφηκε κατά την ανάλυση με τους δείκτες RAPD B-01 και A-04 (7 και 11 ζώνες, αντίστοιχα). Ο αριθμός των πολυμορφικών ζωνών κυμάνθηκε μεταξύ 7 και 42 (OPB-01 και CB-13, αντίστοιχα), με μέση τιμή 18,45 πολυμορφικές ζώνες (Πίνακας 3.2). Τα συνολικά ευρήματα παρέχουν ενδείξεις ότι οι δείκτες RAPD που

χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι κατάλληλοι για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας που υπάρχει τόσο σε διαπληθυσμιακό όσο και σε ενδοπληθυσμιακό επίπεδο στο είδος *C. peregrina*.

Πίνακας 3.2. Χαρακτηριστικά των μοριακών δεικτών RAPD που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάδειξη της γενετικής ποικιλότητας στο υπό μελέτη γενετικό υλικό του είδους *C. peregrina*. Το γενετικό υλικό περιλαμβάνει δύο (2) εμπορικές ποικιλίες και οκτώ (8) τοπικές ποικιλίες.

Εκκινητής RAPD	Αλληλουχία (5' – 3')	Συνολικός αριθμός ζωνών	Αριθμός πολυμορφικών ζωνών	Εύρος μεγέθους προϊόντων (bp)	Ποσοστό πολυμορφισμού (%)
OPA-04	AATCGGGCTG	11	11	240 - 1400	100
OPB-01	GTTTCGCTCC	7	7	375 - 1190	100
OPB-04	GGACTGGAGT	18	18	266 -1946	100
OPG-02	GGCACTGAGG	22	22	239 - 2100	100
OPZ-03	CAGCACCGCA	16	16	343 -2755	100
CB-09	GGTGACGCAG	23	22	211 -2399	95.65
CB-12	AGTCGACGCC	26	26	318 - 2406	100
CB-13	ACGCATCGGA	42	42	176 - 2786	100
CB-15	GGCTGGTTCC	18	18	454 - 2925	100
CB-17	GTAACCAGCC	20	20	354 - 2105	100

Τα χαρακτηριστικά και οι παράμετροι γενετικής ποικιλότητας των RAPD μοριακών δεικτών παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.3. Αναφορικά με τον αριθμό διαφορετικών αλληλομόρφων, η υψηλότερη τιμή καταγράφηκε στο δείκτη OPZ-03 ($N_a = 1,031$), ενώ αντίθετα τη μικρότερη τιμή εμφάνισε ο δείκτης OPA-04 ($N_a = 0.491$). Σε συμφωνία με τα ανωτέρω, τον μεγαλύτερο αριθμό δραστικών αλληλομόρφων εμφάνισε ο δείκτης OPZ-03 ($N_e = 1,289$), ενώ ο μικρότερος αριθμός αφορούσε στο δείκτη OPA-04 ($N_e = 1,089$) (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3. Χαρακτηριστικά και παράμετροι γενετικής ποικιλότητας των διαφορετικών μοριακών δεικτών RAPD που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας στο υπό μελέτη γενετικό υλικό του είδους *C. pero*. Το γενετικό υλικό περιλάμβανε δύο (2) εμπορικές ποικιλίες και οκτώ (8) τοπικές ποικιλίες.

Εκκινητής RAPD	Αλληλουχία (5' – 3')	N	Na	Ne	I	h	uh
OPA-04	AATCGGGCTG	4	0,491	1,089	0,072	0,050	0,067
OPB-01	GTTTCGCTCC	4	0,800	1,231	0,196	0,134	0,183
OPB-04	GGACTGGAGT	4	0,644	1,173	0,146	0,100	0,135
OPG-02	GGCACTGAGG	4	0,605	1,125	0,106	0,072	0,098
OPZ-03	CAGCACCGCA	4	1,031	1,289	0,244	0,167	0,227
CB-09	GGTGACGCAG	4	0,774	1,195	0,160	0,110	0,150
CB-12	AGTCGACGCC	4	0,915	1,265	0,214	0,148	0,203
CB-13	ACGCATCGGA	4	0,652	1,218	0,179	0,123	0,168
CB-15	GGCTGGTTCC	4	0,900	1,259	0,217	0,149	0,201
CB-17		4	0,815	1,215	0,177	0,122	0,166
Total*		40	0,758	1,210	0,174	0,119	0,162
SE			0,019	0,008	0,006	0,004	0,006

*Συνολικός μέσος όρος για όλους τους γενετικούς τόπους και όλους τους πληθυσμούς

N: αριθμός προϊόντων ανά πληθυσμό, *Na*: αριθμός διαφορετικών αλληλομόρφων, *Ne*: αριθμός δραστικών αλληλομόρφων, *I*: δείκτης Shannon, *h*: συντελεστής γενετικής ποικιλότητας, *uh*: συντελεστής αμερόληπτης (*unbiased*) γενετικής ποικιλότητας.

3.3 Ανάλυση της γενετικής παραλλακτικότητας με τη χρήση μοριακών δεικτών RAPD

Η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ και εντός των υπό μελέτη πληθυσμών του είδους *C. Pero* εκτιμήθηκε βάσει του ποσοστού πολυμορφικών ζωνών (PBP %), του αριθμού διαφορετικών αλληλομόρφων (Na), του αριθμού δραστικών αλληλομόρφων (Ne), του δείκτη Shannon (I), του συντελεστή γενετικής ποικιλότητας (h) καθώς και της γενετικής απόστασης (D) και γενετικής ομοιότητας (IN) κατά Nei.

Η μοριακή γενετική ανάλυση, με τη χρήση των επιλεγμένων δεικτών RAPD, ανέδειξε ένα μέσο ποσοστό πολυμορφισμού (PBP) μεταξύ 20,20 % και 35,96 % μεταξύ των πληθυσμών του *C. pero*.

Το μεγαλύτερο ποσοστό πολυμορφικών ζωνών καταγράφηκε στον πληθυσμό P2 (35,96 %), ακολουθούμενο από τον πληθυσμό P6 (33,00 %), ενώ το μικρότερο ποσοστό εντοπίστηκε στους πληθυσμούς P5 και P10 (20,20 και 22,17 %, αντίστοιχα). Το ποσοστό των πολυμορφικών ζωνών (γενετικών τόπων) ανά πληθυσμό για κάθε δείκτη RAPD ξεχωριστά καθώς και για το σύνολο των RAPD δεικτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4. Ποσοστό πολυμορφικών γενετικών τόπων ανά πληθυσμό για κάθε RAPD δείκτη ξεχωριστά καθώς και για το σύνολο των RAPD δεικτών.

Ποσοστό πολυμορφικών γενετικών τόπων											
Πληθυσμός	% Πολυμορφισμού										
	OPA-04	OPB-01	OPB-04	OPG-02	OPZ-03	CB-09	CB-12	CB-13	CB-15	CB-15	Total
P1	18,18	28,57	27,78	13,64	56,25	8,70	23,08	16,67	50,00	30,00	25,12
P2	36,36	57,14	33,33	4,55	37,50	26,09	34,62	45,24	33,33	60,00	35,96
P3	18,18	28,57	44,44	40,91	56,25	13,04	7,69	28,57	44,44	15,00	28,57
P4	18,18	42,86	16,67	0,00	56,25	34,78	42,31	26,19	44,44	10,00	28,08
P5	0,00	28,57	0,00	4,55	43,75	4,35	53,85	21,43	27,78	10,00	20,20
P6	0,00	57,14	16,67	50,00	18,75	30,43	38,46	40,48	50,00	15,00	33,00
P7	0,00	14,29	33,33	27,27	43,75	34,78	38,46	30,95	44,44	35,00	32,51
P8	18,18	28,57	33,33	13,64	43,75	26,09	34,62	38,10	27,78	30,00	30,54
P9	9,09	14,29	16,67	9,09	31,25	43,48	57,69	16,67	33,33	50,00	29,56
P10	0,00	28,57	22,22	13,64	18,75	39,13	15,38	28,57	5,56	35,00	22,17
Mean	11,82	32,86	24,44	17,73	40,63	26,09	34,62	29,29	36,11	29,00	28,57
SE	3,85	4,79	3,99	5,22	4,49	4,20	4,97	3,07	4,32	5,36	1,56

Τα ευρήματα σχετικά με τις γενετικές παραμέτρους παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.5. Ο μέσος αριθμός διαφορετικών αλληλομόρφων (N_a) κυμάνθηκε από 0,645 έως 0,857 για τους πληθυσμούς P10 και P2, αντίστοιχα (Πίνακας 3.5). Σχετικά με τον αριθμό δραστικών αλληλομόρφων (N_e), οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 1,162 και 1,245. Η υψηλότερη τιμή N_e καταγράφηκε στον πληθυσμό P2 (1,245), ενώ οι πληθυσμοί P5 και P10 εμφάνισαν τις μικρότερες τιμές N_e (1,162 και 1,177, αντίστοιχα). Σε συμφωνία με τα ανωτέρω ευρήματα σχετικά με τις τιμές PBP και N_e , ο πληθυσμός P2 εμφάνισε επίσης την μεγαλύτερη ποικιλότητα, βάσει του δείκτη Shannon ($I = 0,212$) και τον υψηλότερο συντελεστή γενετικής ποικιλότητας ($h = 0,144$). Κατ' αναλογία, οι μικρότερες αντίστοιχες τιμές καταγράφηκαν στους πληθυσμούς P5 και P10 (P5: $I = 0,090$ / $h = 0,135$ και P10: $I = 0,099$ / $h = 0,148$) (Πίνακας 3.5).

Πίνακας 3.5. Χαρακτηριστικά και παράμετροι γενετικής ποικιλότητας, όπως υπολογίστηκαν στο υπό μελέτη γενετικό του είδους *C. pero*, με τη χρήση δέκα (10) RAPD μοριακών δεικτών. Το γενετικό υλικό περιλάμβανε δύο (2) εμπορικές ποικιλίες και οκτώ (8) τοπικές ποικιλίες.

Πληθυσμός	Ποικιλία	PBP (%)	N	Na	Ne	I	h	uh
P1	FYTRO FS 243	25,12	4	0,655	1,184	0,152	0,105	0,140
P2	BIG MAX	35,96	4	0,857	1,245	0,212	0,144	0,192
P3	Κολοκύθα για πίτα	28,57	4	0,803	1,203	0,171	0,117	0,156
P4	Νυχάκι	28,08	4	0,778	1,212	0,172	0,119	0,158
P5	Λευκά Μελίτης-BI	20,20	4	0,616	1,162	0,129	0,090	0,135
P6	Στρόγγυλο πορτοκαλί	33,00	4	0,818	1,241	0,200	0,137	0,183
P7	Οβάλ μικρές Νεάπολης	32,51	4	0,808	1,221	0,191	0,130	0,173
P8	Μπουκάλα Λακωνίας	30,54	4	0,808	1,219	0,183	0,126	0,167
P9	Μακεδονικά πράσινα	29,56	4	0,793	1,233	0,184	0,128	0,171
P10	K-7	22,17	4	0,645	1,177	0,141	0,099	0,148
Total*		28,57	40	0,758	1,210	0,174	0,119	0,162
SE		1,56		0,019	0,008	0,006	0,004	0,006

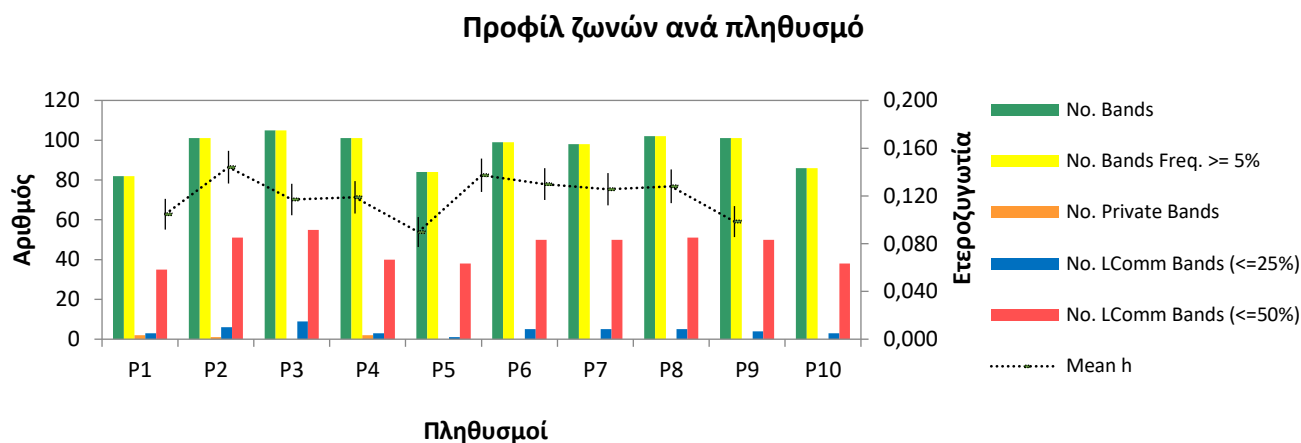
*Συνολικός μέσος όρος για όλους τους γενετικούς τόπους και όλους τους πληθυσμούς

PBP: ποσοστό πολυμορφικών ζωνών, N: αριθμός προϊόντων ανά πληθυσμό, Na: αριθμός διαφορετικών αλληλομόρφων, Ne: αριθμός δραστικών αλληλομόρφων, I: δείκτης Shannon, h: συντελεστής γενετικής ποικιλότητας, uh: συντελεστής αμερόληπτης (unbiased) γενετικής ποικιλότητας.

Τα προφίλ των ζωνών για τα δυαδικά (απλοειδή) δεδομένα ανά πληθυσμό απεικονίζονται στο Γράφημα 3.1. Σύμφωνα με το Γράφημα 3.1, ο μεγαλύτερος αριθμός κοινών ζωνών, που εμφανίζονται σε ποσοστό ≤ 25 %, βρέθηκε στους πληθυσμούς P3 (9 ζώνες) και P2 (6 ζώνες). Αντιθέτως, ο μικρότερος αριθμός ζωνών καταγράφηκε στον πληθυσμό P5 (1 ζώνη). Επιπλέον, η ανάλυση κατέδειξε ότι οι πληθυσμοί P1 και P4 εμφανίζουν το μεγαλύτερο αριθμό μοναδικών

ζωνών (2 ζώνες), προϊόντων δηλαδή που ενισχύθηκαν αποκλειστικά σε ένα πληθυσμό. Αντίθετα, οι πληθυσμοί P3, P5, P6, P7, P8, P9 και P10 δεν εμφάνισαν μοναδικές ζώνες.

Τα προφίλ ζωνών ανά πληθυσμό για κάθε δείκτη RAPD ξεχωριστά καθώς και για το σύνολο των δεικτών παρουσιάζονται στο Παράρτημα (Πίνακας Π3).



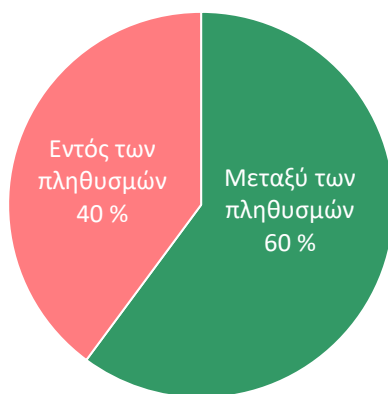
Γράφημα 3.1 Προφίλ ζωνών που προέκυψε έπειτα από ανάλυση με τη χρήση 10 μοριακών δεικτών RAPD ανά πληθυσμό.

[No. Bands = αριθμός διαφορετικών ζωνών, No. Bands Freq. $\geq 5\%$ = αριθμός διαφορετικών ζωνών με συχνότητα $\geq 5\%$, No. Private Bands = αριθμός μοναδικών ζωνών σε έναν πληθυσμό, No. LComm Bands ($\leq 25\%$) = αριθμός κοινών ζωνών (Freq. $\geq 5\%$) που απαντώνται σε ποσοστό 25 % ή λιγότερο των πληθυσμών, No. LComm Bands ($\leq 50\%$) = αριθμός κοινών ζωνών (Freq. $\geq 5\%$) που απαντώνται σε ποσοστό 50 % ή λιγότερο των πληθυσμών].

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της μοριακής παραλλακτικότητας (AMOVA) προκειμένου να προσδιοριστεί η κατανομή της γενετικής διακύμανσης μεταξύ και εντός των υπό μελέτη πληθυσμών. Για τον στατιστικό έλεγχο πραγματοποιήθηκαν 999 μεταθέσεις στο σύνολο των δεδομένων ($N = 999$). Όπως ήταν αναμενόμενο, τα αποτελέσματα της ανάλυσης ανέδειξαν ότι το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης κατανεμήθηκε μεταξύ των πληθυσμών. Συγκεκριμένα, ποσοστό 60 % της συνολικής γενετικής διακύμανσης αποδίδεται σε διαφορές μεταξύ των πληθυσμών, ενώ το υπόλοιπο 40 % της γενετικής διακύμανσης αφορά σε διαφορές που

απαντώνται εντός των πληθυσμών (Γράφημα 3.2, Πίνακας 3.6). Η τιμή PhiPT ήταν 0.601, υποδηλώνοντας την ύπαρξη σημαντικής γενετικής διαφοροποίησης.

Κατανομή της γενετικής ποικιλότητας



Γράφημα 3.2 Κατανομή της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ και εντός των υπό μελέτη πληθυσμών του είδους *C. pero*. Το γενετικό υλικό περιλάμβανε δύο (2) εμπορικές ποικιλίες και οκτώ (8) τοπικές ποικιλίες.

Πίνακας 3.6. Ανάλυση μοριακής παραλλακτικότητας (AMOVA) για το υπό μελέτη γενετικό υλικό του είδους *C. pero* βάσει της μοριακής γενετικής ανάλυσης με δείκτες RAPD. Το γενετικό υλικό περιλάμβανε δύο (2) εμπορικές ποικιλίες και οκτώ (8) τοπικές ποικιλίες.

Πηγή παραλλακτικότητας	DF	SS	MS	Est. Var.	(%)	PhiPT
Μεταξύ των πληθυσμών	9	1006,522	111,836	25,086	60	0.601**
Εντός των πληθυσμών	30	465,583	16,628	16,628	40	
Σύνολο	39	1472,105		41,714	100	

DF: βαθμοί ελευθερίας, SS: άθροισμα τετραγώνων, MS: μέσο άθροισμα τετραγώνων, Est.Var.: εκτιμώμενη διακύμανση, ποσοστό συνολικής διακύμανσης (%), PhiPT: σημαντικότητα (p-value) [$\Phi PT = AP / (WP + AP) = AP / TOT$], ** $p < 0.001$.

Περαιτέρω, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις ανά ζεύγη πληθυσμών, με βάση τις τιμές PhiPT, ώστε να εκτιμηθεί η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών. Οι τιμές PhiPT κυμάνθηκαν μεταξύ 0,338 και 0,693. Η ανάλυση ανέδειξε ως πλέον σημαντική τη διαφορά μεταξύ των πληθυσμών P3 και P9 (PhiPT = 0,693), ενώ τη μικρότερη μεταξύ τους διαφορά εμφάνισαν οι πληθυσμοί P8 και P9 (PhiPT = 0.345) (Πίνακας 3.7).

Πίνακας 3.7. Γενετική διαφοροποίηση, βάσει των τιμών PhiPT, όπως υπολογίστηκε για το υπό μελέτη γενετικό υλικό του είδους *C. pero* με τη χρήση των επιλεγμένων μοριακών δεικτών RAPD. Το γενετικό υλικό περιλάμβανε δύο (2) εμπορικές ποικιλίες και οκτώ (8) τοπικές ποικιλίες.

Πληθυσμός	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
P1	-									
P2	0,535	-								
P3	0,655	0,576	-							
P4	0,642	0,498	0,638	-						
P5	0,668	0,606	0,481	0,644	-					
P6	0,606	0,560	0,487	0,607	0,483	-				
P7	0,527	0,585	0,618	0,635	0,609	0,553	-			
P8	0,648	0,610	0,670	0,577	0,662	0,613	0,577	-		
P9	0,649	0,626	0,693	0,598	0,655	0,624	0,592	0,338	-	
P10	0,648	0,604	0,686	0,585	0,658	0,612	0,610	0,549	0,384	-

Οι τιμές PhiPT υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας 999 μεταθέσεις εντός του συνόλου των δεδομένων (N = 999).

Τέλος, προσδιορίστηκε η γενετική απόσταση και γενετική ομοιότητα κατά Nei προκειμένου να εκτιμηθούν οι γενετικές σχέσεις μεταξύ των πληθυσμών. Η γενετική απόσταση κατά Nei κυμάνθηκε μεταξύ 0,159 και 0,627, ενώ η γενετική ομοιότητα κυμάνθηκε αντιστοίχως από 0,534 έως 0,853 (Πίνακες 3.8 και 3.9). Σε σχέση με τη γενετική απόσταση μεταξύ των πληθυσμών, οι υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν για τους πληθυσμούς P3 και P9 (D = 0,627), ενώ οι χαμηλότερες αντίστοιχες τιμές αφορούσαν στους πληθυσμούς P8 και P9 (D = 0,159) (Πίνακας 3.8). Κατ' αναλογία, οι πληθυσμοί P8 και P9 εμφάνισαν τη μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα (IN = 0,853),

και ακολούθησαν οι πληθυσμοί P9 και P10 ($IN = 0,833$). Αντίθετα, οι πληθυσμοί P3 και P9 εμφάνισαν τη μικρότερη γενετική ομοιότητα ($IN = 0,534$) (Πίνακας 3.9).

Η γενετική απόσταση και γενετική ομοιότητα κατά Nei, βάσει της ανάλυσης των μεμονωμένων δεικτών, παρέχεται στο Παράρτημα (Πίνακας Π4).

Πίνακας 3.8. Γενετική απόσταση κατά Nei, όπως υπολογίστηκε για το υπό μελέτη γενετικό υλικό του είδους *C. pero* με τη χρήση των επιλεγμένων μοριακών δεικτών RAPD. Το γενετικό υλικό περιλάμβανε δύο (2) εμπορικές ποικιλίες και οκτώ (8) τοπικές ποικιλίες.

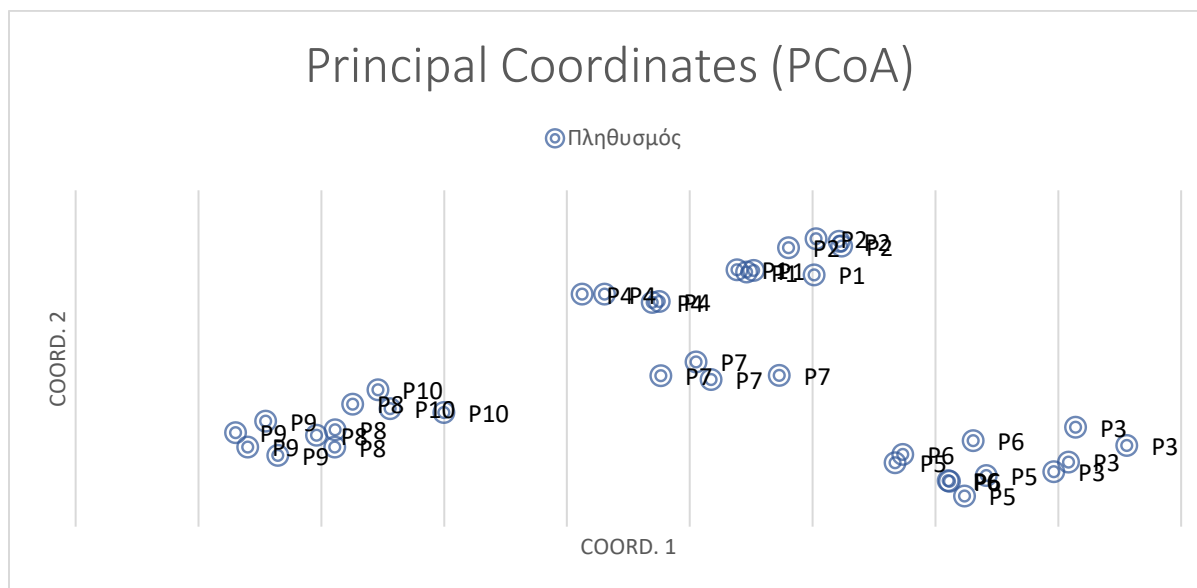
Γενετική απόσταση κατά Nei για τους 10 πληθυσμούς του είδους <i>C. pero</i>										
Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
P1	0,000									
P2	0,308	0,000								
P3	0,441	0,388	0,000							
P4	0,420	0,288	0,444	0,000						
P5	0,432	0,430	0,224	0,430	0,000					
P6	0,398	0,404	0,265	0,432	0,256	0,000				
P7	0,277	0,432	0,432	0,472	0,397	0,366	0,000			
P8	0,450	0,472	0,544	0,356	0,493	0,462	0,379	0,000		
P9	0,459	0,517	0,627	0,395	0,484	0,493	0,409	0,159	0,000	
P10	0,414	0,446	0,550	0,348	0,434	0,443	0,418	0,316	0,182	0,000

Πίνακας 3.9. Γενετική ομοιότητα κατά Nei, όπως υπολογίστηκε για το υπό μελέτη γενετικό υλικό του είδους *C. pero* με τη χρήση των επιλεγμένων μοριακών δεικτών RAPD. Το γενετικό υλικό περιλάμβανε δύο (2) εμπορικές ποικιλίες και οκτώ (8) τοπικές ποικιλίες.

Γενετική ομοιότητα κατά Nei για τους 10 πληθυσμούς του είδους <i>C. pero</i>										
Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
P1	1,000									
P2	0,735	1,000								
P3	0,643	0,679	1,000							
P4	0,657	0,749	0,642	1,000						

P5	0,649	0,650	0,799	0,650	1,000					
P6	0,672	0,668	0,767	0,649	0,774	1,000				
P7	0,758	0,649	0,649	0,624	0,672	0,694	1,000			
P8	0,637	0,624		0,701	0,611	0,630	0,685	1,000		
P9	0,632	0,597	0,534	0,674	0,617	0,611	0,665	0,853	1,000	
P10	0,661	0,640	0,577	0,706	0,648	0,642	0,659	0,729	0,833	1,000

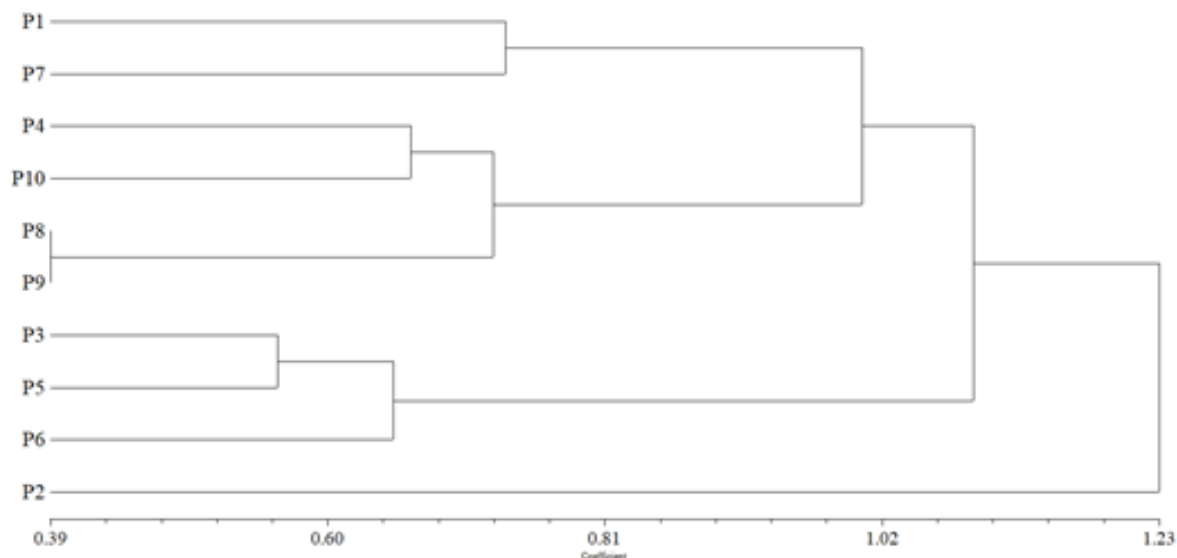
Τέλος, στο πλαίσιο απεικόνισης των γενετικών σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών, διενεργήθηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCoA) και κατασκευή δενδρογράμματος ιεραρχικής ταξινόμησης με χρήση της ομαδοποίησης UPGMA.



Γράφημα 3.3 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCoA) για τους υπό μελέτη πληθυσμούς του είδους *C. peregrina*, βάσει της μοριακής γενετικής ανάλυσης με δείκτες RAPD.

Στο γράφημα συντεταγμένων, τα σημεία αντιστοιχούν στα άτομα των δέκα υπό μελέτη πληθυσμών (Γράφημα 3.3). Τα αποτελέσματα της PCoA βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα σχετικά με τους συντελεστές γενετικής απόστασης και γενετικής ομοιότητας, υποστηρίζοντας το διαχωρισμό των ατόμων σε τρεις κύριες ομάδες. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 3.3, οι πληθυσμοί P8, P9 και P10 ταξινομούνται μαζί. Παράλληλα, η ανάλυση ανέδειξε την στενή γενετική σχέση μεταξύ των πληθυσμών P3, P5 και P6. Τέλος, η τρίτη ομάδα, που περιλαμβάνει

τους πληθυσμούς P1, P2, P4 και P7, εμφανίζει σχετικά μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα συγκριτικά με τις υπόλοιπες. Οι τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες αντιπροσωπεύουν το 40,89 % της συνολικής παραλλακτικότητας.



Γράφημα 3.4 Δενδρόγραμμα που απεικονίζει τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών του είδους *C. pero*.

Σε συμφωνία με τα ανωτέρω ευρήματα, το δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε ανέδειξε την διαχωρισμό των ατόμων σε τρεις κύριες ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει δύο υποκλάδους, όπου στον πρώτο υποκλάδο ταξινομούνται οι πληθυσμοί P1 και P7 και στο δεύτερο υποκλάδο ταξινομούνται οι πληθυσμοί P4, P10, P8 και P9. Μάλιστα, οι πληθυσμοί P8 και P9 ταξινομούνται μαζί. Στη δεύτερη ομάδα, περιλαμβάνονται οι πληθυσμοί P3, P5 και P6. Ο πληθυσμός P2 δεν ταξινομείται σε κάποια ομάδα.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της μελέτης υπογραμμίζουν την καταλληλότητα των μοριακών δεικτών τύπου RAPD για την εκτίμηση της υπάρχουσας γενετικής παραλλακτικότητας τόσο σε διαπληθυσμιακό όσο και σε ενδοπληθυσμιακό επίπεδο στο είδος *C. pero*. Η μοριακή γενετική ανάλυση με δείκτες RAPD στο υπό μελέτη γενετικό υλικό ανέδειξε την ύπαρξη σημαντικής γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ αλλά και εντός των πληθυσμών. Είναι δε ενδιαφέρον, υπό το πρίσμα της βελτίωσης αλλά και εν γένει της αγρονομικής συμπεριφοράς ότι οι ελληνικές τοπικές ποικιλίες, που προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές, εμφανίζουν σημαντική παραλλακτικότητα, η οποία είναι δυνητικά αξιοποιήσιμη.

4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Τα είδη του γένους *Cucurbita* συγκριτικά με άλλα είδη της οικογένειας Cucurbitaceae παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία στο μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα των καρπών (Savage et al., 2015). Παρά τη σημασία του γένους, αναφορικά με την έκταση της καλλιέργειας σε παγκόσμιο επίπεδο, τη θεραπευτική αξία των καρπών και την ευρεία αξιοποίησή τους σε διατροφικό επίπεδο, οι γενετικές αναλύσεις στο γένος *Cucurbita* είναι περιορισμένες. Συγκεκριμένα, το είδος *Cucurbita pepo* L., είναι το πιο ποικιλόμορφο είδος, με την ποικιλότητά του να αφορά κυρίως στα χαρακτηριστικά των καρπών (Paris et al., 2002).

Στο παρελθόν, η εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας τόσο μεταξύ διαφορετικών ειδών όσο και μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων του ίδιου είδους βασίζονταν κυρίως στη χρήση μορφολογικών δεικτών. Τις τελευταίες δεκαετίες, οι έρευνες που εστιάζουν στην εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας ενσωματώνουν ολοένα και περισσότερο τη χρήση μοριακών δεικτών, η οποία παρέχει δυνατότητες ακριβέστερης ανάλυσης του γενετικού υλικού σε σύντομο χρόνο και σαφώς μεγαλύτερη αξιοπιστία. Η χρήση των μοριακών δεικτών ως εργαλεία στις γενετικές αναλύσεις σχετίζεται με το γεγονός ότι εμφανίζουν ανεξαρτησία τόσο από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες όσο και από το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών (Radwan, 2014). Επιπλέον, σημαντικό πλεονέκτημα των μοριακών δεικτών είναι ότι, σε αντίθεση με τους μορφολογικούς και βιοχημικούς δείκτες, εμφανίζουν αφθονία στο σύνολο των φυτικών ειδών (Brown et al., 2001). Τέλος, η χρήση των μοριακών δεικτών επιτρέπει την κάλυψη όλου του γονιδιώματος, με αποτέλεσμα να καθίσταται ευχερής η ανίχνευση πολυμορφισμών που απαντώνται στο φυτικό γονιδίωμα.

Στην παρούσα μελέτη, η χρήση των επιλεγμένων εκκινητών RAPD επέτρεψε την ενίσχυση συνολικά 203 θραυσμάτων, μεγέθους 176 - 2925 bp, με μέσο αριθμό ζωνών ανά δείκτη 20,3. Επιπλέον, η ανάλυση ανέδειξε ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό πολυμορφισμού ανά δείκτη, το οποίο κυμάνθηκε μεταξύ 95,65 έως και 100 %. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με προηγούμενες αναφορές σχετικά με το υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού των δεικτών RAPD, σε γονοτύπους του είδους *C. pepo* (Hadia et al., 2008; Kathiravan et al., 2006; Tsivelikas et al., 2009; Ntuli et al., 2013; Radwan 2014; Hamada, 2019) και παρέχουν επιπλέον ενδείξεις ότι το *C. pepo* αποτελεί ιδιαίτερα πολυμορφικό είδος. Ανάλογο υψηλό ποσοστό πολυμορφισμού, της τάξης του 94 %, καταγράφηκε και στην έρευνα των Nontuthuko et al. (2013), όπου έγινε χρήση ενός σετ δεικτών που είναι εν

μέρει κοινό με τους δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (CB-09, CB-12, CB-13, CB-15, CB-17). Παράλληλα, η έρευνα των Hadia et al. (2008), που ανέδειξε ποσοστό πολυμορφισμού της τάξης του 89 % μεταξύ των γονότυπων του *C. pero*, συνέβαλε στον προσδιορισμό της υπάρχουσας παραλλακτικότητας μεταξύ των ειδών *C. maxima*, *C. moschata* και *C. pero*, καθώς και εντός των πληθυσμών τους.

Αναφορικά με τα χαρακτηριστικά των RAPD δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ο δείκτης OPZ-03 διακρίθηκε καθώς εμφάνισε το μεγαλύτερο αριθμό διαφορετικών αλληλομόρφων καθώς και δραστικών αλληλομόρφων ($N_a = 1,031$ και $N_e = 1,289$, αντίστοιχα). Αντίθετα, τις μικρότερες αντίστοιχες τιμές εμφάνισε ο δείκτης OPA-04 ($N_a = 0,491$ και $N_e = 1,089$, αντίστοιχα). Σε ανάλογη έρευνα όπου προσεγγίστηκε η εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας σε ποικιλίες του είδους *C. pero*, διαπιστώθηκε ότι οι δείκτες OPZ-03 και OPA-04 υπήρξαν οι πλέον πολυμορφικοί, οδηγώντας σε ενίσχυση 13 και 18 πολυμορφικών ζωνών αντίστοιχα (Radwan, 2014). Αντίθετα, οι δείκτες OPB-01 και OPB-02 χαρακτηρίστηκαν από το μικρότερο αριθμό πολυμορφικών ζωνών (3) (Radwan, 2014). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε μερική συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αναφορικά με το χαμηλό επίπεδο πολυμορφισμού στο δείκτη OPB-01. Αναφορικά με το δείκτη OPB-02, εξαιρέθηκε από την ανάλυση στην παρούσα μελέτη καθώς δεν επέτρεψε την ενίσχυση διακριτών και επαναλήψιμων ζωνών. Επιπλέον, η ανάλυση ανέδειξε ότι το επίπεδο πολυμορφισμού μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων ποικίλει για τους διαφορετικούς εκκινητές, οδηγώντας σε σημαντικά διαφοροποιημένα ποσοστά πολυμορφισμού για κάθε δείκτη. Στην παρούσα μελέτη το μέσο ποσοστό πολυμορφισμού για το σύνολο των δεικτών κυμάνθηκε μεταξύ 20,20 % και 35,96 %.

Σχετικά με την παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών, η ανάλυση κατέδειξε ότι ο μεγαλύτερος αριθμός κοινών ζωνών, που εμφανίζονται σε ποσοστό ≤ 25 %, απαντάται στην τοπική ποικιλία 1 (9 ζώνες) και στην εμπορική ποικιλία Big Max (6 ζώνες), ενώ ο μικρότερος αριθμός κοινών ζωνών αφορούσε στην τοπική ποικιλία 3 (Λευκά Μελίτης-BI) (1 ζώνη). Είναι δε αξιοσημείωτο ότι η εμπορική ποικιλία FYTRO FS 243 και η τοπική ποικιλία 2 (Νυχάκι) εμφάνισαν το μεγαλύτερο αριθμό μοναδικών ζωνών (2 ζώνες), προϊόντων δηλαδή που ενισχύθηκαν αποκλειστικά σε ένα πληθυσμό. Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των παραμέτρων, η ποικιλία «Νυχάκι» διαφοροποιείται σημαντικά από τις υπόλοιπες τοπικές ποικιλίες, παρέχοντας

ενδείξεις σχετικά με την πιθανή ενσωμάτωσή της σε προγράμματα βελτίωσης για τη διεύρυνση της γενετικής βάσης του είδους.

Περαιτέρω, πραγματοποιήθηκε AMOVA ώστε να κατανεμηθεί η γενετική διακύμανση μεταξύ και εντός των υπό μελέτη ποικιλιών. Τα ευρήματα ανέδειξαν ότι το 60 % της συνολικής γενετικής διακύμανσης σχετίζεται με διαφορές μεταξύ των πληθυσμών, ενώ το υπόλοιπο 40 % αποδίδεται σε διαφορές εντός των πληθυσμών. Σχετικά με τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των πληθυσμών, ο συντελεστής γενετικής απόστασης κατά Nei υπογραμμίζει ότι τη μεγαλύτερη μεταξύ τους διαφορά ($D = 0,627$) παρουσιάζουν οι τοπικές ποικιλίες 1 και 7 (Κολοκύθι για πίτα και Μακεδονικά πράσινα, αντίστοιχα), ενώ τη μικρότερη διαφορά ($D = 0,159$) εμφανίζουν οι τοπικές ποικιλίες 6 και 7 (Μπουκάλα Λακωνίας και Μακεδονικά πράσινα, αντίστοιχα). Βάσει των ανωτέρω, οι τοπικές ποικιλίες 6 και 7 εμφάνισαν επίσης τη μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα κατά Nei ($IN = 0,853$) και ακολούθησαν οι τοπικές ποικιλίες 7 και 8 (Μακεδονικά πράσινα και K-7, αντίστοιχα ($IN = 0,833$)).

Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και από την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCoA), η οποία υποστηρίζει το διαχωρισμό των ατόμων σε τρεις κύριες ομάδες. Στο πλαίσιο αυτό, η ανάλυση κατέδειξε την ύπαρξη στενής γενετικής σχέσης μεταξύ των τοπικών ποικιλιών Μπουκάλα Λακωνίας (P8), Μακεδονικά πράσινα (P9) και K-7 (P10) καθώς και μεταξύ των τοπικών ποικιλιών Κολοκύθι για πίτα (P3), Λευκά Μελίτης-BI (P5) και Στρόγγυλο πορτοκαλί (P6).

Τα συνολικά ευρήματα της παρούσας διατριβής υπογραμμίζουν την καταλληλότητα των μοριακών δεικτών τύπου RAPDs για την εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας στο είδος *Cucurbita pepo*, τόσο σε διαπληθυσμιακό όσο και σε ενδοπληθυσμιακό επίπεδο. Τα ευρήματα που προκύπτουν από μελέτες εκτίμησης της γενετικής παραλλακτικότητας παρέχουν σημαντικές πληροφορίες από βελτιωτική σκοπιά καθώς συμβάλλουν στη βέλτιστη διαχείριση των διαθέσιμων γενετικών πόρων και ειδικότερα στην επιλογή κατάλληλων γονέων για μεγιστοποίηση της ετέρωσης. Στο πλαίσιο αυτό, η εκτίμηση της υπάρχουσας γενετικής ποικιλότητας αποτελεί τη βάση για τον προσδιορισμό των στρατηγικών βελτίωσης και την ενσωμάτωση κατάλληλων γονοτύπων στα βελτιωτικά σχήματα.

5. Βιβλιογραφία

Ξενόγλωση Βιβλιογραφία:

A

Andres, T.C. and Robinson, R.W., 2002. *Cucurbita ecuadorensis*: An ancient semi-domesticated with multiple disease resistance and tolerance to some adverse growing conditions. In *Cucurbitaceae*, Maynard (ed.) ASHS Press. Alexandria, Va:95-99.

B

Barzergar, R., Peyvast, G., Ahadi, A.M., Rabiei, B., Ebadi, A.A. and Babagolzadeh, A., 2013. Biochemical systematic, population structure and genetic variability studies among Iranian *Cucurbita* (*Cucurbit pepo* L.) accessions, using genomic SSRs and implications for their breeding potential. *Biochemical Systematic and Ecology*, 50: 187-198.

Bhawna, M.Z., Arya, L. and Verma, M., 2017. Use of SCoT markers to assess the gene flow and population structure among two different population of bottle gourd. *Plant Gene*, 9: 80-86.

Brown, Rebecca Nelson. 2001. Traditional and molecular approaches to Zucchini yellow mosaic virus resistance in *Cucurbita*. Doctoral dissertation. Oregon State University, Oregon.

C

Castro, H.A., Galvez, M.J., Gonzalez, S.R. and Villamil, C.B., 2006. Protein composition of *Cucurbita maxima* and *C. moschata* seeds. *Biologia Plantarum*, 50(2), 251-256.

Collard BCY, Mackill DJ, 2009. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27:86–93.

D

Datta, D., Gupta, Sanjeev, Chaturvedi, S.K. and Nadarajan, N. (2011): *Molecular Markers in Crop Improvement*. Indian Institute of Pulses Research, Kanpur - 208 024.

Decker, 1988. Origin evolution and systematics of *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Economic Botany*, 42:4-15.

Decker DS, 1985. Numerical analysis of allozyme variation in *Cucurbita pepo*. *Economic Botany*, 39: 300–309.

Decker-Walters DS, Walters TW, Posluszny U, Kevan PG, 1990. Genealogy and gene flow among annual domesticated species of *Cucurbita*. *Canadian Journal of Botany*, 68:782–789.

Deragon, J.M. and Landry, B.S., 1992. RAPD and other PCR-based analyses of plant genomes using DNA extracted from small leaf discs. *Genome Research*, 1:175-180.

G

Gong Li, Harry S. Paris, Gertraud Stift, Martin Pachner, Johann Vollmann, Tamas Lelley, 2013. Genetic relationships and evolution in *Cucurbita* as viewed with simple sequence repeat polymorphisms: the centrality of *C. okeechobeensis*. *Genetic resources and crop evolution*, 60:1531–1546.

H

Halldén, C., Hansen, M., Nilsson, N.-O., Hjerdin, A. and Säll, T., 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 1185-1192.

Hamada, M. S. 1; M. H. Abd-elAziz² and Norhan M. Sharshera, 2019. Generation mean analysis for some selected crosses based on molecular distances estimated using ISSR and RAPD techniques in squash 9th International Conference for Sustainable Agricultural Development. *Fayoum J. Agriculture Research, & Development*, 33: 1(B).

Hamdi K, Ben-Amor J, Mokrani K, Mezghanni N, Tarchoun N, 2017. Assessment of the genetic diversity of some local squash (*Cucurbita maxima* Duchesne) populations revealed by agromorphological and chemical traits. *Journal of New Sciences*, 42(5):2306–2317.

Heather R. Kates, Pamela S. Soltis, Douglas E. Soltis, 2017. Evolutionary and domestication history of *Cucurbita* (pumpkin and squash) species inferred from 44 nuclear loci. *ScienceDirect*, 111: 98-109.

Heikal, A., Hadia HA, Abdel-Razzak HS, Hafez EE, 2008. Assessment of genetic relationships among and within *Cucurbita* species using RAPD and ISSR markers. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(5): 515-525.

I

Ignart F, Weeden NF, 1984. Allozyme variation in cultivars of *Cucurbita pepo* L.. *Euphytica*, 33: 779–785.

J

Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vázquez & A. Karp, 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3: 381–390.

K

Kathiravan K, Vengedesan G, Singer S, Steinitz B, Paris HS, Gaba V, 2006. Adventitious regeneration in vitro occurs across a wide spectrum of squash (*Cucurbita pepo*) genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 85: 285-295.

L

Lui Chao, Yu Ge, Dong-Jie Wang, Xue Li, Xiao-Xia Yang, Chong-Shi Cui, Shu-Ping Qu, 2013. Morphological and molecular diversity in a germplasm collection of seed pumpkin. *ScienceDirect*, 154: 8-16.

M

Martins-Lopes, P., Lima-Brito, J., Gomes, S., Meirinhos, J., Santos, L. and Guedes-Pinto, H., 2007. RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 117-128.

Mason AS., 2014. SSR Genotyping. *Methods in Molecular Biology*, 1245: 77-89.

Mohamed Abd El-Hameid Abdein, 2018. Genetic Diversity between Pumpkin Accessions Growing in the Northern Border Region in Saudi Arabia Based on Biochemical and Molecular Parameters N. *Egyptian Journals*, 58: 463-476.

N

Nontuthuko R. Ntuli, Alpheus M. Zobolo, Pangirayi B. Tongoona, Nokuthula W. Kunene, 2013. Genetic diversity in *Cucurbita pepo* landraces from northern KwaZulu-Natal, South Africa, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology*, 12: 44.

P

Paris HS., 2016. Overview of the origins and history of the five major cucurbit crops: issues for ancient DNA analysis of archaeological specimens. *Vegetation History Archaeobotany*, 25:405–414.

Paris H.S., N. Yonash, V. Portnoy, N. Mozes-Daube, G. Tzuri, N. Katzir, 2003. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*) using DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 971-978.

R

Radwan SAA, 2014. Molecular discrimination and genetic relationships between some cultivars of *Cucurbita pepo* ssp. *pepo* using random amplification of polymorphic DNA (RAPD) analysis. *African Journal of Biotechnology*, 13(11): 1202-1209.

Rathore, N.S., Rai, M.K., Phulwaria, M., Rathore, N. and Shekhawat, N.S., 2014. Genetic stability in micro propagated *Cleome gynandra* revealed by SCoT analysis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 555-559.

S

Salehi B., Sharifi-Rad J., Capanoglu E., Adrar N., Catalkaya G., Shaheen S., Jaffer M., Giri L., Suyal R., Jugran A. K., Calina D., Docea A. O., Kamiloglu S., Kregiel D., Antolak H., Pawlikowska, E., Sen S., Acharya K., Bashiry M., Cho W. C., 2019. *Cucurbita* plants: From farm to industry. *Applied Sciences* (Switzerland).

Savage, J.A.; Haines, D.F.; Holbrook, N.M., 2015. The making of giant pumpkins: How selective breeding changed the phloem of *Cucurbita maxima* from source to sink. *Plant Cell Environment*, 38: 1543–1554.

Schierwater B. and Ender A., 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Research*, 21: 4647-4648.

Smith, B.D., 1997. The initial domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10,000 years ago. *Science*, 932-934.

Spooner D., Treuren R., Vicente M.C., 2005. Molecular markers for GenBank management. *IPGRI Technical Bulletin*, 10: 136.

Staub, J.E., Danin-Poleg, Y., Fazio, G., Horejsi, T., Reis, N. and Katzir, N., 2000. Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. *Euphytica*, 115: 225-241.

T

Thormann C., M. Ferreira, L. Camargo, J. Tivang and T. Osborn, 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 973-980.

Tsivelikas AL, Koutita O, Anastasiadou A, Skaracis GN, Traka-Mavrona E, Koutsika-Sotiriou M, 2009. Description and analysis of genetic diversity among squash accessions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(2): 271-283.

W

Welsh J., McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 18: 7213–7218.

Williams J.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531–6535.

X

Xanthopoulou, A., Ganopoulos, I., Kalivas, A., Nianiou-Obeidat, Ralli, P., Moysiadis, T., Tsafaris, A. and Madesis, P, 2015. Comparative analysis of genetic diversity in Greek Gene bank collection of summer squash (*Cucurbita pepo*) landraces using start codon targeted (SCoT) polymorphism and ISSR markers. *Australian Journal of Crop Science*, 9(1): 14-21.

Xin Tongxu, Haojie Tian, Yalin Ma, Shenhao Wang, Li Yang, Xutong Li, Mengzhuo Zhang, Chen Chen, Huaisong Wang, Haizhen Li, Jieting Xu, Sanwen Huang, Xueyong Yang, 2022. Targeted creating new mutants with compact plant architecture using CRISPR/Cas9 genome editing by an optimized genetic transformation procedure in cucurbit plants. *Horticulture Research*, 9.

Z

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994 Genome fingerprinting by simple sequence repeat SSR-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία:

Γ

Γιανούλης Δ., 2020. Αξιολόγηση των υβριδίων κολοκυθιού. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών, Αμαλιάδα.

Δ

Δημητράκης Κ. Γ., 1998. Λαχανοκομία. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα.

Κ

Κανάκης, Α. Γ., 2004. Καλλιέργεια λαχανικών στο θερμοκήπιο. Τόμος Β'. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε, Αθήνα.

Ο

Ολύμπιος, Χ. Μ., 2015. Η Τεχνική της Καλλιέργειας των Υπαίθριων Κηπευτικών. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε, Αθήνα.

X

Χα Ι. Α., & Πετρόπουλος Σ., 2014. Γενική Λαχανοκομία και Υπαίθρια Καλλιέργεια Λαχανικών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος.

Οργανισμοί

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022, FAOSTAT database.
www.fao.org

U.S. Department of Agriculture, 2014. USDA database.

USDA

Παράρτημα

Πίνακας Π1. Μήτρα δεδομένων για τον μοριακό δείκτη RAPD-A04. Για κάθε εκκινητή κατασκευάζεται δυαδική μήτρα, όπου ως “1” δηλώνεται η παρουσία και ως “0” η απουσία του προϊόντος ενίσχυσης.

Πληθυσμός	Δείγμα	1400	1300	1200	1100	970	690	630	460	380	300	240
P1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
P1	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
P1	3	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
P1	4	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
P2	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1
P2	2	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
P2	3	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
P2	4	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
P3	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
P3	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
P3	3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
P3	4	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
P4	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1
P4	2	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0
P4	3	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1
P4	4	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0
P5	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
P5	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
P5	3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
P5	4	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
P6	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
P6	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
P6	3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
P6	4	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
P7	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
P7	2	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
P7	3	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
P7	4	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
P8	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0
P8	2	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0
P8	3	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
P8	4	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
P9	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
P9	2	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
P9	3	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
P9	4	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
P10	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
P10	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0

P10	3	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
P10	4	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0

Πίνακας Π2. Τύποι που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των γενετικών παραμέτρων.

Γενετική παράμετρος	Τύπος	Συμβολισμοί
Ne	$Ne = \text{No. of Effective Alleles} = 1 / (p^2 + q^2)$	
I	$I = \text{Shannon's Information Index} = -1 * (p * \ln(p) + q * \ln(q))$	
h	$h = \text{Diversity} = 1 - (p^2 + q^2)$	Where for Haploid Binary data, p = Band Freq. and q = 1 - p
uh	$uh = \text{Unbiased Diversity} = (N / (N-1)) * h$	Where for Haploid Binary data, p = Band Freq. and q = 1 - p
PhiPT	$\text{PhiPT} = AP / (WP + AP) = AP / \text{TOT}$	AP = Est. Var. Among Pops WP = Est. Var. Within Pops

Πίνακας Π3. Προφίλ ζωνών για τα δυαδικά (απλοειδή) δεδομένα ανά Πληθυσμό για κάθε δείκτη ξεχωριστά και για το σύνολο των RAPD δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

OPA-04

Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
No. Bands	4	8	3	6	2	2	4	5	4	3
No. BandsFreq. $\geq 5\%$	4	8	3	6	2	2	4	5	4	3
No. PrivateBands	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands ($\leq 25\%$)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands ($\leq 50\%$)	3	7	2	4	1	2	3	5	4	2
Mean h	0,080	0,148	0,068	0,091	0,000	0,000	0,000	0,068	0,045	0,000
SE of Mean h	0,054	0,063	0,046	0,061	0,000	0,000	0,000	0,046	0,045	0,000
Mean uh	0,106	0,197	0,091	0,121	0,000	0,000	0,000	0,091	0,061	0,000
SE of Mean uh	0,072	0,084	0,061	0,081	0,000	0,000	0,000	0,061	0,061	0,000

No. Bands = No. of Different Bands

No. Bands Freq. $\geq 5\%$ = No. of Different Bands with a Frequency $\geq 5\%$

No. Private Bands = No. of Bands Unique to a Single Population

No. LComm Bands ($\leq 25\%$) = No. of Locally Common Bands (Freq. $\geq 5\%$) Found in 25% or Fewer Populations

No. LComm Bands ($\leq 50\%$) = No. of Locally Common Bands (Freq. $\geq 5\%$) Found in 50% or Fewer Populations

h = Diversity = $1 - (p^2 + q^2)$

uh = Unbiased Diversity = $(N / (N-1)) * h$

Where for Haploid Binary data, p = Band Freq. and $q = 1 - p$.

OPB-01

Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
No. Bands	2	4	6	3	5	5	1	2	3	2
No. BandsFreq. $\geq 5\%$	2	4	6	3	5	5	1	2	3	2
No. PrivateBands	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands ($\leq 25\%$)	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands ($\leq 50\%$)	1	3	5	1	3	3	0	0	1	0
Mean h	0,125	0,214	0,107	0,196	0,127	0,214	0,071	0,107	0,054	0,127
SE of Mean h	0,082	0,076	0,069	0,094	0,082	0,076	0,071	0,069	0,054	0,082
Mean uh	0,167	0,286	0,143	0,262	0,190	0,286	0,095	0,143	0,071	0,190
SE of Mean uh	0,109	0,101	0,092	0,125	0,123	0,101	0,095	0,092	0,071	0,123

OPB-04

Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
No. Bands	8	9	11	8	0	7	8	9	6	6
No. BandsFreq. >= 5%	8	9	11	8	0	7	8	9	6	6
No. PrivateBands	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands (<=25%)	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
No. LCommBands (<=50%)	6	6	7	5	0	6	6	6	3	3
Mean h	0,125	0,125	0,181	0,063	0,000	0,076	0,132	0,125	0,076	0,099
SE of Mean h	0,050	0,043	0,050	0,034	0,000	0,042	0,046	0,043	0,042	0,045
Mean uh	0,167	0,167	0,241	0,083	0,000	0,102	0,176	0,167	0,102	0,148
SE of Mean uh	0,066	0,057	0,066	0,045	0,000	0,056	0,061	0,057	0,056	0,067

OPG-02

Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
No. Bands	10	7	15	7	11	12	10	8	7	7
No. BandsFreq. >= 5%	10	7	15	7	11	12	10	8	7	7
No. PrivateBands	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands (<=25%)	2	1	2	0	1	1	2	0	1	0
No. LCommBands (<=50%)	7	5	11	3	7	9	7	4	4	4
Mean h	0,057	0,017	0,170	0,000	0,020	0,193	0,108	0,057	0,040	0,061
SE of Mean h	0,032	0,017	0,045	0,000	0,020	0,043	0,039	0,032	0,028	0,033
Mean uh	0,076	0,023	0,227	0,000	0,030	0,258	0,144	0,076	0,053	0,091
SE of Mean uh	0,042	0,023	0,061	0,000	0,030	0,057	0,052	0,042	0,037	0,050

OPZ-03

Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
No. Bands	9	6	9	12	11	10	11	11	12	9
No. BandsFreq. >= 5%	9	6	9	12	11	10	11	11	12	9
No. PrivateBands	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands (<=25%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands (<=50%)	4	1	0	1	2	1	4	3	4	2
Mean h	0,242	0,141	0,234	0,234	0,194	0,078	0,172	0,172	0,117	0,083
SE of Mean h	0,056	0,047	0,055	0,055	0,057	0,043	0,051	0,051	0,045	0,045
Mean uh	0,323	0,188	0,313	0,313	0,292	0,104	0,229	0,229	0,156	0,125
SE of Mean uh	0,075	0,063	0,073	0,073	0,085	0,057	0,068	0,068	0,060	0,067

CB-09

Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
No. Bands	11	13	12	13	9	9	13	11	12	15
No. BandsFreq. $\geq 5\%$	11	13	12	13	9	9	13	11	12	15
No. PrivateBands	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands ($\leq 25\%$)	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1
No. LCommBands ($\leq 50\%$)	2	3	2	4	2	1	5	3	5	6
Mean h	0,033	0,109	0,065	0,147	0,019	0,130	0,130	0,098	0,196	0,174
SE of Mean h	0,023	0,040	0,036	0,044	0,019	0,043	0,038	0,035	0,048	0,046
Mean uh	0,043	0,145	0,087	0,196	0,029	0,174	0,174	0,130	0,261	0,261
SE of Mean uh	0,030	0,053	0,048	0,058	0,029	0,057	0,051	0,047	0,064	0,069

CB-12

Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
No. Bands	13	16	13	16	16	14	14	17	19	10
No. BandsFreq. $\geq 5\%$	13	16	13	16	16	14	14	17	19	10
No. PrivateBands	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands ($\leq 25\%$)	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands ($\leq 50\%$)	2	5	5	3	5	4	3	6	7	2
Mean h	0,091	0,149	0,034	0,173	0,239	0,178	0,154	0,154	0,240	0,068
SE of Mean h	0,034	0,042	0,024	0,041	0,044	0,046	0,039	0,043	0,042	0,032
Mean uh	0,122	0,199	0,045	0,231	0,359	0,237	0,205	0,205	0,321	0,103
SE of Mean uh	0,045	0,055	0,031	0,055	0,066	0,061	0,053	0,057	0,056	0,048

CB-13

Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
No. Bands	9	20	16	18	14	17	13	17	13	14
No. BandsFreq. $\geq 5\%$	9	20	16	18	14	17	13	17	13	14
No. PrivateBands	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands ($\leq 25\%$)	0	1	3	2	0	2	0	3	1	2
No. LCommBands ($\leq 50\%$)	6	15	12	14	12	12	9	13	11	12
Mean h	0,071	0,188	0,110	0,110	0,095	0,167	0,125	0,167	0,074	0,127
SE of Mean h	0,025	0,033	0,027	0,029	0,028	0,032	0,030	0,034	0,026	0,031
Mean uh	0,095	0,250	0,147	0,147	0,143	0,222	0,167	0,222	0,099	0,190
SE of Mean uh	0,034	0,044	0,036	0,039	0,043	0,043	0,039	0,045	0,035	0,047

CB-15

Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
No. Bands	10	6	10	8	6	12	14	11	12	8
No. BandsFreq. >= 5%	10	6	10	8	6	12	14	11	12	8
No. PrivateBands	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands (<=25%)	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
No. LCommBands (<=50%)	2	1	5	2	1	6	7	5	5	3
Mean h	0,201	0,132	0,181	0,188	0,123	0,194	0,188	0,111	0,146	0,025
SE of Mean h	0,050	0,046	0,050	0,052	0,048	0,048	0,052	0,044	0,051	0,025
Mean uh	0,269	0,176	0,241	0,250	0,185	0,259	0,250	0,148	0,194	0,037
SE of Mean uh	0,066	0,061	0,066	0,069	0,072	0,064	0,069	0,059	0,068	0,037

CB-17

Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
No. Bands	6	12	10	10	10	11	10	11	13	12
No. BandsFreq. >= 5%	6	12	10	10	10	11	10	11	13	12
No. PrivateBands	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands (<=25%)	0	0	1	0	0	1	2	0	0	0
No. LCommBands (<=50%)	2	5	6	3	5	6	6	6	6	4
Mean h	0,119	0,231	0,063	0,050	0,044	0,069	0,138	0,125	0,225	0,156
SE of Mean h	0,042	0,044	0,035	0,034	0,031	0,038	0,043	0,044	0,053	0,049
Mean uh	0,158	0,308	0,083	0,067	0,067	0,092	0,183	0,167	0,300	0,233
SE of Mean uh	0,056	0,058	0,046	0,046	0,046	0,051	0,058	0,059	0,070	0,073

ALL MARKERS

Population	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
No. Bands	82	101	105	101	84	99	98	102	101	86
No. BandsFreq. >= 5%	82	101	105	101	84	99	98	102	101	86
No. PrivateBands	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0
No. LCommBands (<=25%)	3	6	9	3	1	5	5	5	4	3
No. LCommBands (<=50%)	35	51	55	40	38	50	50	51	50	38
Mean h	0,105	0,144	0,117	0,119	0,090	0,137	0,130	0,126	0,128	0,099
SE of Mean h	0,013	0,014	0,013	0,014	0,013	0,014	0,013	0,014	0,014	0,013
Mean uh	0,140	0,192	0,156	0,158	0,135	0,183	0,173	0,167	0,171	0,148
SE of Mean uh	0,017	0,018	0,018	0,018	0,019	0,019	0,018	0,018	0,019	0,019

Πίνακας Π4. Γενετική απόσταση και γενετική ομοιότητα κατά Nei, όπως υπολογίστηκαν για το υπό μελέτη γενετικό υλικό του είδους *C. pero* με τη χρήση των επιλεγμένων μοριακών δεικτών RAPD. Το γενετικό υλικό περιλαμβάνει δύο (2) εμπορικές ποικιλίες και οκτώ (8) τοπικές ποικιλίες.

OPA-04

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0,000									P1
0,485	0,000								P2
0,273	0,491	0,000							P3
0,651	0,479	0,267	0,000						P4
0,309	0,569	0,011	0,271	0,000					P5
0,607	0,569	0,417	0,558	0,452	0,000				P6
0,132	0,660	0,417	0,964	0,452	0,788	0,000			P7
0,763	0,392	0,823	1,216	0,859	0,348	0,491	0,000		P8
0,584	0,503	0,635	1,411	0,670	0,503	0,360	0,062	0,000	P9
0,187	0,485	0,283	0,404	0,318	0,318	0,318	0,753	0,871	0,000 P10

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Identity									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
1,000									P1
0,616	1,000								P2
0,761	0,612	1,000							P3
0,522	0,620	0,765	1,000						P4
0,734	0,566	0,989	0,763	1,000					P5
0,545	0,566	0,659	0,572	0,636	1,000				P6
0,876	0,517	0,659	0,381	0,636	0,455	1,000			P7
0,466	0,676	0,439	0,296	0,424	0,706	0,612	1,000		P8
0,558	0,605	0,530	0,244	0,512	0,605	0,698	0,940	1,000	P9
0,829	0,615	0,753	0,667	0,727	0,727	0,727	0,471	0,419	1,000 P10

OPB-01

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0,000									P1
0,372	0,000								P2
0,857	0,414	0,000							P3
0,112	0,299	1,087	0,000						P4
0,535	1,064	0,522	0,447	0,000					P5
0,542	0,894	0,481	0,500	0,053	0,000				P6
0,010	0,341	0,936	0,095	0,588	0,610	0,000			P7
0,118	0,481	1,139	0,053	0,317	0,352	0,103	0,000		P8
0,242	0,510	1,233	0,060	0,292	0,351	0,223	0,029	0,000	P9
0,091	0,458	1,128	0,049	0,344	0,371	0,077	0,002	0,045	0,000 P10

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Identity									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
1,000									P1
0,689	1,000								P2
0,424	0,661	1,000							P3
0,894	0,742	0,337	1,000						P4
0,586	0,345	0,593	0,640	1,000					P5
0,581	0,409	0,618	0,607	0,949	1,000				P6
0,991	0,711	0,392	0,910	0,555	0,544	1,000			P7
0,889	0,618	0,320	0,949	0,728	0,704	0,902	1,000		P8
0,785	0,601	0,291	0,942	0,747	0,704	0,800	0,971	1,000	P9
0,913	0,632	0,324	0,952	0,709	0,690	0,926	0,998	0,956	1,000 P10

OPB-04

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0,000									P1
0,442	0,000								P2
0,373	0,473	0,000							P3
0,360	0,067	0,575	0,000						P4
0,298	0,381	0,306	0,353	0,000					P5
0,769	0,674	0,388	0,803	0,345	0,000				P6
0,413	0,556	0,300	0,510	0,236	0,382	0,000			P7
0,492	0,519	0,743	0,405	0,298	0,386	0,556	0,000		P8
0,409	0,481	0,448	0,420	0,267	0,508	0,529	0,172	0,000	P9
0,389	0,503	0,436	0,463	0,199	0,556	0,377	0,301	0,154	0,000 P10

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Identity									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
1,000									P1
0,643	1,000								P2
0,689	0,623	1,000							P3
0,698	0,935	0,563	1,000						P4
0,742	0,683	0,736	0,703	1,000					P5
0,463	0,510	0,679	0,448	0,708	1,000				P6
0,661	0,574	0,741	0,600	0,790	0,682	1,000			P7
0,611	0,595	0,476	0,667	0,742	0,680	0,574	1,000		P8
0,664	0,618	0,639	0,657	0,766	0,602	0,589	0,842	1,000	P9
0,678	0,605	0,646	0,630	0,819	0,573	0,686	0,740	0,858	1,000 P10

OPG-02

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0,000									P1
0,589	0,000								P2
0,641	0,712	0,000							P3
0,459	0,426	0,555	0,000						P4
0,581	0,713	0,061	0,569	0,000					P5
0,343	0,354	0,269	0,586	0,323	0,000				P6
0,322	0,735	0,338	0,450	0,415	0,324	0,000			P7
0,412	0,633	0,593	0,117	0,624	0,580	0,366	0,000		P8
0,458	0,577	0,602	0,113	0,611	0,589	0,411	0,058	0,000	P9
0,532	0,467	0,568	0,098	0,593	0,570	0,370	0,131	0,048	0,000 P10

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Identity									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
1,000									P1
0,555	1,000								P2
0,527	0,491	1,000							P3
0,632	0,653	0,574	1,000						P4
0,560	0,490	0,941	0,566	1,000					P5
0,710	0,702	0,764	0,557	0,724	1,000				P6
0,725	0,479	0,713	0,638	0,660	0,723	1,000			P7
0,663	0,531	0,552	0,889	0,536	0,560	0,694	1,000		P8
0,633	0,561	0,547	0,893	0,543	0,555	0,663	0,943	1,000	P9
0,588	0,627	0,566	0,907	0,553	0,566	0,691	0,877	0,953	1,000 P10

OPZ-03

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0,000									P1
0,183	0,000								P2
0,303	0,078	0,000							P3
0,469	0,423	0,336	0,000						P4
0,693	0,489	0,228	0,297	0,000					P5
0,612	0,641	0,473	0,235	0,153	0,000				P6
0,250	0,571	0,673	0,513	0,698	0,512	0,000			P7
0,525	0,622	0,547	0,158	0,624	0,657	0,459	0,000		P8
0,557	0,689	0,667	0,262	0,718	0,724	0,419	0,080	0,000	P9
1,105	0,661	0,436	0,213	0,352	0,529	0,961	0,252	0,339	0,000 P10

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Identity									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
1,000									P1
0,833	1,000								P2
0,738	0,925	1,000							P3
0,626	0,655	0,714	1,000						P4
0,500	0,613	0,796	0,743	1,000					P5
0,542	0,527	0,623	0,790	0,858	1,000				P6
0,779	0,565	0,510	0,598	0,497	0,599	1,000			P7
0,592	0,537	0,579	0,854	0,536	0,519	0,632	1,000		P8
0,573	0,502	0,513	0,770	0,488	0,485	0,658	0,923	1,000	P9
0,331	0,516	0,647	0,808	0,703	0,589	0,383	0,777	0,712	1,000 P10

CB-09

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0,000									P1
0,496	0,000								P2
0,520	0,370	0,000							P3
0,544	0,188	0,438	0,000						P4
0,570	0,453	0,174	0,488	0,000					P5
0,410	0,351	0,184	0,330	0,103	0,000				P6
0,410	0,405	0,526	0,522	0,441	0,412	0,000			P7
0,816	0,675	0,376	0,562	0,484	0,440	0,540	0,000		P8
0,720	0,718	0,529	0,561	0,650	0,441	0,548	0,113	0,000	P9
0,552	0,540	0,564	0,633	0,910	0,668	0,528	0,314	0,138	0,000 P10

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Identity									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
1,000									P1
0,609	1,000								P2
0,594	0,691	1,000							P3
0,580	0,829	0,645	1,000						P4
0,565	0,636	0,840	0,614	1,000					P5
0,664	0,704	0,832	0,719	0,902	1,000				P6
0,664	0,667	0,591	0,593	0,643	0,663	1,000			P7
0,442	0,509	0,686	0,570	0,616	0,644	0,583	1,000		P8
0,487	0,488	0,589	0,571	0,522	0,643	0,578	0,893	1,000	P9
0,576	0,583	0,569	0,531	0,403	0,513	0,590	0,730	0,871	1,000 P10

CB-12

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0,000									P1
0,205	0,000								P2
0,581	0,504	0,000							P3
0,407	0,400	0,421	0,000						P4
0,417	0,457	0,316	0,461	0,000					P5
0,396	0,371	0,295	0,417	0,215	0,000				P6
0,229	0,411	0,527	0,315	0,375	0,369	0,000			P7
0,581	0,510	0,573	0,189	0,512	0,634	0,295	0,000		P8
0,508	0,677	0,906	0,360	0,333	0,602	0,407	0,346	0,000	P9
0,337	0,509	0,981	0,431	0,306	0,422	0,442	0,627	0,158	0,000 P10

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Identity									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
1,000									P1
0,815	1,000								P2
0,559	0,604	1,000							P3
0,666	0,671	0,656	1,000						P4
0,659	0,633	0,729	0,630	1,000					P5
0,673	0,690	0,744	0,659	0,807	1,000				P6
0,795	0,663	0,590	0,730	0,687	0,692	1,000			P7
0,559	0,601	0,564	0,828	0,599	0,530	0,744	1,000		P8
0,602	0,508	0,404	0,698	0,717	0,548	0,666	0,708	1,000	P9
0,714	0,601	0,375	0,650	0,736	0,656	0,643	0,534	0,853	1,000 P10

CB-13

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0,000									P1
0,175	0,000								P2
0,306	0,270	0,000							P3
0,394	0,308	0,387	0,000						P4
0,355	0,375	0,288	0,407	0,000					P5
0,124	0,150	0,154	0,325	0,235	0,000				P6
0,220	0,162	0,203	0,331	0,198	0,138	0,000			P7
0,238	0,280	0,200	0,265	0,282	0,142	0,195	0,000		P8
0,330	0,391	0,463	0,422	0,314	0,271	0,318	0,285	0,000	P9
0,265	0,279	0,344	0,403	0,299	0,172	0,213	0,206	0,117	0,000 P10

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Identity										
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	
1,000										P1
0,839	1,000									P2
0,737	0,763	1,000								P3
0,674	0,735	0,679	1,000							P4
0,701	0,687	0,750	0,666	1,000						P5
0,883	0,861	0,857	0,722	0,791	1,000					P6
0,802	0,851	0,816	0,718	0,821	0,871	1,000				P7
0,788	0,756	0,819	0,767	0,754	0,868	0,823	1,000			P8
0,719	0,676	0,630	0,656	0,731	0,762	0,728	0,752	1,000		P9
0,767	0,756	0,709	0,669	0,741	0,842	0,808	0,814	0,890	1,000	P10

CB-15

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0,000									P1
0,233	0,000								P2
0,327	0,225	0,000							P3
0,200	0,042	0,192	0,000						P4
0,220	0,109	0,160	0,088	0,000					P5
0,487	0,360	0,099	0,315	0,303	0,000				P6
0,410	0,701	0,623	0,668	0,652	0,414	0,000			P7
0,508	0,666	0,822	0,713	0,820	0,554	0,517	0,000		P8
0,684	0,646	0,766	0,660	0,788	0,534	0,497	0,132	0,000	P9
0,523	0,513	0,741	0,568	0,653	0,711	0,605	0,280	0,154	0,000 P10

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Identity									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
1,000									P1
0,792	1,000								P2
0,721	0,799	1,000							P3
0,819	0,959	0,826	1,000						P4
0,802	0,897	0,852	0,916	1,000					P5
0,615	0,698	0,906	0,730	0,738	1,000				P6
0,664	0,496	0,536	0,513	0,521	0,661	1,000			P7
0,602	0,514	0,439	0,490	0,441	0,574	0,597	1,000		P8
0,504	0,524	0,465	0,517	0,455	0,586	0,609	0,877	1,000	P9
0,593	0,599	0,476	0,567	0,521	0,491	0,546	0,756	0,857	1,000 P10

CB-17

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance									
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0,000									P1
0,171	0,000								P2
0,525	0,481	0,000							P3
0,532	0,354	0,635	0,000						P4
0,504	0,296	0,255	0,910	0,000					P5
0,433	0,577	0,307	0,514	0,392	0,000				P6
0,265	0,305	0,538	0,699	0,501	0,422	0,000			P7
0,310	0,204	0,882	0,528	0,555	0,984	0,480	0,000		P8
0,260	0,162	0,696	0,259	0,560	0,693	0,385	0,069	0,000	P9
0,413	0,302	0,560	0,134	0,521	0,470	0,569	0,477	0,258	0,000 P10

Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Identity										
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	
1,000										P1
0,843	1,000									P2
0,591	0,618	1,000								P3
0,587	0,702	0,530	1,000							P4
0,604	0,744	0,775	0,402	1,000						P5
0,649	0,561	0,736	0,598	0,676	1,000					P6
0,767	0,737	0,584	0,497	0,606	0,656	1,000				P7
0,733	0,815	0,414	0,590	0,574	0,374	0,619	1,000			P8
0,771	0,850	0,499	0,772	0,571	0,500	0,680	0,934	1,000		P9
0,662	0,740	0,571	0,875	0,594	0,625	0,566	0,620	0,773	1,000	P10