

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΜΕΤΑΞΥ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Α. Γ. ΖΑΧΑΡΟΥΛΗ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕ ΔΕΙΚΤΕΣ RAPD ΚΑΙ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΩΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΕΣ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΕ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ

ΒΟΛΟΣ
2004



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4178/1
Ημερ. Εισ.: 13-12-2004
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
633.153 072
ΖΑΧ

Τα μέλη της επιτροπής

Χ. Γούλας	Α. Μαυρομάτης	Α.Χα
Καθηγητής Π.Θ.	Λέκτορας Π.Θ.	Επ. Καθηγητής Π.Θ.
Γενετική Βελτίωση Φυτών	Γενετική Βελτίωση Φυτών	Κηπευτικές Καλλιέργειες

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήταν παράλειψη από μέρους μου να μην ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με στήριξαν κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Χρήστο Γούλα για την ανάθεση σε εμένα του ενδιαφέροντος και πρωτότυπου αυτού θέματος καθώς και τη συνολική του συμβολή τόσο κατά τη διάρκεια των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής καθηγητή κ. Χα και λέκτορα κ. Μαυρομάτη για τις εύστοχες και γόνιμες παρατηρήσεις τους.

Θα ήθελα επιπλέον να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους επιστημονικούς συνεργάτες του εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών κ. Αθανάσιο Κορκόβελο και κ. Άγγελο Αγοραστό για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφεραν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα το σύζυγό μου Πασχάλη Αποστόλου, την αδελφή μου Εριφύλη Ζαχαρούλη, τον αδελφικό μου φίλο Μιχάλη Ξυδάκη και τους στοργικούς μου γονείς χωρίς τη βοήθεια των οποίων το πέρας της διατριβής αυτής δεν θα ήταν εφικτό.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
2	ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	10
2.1	ΓΕΝΙΚΑ	10
2.2	ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	10
2.3	Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	13
2.3.1	ΚΛΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ	13
2.3.2	Βοτανικά γνωρίσματα και μέθοδοι μελέτης αυτών	15
2.3.2.1	Ριζικό σύστημα	15
2.3.2.2	Φύλλα	18
2.3.2.3	Σπόρος	21
2.4	ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	21
2.4.1	Τεχνικές μη βασιζόμενες στην PCR	22
2.4.2	PCR τεχνικές (με αυθαίρετο εκκινητή)	22
2.4.2.1	Διαδικασία προσέγγισης	22
2.4.2.2	Παράγοντες που επηρεάζουν την RAPD ανάλυση	23
2.4.2.3	Εφαρμογές της RAPD τεχνολογίας	24
2.4.2.4	Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα των RAPDs	26
2.4.2.5	Εκτίμηση γενετικής συγγένειας με RAPD ανάλυση	30
2.4.3	Άλλες τεχνικές	32
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	36
3.1	ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	36
3.2	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΕ ΘΑΛΑΜΟ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ	36
3.3	ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	39
3.3.1	Ριζικό σύστημα	39
3.3.2	SPAD	39
3.3.3	Βάρος	40
3.3.4	Ύψος	40
3.4	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	40
3.5	ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	42
3.6	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	45
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
4.1	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΕ ΘΑΛΑΜΟ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ 1 ^{ης} ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	48
4.1.1	ΦΥΤΡΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ	50
4.1.1.1	1 ^ο Πείραμα	50
4.1.1.2	2 ^ο Πείραμα	50
4.1.2	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ	53
4.1.2.1	1 ^ο πείραμα	53
4.1.2.1.1	1 ^η μέτρηση SPAD ημέρας (στάδιο 3 ^{ου} φύλλου)	53
4.1.2.1.2	1 ^η μέτρηση SPAD νύχτας (στάδιο 3 ^{ου} φύλλου)	54
4.1.2.1.3	2 ^η μέτρηση SPAD ημέρας (στάδιο 3 ^{ου} φύλλου)	55
4.1.2.1.4	2 ^η μέτρηση SPAD νύχτας (στάδιο 3 ^{ου} φύλλου)	55
4.1.2.2	2 ^ο πείραμα	56
4.1.2.2.1	1 ^η μέτρηση SPAD ημέρας (στάδιο 3 ^{ου} φύλλου)	56
4.1.2.2.2	1 ^η μέτρηση SPAD νύχτας (στάδιο 3 ^{ου} φύλλου)	56
4.1.2.2.3	2 ^η μέτρηση SPAD ημέρας (στάδιο 5 ^{ου} φύλλου)	57

4.1.2.2.4	2 ^η μέτρηση SPAD νύχτας (στάδιο 5 ^ο φύλλου).....	57
4.1.3	ΒΑΡΟΣ ΧΛΩΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ	58
4.1.3.1	1 ^ο πείραμα (στάδιο 3 ^ο φύλλου).....	58
4.1.3.2	2 ^ο πείραμα (στάδιο 5 ^ο φύλλου).....	59
4.1.4	ΥΨΟΣ ΩΣ ΤΟΝ ΑΝΩΤΑΤΟ ΜΙΣΧΟ	60
4.1.4.1	1 ^ο πείραμα (στάδιο 3 ^ο φύλλου).....	60
4.1.4.2	2 ^ο πείραμα.....	60
4.1.4.2.1	1 ^η μέτρηση ύψους (στάδιο 3 ^ο φύλλου).....	60
4.1.4.2.2	2 ^η μέτρηση ύψους (στάδιο 5 ^ο φύλλου).....	61
4.1.5	ΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΡΙΖΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	62
4.1.5.1	1 ^ο πείραμα (στάδιο 3 ^ο φύλλου).....	62
4.1.5.2	2 ^ο πείραμα.....	63
4.1.5.2.1	1 ^η μέτρηση (στάδιο 3 ^ο φύλλου).....	63
4.1.5.2.2	2 ^η μέτρηση (στάδιο 5 ^ο φύλλου).....	64
4.2	ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	66
4.3	ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	68
5	ΓΕΝΙΚΕΥΜΕΝΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
6	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	73

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το καλαμπόκι (*Zea mays* L.), ένα από τα πιο διαδεδομένα καλλιεργούμενα φυτά στον κόσμο, κατέχει περίοπτη θέση στη λίστα ενδιαφέροντος της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας. Πολλές είναι οι εργασίες που κάθε χρόνο αφιερώνονται στην έρευνα των χαρακτηριστικών αυτού του φυτού και στην αξιολόγηση του γενετικού υλικού προκειμένου να βελτιωθούν ή τροποποιηθούν διάφορα από τα χαρακτηριστικά.

Χαρακτηριστικά όπως αυτά που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία (φυτρωτική ικανότητα, περιεκτικότητα χλωροφύλλης στα φύλλα, ριζικό σύστημα, ύψος και χλωρό βάρος βιομάζας) αποτέλεσαν και εξακολουθούν να αποτελούν το αντικείμενο μελέτης και η σχετική βιβλιογραφία είναι εκτενής.

Η πρώτη μορφή ποικιλίας του καλλιεργούμενου καλαμποκιού ήταν οι ελεύθερα επικονιαζόμενες ποικιλίες ως αποτέλεσμα διασταυρώσεων διάφορων φυλών όπου η επιλογή και η βελτίωση για το χαρακτηριστικό της απόδοσης γινόταν από τους ίδιους του καλλιεργητές. Το πρωτογενές υλικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε από τα πρώτα προγράμματα βελτίωσης καλαμποκιού ήταν οι τοπικές ποικιλίες ελεύθερης διασταύρωσης της παραδοσιακής γεωργίας (Allard, 1960).

Ο Troyer (1999) περιγράφει λεπτομερώς την ιστορία της δημιουργίας του σύγχρονου γενετικού υλικού του καλαμποκιού όπως αυτό διαμορφώθηκε στις ΗΠΑ. Αναφέρει πως στα μέσα του 19^{ου} αιώνα υπήρχαν 250 ποικιλίες ελεύθερης επικονίασης ενώ στα τέλη του ίδιου αιώνα, ο αριθμός αυτός ανέβηκε στις 538. Ο Montgomery (1916) εκτίμησε ότι υπήρχαν 1000 ποικιλίες εκ των οποίων οι 750 δημιουργήθηκαν μετά το 1840. Τελικά και οι 1000 ποικιλίες που υπήρχαν τη δεκαετία του 1920 αυτογονιμοποιήθηκαν σε διάφορες προσπάθειες να αναπτυχθούν χρήσιμες καθαρές σειρές. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα και κυρίως κατά τη δεκαετία του '30 εισήχθησαν τα πρώτα διπλά υβρίδια καλαμποκιού που έδωσαν και την πρώτη μεγάλη αύξηση της απόδοσης. Στη συνέχεια, στη δεκαετία του '60, εμφανίστηκαν τα απλά υβρίδια που αντικατέστησαν τα διπλά και έδωσαν τη δεύτερη μεγάλη ώθηση στην αύξηση της απόδοσης.

Στη διαδρομή του χρόνου το αρχικό γενετικό υλικό εμπλουτίστηκε με νέες πηγές όπως π.χ. το εξωτικό καλαμπόκι (Μεξικό κλπ) ενώ οι καθαρές σειρές που είναι σήμερα διαθέσιμες εκτιμάται ότι ξεπερνούν το ένα εκατομμύριο.

Σήμερα, περίοδος που τα υψηλοαποδοτικά απλά υβρίδια κυριαρχούν στην γεωργική πρακτική, οι τοπικές ποικιλίες επανήλθαν στο προσκήνιο ως πιθανές πηγές γενετικής παραλλακτικότητας για γονίδια ανθεκτικότητας σε καταπονήσεις, προσαρμοστικότητας σε ειδικές συνθήκες και ποιοτικά χαρακτηριστικά αλλά πάντοτε θα παρουσιάζουν ενδιαφέρον οι σχετικές προσπάθειες για τον εντοπισμό του κατάλληλου γενετικού υλικού που θα χρησιμοποιηθεί ως πηγή των επιθυμητών γονιδίων σε διάφορα προγράμματα δημιουργίας υβριδίων, κυρίως, αλλά και τα αντίστοιχα βασικής έρευνας.

Οι τοπικές ποικιλίες, δηλαδή πληθυσμοί, υπόκεινται σε προγράμματα διατήρησης τόσο στις τράπεζες γενετικού υλικού όσο και στα πλαίσια της παραδοσιακής γεωργίας. Σε μια προσπάθεια καταγραφής των πληθυσμών αυτών στην Ευρώπη με συμμετοχή και της Ελλάδας, καταγράφηκαν οι ευρωπαϊκοί πληθυσμοί και έγινε η περιγραφή των χαρακτηριστικών τους.

Προκειμένου ένας πληθυσμός να αξιοποιηθεί σε μελλοντικά προγράμματα είναι απαραίτητη η γνώση του παραγωγικού δυναμικού του και η γενετική διακύμανση για κάθε ένα από τα χαρακτηριστικά (απόδοση και λοιπά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με αυτή, αλλά και εκείνα που αφορούν τη φυσιολογία του φυτού).

Η αξιολόγηση-μελέτη των πηγών του γενετικού υλικού, φυσικά, γίνεται στις αγρονομικές συνθήκες. Όμως προκειμένου να συντομευτεί ο χρόνος και η προσπάθεια που απαιτείται επιδίωξη είναι η αξιολόγηση να γίνεται σε ελεγχόμενες συνθήκες αλλά και στα πρώτα στάδια ανάπτυξης (γνωστή ως early development evaluation).

Επί πλέον διάφορες εργαστηριακές μέθοδοι όπως μελέτη των ισοενζυματικών δεικτών προκειμένου να διαπιστωθεί η γενετική συγγένεια μεταξύ των πηγών γενετικής παραλλακτικότητας που εφαρμόστηκε στη δεκαετία του '70 και έχει σήμερα πλήρως αντικατασταθεί από τις αντίστοιχες προσεγγίσεις με χρήση μοριακών δεικτών, έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ιδιαίτερα η μοριακή αξιολόγηση για το καλαμπόκι του οποίου η ετερωτική συμπεριφορά προϋποθέτει δημιουργία υβριδίων και έλλειψη συγγένειας μεταξύ του γενετικού υλικού.

Η κλασική προσέγγιση της γενεαλογικής ανάλυσης και ο προσδιορισμός της γενετικής συγγένειας με τον συντελεστή ομομιξίας (F) ή γενετικής συγγένειας (R) έχει αντικατασταθεί με νεώτερες προσεγγίσεις όπως της γενετικής απόστασης και της γενετικής ομοιότητας ή ανομοιότητας. Στα βελτιωτικά προγράμματα, η γνώση των σχέσεων γενετικής συγγένειας μεταξύ πηγών παραλλακτικότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συμπληρώσει τις φαινοτυπικές πληροφορίες προκειμένου να

γίνει η σύνθεση των πληθυσμών. Η γνώση της σχετικής γενετικής απόστασης ανάμεσα σε άτομα ή πληθυσμούς σε ένα πρόγραμμα βελτίωσης είναι χρήσιμη γιατί επιτρέπει την οργάνωση του γενετικού υλικού και παρέχει πιο αποτελεσματική δειγματοληψία των επιθυμητών γενοτύπων (Nienhuis et al., 1993) ενώ η γνώση της γενετικής ομοιότητας ανάμεσα στους γενοτύπους μπορεί να διευκολύνει την επιλογή των σειρών που θα διασταυρωθούν σε συνδυασμούς υβριδίων προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η έκφραση της ετέρωσης (Melchinger et al., 1990, Moll et al., 1965, Smith et al., 1990).

Μοριακοί γενετικοί δείκτες σήμερα είναι διαθέσιμοι για μια ποικιλία φυτικών ειδών, ειδικά για το καλαμπόκι. Η χρησιμότητά τους έχει ξεπεράσει τις ανάγκες χαρτογράφησης και γενετικής αποτύπωσης στα πλαίσια της γενετικής πληθυσμών, όπου η προσοχή επικεντρώνεται περισσότερο στις συχνότητες των αλληλομόρφων παρά στα άτομα καθ'αυτά. Η ποικιλομορφία στις συχνότητες των αλληλομόρφων ενδιαφέρει τους βελτιωτές επειδή η τροποποίησή τους με την επιλογή είναι σκοπός τους. Έτσι θεωρείται ότι μια ομάδα τυχαίων, μοριακών δεικτών (δηλαδή τεμάχια DNA), θα είναι αντιπροσωπευτική του όλου γενώματος, και λογικά θα συμπεριλαμβάνει και γονιδιακές θέσεις που κωδικοποιούν για φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και είναι αντικείμενο επιλογής. Η μελέτη της παραλλακτικότητας τέτοιων δεικτών επιτρέπει για γενετική κατάταξη των πληθυσμών ενδεικτικών της συγγενείας τους και μπορεί ακόμη να οδηγήσει στην κατανόηση της φυλογενετικής ιστορίας τους και των αλλαγών που υπέστησαν κατά τη βελτίωσή τους.

Οι μοριακοί γενετικοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη ατόμων ή πληθυσμών προκειμένου να εκτιμηθούν διάφορες παράμετροι γενετικής παραλλακτικότητας, και/ή γενετική συγγένεια, γεγονότα που επιτρέπουν να εξαχθούν συμπεράσματα για τη δομή των πληθυσμών, για την ομαδοποίησή τους (clustering), για να γίνουν έλεγχοι ισορροπίας Hardy-Weinberg για αριθμό γονιδιακών θέσεων (multilocus equilibrium), καθώς και για μελετηθούν πολυμορφικές γονιδιακές θέσεις για ενδεχόμενη επιλεκτική ουδετερότητα (Neutrality).

Επί πλέον η αξιολόγηση σε συνθήκες ελεγχόμενης ανάπτυξης και ειδικότερα στα πρώτα στάδια βλαστικής ανάπτυξης του καλαμποκιού παρουσιάζει αυξημένο ενδιαφέρον για τη Βελτίωση. Συγκεκριμένα, είναι επιθυμητή προκειμένου να μειωθεί ο όγκος της εργασίας στον αγρό αφού επιδιώκεται η απομάκρυνση των ανεπιθύμητων γενοτύπων πριν από το αναπαραγωγικό στάδιο και έχει αυξημένη την αποτελεσματικότητα της επιλογής. Στα πρώτα αυτά αναπτυξιακά στάδια μελετώνται συνήθως παράμετροι όπως το φρέσκο βάρος βιομάζας, παράμετροι φυσιολογίας του

φυτού όπως η περιεκτικότητα χλωροφύλλης σε φύλλα κλπ. Τελευταία, έμφαση αρχίζει να δίνεται στο ριζικό σύστημα που μέχρι τώρα είναι ο μεγάλος άγνωστος ως προς το ρόλο του στην παραγωγική συμπεριφορά του καλαμποκιού και των άλλων φυτών γενικά. Από τις πρώτες προσεγγίσεις για τη μελέτη του ριζικού συστήματος είναι ο προσδιορισμός του όγκου του, ή του βάρους του.

Τέτοιες άμεσες μετρήσεις (όγκος ή βάρος) δεν φαίνονται ιδιαίτερα αξιόπιστες ή εύκολες στον προσδιορισμό. Αντιθέτως έμμεσοι τρόποι προσδιορισμού φαίνεται να έχουν ενδιαφέρον. Μία τέτοια προσέγγιση που αξιοποιεί την ηλεκτροχωρητικότητα φαίνεται να είναι ένα καλό κριτήριο επιλογής.

Σύμφωνα με τα προηγούμενα ένας συνδυασμός αξιολόγησης τοπικού πληθυσμού καλαμποκιού σε συνθήκες ελεγχόμενης ανάπτυξης και αξιοποίηση μοριακών δεικτών θα ήταν ενδιαφέρουσα συμβολή στη μελέτη της παραλλακτικότητας.

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη χαρακτηριστικών πρώτης βλαστικής ανάπτυξης του αραβοσίτου σε ελεγχόμενες συνθήκες σε συνδυασμό με μοριακή αξιολόγηση με δείκτες RAPD για τη μελέτη της παραλλακτικότητας μεταξύ και εντός 5 ελληνικών παραδοσιακών πληθυσμών αραβοσίτου.

2 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Ο αραβόσιτος είναι το δεύτερο, μετά το σιτάρι, προϊόν από άποψη παραγωγικής αξίας στην κατηγορία των δημητριακών στην Ελλάδα. Αντιπροσωπεύει περίπου το 5% της συνολικής καλλιεργούμενης έκτασης της χώρας. Η αξία και η σπουδαιότητα του αραβοσίτου συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη της κτηνοτροφίας αφού το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής καταναλώνεται ως ζωοτροφή. Επί πλέον χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη στη βιομηχανία για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων διατροφής σε σημαντικές ποσότητες (Σέμος και Καρυπίδης, 2000). Μπορεί ακόμη να είναι και ως δεύτερη καλλιέργεια στην ίδια καλλιεργητική περίοδο (επίσπορος) αμέσως μετά από χειμερινά ψυχανθή ή σιτηρά, κάτι που εξασφαλίζει συμπληρωματικό εισόδημα στον παραγωγό. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα υβρίδια (μικρού βιολογικού κύκλου), ισχυρή λίπανση και άρδευση. Τέλος καλλιεργείται και ως σανοδοτικός (χλωρό χόρτο ή ενσίρωση) (Σφήκας, 1991).

Ο αραβόσιτος είναι από τα ελάχιστα γεωργικά προϊόντα που, στη χώρα μας, παρουσίασαν σημαντική άνοδο όχι μόνο στις στρεμματικές αποδόσεις, αλλά και στη συνολική παραγωγή. Έτσι η παραγωγή το 1961 ήταν 228 χιλ. τόνοι ενώ το 1996 έφθασε τους 2017 χιλ. τόνους (Γεωργική Στατιστική 1961-1996). Αυτό σημαίνει μια ετήσια αύξηση της παραγωγής κατά 29% περίπου για τη χρονική περίοδο 1961-1996. Η παραπάνω αύξηση της παραγωγής ήταν το συνδυασμένο αποτέλεσμα της αύξησης των καλλιεργούμενων εκτάσεων, της καλύτερης λίπανσης, της άρδευσης, της πλήρους εκμηχάνισης της καλλιέργειας αλλά κυρίως της θεαματικής αύξησης των αποδόσεων με τη χρήση των υβριδίων (Σέμος και Καρυπίδης, 2000).

2.2 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Ο αραβόσιτος ανήκει στο είδος *Zea mays* L. ($2n=20$), της οικογένειας Graminae. Κατατάσσεται στην υποοικογένεια Maydeae που περιλαμβάνει οκτώ γένη, από τα οποία τα πέντε είναι αυτοφυή από Ινδία ως Αυστραλία ενώ τα τρία και σπουδαιότερα είναι ιθαγενή της Αμερικής.

Ο αραβόσιτος εξημερώθηκε και καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά από τους Ινδιάνους της Αμερικής. Τόπος καταγωγής του θεωρείται η Κεντρική Αμερική και το Μεξικό, όπου απαντάται σε μεγάλη ποικιλία τύπων μαζί με άλλα συγγενή είδη (*Euchlaena* και *Tripsacum*).

Αν και τροπικής καταγωγής, εξημερώθηκε σε μεγάλα υψόμετρα, οπότε αντέχει και σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι έλαβε μεγάλη διάδοση σε όλο τον κόσμο, ώστε να καλλιεργείται από 58°ΒΠ ως 40° ΝΠ και από την επιφάνεια της θάλασσας ως ύψος 3.800 m (Άνδεις Περού). Καλλιεργείται ακόμα και στην Αγγλία ως χλωρά νομή και για ενσίρωση. Επίσης έχουν δημιουργηθεί ποικιλίες και υβρίδια με βιολογικό κύκλο από δύο ως ένδεκα μηνών.

Έτσι θεωρείται φυτό με μεγάλη προσαρμοστικότητα. Συγκεκριμένα σε περιβάλλοντα με βραχεία βλαστική περίοδο προσαρμόζονται τύποι βραχύσωμοι (60cm) με 8-9 φύλλα, που ωριμάζουν σε 60-70 ημέρες. Για τις θερμότερες με μακρά βλαστική περίοδο περιοχές δημιουργήθηκαν υβρίδια που μπορούν να φθάσουν ως 42-44 φύλλα και χρόνο ωρίμανσης 15 μήνες (Σφήκας, 1991).

Η μορφή ποικιλίας στη σύγχρονη εποχή είναι σχεδόν αποκλειστικά υβριδίου, που αξιοποιεί πλήρως το φαινόμενο της ετέρωσης στην αγρονομική πρακτική. Για τη δημιουργία αυτών των υψηλοαποδοτικών υβριδίων απαιτούνται οι κατάλληλες καθαρές σειρές. Οι πρώτες πηγές παραλλακτικότητας που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία καθαρών σειρών ήταν οι ποικιλίες ελεύθερης διασταύρωσης. Έτσι προέκυψαν οι λεγόμενες καθαρές σειρές πρώτης γενιάς. Στη συνέχεια εμφανίζονται οι καθαρές σειρές ανασυνδυασμού ή σειρές δεύτερης γενιάς που προέρχονται από F_2 (elite X elite διασταυρώσεις καθαρών σειρών) ή από τους διάφορους συνθετικούς πληθυσμούς που προήλθαν από εκλεκτό γενετικό υλικό (Bauman, 1981).

Ο Jenkins (1978) ανέφερε αυξημένη χρήση F_2 και πληθυσμών αναδιασταύρωσης από το 1948 για την ανάπτυξη καθαρής σειράς δευτέρου κύκλου με μια ταυτόχρονη μείωση στην χρήση των ελεύθερα επικονιαζόμενων ποικιλιών. Οι συνθετικοί πληθυσμοί τώρα αποτελούν περίπου το 45% του γενετικού υλικού που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη καθαρών σειρών των καλαμποκιού και οι βελτιωτές σχεδιάζουν να αυξήσουν την χρήση των συνθετικών πληθυσμών (Hallauer, 1990). Η ικανότητα ταυτοποίησης των πληθυσμών με την μεγαλύτερη πιθανότητα βελτιωτικής επιτυχίας μπορεί να αυξήσει την χρήση μη προσαρμοσμένων πληθυσμών με την συγκέντρωση πηγών επιθυμητού γενετικού υλικού (Pfarr and Kendhall, 1992).

Οι παραδοσιακές ποικιλίες, προϊόντα της συνεχούς αλληλεπίδρασης γενοτύπου και περιβάλλοντος και της φυσικής επιλογής σε συνδυασμό με την εμπειρική επιλογή από τον ίδιο τον γεωργό, είχαν ως αποτέλεσμα, με την πάροδο των χρόνων, τη συγκέντρωση επιθυμητών γονιδίων που συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται και σήμερα από τους βελτιωτές. Έτσι οι παραδοσιακές ποικιλίες χαρακτηρίζονται από την μεγάλη ποικιλομορφία και την προσαρμοστικότητα σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα.

Ο βαθμός της επιτυχίας που επιτυγχάνεται από ένα βελτιωτικό πρόγραμμα είναι μια λειτουργία του γενετικού υλικού και της βελτιωτικής διαδικασίας. Μία φτωχή επιλογή γενετικού υλικού θα περιορίσει την επιτυχία του βελτιωτικού προγράμματος ανεξάρτητα της βελτιωτικής διαδικασίας (Hallauer and Miranda, 1988). Εξωτικό υλικό ή μη προσαρμοσμένοι πληθυσμοί μπορεί να είναι μια εξαιρετική πηγή επιθυμητών αλληλομόρφων που δεν είναι παρόντα στους πληθυσμούς που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη καθαρών σειρών (Hallauer, 1978; Brown, 1983). Η χρήση επίσης μη προσαρμοσμένου γενετικού υλικού θα βοηθούσε στην αύξηση της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ ευρέως καλλιεργούμενων εκλεκτών εμπορικών ποικιλιών (Stuber, 1978, Geadelmann, 1984, Holley and Goodman, 1988) μια που οι ποικιλίες της σύγχρονης ανταγωνιστικής γεωργίας, αν και υψηλοαποδοτικές, χαρακτηρίζονται από ομοιομορφία και στενή γενετική βάση (Committee, 1972). Αυτό ακριβώς έδωσε την αφορμή των συντονισμένων προσπαθειών που γίνονται για τη συλλογή και τη διατήρηση των φυτογενετικών πόρων. Τα τελευταία χρόνια έχει ενταθεί η προσπάθεια δημιουργίας, σε παγκόσμια κλίμακα, γενετικών τραπεζών για την διασφάλιση της διατήρησης της παραλλακτικότητας ώστε να αποφευχθεί η διάβρωση των πόρων αυτών.

Εξάλλου η ανάγκη δημιουργίας υβριδίων με ανθεκτικότητες σε εχθρούς και καταπονήσεις καθώς και η βελτίωση των χαρακτηριστικών ποιότητας των προϊόντων απαιτεί την αξιοποίηση νέων πηγών παραλλακτικότητας. Έτσι οι τοπικές ποικιλίες και οι ντόπιοι παραδοσιακοί πληθυσμοί επανέρχονται στην επικαιρότητα.

Παραδοσιακές ποικιλίες καλαμποκιού που δημιουργήθηκαν σε συνθήκες καταπόνησης αναμένεται να είναι ανθεκτικές στις καταπονήσεις αυτές όπως η Hays Golden που δημιουργήθηκε στις ξηροθερμικές συνθήκες των αρχών της δεκαετίας του '30 (Marek and Gardner, 1979)

Ισπανικοί παραδοσιακοί πληθυσμοί παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα γενετική παραλλακτικότητα για πρωιμότητα και ευρωστία στα αρχικά στάδια ανάπτυξης σε

αντίξοες συνθήκες πρώιμης σποράς ενώ ταυτόχρονα είχαν καλή συνδυαστική ικανότητα με το σύγχρονο γενετικό υλικό καλαμποκιού (Malvar et al, 1996), ενώ μια νεότερη μελέτη των Vales et al (2001) σε δύο ισπανικούς συνθετικούς πληθυσμούς έδειξε σημαντική αύξηση της απόδοσης και βελτίωση της γενικής συνδυαστικής ικανότητας μετά από τρεις κύκλους επιλογής.

Τοπικές ποικιλίες και πληθυσμοί της Κολομβίας εξακολουθούν, παρά το χαμηλό τους παραγωγικό δυναμικό, να αποτελούν ενδιαφέρουσες πηγές γενετικής παραλλακτικότητας που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για τον εμπλουτισμό της ήδη χρησιμοποιούμενης (Perez – Velasquez et al., 1995).

Για τις ελληνικές συνθήκες 2 τοπικοί πληθυσμοί φάνηκε να αποτελούν ενδιαφέρουσες πηγές παραλλακτικότητας για αξιοποίηση στα σύγχρονα προγράμματα βελτίωσης (Καρακαζάς κ.α., 1998).

Όμως παρά την αναγνωρισμένη αξία του τοπικού γενετικού υλικού καλαμποκιού, μόνο ένα μικρό μέρος από την υπάρχουσα παγκόσμια συλλογή γενετικού υλικού έχει συστηματικά αξιολογηθεί και χρησιμοποιηθεί σε εφαρμοσμένα προγράμματα βελτίωσης καλαμποκιού. Αυτό συμβαίνει λόγω της αδυναμίας αξιολόγησης μεγάλου αριθμού γενοτύπων προκειμένου να επιλεγούν οι πιο επιθυμητοί (Goodman and Brown, 1988).

Από τα παραπάνω φαίνεται πως η αξία των τοπικών πληθυσμών ως πηγή γενετικής παραλλακτικότητας δεν αμφισβητείται μιας και εξακολουθούν να αποτελούν πολύτιμη τέτοια πηγή για χαρακτηριστικά με κληρονομικό ενδιαφέρον. Αποτελεί λοιπόν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα η λεπτομερέστερη μελέτη τέτοιων ελληνικών πληθυσμών.

2.3 Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

2.3.1 ΚΛΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ

Μακρά βλαστική περίοδος, θερμές μέρες, δροσερές νύχτες, μεγάλη ηλιοφάνεια και ομαλή κατανομή βροχοπτώσεως ύψους 460-600 mm κατά την περίοδο της αναπτύξεως αποτελούν τις ιδεώδεις κλιματικές συνθήκες για την καλλιέργεια του αραβοσίτου.

Αναλυτικότερα οι απαιτήσεις του φυτού σε θερμοκρασία και βροχόπτωση συνοψίζονται στα παρακάτω.

*Θερμοκρασία: Ο αραβόσιτος έχει σχετικά μεγάλες απαιτήσεις σε θερμοκρασία, λόγω της τροπικής καταγωγής του. Για το φύτεμα του σπόρου χρειάζεται θερμοκρασία άνω των 10° C. Με θερμοκρασία 21°C ο σπόρος φυτρώνει σε 5-6 ημέρες. Σε θερμοκρασία 15-18° C το φύτεμα διαρκεί 8-10 ημέρες και σε 10-12° C διαρκεί 18-20 ημέρες. Η αντοχή του στις χαμηλές θερμοκρασίες είναι μεγαλύτερη στα πρώτα στάδια (ύψος 15 cm περίπου) και μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Νεαρά φυτά είναι ανθεκτικά σε ελαφρύ παγετό, ενώ τα αναπτυγμένα αναστέλλουν την αύξησή τους σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 13°C και υφίστανται σοβαρές ζημιές αν η θερμοκρασία παραμείνει για αρκετές ημέρες κάτω από 10°C. Ζημιές μπορεί να υποστεί η παραγωγή και από πρώιμους φθινοπωρινούς παγετούς όταν η συγκομιδή είναι όψιμη. Για τα προηγούμενα υπάρχουν διαφορές μεταξύ των γενοτύπων.

Η άριστη θερμοκρασία ημέρας για την αύξηση του αραβοσίτου είναι 24-30°C (μέση θέρους 24°C) και της νύχτας 14-15°C. Οι προηγούμενες θερμοκρασίες και η βλαστική περίοδος 150-180 ημερών έχουν ως αποτέλεσμα μεγάλες αποδόσεις αραβοσίτου. Αντιθέτως, θερμές νύχτες συντελούν σε απώλεια ξηράς ουσίας (αυξημένη αναπνοή) και συνεπώς μικρότερη απόδοση. Μέση θερμοκρασία ημέρας κάτω από 19°C και νύχτας χαμηλότερης από 13°C θεωρούνται μη ευνοϊκές για την ανάπτυξη του.

Αντίθετα, πολύ υψηλές θερμοκρασίες σε συνδυασμό με έλλειψη υγρασίας μπορούν να ζημιώσουν τον αραβόσιτο. Έτσι, σε περίοδο ξηρασίας, θερμοκρασία υψηλότερη των 27°C έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της αναπτύξεως του φυτού. Θερμοκρασίες 30-35°C μπορεί να προκαλέσουν ανωμαλίες στο μεταβολισμό του αζώτου.

*Ένταση φωτισμού: Ο αραβόσιτος είναι τυπικό φυτό φωτοσυνθετικού μηχανισμού C₄. Όταν οι άλλες συνθήκες ανάπτυξης είναι άριστες, τότε με άφθονο φωτισμό ο ρυθμός φωτοσύνθεσης των φύλλων φθάνει τα 60-80 mg CO₂ dm⁻² φύλλου ανά ώρα. Τα άλλα αγρωστώδη τύπου C₃ έχουν ρυθμό γύρω στα 30 mg CO₂ dm⁻² h⁻¹. Επίσης ο αραβόσιτος είναι εξαιρετικά αποδοτικός σε συνθήκες υψηλών εντάσεων φωτισμού (υψηλό σημείο κορεσμού σε σχέση με τα C₃) και σε υψηλότερες θερμοκρασίες (30-40°C). Φωτοσυνθέτει περισσότερο στην νεαρή ηλικία των φύλλων (περίοδος έντονης αυξήσεως) όταν υπάρχει επάρκεια νερού και αζώτου. Τέλος στον αραβόσιτο όταν οι θερμοκρασίες είναι υψηλές, ως φυτό C₄, απουσιάζει η φωτοαναπνοή και επομένως οι απώλειες οφείλονται κυρίως στην αναπνοή.

*Φωτοπερίοδος: Οι μεγάλες ημέρες επιμηκύνουν την περίοδο βλαστήσεως, ενώ απαιτούνται μικρές ημέρες για να μπει το φυτό στην αναπαραγωγή. Γι' αυτό ποικιλίες προσαρμοσμένες στις μεγάλες μέρες των βορειότερων κλιμάτων προμιρίζουν όταν καλλιεργούνται νοτιότερα και αντιστρόφως.

*Βροχόπτωση: Ο αραβόσιτος καλλιεργείται σε περιοχές που διαφέρουν πολύ ως προς τη συνολική βροχόπτωση. Έτσι, η ζώνη του αραβοσίτου στις ΗΠΑ έχει ετήσια βροχόπτωση από 625-1250 mm, αλλά οι τρεις θερινοί μήνες παίρνουν το μερίδιο των 75-150 mm. Η ιδεώδης βροχόπτωση κατά την περίοδο αναπτύξεως του φυτού βρίσκεται στο ύψος των 460-600 mm και πρέπει να κατανέμεται ομοιόμορφα. Ευνοϊκά επιδρούν οι δυνατές (ραγδαίες) βροχές του καλοκαιριού στις οποίες παρεμβάλλεται μεγάλη ηλιοφάνεια και ζεστός καιρός. Ανεπαρκής βροχόπτωση πρέπει να αναπληρωθεί με άρδευση.

Εάν υπάρχει άφθονο νερό, αρδεύουμε συχνά ώστε το έδαφος να είναι πάντα υγρό χωρίς να λιμνάζει το νερό στον αγρό γιατί ζημιώνει το ριζικό σύστημα.

*Βάθος σποράς: Το βάθος σποράς εξαρτάται από την υγρασία, τη θερμοκρασία και το είδος του εδάφους. Με καλές συνθήκες ο αραβόσιτος σπέρνεται στα 2-5 cm. Σε ξηρό έδαφος και ιδίως στα ελαφρότερα εδάφη το βάθος σποράς είναι μεγαλύτερο (8-10 cm). Επειδή ο σπόρος είναι μεγάλος και το φυτόρο αιχμηρό δεν δυσκολεύεται το φύτερωμα από σχετικά μεγαλύτερο βάθος.

2.3.2 Βοτανικά γνωρίσματα και μέθοδοι μελέτης αυτών

2.3.2.1 Ριζικό σύστημα

Με την έναρξη του φυτρώματος του αραβοσίτου εμφανίζεται το ριζίδιο, από το οποίο σχηματίζονται οι εμβρυακές ρίζες στο βάθος που τοποθετήθηκε ο σπόρος, ενώ από τον κόμβο κάτω και κοντά στην επιφάνεια του εδάφους (σταυρό) σχηματίζονται οι μόνιμες ρίζες. Οι μόνιμες ρίζες αναπτύσσονται πρώτα οριζοντίως, διακλαδίζονται άφθονα και εισέρχονται σε βάθος. Παρόλο που οι ρίζες μπορεί να φτάσουν το βάθος των 60 cm και μερικές φορές να ξεπεράσουν και το 1 m με ευνοϊκές εδαφικές συνθήκες, το βάθος του κυρίου ριζοστρώματος δεν ξεπερνά τα 30 cm. Πολύ αργότερα στα αναπτυγμένα φυτά από τους πρώτους 2-3 κόμπους πάνω από την επιφάνεια του

εδάφους εκφύονται οι εναέριες ρίζες των οποίων ο ρόλος είναι κυρίως στηρικτικός. Εισχωρώντας στο έδαφος λειτουργούν όπως και οι άλλες ρίζες.

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διάφορες μέθοδοι μελέτης του ριζικού συστήματος. Μερικές από αυτές στηρίζονται στις αρχές της ηλεκτρικής αγωγιμότητας.

Τα πρώτα πειράματα μέτρησης του μήκους του ριζικού συστήματος με τις μεθόδους αυτές πραγματοποιήθηκαν από τον Kampe (1929), αλλά απέτυχαν. Οι Greenham και Cole (1949) προσπάθησαν να ξεχωρίσουν τις νεκρές από τις ζωντανές ρίζες μετρώντας την ηλεκτρική αγωγιμότητα του ιστού των ριζών εισάγοντας ένα όργανο άμεσης παρατήρησης μέσα στις ρίζες. Παρατήρησαν ότι οι νεκρές ρίζες είχαν υψηλότερη ηλεκτρική αντίσταση από ότι οι ζωντανές. Οι Davis και Johnson (1970) και Johnson και Davis (1971) χρησιμοποίησαν ηλεκτρονικούς αισθητήρες ανάπτυξης στον αγρό για την καταγραφή της καμπύλης ανάπτυξης των σακχαρότευτων, ενώ οι Batchelder και Bouldin (1972) χρησιμοποίησαν τις ιδιότητες της ηλεκτρικής αγωγιμότητας απλών ριζών για τον καθορισμό των ρυθμών επιμήκυνσης των ριζών σε διάφορα στρώματα εδάφους διαφορετικών φυσικών και χημικών ιδιοτήτων. Παρόλες τις προηγούμενες προσπάθειες οι προσεγγίσεις αυτές δεν κατάφεραν να αποτελέσουν παρά μόνο προσπάθειες προσομοίωσης και έτσι οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν δεν κρίθηκαν κατάλληλες για πρακτική εφαρμογή στην έρευνα αγρού.

Πιο πρόσφατα, ο Chloupek (1972a, 1972b, 1976a, 1976b, 1977) μέτρησε την ηλεκτρική χωρητικότητα των ριζικών συστημάτων μέσω μιας γέφυρας ισορροπίας. Μία από τις γέφυρες αυτές ήταν συνδεδεμένη με τη βάση του φυτού ενώ η άλλη ήταν καρφωμένη στο έδαφος με ένα ηλεκτρόδιο 10, 20 ή 30 cm μακριά από το φυτό, σε συγκεκριμένο βάθος. Καθώς ο ζωντανός φυτικός ιστός δρα ως πυκνωτής, η ηλεκτροχωρητικότητά του δίνει μια ένδειξη του μεγέθους του ριζικού συστήματος.

Με την εκτίμηση της ηλεκτροχωρητικότητας, φυσικά, δεν μπορεί να γίνει καμία εκτίμηση σχετικά με τη χωρική διασπορά των ριζών μέσα σε ένα εδαφικό προφίλ. Παρόλα αυτά, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει ενδιαφέρον όταν χρειάζεται να εκτιμηθεί μόνο το σχετικό μέγεθος του ζωντανού ριζικού συστήματος ενός φυτού. Περαιτέρω πειράματα κρίθηκαν απαραίτητα ώστε να συγκριθεί η εγκυρότητα των δεδομένων που αποκτήθηκαν με τη μέτρηση της ηλεκτροχωρητικότητας σε σύγκριση με αντίστοιχα που βρέθηκαν από άλλες μεθόδους μελέτης του ριζικού συστήματος (Böhm, 1979).

Διάφορες μέθοδοι έχουν προταθεί για τον προσδιορισμό της ποσότητας και των χαρακτηριστικών της ρίζας αλλά οι περισσότερες είναι χρονοβόρες και με υψηλό κόστος. Ο Chloupek (1972a) μελέτησε την ηλεκτρική χωρητικότητα των ριζών ως έναν

μη επιθετικό τρόπο εκτίμησης της ριζικής επιφάνειας στον αραβόσιτο, τον ηλιάνθο (*Helianthus annuus* L.) τη βρώμη (*Avena sativa* L.), το κρεμμύδι (*Allium cepa* L.) και τη ελαιοκράμβη (*Brassica napus* L.). Σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε ($r=0.66-0.96$, $P<0.01$) ανάμεσα στην ηλεκτρική χωρητικότητα και την ριζική επιφάνεια σε καλλιέργειες των οποίων η ριζική επιφάνεια και η ριζική μάζα έχουν υψηλή συσχέτιση (αραβόσιτος, ηλιάνθος, σίκαλη και κρεμμύδι), αλλά όχι στις καλλιέργειες στις οποίες οι ρίζες έχουν μεγάλη μάζα αλλά μικρή ριζική επιφάνεια όπως στην ελαιοκράμβη. Ακολούθως, ο Chloupek (1977) έδειξε ότι τα ριζικά κύτταρα και τα περιεχόμενά τους ανέχονται αξιόλογη αντίσταση στο ρεύμα που διέρχεται από το ριζικό σύστημα. Έτσι, έδειξε ότι οι μετρήσεις της ηλεκτρικής χωρητικότητας εξαρτώνται και από τη ριζική επιφάνεια αλλά και από το περιεχόμενο του ριζικού κυττάρου.

Οι Kendall et al. (1982) έλεγξαν την ηλεκτρική χωρητικότητα ως εκτίμηση της ριζικής ξηράς ουσίας στο κόκκινο τριφύλλι (*Trifolium pratense* L.) και τη μηδική (*Medicago sativa* L.). Η χωρητικότητα ήταν αποτελεσματική για την εκτίμηση της ριζικής ξηράς ουσίας στο κόκκινο τριφύλλι ($r=0.87$) αλλά για τη μηδική ήταν αποτελεσματική μόνο στην αρχή ($r=0.54$) και το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου ($r=0.66$). Η ασυμφωνία στις εκτιμήσεις αποδόθηκε σε εδαφικούς παράγοντες όπως διαφορές στην εδαφική υγρασία ανάμεσα στις ριζικές επιφάνειες, ή στη γέφυρα και το έδαφος που μπορεί να επηρέασαν της ακρίβεια των μετρήσεων στο μέσο της καλλιεργητικής περιόδου.

Πιο πρόσφατα, ο Dalton (1995) παρουσίασε τη θεωρία και τις υποθέσεις των μετρήσεων της ηλεκτρικής χωρητικότητας στα ριζικά συστήματα. Παρατήρησε μια καλή συσχέτιση της ριζικής χωρητικότητας και της ριζικής ξηρής μάζας ($r=0.88$) σε υδροπονικά καλλιεργημένα τομάτα (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Ο Dalton (1995) έδειξε την επίδραση του βαθμού κορεσμού του εδαφικού νερού στην χωρητικότητα και πρότεινε ένα εύρος εδαφικής υγρασίας μέσα στο οποίο η επίδραση του περιεχόμενου εδαφικού νερού επάνω στην χωρητικότητα είναι η ελάχιστη. Επιπλέον, έδειξε την επίδραση της τοποθέτησης του ηλεκτροδίου επάνω στην χωρητικότητα δείχνοντας μια μείωση στην ριζική χωρητικότητα καθώς το ηλεκτρόδιο τοποθετήθηκε σε αυξανόμενες αποστάσεις πάνω από τη βάση του βλαστού.

Τρία χρόνια αργότερα, οι Van Beem et al., (1998) απέδειξαν ότι η ριζική ηλεκτροχωρητικότητα εμφανίζει υψηλή συσχέτιση με τη ριζική χλωρή μάζα ($r=0.85$, $P<0.001$) στα πρώτα στάδια ανάπτυξης καθαρών σειρών, υβριδίων και πληθυσμών καλαμποκιού σε πειράματα θερμοκηπίου. Η σχέση με την οποία συνδέονται τα δύο

αυτά χαρακτηριστικά για τις καθарές σειρές, τα υβρίδια και τους πληθυσμούς σε συνθήκες θερμοκηπίου είναι της μορφής: $y = -6.7 + 0.63x$. Στην ίδια εργασία, σε συνθήκες αγρού φάνηκε μια μικρότερη συσχέτιση ($r=0.73$), με πολύ μεγαλύτερο πειραματικό σφάλμα.

Στο παρελθόν, οι μετρήσεις στον αγρό με καπασίμετρα ήταν δυσκίνητες λόγω του μεγάλου μεγέθους των οργάνων και των μπαταριών που χρειαζόνταν για να λειτουργήσουν. Επιπλέον, η τεχνική που χρησιμοποιούνταν ήταν χρονοβόρα διότι απαιτούνταν η χρήση μιας επιδερμικής βελόνας που τοποθετούνταν στο κέντρο του βλαστού. Η πρόσφατη ανάπτυξη ενός ελαφρού καπασίμετρου θα μπορούσε να παρέχει στους ερευνητές ένα ωφέλιμο εργαλείο για την εκτίμηση της ριζικής μάζας, ειδικά για την εκτίμηση του σχετικού μεγέθους του ριζικού συστήματος με σκοπό την κατάταξη γενοτύπων για επιλογή. Αν συνδυαζόταν με μια πιο γρήγορη μέθοδο για την απόκτηση των μετρήσεων, μια τέτοια συσκευή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή γενοτύπων των οποίων τα ριζικά χαρακτηριστικά πλεονεκτούν κάτω από διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Σύμφωνα με δημοσιευμένα δεδομένα τα χαρακτηριστικά των ριζών του αραβοσίτου σχετίζονται με τη ρύθμιση της ανθεκτικότητας στην ξηρασία (Lebreton et al., 1995, Leinhos and Bergmann, 1995, O'Regan et al., 1993, Weerathaworn et al., 1992) και την ανθεκτικότητα στο πλάγιασμα (Reidell and Evenson, 1993, Uelger et al., 1987) (Van Beem et al., 1998).

2.3.2.2 Φύλλα

Όσον αφορά τα φύλλα, οι 5-6 καταβολές των φύλλων που ήδη υπάρχουν στον σπόρο αρχίζουν να αναπτύσσονται από το φύτρωμα του αραβοσίτου. Καθώς μακραίνει το στέλεχος σχηματίζονται νέες καταβολές ενώ συνήθως σε 3 εβδομάδες από το φύτρωμα και σε φυτά ύψους γύρω στα 35 cm ολοκληρώνεται η καταβολή των φύλλων.

Το αναπτυγμένο φύλλο αποτελείται από α) τον κολεό, που περιβάλλει το μεσογονάτιο ως τον επόμενο κόμβο, β) το έλασμα, πλάτους 8-13 cm και γ) τη γλωσσίδα. Οι νευρώσεις του φύλλου είναι παράλληλες. Ο αριθμός φύλλων σχετίζεται με την πρωιμότητα των ποικιλιών. Έτσι, οι πρώιμες ποικιλίες έχουν 9-10 φύλλα, οι μεσοπρώιμες 17-21 και οι όψιμες 40 και περισσότερα (Σφήκας, 1991).

Ένα από τα χαρακτηριστικά του φύλλου που επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη των φυλλοστοιβάδων του αραβοσίτου (Muchow, 1988) και τη φωτοσύνθεσή τους

(Muchow and Davis, 1988; Greef, 1994) είναι η συγκέντρωση αζώτου. Η κατανόηση της επιρροής της αζωτούχου λίπανσης στην απόδοση των καλλιεργειών απαιτεί ακριβή παρακολούθηση των επιπέδων αυτών (Kropff et al., 1993; Sinclair and Muchow, 1995), καθώς το άζωτο που εφαρμόζεται κατά τη σπορά ίσως έχει μικρή σχέση με την αφομοίωση του N και την απόδοση της καλλιέργειας (Cassman et al., 1993; Muchow and Sinclair, 1995). Συνήθως καταγράφεται η συγκέντρωση N στο φύλλο (% ή g N kg⁻¹ ξηράς ουσίας) σε σχέση με διάφορους παράγοντες περιβάλλοντος και διαχείρισης. Η τεχνολογία για συμβατική μέτρηση της συγκέντρωσης N, απαιτεί εργαστηριακές εγκαταστάσεις που κοστίζουν και συχνά δεν είναι διαθέσιμες. Επίσης, η μέθοδος μέτρησης N που ανέπτυξε ο Kjeldahl είναι χρονοβόρα, κάτι που μειώνει τη χρηστικότητα της για διαχείριση της προσθήκης N κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου.

Παρόλες τις δυσκολίες, η παρακολούθηση των επιπέδων N στο φυτό είναι σημαντική όσον αφορά τη βελτίωση της ισορροπίας μεταξύ των απαιτήσεων N της καλλιέργειας και την προσθήκη N στο έδαφος με την εφαρμοζόμενη λίπανση. Επειδή το N που περιέχεται στο φύλλο σχετίζεται στενά με το ρυθμό φωτοσύνθεσης και την παραγωγή βιομάζας (Kropff et al., 1993), αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη των δυναμικών αλλαγών στις απαιτήσεις της καλλιέργειας σε N κατά την καλλιεργητική περίοδο. Λόγω του ότι η άμεση μέτρηση της συγκέντρωσης του N στο φύλλο με διαδικασίες εργαστηρίου απαιτεί πολύ χρόνο, εργασία και χρήματα, πολλές φορές στη βιβλιογραφία αξιοποιείται η μέτρηση με χλωροφυλλόμετρο SPAD (συντομογραφία των λέξεων Soil Plant Analysis Development), η οποία παρέχει μια απλή, γρήγορη και μη καταστροφική μέθοδο εκτίμησης της χλωροφύλλης που περιέχεται στο φύλλο. Το χλωροφυλλόμετρο SPAD 502 της Minolta εκτιμά την περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη των φύλλων έμμεσα με την εκτίμηση της έντασης του πράσινου χρώματος των φύλλων και έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σε πολλές καλλιέργειες όπως το ρύζι (Balasubramanian et al., 1999; Hussain et al., 2000), το καλαμπόκι (Peterson et al., 1993) και το σιτάρι (Follet et al., 1992). Από μετρήσεις σε ένα συνθετικό πληθυσμό, 16 καθαρές σειρές και 118 υβριδικούς συνδυασμούς των καθαρών σειρών μεταξύ τους, ο Κορκόβελος (2003) κατέληξε ότι η μέτρηση σε μονάδες SPAD και η ολική χλωροφύλλη (σε [Chl] mg cm²) συνδέονταν με τη σχέση $y=1.76x - 26.04$ και συντελεστή συσχέτισης πολύ υψηλό ($r=0.98^{**}$). Οι Singh et al., 2002 σε μια προσπάθεια μέτρησης των επιπέδων αζώτου σε καλλιέργεια ρυζιού και σιταριού κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος μέτρησης της χλωροφύλλης με

χλωροφυλλόμετρο μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την εκτίμηση της σωστής διαχείρισης της αζωτούχου λίπανσεως σε όλα τα στάδια της καλλιεργητικής περιόδου και για τα δύο είδη ενώ ταυτόχρονα ελέγχει τις συμβατικά συνιστώμενες ποσότητες και δόσεις λίπανσης. Στο σιτάρι η συνιστώμενη λίπανση βρέθηκε ανεπαρκής για τη διατήρηση των σύγχρονων αποδόσεων ενώ για το ρύζι υπερβολική οδηγώντας σε μικρή αποτελεσματικότητα ανάκτησης N, μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης των υπογείων και επιφανειακών υδάτων από NO₃ και αυξημένο κόστος.

Ενώ τα χλωροφυλλόμετρα έχουν σχεδιαστεί για να καθορίζουν τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης των φύλλων (Peng et al., 1993), το γεγονός ότι ένα μεγάλο μέρος του N των φύλλων είναι ενσωματωμένο στα ένζυμα που σχετίζονται με τη χλωροφύλλη μετέτρεψαν αυτά τα όργανα σε ένα δημοφιλές μέσο για την εκτίμηση του αζώτου των φύλλων. Άλλες χρήσεις για τα όργανα αυτά είναι η ταξινόμηση χλωρωτικού γενετικού υλικού (Krug et al., 1994) και η επιλογή σειρών αραβοσίτου για ανθεκτικότητα σε χαμηλά επίπεδα εδαφικού N (Lafitte and Edmeades, 1994) ή για αυξημένο ρυθμό και διάρκεια της φυλλικής φωτοσύνθεσης (Chapmann & Barreto, 1997).

Οι μετρήσεις σε μονάδες SPAD εμφανίζουν δειγματοληπτικό σφάλμα το οποίο μπορεί να προέλθει από διάφορους παράγοντες. Το χλωροφυλλόμετρο αρχικά σχεδιάστηκε για το ρύζι, το οποίο έχει πολύ πιο στενά φύλλα από τον αραβόσιτο, με αποτέλεσμα η πραγματική δειγματοληπτική περιοχή να είναι μόνο 2-3 mm. Σε υγιή φύλλα αραβοσίτου με σχετικά μεγάλα νεύρα σε σύγκριση με το ρύζι, οι επιτυχείς μετρήσεις μπορεί να ποικίλουν μέχρι και 5 μονάδες (10-15%) καθώς το χλωροφυλλόμετρο τοποθετείται σε διάφορα σημεία κατά πλάτος του φυλλικού ελάσματος, προς το κεντρικό νεύρο. Για τη δειγματοληψία, λοιπόν, μιας περιοχής σε ένα μόνο φύλλο αραβοσίτου με οποιοδήποτε βαθμό ακρίβειας, χρειάζονται 5 με 10 μετρήσεις. Επίσης, είναι πιθανή η διακύμανση των μετρήσεων ανάλογα με την περιοχή του ελάσματος που εκλαμβάνεται ως δείγμα. Διαφορές στο πάχος του φύλλου πιθανώς προκαλούν διακύμανση στη σχέση μεταξύ των μετρήσεων του χλωροφυλλόμετρου και των συγκεντρώσεων N στο φύλλο. Το πάχος του φύλλου μπορεί να ποικίλλει με την καλλιέργεια, το στάδιο ανάπτυξης, την ποικιλία και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Greef, 1994).

Επιπρόσθετες πηγές σφάλματος μπορεί να αποτελέσουν ο αριθμός των φύλλων που παίρνεται ως δείγμα ανά φυτό (συνήθως μόνο τα νεότερα και πλήρως εκπτυγμένα φύλλα ή το φύλλο του σπάδικα) και ο αριθμός των φυτών ανά πειραματικό τεμάχιο. Η

τελευταία πηγή σφάλματος είναι πιο πιθανό να είναι μεγαλύτερη σε πληθυσμούς παρά σε υβρίδια (Chapmann & Barreto, 1997).

2.3.2.3 Σπόρος

Ο κόκκος του αραβοσίτου ποικίλλει τόσο στο μέγεθος όσο και στο σχήμα. Κάθε κόκκος μπορεί να ζυγίζει, ανάλογα με την ποικιλία, κατά μέσο όρο 0.03-1.00 g. Το σχήμα του μπορεί να είναι σφαιρικό, ωοειδές, πεπλατυσμένο κ.ο.κ. ενώ η σύστασή του ποικίλλει επίσης. Η συντήρησή του δεν είναι τόσο εύκολη όσο των χειμερινών σιτηρών. Η φυτρωτικότητα του σπόρου μπορεί να διατηρηθεί υψηλή για πάνω από 10 έτη στη θερμοκρασία δωματίου όταν έχει χαμηλή υγρασία ή με κανονική υγρασία (11-12%) σε χαμηλές θερμοκρασίες και καλύτερα σε αεροστεγή δοχεία.

Όσον αφορά τη σπορά, ενδιαφέρον παρουσιάζει το κατάλληλο βάθος το οποίο εξαρτάται από την υγρασία, τη θερμοκρασία και το είδος του εδάφους. Με καλές συνθήκες ο αραβόσιτος σπέρνεται στα 2-5cm. Επειδή ο σπόρος είναι μεγάλος και το φυτόρο αιχμηρό δεν δυσκολεύεται το φύτεμα από σχετικά μεγαλύτερο βάθος. (Σφήκας, 1991).

Η επιτυχία της εγκατάστασης των φυταρίων είναι πολύ σημαντική για μια καλλιέργεια και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η ποιότητα του σπόρου που χρησιμοποιείται και/ή οι συνθήκες στις οποίες εκτίθεται κατά τη σπορά. Για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς του σπόρου και των φυταρίων έχουν προταθεί αρκετές μαθηματικές προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί ειδικά για τη μέτρηση των διαφορών στη συμπεριφορά των σποροπαρτίδων που οφείλονται στη ρώμη, αλλά μπορούν και να χρησιμοποιηθούν στην αξιολόγηση γενετικού υλικού για διαφορές στη ρώμη ή στην απόκρισή τους σε διαφορετικές περιβαλλοντικές καταπονήσεις.

2.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την ανίχνευση πολυμορφισμών σε επίπεδο DNA έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές και η επιλογή της κατάλληλης κάθε φορά, αποτελεί για το συγκεκριμένο πρόγραμμα ουσιαστικά το πρώτο από τα προβλήματα που καλείται να λύσει ο ερευνητής. Στην πραγματικότητα, υπάρχουν τρεις κατηγορίες στις οποίες κατατάσσεται κάθε τεχνική: α) Οι προσεγγίσεις που δεν βασίζονται στην PCR, β)

μέθοδοι βασιζόμενοι σε PCR ((με αυθαίρετο εκκινητή και γ) PCR συγκεκριμένου στόχου και αλληλούχηση.))

2.4.1 Τεχνικές μη βασιζόμενες στην PCR

Στην κατηγορία αυτή ανήκει η RFLP ανάλυση (Restriction Fragment Length Polymorphism) που αποτελεί και την πρώτη τεχνολογία που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση των πολυμορφισμών σε επίπεδο αλληλουχίας DNA. Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει αποικοδόμηση του DNA με περιοριστικά ένζυμα, διαχωρισμό των τμημάτων DNA που προκύπτουν με πηκτή ηλεκτροφόρησης, διαχωρισμό των τμημάτων σε ένα φίλτρο και υβριδισμός ανιχνευτών στα ξεχωρισμένα τμήματα.

2.4.2 PCR τεχνικές (με αυθαίρετο εκκινητή)

2.4.2.1 Διαδικασία προσέγγισης

Η ανάλυση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεοτιδίων, όπως πολλές αναλυτικές διαδικασίες, συχνά εμποδίζεται από την παρουσία ξένων υλών ή από την υπερβολικά μικρή ποσότητα υλικού που είναι διαθέσιμα για εξέταση. Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) υπερπηδά τα εμπόδια αυτά. Η τεχνική αυτή είναι ικανή να εμπλουτίσει επιλεκτικά μια συγκεκριμένη DNA αλληλουχία κατά 10^6 , διευκολύνοντας σημαντικά τον επακόλουθο αναλυτικό χειρισμό.

Η ενίσχυση με PCR περιλαμβάνει δύο ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές οι οποίοι πλευρίζουν το τμήμα του DNA που θα ενισχυθεί και επαναλαμβανόμενους κύκλους θέρμανσης του μείγματος ώστε να ανοίξουν οι δύο αλυσίδες του DNA και να χωρίσουν η μία από την άλλη (στάδιο denaturation), τον υβριδισμό του εκκινητή στις συμπληρωματικές αλληλουχίες (στάδιο annealing) και την προσθήκη τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων, μέσω της Taq Polymerase, στο 3' άκρο των εκκινητών χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο της ανοιγμένες αλυσίδες του DNA (στάδιο extension).

Αφού τα προϊόντα της επέκτασης είναι επίσης συμπληρωματικά των εκκινητών και μπορούν να τους δεσμεύουν, κάθε επιτυχημένος κύκλος ουσιαστικά διπλασιάζει το ποσό του DNA που συντέθηκε στον προηγούμενο κύκλο. Το γεγονός αυτό καταλήγει στην εκθετική συσσώρευση του συγκεκριμένου τμήματος-στόχου, περίπου 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων.

Με την εμφάνιση της PCR έγινε διαθέσιμη μια σειρά τεχνικών για αξιολόγηση της γενετικής παραλλακτικότητας. Αυτές δεν απαιτούν προηγούμενη γνώση των αλληλουχιών και γι'αυτό μπορούν να εφαρμοσθούν απευθείας σε οποιοδήποτε οργανισμό. Βασίζονται στη χρήση ενός αυθαίρετου εκκινητή (που μπορεί εύκολα να αγοραστεί από κάποια εταιρεία) σε μια αντίδραση PCR που αφορά γενωμικό DNA και καταλήγει στην ενίσχυση αρκετών διακριτών προϊόντων DNA. Στην αντίδραση αυτή, ο εκκινητής συνδέεται με το γενωμικό DNA σε δύο διαφορετικές θέσεις στις συμπληρωματικές αλυσίδες του πρότυπου DNA. Αν οι δύο αυτές θέσεις βρίσκονται αρκετά κοντά μεταξύ τους, παράγεται ένα διακριτό προϊόν διαμέσου θερμοκυκλικής ενίσχυσης (Karp & Edwards, 1995)

Οι Weeden et al. (1992) αναφέρουν ως κατάλληλες συνθήκες αντίδρασης PCR τους 94°C για 1 min, 2 min στους 35°C και 2 min στους 72°C. Μετά από 35 κύκλους για 8 min στους 72°C πριν την ψύξη στους 5°C. Οι τυπικές συνθήκες αντίδρασης και οι παράμετροι του κύκλου φαίνεται να είναι οι κατάλληλες για ένα μεγάλο εύρος φυτών (Weeden et al., 1992).

Ένας αριθμός παρόμοιων τεχνικών που βασίζονται στην αρχή αυτή αναπτύχθηκε την ίδια εποχή και συνολικά αναφέρονται ως MAAP (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling). Η πιο κοινή είναι η RAPD ανάλυση (Randomly Amplified Polymorphic DNA) στην οποία χρησιμοποιούνται εκκινητές 10 ως 20 βάσεων και τα προϊόντα ενίσχυσης διαχωρίζονται σε πηκτή αγαρόζης παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και παρουσιάζονται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Δυο παρόμοιες τεχνικές AP-PCR (Arbitrary Primed PCR) και DAF (DNA Amplification Fingerprinting) διαφέρουν από την RAPD κυρίως στο μήκος του εκκινητή, στην αυστηρότητα με τη οποία τηρούνται οι συνθήκες και τη μέθοδο διαχωρισμού και ανίχνευσης των τμημάτων. Σε όλες τις περιπτώσεις οι πολυμορφισμοί ανιχνεύονται ως παρουσία ή απουσία ζωνών στην ηλεκτροφόρηση και προκαλούνται από διαφορές στην αλληλουχία στη μία ή και στις δύο θέσεις σύνδεσης του εκκινητή (Karp & Edwards, 1995).

2.4.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την RAPD ανάλυση

Η RAPD τεχνολογία κέρδισε γρήγορα την αποδοχή και την εφαρμογή γιατί αποτελεί ένα εργαλείο γενετικής ανάλυσης των βιολογικών συστημάτων που προηγουμένως δεν ήταν δυνατόν να μελετηθούν με τη χρήση των μοριακών δεικτών. Βέβαια εξαιτίας της στοχαστικής φύσης της ενίσχυσης του DNA με τυχαίους εκκινητές

αλληλουχιών, είναι σημαντικό να διατηρηθούν σταθερές οι συνθήκες αντίδρασης που έχουν βελτιστοποιηθεί για την ενίσχυση αναπαραγωγίμου DNA. Αρκετοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης του πρότυπου DNA, της συγκέντρωσης μαγνησίου, τη θερμοκρασία annealing (αναδόμηση) του εκκινητή, το μήκος του εκκινητή και τη σύνθεση των βάσεων του εκκινητή επηρεάζουν την αντίδραση και θα πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά (Tingey et al., 1992).

Η συγκέντρωση του DNA είναι μια παράμετρος που εμφανίζει δυσκολίες στην εκτίμηση, ιδιαίτερα όταν η εργασία γίνεται με μικρές ποσότητες φυτικών ιστών. Σχεδόν ίδιοι RAPD φαινότυποι παρατηρήθηκαν για ποσότητες DNA-εκμαγείου ανάμεσα σε 3-30 ng. Στα όρια αυτά οι συγκεντρώσεις του εκκινητή που δίνουν επαναλήψιμα αποτελέσματα κυμάνθηκαν μεταξύ 0.2-1.0 μM . Μικρότερες συγκεντρώσεις τείνουν να ενισχύουν μεγαλύτερα τμήματα (1500-3000 bp). Τα τμήματα αυτά εξαφανίζονταν όταν αυξάνονταν οι συγκεντρώσεις των εκκινητών και συχνά αντικαθιστούνταν από πολύ μικρότερα (200-400 bp). Συγκεκριμένοι εκκινητές έδωσαν βέλτιστη ενίσχυση σε συγκεντρώσεις 2 με 4 φορές υψηλότερες των περισσότερων εκκινητών δείχνοντας πως ίσως οι προηγούμενες αλληλουχίες είναι πιο άφθονες στο γένωμα και έτσι οι εκκινητές μειώνονται πιο γρήγορα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ενίσχυσης.

Η ποιότητα του DNA-εκμαγείου έχει μεγάλη επίδραση στην παραγωγή και ανάλυση των ενισχυμένων προϊόντων. Το DNA που απομονώθηκε με σημαντικές ποσότητες πολυσακχαριτών ή φαινολικών ουσιών δεν είναι κατάλληλο ενώ DNA που περιέχει μέτριες ποσότητες ξένων υλών συχνά παράγει θολούς ή εξασθενημένους RAPD φαινότυπους. Επειδή η διαδικασία της ενίσχυσης απαιτεί μικρές ποσότητες της μήτρας DNA, οι διαδικασίες εξαγωγής που δίνουν έμφαση στην καθαρότητα παρά στην ποιότητα είναι οι πιο κατάλληλες για την έρευνα με δείκτες RAPD.

Οι (Weeden et al., 1992) συμπέραναν ότι με καθαρό DNA και φροντίδα των συνθηκών ενίσχυσης και ηλεκτροφόρησης καθώς και συντηρητική επιλογή των παρατηρούμενων διασπώμενων αποτυπώσεων η εγγενής αναλογία λάθους στην επιλογή των διασπώμενων RAPDs μπορεί να είναι μικρότερη από το 4%.

2.4.2.3 Εφαρμογές της RAPD τεχνολογίας

Υπάρχουν αρκετές εφαρμογές των RAPD δεικτών, κάθε μια από τις οποίες αξιοποιεί την αποτελεσματικότητα ανίχνευσης των πολυμορφισμών που βασίζονται σε αλληλουχίες του DNA. Ο τομέας της έρευνας με τη μεγαλύτερη ανάπτυξη όσον αφορά

τη χρήση της RAPD τεχνολογίας είναι αυτός της γενετικής πληθυσμών (Hedrick, 1992). Οι RAPD δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για να δημιουργήσουν αποτυπώματα DNA για τη μελέτη της ατομικής ταυτότητας και της ταξονομικής σχέσης στους ευκαρυωτικούς και τους προκαρυωτικούς οργανισμούς (Caetano-Anollés et al., 1991; Hadrys et al., 1992; Hu and Quiros, 1991; Kresovich et al., 1992; Lark et al., 1992; Stiles et al., 1992; Welsh et al., 1991; Wilde et al., 1992; Wöstemeyer et al., 1991).

Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν αναφέρει τη χρησιμότητα των RAPD δεικτών ως πηγή φυλογενετικών πληροφοριών. Οι Arnold et al. (1991) πέτυχαν να χρησιμοποιήσουν τους RAPD δείκτες για να ελέγξουν τη διειδική ροή γονιδίων μεταξύ των ειδών *Iris fulva* και *I. hexagona* και να μελετήσουν την υποτιθέμενη καταγωγή του υβριδίου *I. nelsonii*. Οι Hu και Quiros (1991) έδειξαν ότι τα προϊόντα ενίσχυσης μόνο από 4 τυχαίους εκκινητές ήταν αρκετά για να ξεχωρίσουν μεταξύ 14 διαφορετικών ποικιλιών μπρόκολου και 12 κουνουπιδιού. Οι RAPD δείκτες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας σε συλλογές γενετικού υλικού. Χρησιμοποιώντας μόνο 25 διαφορετικούς δεκαμερείς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, οι Kresovich et al. (1992) κατάφεραν να συλλέξουν πληροφορίες για 140 διαφορετικούς πολυμορφικούς χαρακτήρες σε μια δοκιμή ελέγχου ατόμων που αντιπροσωπεύουν το *Brassica oleracea* L. και *B. para* L. Από τα δεδομένα φάνηκε η χρησιμότητα της δοκιμής για το διαχωρισμό μεταξύ διαφορετικών ατόμων σε μια συλλογή γενετικού υλικού και ότι η ικανότητα να διαχωρίζονται στενά συγγενή άτομα ήταν απλά μια λειτουργία του αριθμού των ζωνών RAPD που παρατηρούνταν. Οι RAPD δείκτες έδωσαν μια αποτελεσματική τεχνολογία για την ανακάλυψη τέτοιων πολυμορφικών χαρακτήρων. Χρησιμοποιώντας έναν τυχαίο μικρό εκκινητή μήκους 5 μόνο νουκλεοτιδίων, σε συνδυασμό με σήμανση αργύρου για να αυξηθεί η ευαισθησία ανίχνευσης των ζωνών RAPD οι Caetano-Anollés et al. (1991) παράγαγαν ένα λεπτομερές και σχετικά πολύπλοκο αποτύπωμα DNA για αρκετά διαφορετικά είδη. Η προσέγγιση αυτή, που ονομάστηκε DAF (DNA amplification fingerprinting) υπόσχεται να δώσει περισσότερες γενετικές πληροφορίες μετά από κάθε ενίσχυση.

Η ιχνηλάτηση (fingerprint) των φυτών έχει πολλές εφαρμογές στο εμπόριο και σε νομικές υποθέσεις. Μια εξ'αυτών περιλαμβάνει τη χρήση της σε βελτιωτικά προγράμματα προκειμένου να καθοριστεί η συγγένεια των γενοτύπων και η πιστοποίηση των απογόνων, ενώ επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για την πιστοποίηση των απογόνων των καταγεγραμμένων ζώων, το σπέρμα και τα έμβρυα αυτών. Επίσης οι

τεχνικές αποτύπωσης DNA μπορεί να χρησιμεύσουν στη δημιουργία, απόκτηση και ενίσχυση των ιδιοκτησιακών δικαιωμάτων στα φυτά. (Jondle, R.J., 1992).

Ιστορικά, πολλά προβλήματα στα διάφορα καλλιεργητικά συστήματα δεν μπορούσαν να λυθούν λόγω έλλειψης γενετικών δεικτών. Για παράδειγμα, η ανάλυση της γενετικής σύνδεσης στα κωνοφόρα ήταν αρχικά αργή λόγω του μεγάλου μεγέθους του γενώματος και λόγω της έμφυτης δυσκολίας παραγωγής ενός διασπώμενου F₂ πληθυσμού (Carlson et al., 1991). Οι Carlson et al, (1991) και Chaparro et al., (1992) πρόσφατα έδειξαν ότι η ταχύτητα και η αποτελεσματικότητα της RAPD ανάλυσης έχουν συνεισφέρει ιδιαίτερα στην χαρτογράφηση των κωνοφόρων.

Μια από τις πρώτες πρακτικές εφαρμογές των RAPD δεικτών ήταν η δημιουργία γενετικών χαρτών υψηλής πυκνότητας. Χρησιμοποιώντας μια πιο αποτελεσματική δοκιμή οι Reiter et al. (1992) κατάφεραν να τοποθετήσουν περισσότερους από 250 νέους γενετικούς δείκτες σε μια ανασυνδυασμένη καθαρή σειρά *Arabidopsis thaliana* σε 4 μόνο ανθρωπομήνες, δείχνοντας καθαρά τη χρησιμότητα των RAPD δεικτών για γρήγορη ολοκλήρωση ενός γενετικού χάρτη.

Επίσης, αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει τη μεθοδολογία RAPD ως αποτελεσματικό εργαλείο προκειμένου να αναγνωρίσουν μοριακούς δείκτες που βρίσκονται μέσα σε περιοχές ενός γενώματος που ενσωματώθηκε κατά την ανάπτυξη σχεδόν ισογονιδιακών σειρών (Klein-Lankhorst et al., 1991; Martin et al., 1991; Paran et al., 1991).³ Ωστόσο υπάρχουν δύο μειονεκτήματα στη χρησιμοποίηση σχεδόν ισογονιδιακών σειρών για την αναγνώριση δεικτών συνδεδεμένων με ένα γενετικό χαρακτηριστικό: το πρώτο είναι ότι χρειάζονται αρκετές γενεές αναδιασταύρωσης για να δημιουργηθεί η σχεδόν ισογονιδιακή σειρά, ενώ το δεύτερο είναι ότι συχνά υπάρχουν αρκετές περιοχές του γενώματος-δότη που έχουν ακούσια ενσωματωθεί στην σχεδόν ισογονιδιακή σειρά (Young and Tanksley, 1989). Αυτό καταλήγει στην αναγνώριση των πολυμορφισμών των δεικτών μεταξύ near-isogenic σειρών που δεν συνδέονται απαραίτητα με το χαρακτηριστικό που μελετάται (Tingey et al., 1992).

2.4.2.4 Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα των RAPDs

Το κύριο πλεονέκτημα των RAPD είναι ότι δεν απαιτούνται ανιχνευτές DNA (DNA probes), ούτε γνώση των αλληλουχιών προκειμένου να σχεδιαστούν συγκεκριμένοι εκκινητές. Η διαδικασία δεν περιλαμβάνει μεταφορά σε μεμβράνη ή στάδια υβριδισμού. Γι'αυτό η τεχνική είναι γρήγορη, απλή και αποτελεσματική και απαιτεί μόνο την αγορά του μηχανήματος των θερμικών κύκλων και συσκευές πηκτής

αγαρόζης. Χρειάζεται μικρές μόνο ποσότητες DNA (10 ng ανά αντίδραση) κάτι που σε μερικές περιπτώσεις κρίνεται απαραίτητο. Στην περίπτωση για παράδειγμα που χαρτογραφούμε τα γονίδια των κωνοφόρων μέσω ιστού μεγαγαμετόφυτου, το μειονέκτημα των ελάχιστων ποσοτήτων DNA υπερνικάται ενώ ταυτόχρονα δίνεται χρήση των πλεονεκτημάτων της 1:1 αναλογίας διάσπασης και των πλήρων πληροφοριών παρόλο που οι RAPDs είναι κυριαρχικοί δείκτες (Grattapaglia et al., 1992). Εξάλλου τα δείγματα μπορούν να αναλύονται γρήγορα και η διαδικασία μπορεί να αυτοματοποιηθεί.

Οι RAPDs έχει αποδειχθεί ότι ανιχνεύουν υψηλότερα επίπεδα πολυμορφισμών σε σχέση με τους RFLPs στις περιπτώσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί και οι δύο τεχνικές στο ίδιο γενετικό υλικό (Karp & Edwards, 1995).

Στις μελέτες με ισογονιδιακές σειρές οι RAPD δείκτες αποδείχθηκαν πιο αποτελεσματικοί από τους RFLPs όσον αφορά την ανίχνευση των πολυμορφισμών, το χρόνο και την εργασία που απαιτήθηκε. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι δεν απαιτείται ο γενετικός χάρτης όλου του γενώματος για να αναγνωριστούν δείκτες που συνδέονται με τα χαρακτηριστικά που κάθε φορά ενδιαφέρουν. Αντί αυτού μπορούμε να επικεντρωθούμε σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος (Tingey et al., 1992).

Οι Kesseli et al. (1994) που συνέκριναν τα επίπεδα πολυμορφισμού που ανιχνεύονται από τους RFLPs και τους RAPDs σε δύο ποικιλίες μαρουλιού διαπίστωσαν ότι το σφάλμα στην επιλογή ήταν παρόμοιο στις δύο τεχνικές, οι οποίες έδειξαν παρόμοιες κατανομές σε όλο το γένωμα και αναγνώρισαν παρόμοια επίπεδα πολυμορφισμού αλλά η διαδικασία των RAPDs ήταν πολύ πιο γρήγορη από την RFLP αφού ο ένας στους δύο εκκινητές αναγνώρισε έναν πολυμορφισμό (Kesseli et al., 1994).

Οι Kesseli et al. (1992) σε μια συγκριτική μελέτη χαρτογράφησης μεταξύ RAPDs και RFLPs στη *Lactuca sativa* (L.) κατέληξαν ότι τα επίπεδα πολυμορφισμού μεταξύ τους ήταν παρόμοια. Οι RAPDs παρουσίασαν τυχαία κατανομή στις ομάδες σύνδεσης, ενώ η χαρτογραφική τους αποτελεσματικότητα είναι πιο υψηλή σε σχέση με τους RFLPs.

Σχετικά με τα μειονεκτήματα αναφέρονται τα ακόλουθα:

Επειδή οι RAPD πολυμορφισμοί είναι το αποτέλεσμα είτε αλλαγής βάσης νουκλεοτιδίου που αλλάζει το σημείο σύνδεσης του εκκινητή, είτε μια εισαγωγή ή μια διαγραφή μέσα στην ενισχυμένη περιοχή (Parks et al., 1991, Williams et al., 1990), οι

πολυμορφισμοί συνήθως σημειώνονται από την παρουσία ή απουσία ενός ενισχυμένου προϊόντος μιας περιοχής. Αυτό σημαίνει ότι η RAPD τεχνική τείνει να παρέχει μόνο δείκτες κυριαρχίας. Άτομα που περιέχουν δύο αντίγραφα ενός αλληλομόρφου δεν ξεχωρίζονται ποσοτικά από εκείνα που περιέχουν ένα μόνο αντίγραφο του αλληλομόρφου. Το μειονέκτημα της χαρτογράφησης με δείκτες κυριαρχίας είναι ότι οι δείκτες που συνδέονται σε ετερόπλευρη διάταξη, για παράδειγμα δείκτες που τοποθετούνται σε ξεχωριστές χρωματίδες (όπως θα μπορούσαν να βρεθούν σε έναν F_2 πληθυσμό) παρέχουν λίγες μόνο πληροφορίες για την εκτίμηση της γενετικής απόστασης (Allard, 1956). Έτσι, κατά τη χαρτογράφηση με δείκτες κυριαρχίας, είναι απαραίτητη η εργασία με δείκτες που είναι μόνο συνδεδεμένοι ομόπλευρα, π.χ. δείκτες τοποθετημένοι σε μια μόνο χρωματίδα, όπως μπορεί να συμβεί σε έναν πληθυσμό καθαρής σειράς από ανασυνδυασμό, σε απλοειδή ή γαμετοφυτικό ιστό ή εναλλακτικά σε έναν F_2 πληθυσμό όπου χαρτογραφούνται RAPD δείκτες που ενισχύθηκαν από έναν μόνο γονέα (Williams et al 1992).

Γενετικές προσομοιώσεις δείχνουν ότι οι δείκτες κυριαρχίας που είναι συνδεδεμένοι ομόπλευρα είναι τόσο αποτελεσματικοί για χαρτογράφηση όσο και οι συγκυριαρχικοί δείκτες σε μια βάση ανά γαμέτη. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν RAPD προϊόντα ως ανιχνευτές υβριδισμού για να ανιχνευθούν συγκυριαρχικοί RFLPs πολυμορφισμοί. Παρόλα αυτά, η χρησιμότητα της προσέγγισης αυτής εξαρτάται από το αν το προϊόν της RAPD ενίσχυσης είναι ομόλογο σε μια αλληλουχία που έχει ένα μόνο αντίγραφο στο γένωμα (Tingey et al., 1992).

Οι RAPDs έχουν εκτενώς χρησιμοποιηθεί για μελέτη ποικιλότητας, ειδικά σε ενδοειδικό επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων της μελέτης πολλών πληθυσμών. Υπάρχουν όμως και περιορισμοί. Ο πρώτος περιορισμός αφορά τη φύση των δεδομένων που παράγονται. Οι RAPDs είναι κυριαρχικοί δείκτες με αποτέλεσμα μόνο οι ομοζυγωτικές περιπτώσεις να είναι ξεκάθαρες ως παρουσία ή απουσία της ζώνης. Επιπλέον η παρουσία μιας ζώνης που φαίνεται να έχει ακριβώς το ίδιο μοριακό βάρος στην πηκτή RAPD διαφορετικών ατόμων δεν μπορεί να ληφθεί ως απόδειξη ότι τα δύο άτομα έχουν την ίδια ζώνη, αν και συνήθως γίνεται αυτή η παραδοχή. Άλλες επιπλοκές είναι ότι μία RAPD ζώνη μπορεί να περιλαμβάνει αρκετά προϊόντα που «μεταναστεύουν με τον ίδιο τρόπο στην πηκτή» και, όπως στην περίπτωση της DNA αποτύπωσης, μπορεί να υπάρχει αβεβαιότητα στην τοποθέτηση δεικτών σε συγκεκριμένες θέσεις απουσία προκαταρκτικής γενεαλογικής ανάλυσης. Οι Lynch και Milligan (1994) αναφέρουν ότι αν θεωρήσουμε ότι υπάρχει μόνο ένα αλληλόμορφο

ανά γονιδιακή θέση που μπορεί να ενισχυθεί, αυτό δεν εμποδίζει την εκτίμηση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων που είναι απαραίτητα για τη γενετική ανάλυση πληθυσμών αλλά μειώνει την ακρίβεια μιας τέτοιας εκτίμησης σε σχέση με την ανάλυση με συγκυριαρχικούς δείκτες. Αν και δεν φαίνεται να είναι δυνατόν να υπάρχουν εντελώς αμερόληπτοι εκτιμητές (estimators) για τους RAPDs, αυτοί που υπάρχουν μπορούν να εξασφαλίσουν ότι η μεροληψία θα είναι αμελητέα. Από τα δεδομένα προκύπτουν εκτιμητές για γονιδιακές και γενοτυπικές συχνότητες, ετεροζυγωτίες εντός και μεταξύ πληθυσμών, βαθμός ομοζυγωτίας, υποδιαίρεση πληθυσμού και βαθμός ατομικής συγγένειας. Ένα σημαντικό συμπέρασμα από την έρευνά τους είναι ότι για να αποκτηθεί ο ίδιος βαθμός στατιστικής αξιοπιστίας χρησιμοποιώντας RAPDs (ή οποιοδήποτε άλλο σύστημα κυριαρχικών δεικτών), σε σχέση με τους συγκυριαρχικούς δείκτες, χρειάζεται το δείγμα ατόμων ανά γονιδιακή θέση να είναι από δύο ως δέκα φορές μεγαλύτερο και επιπλέον, για να αποφευχθεί η μεροληψία στην εκτίμηση των παραμέτρων, τα αλληλόμορφα-δείκτες για τις περισσότερες από τις θέσεις αυτές, θα πρέπει να βρίσκονται σε σχετικά μικρή συχνότητα (Karp & Edwards, 1995).

Ένα σημαντικό ερώτημα είναι αν οι ζώνες RAPD του αυτού μοριακού βάρους, που μοιράζονται μεταξύ ατόμων, είναι ομόλογα χαρακτηριστικά, δηλαδή χαρακτηριστικά που κληρονομήθηκαν από ένα κοινό πρόγονο, ή ομοπλαστικά χαρακτηριστικά, που προκύπτουν ανεξάρτητα μέσα σε ένα πληθυσμό. Φαίνεται πιθανό ότι τα στενά συσχετιζόμενα άτομα θα συγκληρονομούσαν έναν χαρακτηριστικό που μοιράζονται από κάποιο κοινό πρόγονο παρά να απέκτησαν το ίδιο χαρακτηριστικό ανεξάρτητα. Οι Williams et al. (1992) απέδειξαν ότι έτσι συμβαίνει χρησιμοποιώντας απλές ζώνες RAPD ως ανιχνευτές υβριδισμού για να ανιχνεύσουν ομόλογα χαρακτηριστικά πάνω σε ένα DNA που βρίσκεται σε μεμβράνη από RAPD προϊόντα. Μέσα στα όρια της ανάλυσης που παρέχει μια πηκτή αгарόζης, οι RAPD ζώνες που είχαν ενισχυθεί από διαφορετικά είδη του γένους *Glycine*, και εμφανίζονταν ως ομόλογες μέσω της σχετικής κινητικότητας, φάνηκαν επίσης να είναι ομόλογες μέσω υβριδισμού (Tingey et al., 1992).

Η δυσκολία ταυτοποίησης των ενισχυμένων προϊόντων σε μια RAPD ανάλυση με συγκεκριμένα τμήματα DNA εμποδίζει δύο πιθανές χρήσεις των RAPDs ως γενετικούς δείκτες: τη συγκριτική χαρτογράφηση σε συγγενή είδη, και στρατηγικές κλωνοποίησης. Βέβαια η έλλειψη ομολογίας μεταξύ γενωμάτων παρέχει ένα εμφανές πλεονέκτημα στους RAPDs κατά την κατασκευή χαρτών σε πολυπλοειδή είδη. Στα

πολυπλοειδή οι RFLP ανιχνευτές ενός αντιγράφου υβριδίζονται σε πολλαπλές ακολουθίες παράγοντας πολύπλοκα σχέδια ζωνών με εναλλακτικά αλληλόμορφα που είναι δύσκολο να αναγνωριστούν. Αντίθετα, είναι πιθανόν ότι οι πιο πολύ RAPDs θα διασπώνται σε απλές αναλογίες 3:1 (Kesseli et al., 1992).

2.4.2.5 Εκτίμηση γενετικής συγγένειας με RAPD ανάλυση

Οι τεχνικές που συσχετίζονται με τη μέτρηση του βαθμού γενετικής συγγένειας με τη χρήση ισοενζύμων και RFLPs μπορούν να εφαρμοσθούν με μια μικρή τροποποίηση και σε δεδομένα ανάλυσης με RAPD δείκτες. Οι Gower (1985) και Jackson et al. (1989) συνόψισαν τις επιλογές που αφορούν την επιλογή του εκτιμητή γενετικής απόστασης. Οι τέσσερις πιθανές παρατηρήσεις της σύγκρισης δύο γενοτύπων για έναν RAPD δείκτη κατατάσσονται ανάλογα με την παρουσία ('1') ή την απουσία ('0') ενός RAPD δείκτη για κάθε γενότυπο (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Πίνακας πιθανοτήτων που δείχνει τα 4 πιθανά αποτελέσματα της σύγκρισης δύο γενοτύπων για την παρουσία ή απουσία ενός RAPD δείκτη.

		Γενότυπος 1	
		1	0
Γενότυπος 2	1	A (1,1)	B (0,1)
	2	C (1,0)	D (0,0)

Η παρουσία ενός RAPD δείκτη και στους δύο γενοτύπους (περίπτωση A) υποδηλώνει ένα υψηλό επίπεδο ομολογίας των αλληλουχιών στη γονιδιακή αυτή θέση (Williams et al., 1992). Στην περίπτωση που ο ένας μόνο γενότυπος εμφανίζει το δείκτη ενώ ο άλλος όχι (περιπτώσεις B, C), υπάρχει κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των αλληλουχιών των δύο γενοτύπων. Η τρίτη πιθανότητα (περίπτωση D) είναι η αποτυχία ενίσχυσης προϊόντων και στους δύο γενοτύπους, ένα γεγονός που δεν μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για την ομολογία των αλληλουχιών γιατί η αιτία της ταυτόχρονης απουσίας μιας RAPD ζώνης σε δύο γενοτύπους μπορεί να υφίσταται λόγω αλλαγής σε μία και μόνο βάση, που όμως είναι κοινή και στους δύο γενοτύπους (ή οι δύο ακολουθίες μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικές).

Για την εκτίμηση της γενετικής απόστασης ή ομοιότητας ανάμεσα σε δύο γενοτύπους χρησιμοποιούνται οι εκτιμητές γενετικής απόστασης (estimators) οι οποίοι

διαφέρουν στο πώς συνδυάζουν τα A, B, C, D στη σχέση που αντιπροσωπεύουν. Η βασική υπόθεση στην οποία στηρίζεται η εκτίμηση της γενετικής συγγένειας είναι ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από RAPD θέσεις δεικτών διανεμημένες σε όλο το γένωμα με τέτοιον τρόπο που η αναλογία των διαφορών που ανακαλύπτονται σε ένα τυχαίο δείγμα των θέσεων αυτών θα είναι μια σχετικά καλή μέτρηση των διαφορών ακολουθίας ανάμεσα στα γενώματα. Έτσι η γενετική απόσταση (GD) μπορεί να εκτιμηθεί ως ο αριθμός των διαφορών διηρημένος από τον ολικό αριθμό των συγκρίσεων: $GD=(A+D)/(A+B+C+D)$.

Οι εκτιμητές που χρησιμοποιούνται στις συγκρίσεις αυτές είναι η απόσταση του Jaccard ή το συμπληρωματικό αυτής (Debnar et al., 1990) και η ομαλοποιημένη (normalized) ταυτότητα του Nei (Nei, 1972).

Ο εκτιμητής του Jaccard (ή δείκτης κατά Jaccard) δίνεται από τον τύπο:

$$S_{ij}=a/(a+b+c) \text{ (Sneath and Sokal 1973)}$$

Ενώ ο εκτιμητής των Nei-Li:

$$S_{ij}=2a/(2a+b+c) \text{ (Nei \& Li 1979)}$$

Οπού S_{ij} : η γενετική ομοιότητα των δειγμάτων I και j

a: το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα I και j

b: το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα I αλλά απουσιάζουν από το δείγμα j

c: το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα j αλλά απουσιάζουν από το δείγμα I

Για υπολογισμούς γενετικής ομοιότητας χρησιμοποιούνται ευρέως η γενετική απόσταση των Nei-Li (1979) ή το συμπληρωματικό αυτής όπως παρουσιάστηκε από τους Borrenmaier et al. (1992). Τελευταία στη λίστα είναι η τροποποιημένη απόσταση του Rogers (MRD) (Rogers, 1972). Ο εκτιμητής αυτός εφαρμόστηκε σε δυαδικά δεδομένα από τους Lee et al. (1989). Ο MRD απαιτεί πληροφορίες για τα αλληλόμορφα και γι' αυτό είναι ασυμβίβαστος με τα δεδομένα από δείκτες RAPD. Η καλύτερη επιλογή εκτιμητή γενετικής απόστασης για χρήση σε RAPD δεδομένα εξαρτάται από τη σχετική ποσότητα και ποιότητα των πληροφοριών που παρέχει η κάθε σύγκριση για την εκτίμηση του πολυμορφισμού των αλληλουχιών (Smith et al., 1990).

2.4.3 Άλλες τεχνικές

Μια άλλη μοριακή προσέγγιση η οποία σχεδιάστηκε για την αναγνώριση γενετικών δεικτών συνδεδεμένων σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος περιέγραψαν οι Arnheim et al. (1985) που ονομάστηκε genome pooling strategy. Η τεχνική αυτή επιτρέπει τη στόχευση RFLP δεικτών σε μια περιοχή του γενώματος που δεν βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας λόγω εφαρμοζόμενης επιλογής σε μια γονιδιακή θέση της περιοχής αυτής. Η στρατηγική απαιτεί την εξαγωγή γενωμικού DNA από άτομα γενετικά τροποποιημένα (genetically fixed) στη συγκεκριμένη γονιδιακή θέση. Οι δείκτες που συνδέονται με τη θέση αυτή αναγνωρίζονται από την ανισορροπία σύνδεσης στην οποία βρίσκονται σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό. Οι περιορισμοί της προσέγγισης αυτής είναι ότι βασίζονται σε RFLP τεχνολογία, που είναι σχετικά αναποτελεσματική όσον αφορά την αναγνώριση πολυμορφικών περιοχών σε ένα γένωμα, πάντα με την προϋπόθεση ότι υπάρχει ανισορροπία σύνδεσης κοντά στη θέση που ενδιαφέρει μέσα σε έναν πληθυσμό-πηγή.

Πρόσφατα οι Michelmore et al. (1991) περιέγραψαν τη χρήση RAPD δεικτών ως αποτελεσματική μέθοδο αναγνώρισης δεικτών που βρίσκονται σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος. Η μέθοδος αυτή καλείται BSA (Bulk Segregant Analysis) και βασίζεται στη μελέτη δείγματος DNA που εξήχθη από ομάδα ατόμων που διαφοροποιούνται σε έναν πληθυσμό. Συγκεκριμένα κάθε μαζικό δείγμα συντίθεται από άτομα που διαφέρουν κατά ένα συγκεκριμένο φαινότυπο ενός διασπώμενου πληθυσμού. Για απλά γενετικά χαρακτηριστικά, όλες οι γονιδιακές θέσεις στο γένωμα θα πρέπει να εμφανίζονται ότι βρίσκονται σε ισορροπία σύνδεσης εκτός από την περιοχή του γενώματος που είναι κοντά στην επιλεγμένη γονιδιακή θέση. Οι δείκτες που βρίσκονται στη θέση αυτή θα πρέπει να εμφανίζουν πολυμορφία μεταξύ των δειγμάτων για τα διάφορα πατρικά αλληλόμορφα. Επειδή πολλά διασπώμενα άτομα χρησιμοποιούνται για να παραχθούν τα δείγματα υπάρχει μικρή μόνο πιθανότητα οι περιοχές του γενώματος που δεν είναι συνδεδεμένες στη θέση-στόχο να είναι επίσης πολυμορφικές ανάμεσα στα δείγματα. Τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά τυχαίοι εκκινητές για την ενίσχυση των επιθυμητών γονιδιακών θέσεων κάθε δείγματος και για την αναγνώριση RAPD πολυμορφισμών που συνδέονται στο χαρακτηριστικό που ενδιαφέρει. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνολογίας είναι ότι οι δείκτες στοχεύουν σε μια πολύ μικρότερη γονιδιακή περιοχή και η πιθανότητα αναγνώρισης περισσότερων δεικτών από όσους πραγματικά

υπάρχουν είναι μικρή (Michelmore et al. 1991) σε σχέση με την ανάλυση σχεδόν ισογονιδιακών σειρών. Τα άτομα που επιλέγονται από έναν F₂ πληθυσμό θα βρίσκονται πάντα σε ανισορροπία σύνδεσης όσον αφορά τις επιλεγμένες περιοχές και οι δείκτες μπορούν να στοχεύσουν σε οποιαδήποτε γονιδιακή θέση μπορεί να εφαρμοσθεί επιλογή, φαινοτυπική ή γενοτυπική.

Οι Giovannoni et al. (1991) επέδειξαν τη χρήση μιας pooling strategy βασισμένη σε γνωστούς RFLP γενότυπους από πληθυσμούς για τους οποίους υπάρχει χαρτογράφηση, προκειμένου να δημιουργήσουν δείγματα DNA από άτομα ομόζυγα για αντίθετα αλληλόμορφα των γονέων τους σε ένα χρωμοσωμικό τμήμα-στόχο. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για να στοχεύσουν RAPD δείκτες σε περιοχές του γενώματος της τομάτας που ευθύνεται για την ωρίμανση του καρπού. Οι Reiter et al. (1992) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο αυτή για να αναγνωρίσουν 100 RAPD δείκτες εξειδικευμένους στο χρωμόσωμα 1 της *Arabidopsis thaliana*. Καθώς οι γενετικοί χάρτες πλησιάζουν στην ολοκλήρωσή τους, η δημιουργία μαζικών δειγμάτων στο φαινότυπο ή το γενότυπο θα επιτρέψει στους ερευνητές να ξεφύγουν από την τυχαία προσέγγιση της πλήρους χαρτογράφησης και να συγκεντρωθούν πιο αποτελεσματικά σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος (Tingey et al., 1992).

Πιο πρόσφατα η Keygene ανέπτυξε μια μέθοδο που είναι εξίσου εφαρμόσιμη παγκοσμίως, η οποία αποκαλύπτει πολύ υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και εμφανίζει υψηλή επαναληψιμότητα. Η διαδικασία αυτή που ονομάζεται AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) είναι ουσιαστικά μια ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ RFLPs και RAPDs με την έννοια ότι το πρώτο στάδιο αποτελεί η πέψη του γενωμικού DNA αλλά μετά ακολουθούν επιλεκτικοί γύροι ενίσχυσης με PCR των κομμένων τμημάτων.

Ο σχεδιασμός εκκινητών με στόχο γνωστές περιοχές του γενώματος αποτελεί μια άλλη προσέγγιση στη μοριακή ανάλυση. Το ενισχυμένο προϊόν το οποίο στοχεύθηκε μπορεί να συγκριθεί σε πηκτή αγαρόζης με ένα αντίστοιχο προϊόν από ένα άλλο άτομο αλλά η ανάλυση των δύο θα ανιχνεύσει μόνο διαφορές στο μήκος του τμήματος που απορρέουν από πολλές αλλαγές στα ζεύγη των βάσεων (Karp & Edwards, 1995).

Τέλος αναφέρεται η τεχνική με μικροδορυφόρους. Οι μικροδορυφορικές περιοχές είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες όπου ο αριθμός των βάσεων των επαναλαμβανόμενων μοτίβων ποικίλει από δύο ως οκτώ βάσεις. Στην περίπτωση αυτή οι πολυμορφισμοί προκύπτουν από τις διαφορές των επαναλήψεων της βασικής επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας. Οι μικροδορυφόροι ή SSRs (Simple Sequence

Repeats) είναι συγκυρίαρχοι μοριακοί δείκτες με τους οποίους μπορούμε να δούμε όλα τα αλληλόμορφα για κάθε γενωμική περιοχή (Κορκόβελος et al., 2000).

Σύμφωνα με τα προηγούμενα η αξιολόγηση του γενετικού υλικού, πληθυσμών ή άλλου διασπόμενου υλικού, μπορεί να γίνει με συμβατική ή μοριακή προσέγγιση προκειμένου να εκτιμηθεί η αξία των πληθυσμών για ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά.

Η αξία ενός πληθυσμού εξαρτάται από τη μέση συμπεριφορά του (δηλαδή το μέσο όρο), σε σύγκριση με μάρτυρα και από την ύπαρξη ή μη γενετικής παραλλακτικότητας (διακύμανση). Η αξιολόγηση μπορεί να γίνει σε συνθήκες αγρονομικής πρακτικής, δηλαδή τελική συμπεριφορά στον αγρό ή/και σε πρώτα στάδια ανάπτυξης σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών. Επίσης μπορεί να γίνει με μοριακούς δείκτες που μπορούν να δώσουν εκτίμηση της γενετικής συγγένειας και της διακύμανσης.

Η αξιολόγηση στον αγρό απαιτείται στην περίπτωση χαρακτηριστικών στα τελευταία στάδια ανάπτυξης του φυτού, όπως η απόδοση, η αναπαραγωγική συμπεριφορά, το τελικό ύψος κ.α. χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν εφαρμόζεται και στα πρώτα στάδια.

Η πρακτική αυτή είναι απαραίτητη γιατί αποτελεί το τελικό σύνορο μεταξύ της έρευνας και της αξιοποίησης του γενετικού υλικού προσομοιάζοντας τις πραγματικές συνθήκες στις οποίες το υλικό καλείται να αποδείξει της αξία του. Όμως ενέχει το πλεονέκτημα και συνάμα μειονέκτημα της περιβαλλοντικής εξειδίκευσης. Τα αξιολογούμενα φυτά καλλιεργούνται σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον και η συμπεριφορά τους αφορά μόνο το περιβάλλον αυτό. Αξιολόγηση σε άλλες συνθήκες μπορεί να εμφανίσει διαφορετική συμπεριφορά και εντελώς διαφορετικά αποτελέσματα.

Η αξιολόγηση στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών παρέχει προστασία από αστάθμητους περιβαλλοντικούς παράγοντες που ευθύνονται για πολλές αποτυχίες προγραμμάτων και παρέχει τις επιθυμητές συνθήκες θερμοκρασίας, φωτισμού και υγρασίας. Όμως από τη μία δεν επιτυγχάνει να αντικαταστήσει πλήρως τις συνθήκες στις οποίες υποβάλλεται ο πληθυσμός στον αγρό μέσα στις οποίες καλείται να αποδώσει, ενώ από την άλλη υπάρχει περιορισμός χώρου με αποτέλεσμα τα δείγματα να περιορίζονται εξίσου. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται περισσότερο για τη μελέτη χαρακτηριστικών πρώτης ανάπτυξης και την ανακάλυψη συσχετίσεών τους με άλλα,

επόμενων σταδίων, ώστε να μην είναι απαραίτητη η διατήρηση των φυτών για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Τέλος η μοριακή προσέγγιση μπορεί να αποτελέσει μόνο επικουρικό μέσο αξιολόγησης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, γιατί μέχρι σήμερα δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως τα φαινόμενα που συμβαίνουν στο φυτό σε μοριακό επίπεδο. Όμως, είναι γεγονός ότι πλέον καταφέραμε να απομακρύνουμε από την ψευδαίσθηση του φαινοτύπου και πλησιάσαμε πιο πολύ στο γενότυπο.

Ένας συνδυασμός συμβατικής αξιολόγησης και μοριακής με χρήση των κατάλληλων δεικτών είναι ενδιαφέρουσα.

Σκοπός της εργασίας είναι ο συνδυασμός της μελέτης χαρακτηριστικών πρώτης βλαστικής ανάπτυξης σε ελεγχόμενες συνθήκες και της μοριακής αξιολόγησης με δείκτες RAPD προκειμένου να αξιολογήσει 5 ελληνικούς παραδοσιακούς πληθυσμούς καλαμποκιού όσον αφορά την εντός και μεταξύ τους παραλλακτικότητα.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Χρησιμοποιήθηκαν οι πέντε τοπικοί παραδοσιακοί πληθυσμοί:

- 163/GR-OP-85
- 30/GR-OP-165
- 102/GR-OP-84
- 28/GR-OP-183
- 141/GR-OP-12

οι οποίοι ανήκουν στη συλλογή του Ινστιτούτου Σιτηρών του ΕΘΙΑΓΕ, Τμήμα Καλαμποκιού και το υβρίδιο CONSTANZA ως μάρτυρα.

Πίνακας 2. Οι μελετούμενοι πληθυσμοί

ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ	ΤΟΠΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΝΟΜΟΣ	ΕΤΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΣΠΟΡΟΥ
28/GR-OP-183	ΤΙΜΦΡΙΣΤΟΣ	ΦΘΙΩΤΙΔΑ	1985	FL-large
30/GR-OP-165		ΗΛΕΙΑ		D-FL
102/GR-OP-84	ΤΣΟΤΙΛΙ	ΚΟΖΑΝΗ	1967	FL
141/GR-OP-12	Α. ΜΑΜΑΣ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	1966	FL
163/GR-OP-85	ΣΑΛΑΚΟΣ	ΡΟΔΟΣ (ΔΩΔΕΚΑΝ)		D

Η αξιολόγηση των πληθυσμών έγινε στα πρώτα στάδια βλαστικής ανάπτυξης σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών και με μοριακή ανάλυση δεικτών RAPD.

3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΕ ΘΑΛΑΜΟ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ

Για κάθε πληθυσμό και το μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε δείγμα 96 φυτών που σπάρθηκαν σε 32 γλάστρες (σπάρθηκαν 3 σπόροι σε κάθε γλάστρα). Έτσι υπήρχαν 32x5 γλάστρες με τους 5 πληθυσμούς και 32 με το μάρτυρα-υβρίδιο. Οι γλάστρες ήταν τοποθετημένες με πειραματική διάταξη 'απλό σχέδιο χωρίς ομάδες, δείγματα ίσα'.

Το πείραμα εγκαταστάθηκε στο θάλαμο του εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης των Φυτών στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Ο θάλαμος είχε φωτοπερίοδο 16 ωρών ημέρας (με τεχνητούς λαμπτήρες έντασης φωτός 10 klux σε ύψος 3m) και 8 νύχτας,

νερού. Οι γλάστρες αρδεύονταν συχνά ώστε το έδαφος να είναι πάντα υγρό αλλά χωρίς να λιμνάζει. Μετρήθηκε το σύνολο των σπόρων που βλάστησαν συνολικά καθώς και η χρονική πορεία της βλάστησης.

Οι παρατηρήσεις που καταγράφηκαν ήταν οι παρακάτω:

I) Φυτρωτική ικανότητα και ομαλή ανάπτυξη ή ξήρανση φυτών. Οι μετρήσεις φυτρωτικής ικανότητας λαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (δύο ημερών) και υπολογίστηκε ο δείκτης φυτρωτικής ικανότητας (emergency index EI):

$EI = \frac{\sum T_i N_i}{S}$ (Smith and Millet, 1964).

Όπου $\sum T_i$ είναι ο αριθμός των ημερών μετά τη σπορά, N_i είναι ο αριθμός των σπόρων που φύτρωσαν την ημέρα I και S ο συνολικός αριθμός των σπόρων που φυτεύτηκαν. Επίσης μετρήθηκαν τα φυτά τα οποία τελικά δεν επέζησαν μέχρι το τέλος των πειραμάτων ώστε να αποκλεισθούν από τις στατιστικές αναλύσεις.

II) Ύψος του κολεού του τελευταίου φύλλου (ΥΚΦ) από το επίπεδο του εδάφους σε cm. Στο πείραμα που έγινε το καλοκαίρι του 2002 του ΥΚΦ μετρήθηκε στις 38 ημέρες από τη σπορά (3^ο φύλλο), ενώ στο δεύτερο πείραμα, το χειμώνα του 2003 μετρήθηκε στις 37 (3^ο φύλλο) και στις 62 ημέρες από τη σπορά (5^ο φύλλο).

III) Η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη των φύλλων σε μονάδες SPAD. Στο πείραμα του 2002 η χλωροφύλλη μετρήθηκε στις 29 και στις 34 ημέρες από τη σπορά (3^ο φύλλο), ενώ στο πείραμα του 2003 στις 42 και στις 61 ημέρες από τη σπορά (3^ο και 5^ο φύλλο αντίστοιχα).

IV) Έγινε έμμεση εκτίμηση του όγκου του ριζικού συστήματος με βάση την ηλεκτρική χωρητικότητα αυτού σε τιμές nF (nFarrad). Οι μετρήσεις έγιναν ως εξής: στο πείραμα του 2002 στις 38 ημέρες από τη σπορά (3^ο φύλλο), ενώ στο πείραμα του 2003, στις 37 και στις 62 ημέρες από τη σπορά (3^ο και 5^ο φύλλο αντίστοιχα).

V) Η τελική βιομάζα των φυταρίων σε g. Στο πρώτο πείραμα πραγματοποιήθηκε στις 38 ημέρες (3^ο φύλλο) ενώ στο δεύτερο στις 62 ημέρες από τη σπορά (5^ο φύλλο).

Οι μετρήσεις και η στατιστική ανάλυση έγιναν για κάθε φυτό χωριστά.

3.3 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

3.3.1 Ριζικό σύστημα

Η ριζική χωρητικότητα μετρήθηκε με ένα καπασίμετρο BK Precision 810B της εταιρείας MAXTEC Inc που λειτουργούσε στη συχνότητα των 1 kHz και σε εύρος μεταξύ 200pF και 20mF. Προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι αυτή είναι η άριστη συχνότητα λειτουργίας για τις μετρήσεις του ριζικού συστήματος στον αραβόσιτο. Σε προηγούμενα πειράματα, η ηλεκτρική επαφή με το φυτό γινόταν μέσω εισαγωγής μιας βελόνας μέσα στο βλαστό του φυτού. Στη μελέτη αυτή, η ηλεκτρική επαφή επιτεύχθηκε συνδέοντας το αρνητικό ηλεκτρόδιο στο βλαστό του αραβοσίτου μέσω μιας τσιμπιδας στα 4 cm πάνω από την επιφάνεια του εδάφους. Το θετικό ηλεκτρόδιο ήταν συνδεδεμένο μέσω τσιμπιδας σε μία ράβδο από χαλκό, μήκους 55 cm, η οποία τοποθετήθηκε μέσα στο έδαφος σε βάθος 15 cm και απόσταση 5 cm περίπου από τη βάση του βλαστού. Αποτελέσματα από προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι η απόσταση και το βάθος στο οποίο βρίσκεται η χάλκινη ράβδος μέσα στο έδαφος καθώς και η θέση του θετικού ηλεκτροδίου επάνω στη χάλκινη ράβδο, δεν έχουν καμία επίδραση στη μέτρηση της χωρητικότητας. Όπως έδειξε ο Dalton (1995) η ριζική χωρητικότητα επηρεάζεται από τη θέση του αρνητικού ηλεκτροδίου επάνω στο φυτικό βλαστό (Van Beem et al., 1998). Το όργανο ήταν ρυθμισμένο στο επίπεδο των 20-nF ρυθμίζοντας την ένδειξη στο μηδέν μέσω του διακόπτη ρύθμισης μηδενικής τιμής. Κάθε μέτρηση λήφθηκε στα 200 nF μετά από 5 sec που χρειάζονταν για τη σταθεροποίηση της μέτρησης. Στο πείραμα του καλοκαίρι του 2002, για κάθε φυτό πραγματοποιήθηκε μία μέτρηση στις 38 ημέρες από τη σπορά ενώ στο πείραμα το χειμώνα του 2003 για κάθε φυτό πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις, στις 37 και 62 ημέρες από τη σπορά αντίστοιχα. Όλες οι μετρήσεις πάρθηκαν αφού πρώτα τα φυτά είχαν αρδευτεί και ενώ δεν υπήρχε εμφανές νερό στην επιφάνεια του εδάφους, το έδαφος ήταν κορεσμένο.

3.3.2 SPAD

Μέχρι το πέρας κάθε πειράματος, ο αριθμός των φύλλων κάθε φυτού δεν ξεπερνούσε τα 5 ενώ ταυτόχρονα δεν είχε ακόμη επιτευχθεί πλήρης ανάπτυξη αυτών. Από τη διαθέσιμη φυλλική επιφάνεια αποκτήθηκαν 5 μετρήσεις χλωροφύλλης. Ο

μέσος όρος αυτών αποτέλεσε τελικά την μέτρηση SPAD που χρεώθηκε στο κάθε φυτό. Η κοτυληδόνα δεν λήφθηκε υπόψη στις μετρήσεις.

Το χλωροφυλλόμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα SPAD-502 (Minolta Corp., Ramsey, NY). Το όργανο μετρά την ένταση του πράσινου χρώματος του φύλλου (leaf greenness) που σχετίζεται θετικά με την περιεκτικότητα χλωροφύλλης του φύλλου (Fleming and Palmer, 1975, Κορκόβελος, 2003) καθώς και με την αζωτούχο θρεπτική κατάσταση του φυτού (Blackmer et al., 1994).

3.3.3 Βάρος.

Το χλωρό βάρος όλου του υπέργειου τμήματος του φυτού μετρήθηκε με ένα ζυγό ακρίβειας.

3.3.4 Ύψος.

Το ύψος του κολεού του τελευταίου φύλλου από το επίπεδο του εδάφους μετρήθηκε με ένα κοινό χάρακα αμέσως μετά από την κοπή των φυτών από τη βάση του βλαστού.

3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι μετρήσεις κάθε χαρακτηριστικού έγιναν για κάθε φυτό χωριστά (96 φυτά για κάθε πληθυσμό και υβρίδιο). Τελικά, για κάθε πληθυσμό και για το μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των φυταρίων για κάθε πληθυσμό και το μάρτυρα που επιβίωσαν ως το τέλος κάθε πειράματος. Ο πληθυσμός 163/GR-OP-85 δεν συμπεριλήφθηκε στη συνδυασμένη ανάλυση λόγω μικρού δείγματος και αναλύεται χωριστά.

Τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το MSTATC για MS-DOS και τα EXCEL και SPSS για WINDOWS. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με την ανάλυση διακύμανσης ANOVA1 και η εκτίμηση της εντός και μεταξύ των πληθυσμών διακύμανσης επέτρεψε τον υπολογισμό των γενετικών παραμέτρων.

Σύμφωνα με το σχεδιασμό, η στατιστική ανάλυση ακολούθησε το παρακάτω πρότυπο:

Πίνακας 3. Συνδυασμένη ανάλυση που αφορά το 1^ο πείραμα

ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	ΒΕ	ΜΕΣΑ ΤΕΤΡΑΓΩΓΑ	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΜΕΣΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΑ
Μεταξύ πληθυσμών	3	M ₁	$\sigma^2_w + r\sigma^2_g$
Εντός πληθυσμών	283	M ₂	σ^2_w
Σύνολο	286		

Πίνακας 3. Συνδυασμένη ανάλυση που αφορά το 2^ο πείραμα

ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	ΒΕ	ΜΕΣΑ ΤΕΤΡΑΓΩΓΑ	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΜΕΣΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΑ
Μεταξύ πληθυσμών	3	M ₁	$\sigma^2_w + r\sigma^2_g$
Εντός πληθυσμών	157	M ₂	σ^2_w
Σύνολο	160		

σ^2_g =γενετική διακύμανση

$\sigma^2_p = \sigma^2_e + \sigma^2_g$ =φαινοτυπική διακύμανση

r=αριθμός μετρήσεων πληθυσμού

σ^2_w =η παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών

Η φαινοτυπική παραλλακτικότητα του υβριδίου αποτελεί το σφάλμα του πειράματος (σ^2_e) και στα χαρακτηριστικά που είναι μικρότερο του σ^2_w το υπόλοιπο τμήμα του σ^2_p αποτελεί το γενετικό κομμάτι εντός των πληθυσμών.

Η στατιστική ανάλυση που ακολούθησε έκανε δυνατή την εκτίμηση πολλών παραμέτρων για κάθε πληθυσμό χωριστά αλλά και συνολικά σε σχέση με το μάρτυρα: εκτιμήθηκαν οι μέσοι όροι, οι συντελεστές παραλλακτικότητας και οι γενετικές παράμετροι σ^2_g , σ^2_p , ο γενετικός συντελεστής παραλλακτικότητας για κάθε πληθυσμό χωριστά και ο συνδυασμένος $GCV = \{(\sqrt{\sigma^2_g/MO_{\text{πληθυσμού}}}) * 100\}$. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος του υβριδίου και ο συντελεστής κληρονόμησης $H = \{\sigma^2_g / \sigma^2_p\}$ με την ευρεία έννοια.

Επίσης, μέσω σύγκρισης των τιμών κάθε πληθυσμού με την τυπική απόκλιση του μάρτυρα υπολογίστηκε έμμεσα αν υπάρχουν διαφορές εντός του πληθυσμού. Για να εκτιμηθεί η γενετική παραλλακτικότητα εντός κάθε πληθυσμού, από τη φαινοτυπική του παραλλακτικότητα αφαιρέθηκε η διακύμανση εντός του υβριδίου. Αυτή η εκτίμηση μπορεί να γίνει διότι η παραλλακτικότητα που εμφανίζει ο μάρτυρας αποτελεί την παραλλακτικότητα λόγω περιβάλλοντος, λόγω του ότι είναι υβρίδιο και άρα όλα τα φυτά του έχουν τον ίδιο γενότυπο.

Για κάθε χαρακτηριστικό όσον αφορά κάθε πληθυσμό χωριστά αλλά και συνολικά έχουν δημιουργηθεί ιστογράμματα συχνοτήτων και συγκρίθηκαν με το μάρτυρα.

Τέλος, υπολογίστηκαν οι φαινοτυπικές συσχετίσεις όλων των χαρακτηριστικών μεταξύ τους για όλους τους πληθυσμούς συνολικά.

3.5 ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη μοριακή ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 30 τυχαία δείγματα φρέσκων φύλλων από φυτά που φυτεύθηκαν, ειδικά για το σκοπό αυτό, σε άριστες συνθήκες στο εργαστήριο, 5 από κάθε πληθυσμό και 5 από το υβρίδιο. Κάθε δείγμα αποτελούνταν από ιστό ενός μόνο φυταρίου. Για κάθε ένα από αυτά χρησιμοποιήθηκαν από 0.1993g ως 0.5285g ιστού από νέα φύλλα φυταρίων που για αρκετές ημέρες στερούνταν φωτισμού της αποφυγή συσσώρευσης πολυσακχαριτών. Ο ιστός κάθε δείγματος αρχικά αλέσθηκε με τη χρήση υγρού αζώτου μέσα σε αποστειρωμένο γουδί. Έπειτα τοποθετήθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα μαζί με 1 ml CTAB buffer και 10 μl β-μερκαπτοαιθανόλης (1%v/v) και διατηρήθηκε για 10 με 15 min σε υδατόλουτρο της 65 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν όσα ml φρέσκου διαλύματος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1 v/v) χωρούσαν μέσα στο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και αναποδογυρίστηκε απαλά με το χέρι 100 φορές με άνοιγμα του σωλήνα κατά διαστήματα της διαφυγή των παραγόμενων αερίων. Ακολούθησε φυγοκέντρωση της 7000 rpm για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Σε έναν αποστειρωμένο, νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα μεταφέρθηκε η υπερκείμενη υδάτινη φάση χρησιμοποιώντας κομμένες tips του 1 ml προκειμένου να αποφευχθεί ζημιά στο DNA. Στο νέο αυτό σωλήνα προστέθηκε το 2/3 του όγκου 2-ισοπροπανόλη και 1/10 Na-acetate για να έρθει το διάλυμα στο 0.1 M. Μετά από απαλές κινήσεις ανάμιξης του διαλύματος τοποθετήθηκε στο ψυγείο σε θερμοκρασία -20°C για 30 min. Έπειτα, το διάλυμα ξαναπέρασε από φυγοκέντρωση, αυτή τη φορά της 10000 rpm για 6 min και χύθηκε το υπερκείμενο διάλυμα προσεκτικά. Ακολούθησε πλύση με 900 μl 70% EtOH και 100μl 0.1 M K acetate/acetic acid buffer pH 6.0 και ξανά φυγοκέντρωση της 10000 rpm για 6min. Στην συνέχεια ακολούθησε πλύση με 300 μl 95% EtOH και φυγοκέντρωση της 10000 rpm για 6 min. Μετά από προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου, ο σωλήνας μπήκε για ξήρανση σε κενό αέρος και θερμοκρασία 60°C για

5 min. Τέλος η πελλέτα του DNA αραιώθηκε σε 100 μl αποστειρωμένου ύδατος, με προσεκτική ανακίνηση και τοποθετήθηκε στο ψυγείο της -20°C. Τα τελικά διαλύματα, μετά από μετρήσεις στο φωτόμετρο, περιείχαν από 4607 ngr/μl μέχρι 2610.7 ngr/μl γι' αυτό και υπέστησαν περαιτέρω αραιώση 10 φορές.

Τα διαλύματα υπέστησαν επιπλέον καθαρισμό με RNA-άση.

Για την τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκαν 20 εκκινητές των σειρών OPB, OBE και OBF της εταιρείας OPERON. Κάθε εκκινητής αποτελείται από 10 βάσεις σε τυχαία σειρά αλλά με της προϋποθέσεις να μην έχει συμπληρωματικά άκρα και το άθροισμα των βάσεων της γουανίνης και της κυτοσίνης (G+C) που περιέχονται να είναι της τάξεως του 67-70% του συνόλου των βάσεων. Έτσι συνολικά η μοριακή ανάλυση περιέλαβε 600 αντιδράσεις.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Πίνακας 4. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα	
1. OPB-04 5'-GGACTGGAGT-3'	2. OPB-05 5'-TGCGCCCTTC-3'
3. OPB-06 5'-TGCTCTGCCC-3'	4. OPB-09 5'-TGGGGGACTC-3'
5. OPB-10 5'-CTGCTGGGAC-3'	6. OPB-16 5'-TTTGCCCGGA-3'
7. OPB-20 5'-GGACCCTTAC-3'	8. OPE-01 5'-CCCAAGGTCC-3'
9. OPE-04 5'-GTGACATGCC-3'	10. OPE-06 5'-AAGACCCCTC-3'
11. OPE-07 5'-AGATGCAGCC-3'	12. OPE-09 5'-CTTCACCCGA-3'
13. OPE-10 5'-CACCAGGTGA-3'	14. OPE-13 5'-CCCGATTCCGG-3'
15. OPE-14 5'-TGCGGCTGAG-3'	16. OPE-17 5'-CTACTGCCGT-3'
17. OPE-18 5'-GGACTGCAGA-3'	18. OPF-02 5'-GAGGATCCCT-3'
19. OPF-10 5'-GGAAGCTTGG-3'	20. OPF-13 5'-GGCTGCAGAA-3'

Τα μείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR είχαν τελικό όγκο 25 μl και ανά αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

2.5μl διαλύματος PCR buffer 10x

2μl διαλύματος MgCl συγκέντρωσης 25 mM

2μl διαλύματος dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dATP, dGTP, dCTP, dTTP) με τελική συγκέντρωση 2.5 mM

33 pmoles primer

1 unit Taq Polymerase

50 ng περίπου DNA

αποστειρωμένο νερό

Τα υλικά αυτά αναμείχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε μια συσκευή PCR thermocycler της εταιρείας Eppendorf που έχει την ικανότητα να προγραμματίζει τον αριθμό των θερμικών κύκλων, τη θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου της επαναλαμβανόμενου κύκλου, την τελική θερμοκρασία του δείγματος κ.α.

Ο θερμικός κύκλος που ακολουθήθηκε είναι ο εξής:

1. Θέρμανση του μείγματος στους 94.5 °C για 6 min ώστε να διευκολυνθεί το άνοιγμα των αλυσίδων του DNA (στάδιο predenaturation).

2. Επανάληψη για 35 φορές του ακόλουθου θερμικού κύκλου:

A. Θέρμανση του μείγματος στους 94°C για 1 min. Οι δύο αλυσίδες του DNA ανοίγουν και χωρίζουν η μία από την άλλη (στάδιο denaturation).

B. Γρήγορη κάθοδος της θερμοκρασίας στους 35°C για 1 min. Με τον τρόπο αυτό ο εκκινητής υβριδίζει της συμπληρωματικές θέσεις του γενώματος (στάδιο annealing).

Γ. Άνοδος της θερμοκρασίας στους 72°C και παραμονή εκεί για 1.3 min. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου η Taq Polymerase προσθέτει τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια στο 3' άκρο των εκκινητών χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο της ανοιγμένες αλυσίδες του DNA (στάδιο extension).

3. Με τη συμπλήρωση των 35 θερμικών κύκλων ακολουθεί η τελική επέκταση των αλυσίδων στους 72°C για 7 min (στάδιο final extension).

Τα δείγματα μετά το τέλος της αντίδρασης διατηρήθηκαν της 4°C ως τη στιγμή που ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζης συγκέντρωσης 1.5%. Τα αποτελέσματα φωτογραφήθηκαν με κάμερα SONY κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

3.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Κατά την μοριακή εξέταση των υπό εξέταση δειγμάτων και οι 20 εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίασαν πολυμορφικά προϊόντα ενίσχυσης γι' αυτό και χρησιμοποιήθηκαν όλοι της για την περαιτέρω ανάλυση. Τα προϊόντα ενίσχυσης που εμφανίστηκαν στην πηκτική αγαρόζης αποτυπώθηκαν σε πίνακες όπου σημειώθηκαν η παρουσία (1) ή η απουσία (0) των αντίστοιχων ζωνών (ζεύγη βάσεων) για κάθε εκκινητή και δείγμα. Υπολογίστηκε το ποσοστό (%) παρουσίας της κάθε ζώνης εντός και μεταξύ κάθε πληθυσμού αλλά και εντός του υβριδίου.

Με το πρόγραμμα Popgene32 (Yeh and Boyle, 1997) εκτιμήθηκε η γονιδιακή παραλλακτικότητα σύμφωνα με το Nei (Nei, 1979) καθώς και το ποσό των πολυμορφικών θέσεων σε κάθε έναν από τους μελετώμενους γενοτύπους.

Το πρόγραμμα NTSYS-pc2 (Rohlf, 2000) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθούν τα μοριακά δεδομένα του πειράματος με σκοπό να σχηματισθεί δενδρόγραμμα γενετικής ομοιότητας των πληθυσμών. Για την εξαγωγή του δενδρογράμματος δοκιμάστηκαν ο συντελεστής ομοιότητας του Jaccard και ο συντελεστής ομοιότητας των Nei-Li με δύο διαφορετικές προσεγγίσεις: την προσέγγιση UPGMA (Unweighted pair-group method of arithmetic average) και την προσέγγιση του Neighbourjoining. Σύμφωνα με της Smith et al. (1990) η καλύτερη επιλογή εκτιμητή γενετικής απόστασης για χρήση σε RAPD δεδομένα εξαρτάται από τη σχετική ποσότητα και ποιότητα των πληροφοριών που παρέχει η κάθε σύγκριση για την εκτίμηση του πολυμορφισμού των αλληλουχιών. Ο συνδυασμός δείκτη-προσέγγισης που απέφερε το δενδρόγραμμα με τη μεγαλύτερη συσχέτιση με τον αρχικό πίνακα των δεδομένων ήταν της που υπολογίστηκε με τον αλγόριθμο του Jaccard και το μοντέλο UPGMA ($r=0.87$). Συνδυασμός της χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Επίσης έγινε ανάλυση της μοριακής διακύμανσης μεταξύ και ανάμεσα της γενοτύπους υπολογίστηκε με την τεχνική της AMOVA (Excoffier et al., 1992) στο πρόγραμμα Arlequin (Schneider et al., 2001).

Το πρότυπο ανάλυσης ήταν:

Πίνακας 5.

ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	ΒΕ	ΜΕΣΑ ΤΕΤΡΑΓΩΓΑ	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΜΕΣΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΑ
Μεταξύ πληθυσμών	$P-1$	$SSD(AP)$	$n\sigma_a^2 + \sigma^2_b$
Εντός πληθυσμών	$N-P$	$SSD(WP)$	σ^2_b
Σύνολο	$N-1$	$SSD(T)$	σ^2_T

Όπου

$SSD(AP)$: Το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων μεταξύ πληθυσμών

$SSD(WP)$: Το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων εντός πληθυσμών

$SSD(T)$: Συνολικό άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων

P : Συνολικός αριθμός πληθυσμών

N : Συνολικός αριθμός των ατόμων για γενοτυπικά δεδομένα ή συνολικός αριθμός αντιγράφων γονιδίων για απλοειδικά δεδομένα.

$$n = \frac{N - \sum_{p=1}^P N_p^2 / N}{P-1}$$

$$F_{ST} = \frac{\sigma^2_a}{\sigma^2_T}$$

Οι επιδράσεις της υποδιαίρεσης ενός πληθυσμού μπορούν να ποσοτικοποιηθούν μέσω ενός δείκτη, του F_{ST} ο οποίος ορίζεται ως η μείωση στην ετερωζυγωτία σε έναν υποπληθυσμό λόγω μη τυχαίας διασταύρωσης σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό (González-Candelas F., & C. Palacios, 1995).

Η σ^2_T , η συνολική μοριακή διακύμανση είναι το άθροισμα του συστατικού της συνδυακύμανσης που οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των απλοτύπων εντός πληθυσμού (σ^2_b) και του συστατικού της συνδυακύμανσης μεταξύ απλοτύπων σε διαφορετικούς πληθυσμούς μέσα σε μια ομάδα ($n\sigma_a^2 + \sigma^2_b$)

Κατά την επιλογή δεικτών με τυχαία δειγματοληψία, υπάρχει σφάλμα δείγματος όταν η αναλογία των διαφορών στις θέσεις των δεικτών σε ένα τυχαίο υποδείγμα δεν αντιστοιχεί στην τιμή που λαμβάνεται αν εξεταστούν όλες οι θέσεις. Διάφορες μελέτες

(Smith et al., 1990, Tivang et al., 1992) κατέληξαν στο συμπέρασμα πως όσο αυξάνονται οι RAPD ζώνες, τόσο μειώνεται ο συντελεστής παραλλακτικότητας του σφάλματος. Για μια γενετική απόσταση d που βασίστηκε σε RAPD ζώνες, η διακύμανση και το τυπικό σφάλμα δίνονται από τους δύο παρακάτω τύπους:

$$\text{Variance (d)} = nd(1-d)/(n-1)$$

$$\text{Estimated standard error} = [\text{var}(d)/n]^{1/2}$$

Μία από τις μεγαλύτερες ανησυχίες των ερευνητών είναι η απαναληψιμότητα του αποτελέσματος. Η επαναληψιμότητα του τρόπου που ένα συγκεκριμένο σετ RAPD δεδομένων οργανώνει το γενετικό υλικό μπορεί να μετρηθεί με έλεγχο της επαναληψιμότητας των διαφορών μεταξύ των γενετικών αποστάσεων. Το τυπικό σφάλμα της διαφοράς μεταξύ αποστάσεων θα είναι μία σχέση μεταξύ των διακυμάνσεων και της συνδιακύμανσης των αποστάσεων.

Για την αποφυγή μεγάλων σφαλμάτων θα πρέπει να λαμβάνονται μεγάλα δείγματα. Όμως τα μεγάλα δείγματα παρουσιάζουν και μεγαλύτερο κόστος. Έτσι, το σφάλμα δειγματοληψίας θα μπορούσε να μειωθεί αν μπορούσαν να επιλεγούν δείκτες που θα έδιναν πληροφορίες για ένα συγκεκριμένο πληθυσμό και δεν θα υπερεκτιμούσε ούτε θα υποβίβαζε τον αριθμό των δεικτών σε κάποια περιοχή του γενώματος (Sktoch et al., 1992).

Επίσης λόγω της κυριαρχικής συμπεριφοράς των RAPD δεικτών, δεν μπορεί να ξέρει κάποιος τη γενωμική τοποθεσία των ενισχυμένων τμημάτων εκτός αν κάθε τμήμα έχει χαρτογραφηθεί από μια ξεχωριστή ανάλυση διάσπασης (segregation analysis) (Thormann & Osborn, 1992).

Τυπικά, οι RAPD φαινότυποι (ή προφίλ) για πολλά είδη φυτών δείχνουν περισσότερα από ένα ενισχυμένα τμήματα (ζώνες) και η ένταση των τμημάτων αυτών συχνά διαφέρει αξιοσημείωτα. Σε διασπώμενους πληθυσμούς, όλοι οι τύποι των ενισχυμένων τμημάτων, από τα πιο έντονα ως τα πιο αμυδρά, μπορούν να δείξουν την παρουσία ή την απουσία πολυμορφισμού. Η segregation analysis προσφέρει ένα τέλειο μέσο εκτίμησης της επαναληψιμότητας των αντιδράσεων ενίσχυσης. Συγκρίσεις σε προφίλ διάσπασης ανάμεσα σε γενεές ή joint segregation analysis, αν είναι διαθέσιμος αρκετός αριθμός δεικτών, παρέχουν ένα πολύ ισχυρό τεστ της αξιοπιστίας των RAPD δεικτών (Weeden et al., 1992).

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΕ ΘΑΛΑΜΟ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ 1^{ης} ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Η πρώτη ανάπτυξη του φυτού παρουσιάζει ενδιαφέρον για την πρόγνωση της μετέπειτα ανάπτυξης. Η αξιολόγηση χαρακτηριστικών πρώτης ανάπτυξης ενδιαφέρει στο μέτρο που αυτά τα χαρακτηριστικά και η έκφρασή τους σε ελεγχόμενες συνθήκες θα μπορούσαν να διαφοροποιήσουν τους γενοτύπους και να προβλέψουν τις διαφορές στο τελικό στάδιο των φυτών. Οι μελετώμενοι πληθυσμοί αξιολογήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία για τα χαρακτηριστικά πρώτης ανάπτυξης που αναφέρονται πιο κάτω. Κάθε χαρακτηριστικό αναλύεται χωριστά.

Στους πίνακες 6 και 7 εμφανίζεται η συνδυασμένη ανάλυση σε κάθε πείραμα χωριστά. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των 4 πληθυσμών (ο 163/GR-OP-85 δεν συμπεριλήφθηκε στην ανάλυση λόγω μικρού δείγματος).

Συγκεκριμένα στο 1^ο πείραμα οι διαφορές μεταξύ των πληθυσμών φάνηκε να είναι μεγαλύτερες από τις διαφορές εντός των πληθυσμών για όλα τα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν. Στο 2^ο πείραμα οι διαφορές εντός των πληθυσμών φάνηκαν να υπερτερούν στα χαρακτηριστικά: 2^η μέτρηση SPAD ημέρας (στο 5^ο φύλλο), βάρος χλωρής βιομάζας (στο στάδιο του 5^{ου} φύλλου) και ύψος υπέργειου τμήματος (και στα δύο στάδια ανάπτυξης 3^{ου} και 5^{ου} φύλλου).

Πίνακες Μέσων Τετραγώνων Συνδυασμένης Ανάλυσης

Πίνακας 6. Δεδομένα συνδυασμένης ανάλυσης 1^{ου} περσμάματος

	1 ^η SPAD ημέρας (3 ^ο φύλλο)	1 ^η SPAD νόχτας (3 ^ο φύλλο)	2 ^η SPAD ημέρας (3 ^ο φύλλο)	2 ^η SPAD νόχτας (3 ^ο φύλλο)	Βάρος χλωρής βιομάζας (3 ^ο φύλλο)	Υψος Υπέργειου (3 ^ο φύλλο)	Ηλεκτρική Χωρητικότητα ρίζας (3 ^ο φύλλο)
ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΗΘΥΣΜΩΝ	293.193	462.515	473.920	367.024	3.281	18.579	5.101
ΕΝΤΟΣ ΠΑΗΘΥΣΜΩΝ	18.196	13.000	13.680	17.257	0.838	5.461	1.484

Πίνακας 7. Δεδομένα συνδυασμένης ανάλυσης 2^{ου} περσμάματος

	1 ^η SPAD ημέρας (3 ^ο φύλλο)	1 ^η SPAD νόχτας (3 ^ο φύλλο)	2 ^η SPAD ημέρας (5 ^ο φύλλο)	2 ^η SPAD νόχτας (5 ^ο φύλλο)	Βάρος χλωρής βιομάζας (5 ^ο φύλλο)	1 ^ο Υψος Υπέργειου (3 ^ο φύλλο)	2 ^ο Υψος Υπέργειου (5 ^ο φύλλο)	1 ^η Ηλεκτρική Χωρητικότητα ρίζας (3 ^ο φύλλο)	2 ^η Ηλεκτρική Χωρητικότητα ρίζας (5 ^ο φύλλο)
ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΗΘΥΣΜΩΝ	157.104	131.301	9.484	50.562	1.567	3.527	3.841	1.682	7.663
ΕΝΤΟΣ ΠΑΗΘΥΣΜΩΝ	21.424	25.082	27.336	21.209	2.432	6.865	11.729	0.404	3.638

4.1.1 ΦΥΤΡΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Ο αριθμός των φυτών που αναπτύχθηκαν αποτελεί ένα μέτρο της φυτρωτικής δύναμης κάθε πληθυσμού και πιθανόν να σχετίζεται με τη ρώμη και την 1^η ανάπτυξη. Επιπλέον η ταχύτητα φυτρώματος όπως εκτιμάται με το δείκτη φυτρωτικής ικανότητας emergency index (EI) είναι ένα πιο έγκυρο χαρακτηριστικό που σχετίζεται με τη ρώμη των γενοτύπων. Η θέση κάθε πληθυσμού σε σχέση με το μάρτυρα σε καθεμία από αυτές τις ιδιότητες δίνει πολύτιμες πληροφορίες για το δυναμικό του πληθυσμού και την προοπτική της αξιοποίησής του. Τα ποσοστά φυτρώματος των δύο πειραμάτων καθώς και οι δείκτες φυτρωτικής ικανότητας παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

4.1.1.1 1^ο Πείραμα

Η φυτρωτική ικανότητα ως τιμή ή ως δείκτης του υβριδίου δίνει την πραγματική εικόνα όπως αυτή εκφράζεται σε αγρονομικές συνθήκες. Από όλους τους πληθυσμούς το μεγαλύτερο ποσοστό φυτρώματος παρουσίασε ο 141/GR-OP-12 (96.97%) ο οποίος εμφανίστηκε καλύτερος του μάρτυρα (93.94%). Ο πληθυσμός 163/GR-OP-85 είχε το ίδιο ποσοστό φυτρώματος με το υβρίδιο ενώ τη χειρότερη φυτρωτικότητα επέδειξε ο 28/GR-OP-183 με ποσοστό 81.82%.

4.1.1.2 2^ο Πείραμα

Η καλύτερη φυτρωτικότητα φάνηκε στο μάρτυρα με ποσοστό 97.98%. Από τους πληθυσμούς, δύο μοιράζονται την πρώτη θέση: ο 141/GR-OP-12 και ο 30/GR-OP-165 με ποσοστά αρκετά μικρότερα του μάρτυρα (82.83%). Την χειρότερη φυτρωτικότητα φάνηκε να έχει ο 28/GR-OP-183 με ποσοστό 69.70%.

Τα δύο πειράματα μοιράζονται τους ίδιους καλύτερους και χειρότερους πληθυσμούς με ποσοστά που παρουσιάζονται εμφανώς μικρότερα στο 2^ο πείραμα. Το γεγονός ότι ο μάρτυρας είχε καλύτερο ποσοστό στο πείραμα αυτό και δεδομένου ότι είχε σπόρους που είχαν επενδυθεί, υποδεικνύει για τους πληθυσμούς προβλήματα αποθήκευσης.

Πίνακας 8. Φυτρωτική ικανότητα των 5 πληθυσμών & μάρτυρα σε συνθήκες θαλάμου ελεγχόμενων συνθηκών για το 1^ο και 2^ο πείραμα.

	163/GR-OP-85		30/GR-OP-165		102/GR-OP-84		28/GR-OP-183		141/GR-OP-12		Constanza	
	--1 ^ο --	--2 ^ο --	--1 ^ο --	--2 ^ο --	--1 ^ο --	--2 ^ο --	--1 ^ο --	--2 ^ο --	--1 ^ο --	--2 ^ο --	--1 ^ο --	--2 ^ο --
ΦΥΤ%	93.9	75.8	85.9	82.8	89.9	73.7	81.8	69.7	97.0	82.8	93.9	98.0
EI	9.6	13.1	9.9	13.5	9.8	13.9	10.2	13.0	9.7	13.2	7.8	11.6

ΦΥΤ%=το ποσοστό φυτρώματος των 5 πληθυσμών & μάρτυρα σε συνθήκες θαλάμου ελεγχόμενων συνθηκών

EI= ο δείκτης φυτρωτικής ικανότητας των 5 πληθυσμών & μάρτυρα σε συνθήκες θαλάμου ελεγχόμενων συνθηκών

Για την περαιτέρω ανάλυση της βλάστησης σε ελεγχόμενες συνθήκες υπολογίστηκε ο δείκτης φυτρωτικότητας (EI) του οποίου η τιμή αποτελεί ένα μέτρο εκτίμησης της ευκολίας έκπτυξης του υπό εξέταση γενετικού υλικού.

Στον πίνακα 9 φαίνεται ο δείκτης φυτρωτικότητας που υπολογίστηκε για το 1^ο πείραμα. Το υβρίδιο, που παρουσιάζει το μικρότερο δείκτη (7.8), παρουσίασε την πιο γρήγορη βλάστηση, ενώ ο 28/GR-OP-183 χρειάστηκε τις περισσότερες ημέρες για να βλαστήσει το σύνολο των σπόρων (10.2).

Όσον αφορά το δεύτερο πείραμα (πίνακας 10), το υβρίδιο εξακολουθεί να έχει το μικρότερο δείκτη φυτρωτικότητας με τιμή 11.60. Ο πληθυσμός 30/GR-OP-165 εμφανίζει κατέχει την ίδια θέση (4^η) όσον αφορά τον EI των δύο πειραμάτων ενώ τον περισσότερο χρόνο φυτρώματος χρειάστηκε ο πληθυσμός 102/GR-OP-84.

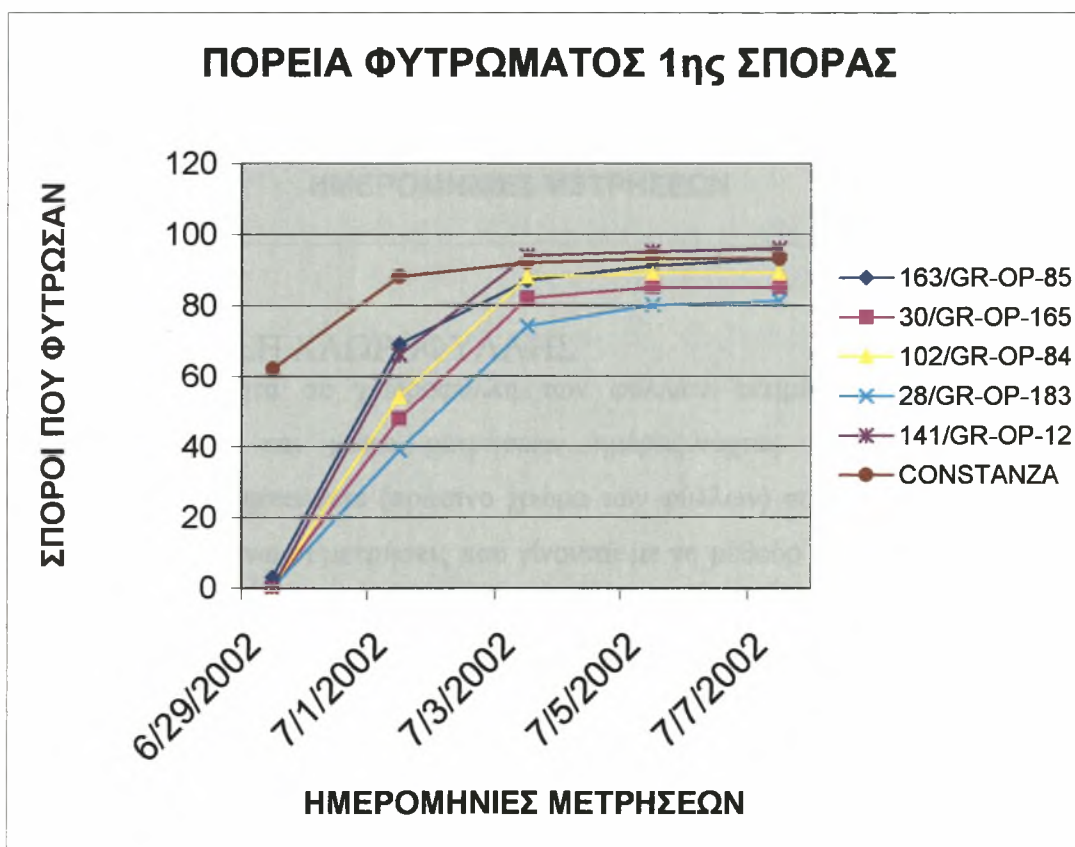
Παρόλο που υπάρχει η κατάταξη των γενοτύπων στους δύο παραπάνω πίνακες, όλοι οι πληθυσμοί παρουσιάζουν μικρή απόκλιση μεταξύ τους και ουσιαστικά δεν παρατηρούνται διαφορές, ενώ παράλληλα γίνεται εμφανής η υπεροχή του μάρτυρα στο συγκεκριμένο δείκτη που αποτελεί μια εκτίμηση της διάρκειας του σταδίου της βλάστησης, ενός παράγοντα πολύ σημαντικού για την ομοιομορφία της καλλιέργειας του φυτού.

Τέλος, αξίζει να σημειώσουμε ότι μεταξύ των δύο πειραμάτων παρήλθε χρονικό διάστημα 6 μηνών, γεγονός που ίσως μπορεί να εξηγήσει τους μεγαλύτερους δείκτες φυτρωτικότητας στο 2^ο πείραμα. Πιθανή μόλυνση από παθογόνα στα οποία το υβρίδιο δεν εξετέθη λόγω επικάλυψης σπόρου με παρασιτοκτόνα, καθώς και η επιπλέον αποθήκευση για 6 μήνες ίσως μείωσαν την ευρωστία των σπόρων.

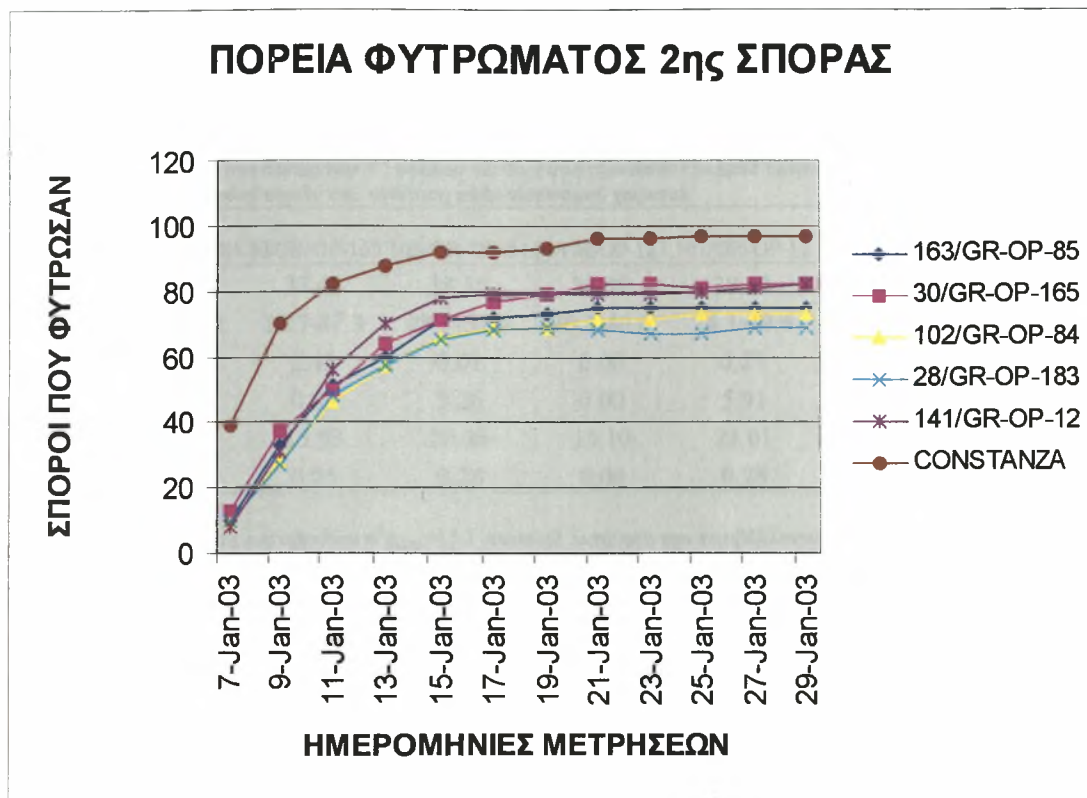
Η πορεία της βλάστησης στα δύο πειράματα παρουσιάζεται στα διαγράμματα 2 και 3 που επιβεβαιώνουν τα προαναφερθέντα. Επίσης φαίνεται ότι στις πρώτες ημέρες

υπάρχει υπεροχή του υβριδίου, αργότερα όμως οι πληθυσμοί ανακάμπτουν. Η επίδραση της αποθήκευσης φαίνεται στις διαφορές μεταξύ των δύο διαγραμμάτων καθώς οι πληθυσμοί στο 2^ο πείραμα υστερούν πολύ από το μάρτυρα τόσο στο τελικό ποσοστό φυτρώματος όσο και κατά την πορεία του φυτρώματος.

Διάγραμμα 2.



Διάγραμμα 3.



4.1.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ

Η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη των φύλλων εκτιμήθηκε εμμέσως με το χλωροφυλλόμετρο και μέσω μετρήσεων ημέρας-νύχτας. Στην πραγματικότητα μετρήθηκε το leaf greenness (πράσινο χρώμα των φύλλων) σε διάφορα στάδια. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω οι μετρήσεις που γίνονται με τη μέθοδο αυτή σχετίζονται στενά με την περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη των φύλλων (Κορκόβελος, 2003). Οι πίνακες 9-16 παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για το χαρακτηριστικό αυτό.

4.1.2.1 1^ο πείραμα

4.1.2.1.1 1^η μέτρηση SPAD ημέρας (στάδιο 3^{οο} φύλλου)

Στο 1^ο πείραμα, η 1^η SPAD ημέρας μετρήθηκε στις 29 ημέρες από τη σορά. Ο πληθυσμός με το μεγαλύτερο μ.ο. ήταν ο 141/GR-OP-12 (39.13 σε μονάδες SPAD) τόσο μεταξύ των πληθυσμών όσο και από τον μέσο όρο του υβριδίου. Διαφέρει σημαντικά από όλους τους πληθυσμούς. Ο γενετικός συντελεστής παραλλακτικότητας

εμφανίστηκε μικρός ή αμελητέος και κατά συνέπεια ήταν μικρή και η γενετική παραλλακτικότητα. Ο συντελεστής κληρονομής είχε μικρή τιμή (0.20) ενώ για κάθε πληθυσμό ήταν πολύ μικρός (από 0 ως 0.28).

Πίνακας 9.

Δεδομένα 1^{ου} πειράματος στο στάδιο του 3^{ου} φύλλου για το χαρακτηριστικό «1ο spad ημέρας» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	35.43	37.48	38.19	34.30	39.13	37.49	39.06
Εύρος	27.2-43.2	28.7-47.3	28.7-51.0	26.3-40.6	24.1-49.4	24.1-51.0	30.6-48.4
GCV%	0.00	2.43	6.01	0.00	6.21	4.70	
σ^2_g	0.00	0.83	5.26	0.00	5.91	3.74	
σ^2_p	15.10	15.93	20.36	15.10	21.01	18.84	
H	0.00	0.05	0.26	0.00	0.28	0.20	

CV=11.38%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{p_{con}}=15.1$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

4.1.2.1.2 1^η μέτρηση SPAD νύχτας (στάδιο 3^{ου} φύλλου)

Στις 29 ημέρες από τη σπορά λήφθηκε άλλη μια μέτρηση SPAD σε συνθήκες έλλειψης φωτισμού. Ο 141/GR-OP-12 εξακολουθεί να έχει τον υψηλότερο μ.ο. (38.15) και να διαφέρει σημαντικά από τους υπόλοιπους πληθυσμούς και το μάρτυρα. Ο γενετικός συντελεστής παραλλακτικότητας είχε αρκετά μικρή τιμή (5-7%) ενώ ο H ήταν μέτριος (0.44). Ο συντελεστής κληρονομής κάθε πληθυσμού χωριστά ήταν μέτριος (0.24 ως 0.49).

Πίνακας 10.

Δεδομένα 1^{ου} πειράματος στο στάδιο του 3^{ου} φύλλου για το χαρακτηριστικό «1ο spad νύχτας» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	35.40	35.49	36.61	32.03	38.15	36.06	36.93
Εύρος	27.2-43.2	18.2-43.9	28.7-45.5	21.6-38.2	29.9-46.6	18.2-46.6	30.8-42.7
GCV%	5.99	7.79	6.91	4.90	5.21	6.28	
σ^2_g	4.49	7.65	6.40	2.46	3.95	6.22	
σ^2_p	12.36	15.52	14.27	10.33	11.82	14.09	
H	0.36	0.49	0.45	0.24	0.33	0.44	

CV=10.06%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{p_{con}}=7.87$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

4.1.2.1.3 2^η μέτρηση SPAD ημέρας (στάδιο 3^ο φύλλου)

Η μέτρηση αυτή λήφθηκε στο ίδιο στάδιο στις 34 ημέρες από τη σπορά. Ο πληθυσμός με το μεγαλύτερο μ.ο. (39.16) ήταν ο 141/GR-OP-12 με διαφορές από τους άλλους, όχι όμως και από τον μάρτυρα. Ο GCV παραμένει στα ίδια επίπεδα (5.83%) όπως και η γενετική παραλλακτικότητα τόσο στο σύνολο των πληθυσμών (6,4) όσο και εντός των πληθυσμών (0.46 ως 7.54). Οι τιμές του συντελεστή κληρονομιάς είναι μέτριες εκτός από αυτές των πληθυσμών 163/GR-OP-85 και 28/GR-OP-183 που ήταν μηδενικές.

Πίνακας 11.

Δεδομένα 1^ο πειράματος στο στάδιο του 3^ο φύλλου για το χαρακτηριστικό «2ο spad ημέρας» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	32.75	36.15	37.22	32.92	39.16	36.66	38.35
Εύρος	27.6-39.6	28.4-46.6	26.4-47.8	25.0-40.3	28.6-46.0	25.0-47.8	30.5-48.1
GCV%	2.07	6.69	7.38	0.00	5.46	5.83	
σ^2_g	0.46	5.85	7.54	0.00	4.57	6.40	
σ^2_p	9.57	14.96	16.65	9.11	13.68	15.51	
H	0.05	0.39	0.45	0.00	0.33	0.41	

CV=10.09%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{p_{con}}=9.11$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

4.1.2.1.4 2^η μέτρηση SPAD νύχτας (στάδιο 3^ο φύλλου)

Ο πληθυσμός που ξεχωρίζει είναι ο 141/GR-OP-12 (μ.ο.=37.64) ακόμα και από το μάρτυρα χωρίς όμως να διαφέρει από τον 2^ο καλύτερο μ.ο. (102/GR-OP-84 με μ.ο. 37.09). Ο γενετικός συντελεστής παραλλακτικότητας παρουσίασε μικρές ως μέτριες τιμές εντός και μεταξύ των πληθυσμών ενώ ο συντελεστής κληρονομιάς παρουσιάζει τιμές μεταξύ 0.3 και 0.4 (για τον πληθυσμό 28/GR-OP-183 είναι αμελητέος).

Πίνακας 12.

Δεδομένα 1^ο πειράματος στο στάδιο του 3^ο φύλλου για το χαρακτηριστικό «2ο spad νύχτας» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	33.44	34.78	37.09	32.60	37.64	35.77	35.97
Εύρος	21.9-39.6	23.5-44.9	26.6-48	18.7-39.9	28.1-50.5	18.7-50.5	22.9-44.3
GCV%	7.73	6.91	8.67	2.57	6.50	6.80	
σ^2_g	6.69	5.78	10.34	0.70	5.98	4.83	
σ^2_p	18.02	17.11	21.67	12.03	17.31	16.16	
H	0.37	0.34	0.48	0.06	0.35	0.30	

CV=11.61%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{p_{con}}=11.33$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

Όσον αφορά γενικά τις μετρήσεις SPAD του 1^{ου} πειράματος που έγιναν στο ίδιο βλαστικό στάδιο έχουμε να παρατηρήσουμε ότι όλοι οι πληθυσμοί παρουσιάζουν διαφορές τόσο μεταξύ τους όσο και εντός, με μικρές τιμές γενετικού συντελεστή παραλλακτικότητας-γενετικής παραλλακτικότητας και μέτριες τιμές συντελεστή κληρονόμησης. Ο 141/GR-OP-12 είναι σταθερά καλύτερος ακόμα και από το μάρτυρα ενώ ο πληθυσμός με τους μικρότερους μέσους όρους ήταν ο 28/GR-OP-183.

4.1.2.2 2^ο πείραμα

4.1.2.2.1 1^η μέτρηση SPAD ημέρας (στάδιο 3^{οο} φύλλου)

Η μέτρηση έγινε στις 42 ημέρες από τη σπορά. Ο 141/GR-OP-12 είχε τον υψηλότερο μέσο όρο (39.06) και διαφορετικό του υβριδίου και των υπολοίπων πληθυσμών. Ο γενετικός συντελεστής παραλλακτικότητας και ο συντελεστής κληρονόμησης υπήρξαν μηδενικοί.

Πίνακας 13.

Δεδομένα 2^{ου} πειράματος στο στάδιο του 3^{ου} φύλλου για το χαρακτηριστικό «1ο spad ημέρας» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	29.74	34.72	35.77	36.33	39.06	36.58	36.21
Εύρος	23.0-39.2	24.5-43.2	24.8-45.1	25.0-43.2	27.1-49.4	24.5-49.4	19.9-44.9
GCV%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
σ^2_g	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
σ^2_p	24.60	24.60	24.60	24.60	24.60	24.60	
H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

CV=12.65%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{p_{con}}=24.60$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

4.1.2.2.2 1^η μέτρηση SPAD νύχτας (στάδιο 3^{οο} φύλλου)

Οι παρατηρήσεις που αφορούν τη μέτρηση αυτή συμφωνούν με την προηγούμενη παράγραφο. Ο 141/GR-OP-12 έχει την υψηλότερη τιμή μ.ο. (36.55), διαφορετική του υβριδίου (34.05) και των άλλων πληθυσμών. Οι γενετικές παράμετροι παρουσίασαν αμελητέες τιμές.

Πίνακας 14.

Δεδομένα 2^{ου} πειράματος στο στάδιο του 3^{ου} φύλλου για το χαρακτηριστικό «1ο spad νύχτας» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	28.21	32.45	34.01	34.89	36.55	34.51	34.05
Εύρος	18.6-36.6	20.8-42.3	16.7-41.7	26.0-42.5	26.9-47.0	16.7-47.0	15.5-45.5
GCV%	0.00	3.50	3.18	0.00	0.00	0.00	
σ^2_g	0.00	1.29	1.17	0.00	0.00	0.00	
σ^2_p	27.21	28.50	28.38	27.21	27.21	27.21	
H	0.00	0.05	0.04	0.00	0.00	0.00	

CV=14.51%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{rcop}=27.21$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

4.1.2.2.3 2^η μέτρηση SPAD ημέρας (στάδιο 5^{ου} φύλλου)

Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στις 61 ημέρες. Ο 141/GR-OP-12 έχει την υψηλότερη θέση χωρίς όμως να παρατηρηθεί κάποια διαφορά με τους άλλους γενοτύπους. Αντίθετα, εντός των πληθυσμών παρατηρούνται διαφορές. Οι γενετικές παράμετροι παρέμειναν αμελητέες.

Πίνακας 15.

Δεδομένα 2^{ου} πειράματος στο στάδιο του 5^{ου} φύλλου για το χαρακτηριστικό «2ο spad ημέρας» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	34.14	36.99	37.26	38.05	37.87	37.51	39.45
Εύρος	25.6-41.3	21.8-47.7	30.3-45.9	30.3-47.9	14.3-48.4	14.3-48.4	27.9-50.8
GCV%	0.00	1.95	0.00	0.00	11.82	3.99	
σ^2_g	0.00	0.52	0.00	0.00	20.04	0.00	
σ^2_p	25.10	25.62	25.10	25.10	45.14	25.10	
H	0.00	0.02	0.00	0.00	0.44	0.00	

CV=13.94%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{rcop}=25.10$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

4.1.2.2.4 2^η μέτρηση SPAD νύχτας (στάδιο 5^{ου} φύλλου)

Στις 61 ημέρες μετρήθηκαν τα επίπεδα SPAD νύχτας. Από την ανάλυση δεν φάνηκαν να υπάρχουν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών. Ο υψηλότερος μ.ο. προέρχεται από τον 141/GR-OP-12 πληθυσμό (36.96) ο οποίος ήταν μικρότερος του υβριδίου. Εντός των πληθυσμών υπήρξαν διαφορές. Ο GCV είναι αρκετά ικανοποιητικός (5 με 12%), ενώ ο H εμφανίζεται μικρός ως μέτριος για όλους τους πληθυσμούς (από 0.27 ως 0.66).

Πίνακας 16

Δεδομένα 2^{ου} πειράματος στο στάδιο του 5^{ου} φύλλου για το χαρακτηριστικό «2ο spad νόχτας» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	32.80	34.96	34.74	36.38	36.96	35.74	37.64
Εύρος	26.7-39.6	23.7-42.5	26.8-45.9	29.9-47.1	23.0-46.7	23.0-47.1	28.2-43.8
GCV%	5.91	5.86	7.36	9.41	12.18	9.25	
σ^2_g	3.76	4.19	6.54	11.71	20.27	0.17	
σ^2_p	14.04	14.47	16.82	21.99	30.55	10.45	
H	0.27	0.29	0.39	0.53	0.66	0.02	

CV=12.88%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{p_{con}}=10.28$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

Η γενική τάση των μετρήσεων SPAD στο 2^ο πείραμα εμφανίζει χαμηλούς ως ημελητέους GCV, μηδενικούς H και σημαντικές διαφορές (εντός των πληθυσμών κυρίως). Δεν υπάρχει γενετική παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών. Ο 141/GR-OP-12 παραμένει ο πληθυσμός με τον υψηλότερο μέσο όρο ενώ ο 163/GR-OP-85 με το χαμηλότερο.

Τόσο στο 1^ο όσο και στο 2^ο πείραμα παρατηρήθηκαν χαμηλότεροι μέσοι όροι στις μετρήσεις SPAD νόχτας σε σχέση με τους μέσους όρους που παρατηρήθηκαν στις αντίστοιχες μετρήσεις ημέρας, μικροί ως μέτριοι γενετικοί συντελεστές παραλλακτικότητας τόσο εντός όσο και μεταξύ των πληθυσμών. Οι συντελεστές κληρονομησης έχουν τιμές που συμφωνούν με τον Κορκόβελο (2003). Έτσι το χαρακτηριστικό «περιεκτικότητα χλωροφύλλης στα φύλλα», με έμμεση εκτίμηση σε μονάδες SPAD, φαίνεται ότι συμπεριφέρεται ως ποσοτικό κληρονομήσιμο χαρακτηριστικό με μικρό ως μέτριο συντελεστή κληρονομησης.

4.1.3 ΒΑΡΟΣ ΧΛΩΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Το βάρος χλωρής βιομάζας αναμένεται να έχει ενδιαφέρον στο τελικό στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Οι μέσοι όροι πληθυσμών-μάρτυρα και οι σχετικές παράμετροι διακύμανσης παρουσιάζονται στους πίνακες 17 και 18.

4.1.3.1 1^ο πείραμα (στάδιο 3^{ου} φύλλου)

Το βάρος χλωρής βιομάζας στο 1^ο πείραμα μετρήθηκε στις 38 ημέρες από τη σπορά. Ο 141/GR-OP-12 πληθυσμός έχει το μέγιστο μ.ο. (2.60g) διαφέροντας από το μάρτυρα και από τους 2 τελευταίους στην κατάταξη πληθυσμούς. Ο γενετικός

συντελεστής παραλλακτικότητας ήταν υψηλός (GCV=25.5%), η γενετική παραλλακτικότητα αρκετά υψηλή εντός καθώς και η γενική γενετική παραλλακτικότητα (0.44). Ο συντελεστής κληρονόμησης ήταν μικρός ως μέτριος εντός και μεταξύ με καλύτερο αυτόν του 141/GR-OP-12 του οποίου η τιμή ήταν 0.61.

Πίνακας 17.

Δεδομένα 1^{ου} πειράματος στο στάδιο του 3^{ου} φύλλου για το χαρακτηριστικό «βάρους χλωρής βιομάζας» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	1.24	2.13	2.54	2.41	2.60	2.43	2.24
Εύρος	0.5-2.4	0.7-3.9	0.3-4.7	0.9-4.8	0.5-5.4	0.3-5.4	0.8-4.1
GCV%	0.00	11.50	24.27	20.75	32.41	25.59	
σ^2_g	0.00	0.06	0.38	0.25	0.71	0.44	
σ^2_p	0.45	0.51	0.83	0.70	1.16	0.89	
H	0.00	0.12	0.46	0.36	0.61	0.49	

CV=37.59%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{pcon}=0.45$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

4.1.3.2 2^ο πείραμα (στάδιο 5^{ου} φύλλου)

Η αντίστοιχη μέτρηση του βάρους στο 2^ο πείραμα έγινε στις 62 ημέρες. Οι διαφορές μεταξύ των πληθυσμών δεν είναι σημαντικές, είναι όμως σημαντικές οι διαφορές μεταξύ των φυτών καθενός πληθυσμού. Για πρώτη φορά, την πρωτιά παίρνει ο 28/GR-OP-183 (μ.ο. 3.08g). Ο γενετικός συντελεστής παραλλακτικότητας είναι πολύ μεγάλος (36.06%) με παρόμοια επίπεδα και εντός των πληθυσμών εκτός του 30/GR-OP-165 (16.44%) και του 163/GR-OP-85 (0%). Ο συντελεστής κληρονόμησης ακολούθησε παρόμοια πορεία.

Πίνακας 18.

Δεδομένα 2^{ου} πειράματος στο στάδιο του 5^{ου} φύλλου για το χαρακτηριστικό «βάρους χλωρής βιομάζας» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	1.49	2.58	2.66	3.08	2.68	2.72	2.64
Εύρος	0.4-3.7	0.3-6.1	0.5-7.2	0.4-6.7	0.6-6.7	0.3-7.2	0.5-5.4
GCV%	0.00	16.44	41.52	38.69	39.84	36.06	
σ^2_g	0.00	0.18	1.22	1.42	1.14	0.00	
σ^2_p	1.47	1.65	2.69	2.89	2.61	1.47	
H	0.00	0.11	0.45	0.49	0.44	0.00	

CV=57.34%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{pcon}=1.47$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

Το χαρακτηριστικό του βάρους χλωρής βιομάζας και στα δύο πειράματα δείχνει ότι υπάρχουν πληθυσμοί με υψηλότερους μέσους όρους από το μάρτυρα και αρκετή

γενετική παραλλακτικότητα για επιλογή, ενώ ο συντελεστής κληρονομικότητας είχε σταθερές, μέτριες τιμές.

4.1.4 ΥΨΟΣ ΩΣ ΤΟΝ ΑΝΩΤΑΤΟ ΜΙΣΧΟ

Η συνδυασμένη ανάλυση των μετρήσεων του ύψους υπέργειου τμήματος ως το μίσχο του ανώτατου φύλλου παρουσιάζεται στους πίνακες 19 ως 21.

4.1.4.1 1^ο πείραμα (στάδιο 3^ο φύλλου)

Το ύψος μετρήθηκε στις 38 ημέρες από τη σπορά. Πρώτος στην κατάταξη ήταν ο 141/GR-OP-12 (15.41cm) που διέφερε σημαντικά από το μάρτυρα και τους πληθυσμούς. Ο GCV ήταν ικανοποιητικός (10-15%) με τις σ^2g σε παρόμοια επίπεδα (0.37-5.95). Ο πληθυσμός 141/GR-OP-12 παρουσιάζει ενδιαφέρον όσον αφορά την αξιοποίηση του γενετικού του δυναμικού ($\sigma^2g=5.94$). Οι τιμές του συντελεστή κληρονομότητας κυμάνθηκαν ανάλογα με τον πληθυσμό σε χαμηλά μέτρια ή ακόμα και υψηλά επίπεδα (στον 141/GR-OP-12 πληθυσμό 0.78) και η γενική τιμή του ήταν 0.03.

Πίνακας 19.

Δεδομένα 1^ο πειράματος στο στάδιο του 3^ο φύλλου για το χαρακτηριστικό «ύψος υπέργειου τμήματος ως τον ανώτατο μίσχο» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	11.52	14.59	14.64	14.25	15.41	14.78	13.63
Εύρος	7.8-13.6	9.8-18.5	7-19.2	9.5-18.1	9.2-20.4	7-20.4	8.9-16.7
GCV%	5.28	10.94	12.92	10.46	15.82	13.14	
σ^2g	0.37	2.55	3.58	2.22	5.94	0.05	
σ^2p	2.06	4.24	5.27	3.91	7.63	1.74	
H	0.18	0.60	0.68	0.57	0.78	0.03	

CV=15.81%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{p_{\text{con}}}=1.69$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

4.1.4.2 2^ο πείραμα

4.1.4.2.1 1^η μέτρηση ύψους (στάδιο 3^ο φύλλου)

Η 1^η μέτρηση έγινε στις 37 ημέρες από τη σπορά. Ο μεγαλύτερος μέσος όρος εμφανίστηκε από τον 28/GR-OP-183 (8.19cm) αλλά ήταν χαμηλότερος του μάρτυρα (7.72cm) και χωρίς διαφορές από τους άλλους πληθυσμούς. Ο γενετικός συντελεστής

παραλλακτικότητας για όλους τους πληθυσμούς ήταν μεγάλος (21.2%). Η σ^2g φαίνεται να είναι μεγάλη σε 4 πληθυσμούς (2.8-3.25) και αντίστοιχα με μέτριους συντελεστές κληρονόμησης (0.38-0.44). Ο 163/GR-OP-85 πληθυσμός δεν εμφάνισε κάποιο ενδιαφέρον στοιχείο.

Πίνακας 20.

Δεδομένα 2^ο πειράματος στο στάδιο του 3^ο φύλλου για το χαρακτηριστικό «1^η μέτρηση ύψους υπέργειου τμήματος ως των ανώτατο μίσχο» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	5.93	7.98	7.50	8.19	8.04	7.90	7.72
Εύρος	2.5-9.5	3.1-12.7	2.5-14.0	3.0-14.0	1.7-13.7	1.7-14.0	2.5-12.0
GCV%	0.00	20.97	22.71	22.01	19.71	21.20	
σ^2g	0.00	2.80	2.90	3.25	2.51	0.00	
σ^2p	4.06	6.86	6.96	7.31	6.57	4.06	
H	0.00	0.41	0.42	0.44	0.38	0.00	

CV=33.15%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{con}=4.06$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

4.1.4.2.2 2^η μέτρηση ύψους (στάδιο 5^ο φύλλου)

Η δεύτερη μέτρηση έγινε στο στάδιο του 5^ο φύλλου, στις 62 ημέρες. Υπάρχουν 4 πληθυσμοί με μέσο όρο υψηλότερο (αλλά όχι διαφορετικό) της Constanza, με καλύτερο τον 141/GR-OP-12 (12.47cm) που όμως δεν διαφέρουν μεταξύ τους. Με GCV υψηλό (στο 14.39-23.63%), η γενετική παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών είναι μεγαλύτερη από τη γενική γενετική παραλλακτικότητα. Τη μεγαλύτερη σ^2g παρουσιάζει ο 102/GR-OP-84 (9,63) και τη μικρότερη ο 163/GR-OP-85 (21.32). Οι τιμές του συντελεστή κληρονόμησης ακολουθούν την ίδια πορεία, με μεγαλύτερο αυτόν του 102/GR-OP-84 (H=0.61) και μικρότερο του 163/GR-OP-85 (H=0.27). Ο συντελεστής κληρονόμησης για όλους τους πληθυσμούς είναι μηδενικός.

Συνολικά παρατηρήθηκαν χαμηλότεροι μέσοι όροι στο 2^ο πείραμα αν και διήρκεσε περισσότερο. Κατά πάσα πιθανότητα αυτό συνέβη λόγω της μη εφαρμογής λίπανσης στο πείραμα αυτό.

Οι διαφορές που παρατηρούνται και στα δύο πειράματα για το χαρακτηριστικό αυτό παρουσιάζονται σημαντικές εντός των πληθυσμών αλλά όχι και μεταξύ τους.

Ο 141/GR-OP-12 πληθυσμός δείχνει να υπερέχει, με τάση να ξεπερνά και το μάρτυρα, ενώ ο 28/GR-OP-183 δείχνει να έχει τη μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα.

Τέλος ο γενικός συντελεστής κληρονόμησης παρουσιάζεται από μικρός ως μέτριος ενώ ειδικότερα για κάθε πληθυσμό οι μεγαλύτερες τιμές του προέρχονται από τον 102/GR-OP-84 και τον 28/GR-OP-183.

Πίνακας 21.

Δεδομένα 2^{ου} πειράματος στο στάδιο του 5^{ου} φύλλου για το χαρακτηριστικό «2^η μέτρηση ύψους υπέργειου τμήματος ως των ανώτατο μίσχο» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	8.59	12.98	13.13	12.96	12.47	12.86	12.17
Εύρος	4.8-13.8	6.2-18.4	6.3-22.0	7.5-21.7	6.6-21.0	6.2-22.0	6.6-16.6
GCV%	17.73	14.39	23.63	18.61	14.81	18.25	
σ^2_g	2.32	3.49	9.63	5.82	3.41	0.00	
σ^2_p	8.54	9.71	15.85	12.04	9.63	6.22	
H	0.27	0.36	0.61	0.48	0.35	0.00	

CV=26.63%

H φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{p_{con}}=6.22$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

4.1.5 ΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΡΙΖΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η παρουσίαση των παραμέτρων του χαρακτηριστικού γίνεται στους πίνακες 22 ως 24.

4.1.5.1 1^ο πείραμα (στάδιο 3^{ου} φύλλου)

Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στο στάδιο του 3^{ου} μόνιμου φύλλου, στις 38 ημέρες. Την πρώτη θέση σύμφωνα με τον μέσο όρο καταλαμβάνει ο 163/GR-OP-85 (2.88nF) και διαφέρει από τους πληθυσμούς και τον μάρτυρα ο οποίος καταλαμβάνει την τελευταία θέση. Ο 163/GR-OP-85 είναι ο πληθυσμός που κατέχει και τη μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα (0.90) ενώ ακολουθεί ο 102/GR-OP-84 με $\sigma^2_g=0.82$. Ο GCV είναι μεγάλος (19.21 ως 35.51%) σε τρεις πληθυσμούς ενώ για τους δύο άλλους είναι μηδενικός. Ο γενικός γενετικός συντελεστής παραλλακτικότητας έχει τιμή 18.16%. Ο συντελεστής κληρονόμησης παρουσίασε ενδιαφέρον στους πληθυσμούς 163/GR-OP-85 (H=0.41), 102/GR-OP-84 (H=0.38) και 141/GR-OP-12 (0.14) ενώ για το σύνολο των πληθυσμών ήταν σχεδόν μηδενικός.

Πίνακας 22.

Δεδομένα 1^{ου} πειράματος στο στάδιο του 3^{ου} φύλλου για το χαρακτηριστικό «ηλεκτρική χωρητικότητα ριζικού συστήματος» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	2.88	2.03	2.55	1.95	2.30	2.23	1.77
Εύρος	0.7-6.3	0.3-5.5	0.8-6.3	0.6-5.2	0.3-8	0.3-8	0.5-8.2
GCV%	32.94	0.00	35.51	0.00	19.92	18.16	
σ^2_g	0.90	0.00	0.82	0.00	0.21	0.06	
σ^2_p	2.22	1.32	2.14	1.32	1.53	1.38	
H	0.41	0.00	0.38	0.00	0.14	0.04	

CV=54.69%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{p_{con}}=1.32$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

4.1.5.2 2^ο πείραμα

4.1.5.2.1 1^η μέτρηση (στάδιο 3^{ου} φύλλου)

Η μέτρηση έλαβε μέρος στις 37 ημέρες από τη σπορά (3^ο φύλλο). Ο πληθυσμός με το μεγαλύτερο μέσο όρο, ο 28/GR-OP-183 (1.65nF) είχε σημαντική διαφορά από τους πληθυσμούς και το υβρίδιο. Επίσης είχε και τη μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα (0.56). Ο 141/GR-OP-12 που στα άλλα χαρακτηριστικά κατείχε την πρώτη θέση, τώρα πέφτει στις τελευταίες (1.25nF) μαζί με το μάρτυρα (1.21nF). Ο γενικός GCV είναι μεγάλος (37.5%) ενώ η γενική γενετική παραλλακτικότητα ήταν σχεδόν μηδενική. Η μοναδική τιμή του γενετικού συντελεστή παραλλακτικότητας διάφορη του μηδενός, παρουσιάστηκε εντός του πληθυσμού 28/GR-OP-183 ο οποίος μάλιστα έχει πολύ υψηλή τιμή (45.35%) κάτι που υποδεικνύει υψηλή γενετική παραλλακτικότητα εντός του πληθυσμού αυτού. Η παραλλακτικότητα εντός φανερώνει πως υπάρχει αρκετό γενετικό δυναμικό στον πληθυσμό προς αξιοποίηση. Ο συντελεστής κληρονομής εμφανίζει μεγάλη διακύμανση ανάμεσα στους πληθυσμούς (από 0 ως 0.77 στον πληθυσμό 28/GR-OP-183) ενώ ο γενικός συντελεστής κληρονομής παρουσιάζεται μικρός (0.19).

Πίνακας 23.

Δεδομένα 2^{οο} πειράματος στο στάδιο του 3^{οο} φύλλου για το χαρακτηριστικό «1^η μέτρηση ηλεκτρικής χωρητικότητας ριζικού συστήματος» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	1.35	1.11	1.28	1.65	1.25	1.29	1.21
Εύρος	0.6-2.3	0.2-2.0	0.5-2.6	0.06-3.7	0.05-2.5	0.05-3.7	0.1-3.2
GCV%	0.00	0.00	0.00	45.35	0.00	37.50	
σ^2_g	0.00	0.00	0.00	0.56	0.00	0.04	
σ^2_p	0.17	0.17	0.17	0.73	0.17	0.21	
H	0.00	0.00	0.00	0.77	0.00	0.19	

CV=49.23%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{p_{con}}=0.17$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

4.1.5.2.2 2^η μέτρηση (στάδιο 5^{οο} φύλλου)

Η δεύτερη μέτρηση έγινε στο 5^ο φύλλο (62 ημέρες). Οι τιμές των μέσων όρων εμφανίζονται υψηλότερες όσο προχωρούμε προς μεγαλύτερο βλαστικό στάδιο. Ο πληθυσμός με την υψηλότερη θέση στην κατάταξη ήταν ο 30/GR-OP-165 (4.05nF), χωρίς να παρουσιάσει σημαντικές διαφορές σε σχέση με όλους τους γενοτύπους συμπεριλαμβανομένης και της Constanza. Ο γενετικός συντελεστής παραλλακτικότητας είναι υψηλός (32.10 ως 41.25%) με εξαίρεση τον GCV του πληθυσμού 28/GR-OP-183 που έχει μηδενική τιμή. Στο 32.4% βρίσκεται ο γενικός γενετικός συντελεστής παραλλακτικότητας. Μεγάλες τιμές γενετικής παραλλακτικότητας παρουσιάζουν ο 102/GR-OP-84 ($\sigma^2_g=1.99$), ενώ ο συντελεστής κληρονομής εμφανίζει αρκετά υψηλές τιμές εντός των πληθυσμών.

Πίνακας 24.

Δεδομένα 2^{οο} πειράματος στο στάδιο του 5^{οο} φύλλου για το χαρακτηριστικό «2^η μέτρηση ηλεκτρικής χωρητικότητας ριζικού συστήματος» που περιλαμβάνουν συνδυασμένη ανάλυση 4 πληθυσμών και ανάλυση κάθε πληθυσμού χωριστά.

	163/GR-OP-85	30/GR-OP-165	102/GR-OP-84	28/GR-OP-183	141/GR-OP-12	Μέσοι όροι παραμέτρων	Constanza
Μέσος όρος	3.37	4.05	3.42	2.91	3.41	3.49	3.60
Εύρος	1-8.1	1.3-9.5	0.7-12.6	0.9-5.9	0.8-13.2	0.7-13.2	1.1-9.8
GCV%	34.61	32.10	41.25	0.00	38.35	32.40	
σ^2_g	1.36	1.69	1.99	0.00	1.71	0.06	
σ^2_p	3.72	4.05	4.35	2.36	4.07	2.42	
H	0.37	0.42	0.46	0.00	0.42	0.02	

CV=54.64%

Η φαινοτυπική διακύμανση του υβριδίου $\sigma^2_{p_{con}}=2.36$ αποτελεί εκτίμηση του περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των παραμέτρων του πίνακα

Σε παρατηρήσεις δημοσιευμένων δεδομένων (Van Beem et al., 1998) φαίνεται ότι υβρίδια και πληθυσμοί δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές. Το συμπέρασμα που εξάγεται από τη μελέτη των πινάκων της παρούσας μελέτης που σχετίζονται με το

χαρακτηριστικό της ηλεκτρικής χωρητικότητας της ρίζας είναι ότι υπήρξαν πληθυσμοί που εμφάνισαν καλύτερους μέσους όρους από το μάρτυρα και μάλιστα σε σημαντικό βαθμό. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αυτό συνεπάγεται μεγαλύτερο όγκο ριζικού συστήματος κάτι που όμως που δεν είναι πάντα επιθυμητό αν αναλογιστούμε το μέγεθος του ριζικού συστήματος που θεωρείται άριστο. Η Constanza μέσα από τις διαδικασίες επιλογής στις οποίες έχει εκτεθεί προκειμένου να φτάσει σε υψηλές αποδόσεις, έχει διαμορφώσει καλύτερη σχέση βλαστού-ρίζας. Η αναλογία των δύο αυτών φυτικών μερών παίζει σημαντικό ρόλο σύμφωνα με τους Richner et al (1996) οι οποίοι αναφέρουν ότι μεγάλα ριζικά συστήματα καταναλώνουν τα φυτικά προϊόντα τα οποία ειδάλλως θα είχαν επενδυθεί σε φωτοσυνθετικά ενεργές φυλλικές επιφάνειες. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί σε περαιτέρω έρευνες σχετικά με τη σχέση υπέργειου-υπόγειου μέρους του φυτού και αναζήτηση της τέλει αναλογίας αυτού.

Οι τιμές που μετρήθηκαν σε σχέση με τους Van Beem et al ήταν πολύ μικρότερες λόγω διαφόρων παραγόντων (σύσταση νερού άρδευσης, μέσο ανάπτυξης των φυτών, μικρή ανάπτυξη των φυτών λόγω τεχνητού φωτισμού). Ειδικά το μέσο ανάπτυξης το οποίο ήταν έδαφος από το αγρόκτημα του πανεπιστημίου ίσως ήταν η αιτία εμφάνισης μεγάλου εύρους τιμών τόσο στους πληθυσμούς όσο και στο μάρτυρα.

Επίσης σε όλες τις μετρήσεις ο συντελεστής κληρονομικότητας για το χαρακτηριστικό αυτό παρουσιάζεται μηδενικός.

Τέλος φαίνεται ότι οι πληθυσμοί με τις μεγάλες γενετικές διακυμάνσεις παρουσιάζουν και μεγαλύτερους μέσους όρους ηλεκτρικής χωρητικότητας του ριζικού συστήματος.

4.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Η σύγκριση των χαρακτηριστικών (πίνακες 27-38) έδειξε μια σαφή συσχέτιση μεταξύ τους. Το μόνο χαρακτηριστικό το οποίο δεν φαίνεται να παρουσιάζει καμία συσχέτιση με τα υπόλοιπα είναι αυτό της φυτρωτικής ικανότητας (δεδομένα και διαγράμματα δεν φαίνονται).

Οι μετρήσεις που έγιναν στο πρώτο πείραμα αντιπροσώπευσαν ένα μόνο βλαστικό στάδιο (στο 3^ο φύλλο) και έγιναν μέσα σε λίγες ημέρες. Έτσι οι συσχετίσεις που παρουσιάστηκαν αναφέρονται στο στάδιο αυτό και είναι οι παρακάτω:

Όλες οι μετρήσεις SPAD είχαν μέτρια ως καλή συσχέτιση μεταξύ τους (r από 0.51 ως 0.73). Μικρή συσχέτιση υπήρξε μεταξύ SPAD και βάρους χλωρής βιομάζας (r από 0.22 ως 0.34) καθώς και με το ύψος (r από 0.25 ως 0.43). Το ύψος έχει μέτριο συντελεστή συσχέτισης με το βάρος ($r=0.56$). Η ηλεκτρική χωρητικότητα της ρίζας δεν φάνηκε να συσχετίζεται ικανοποιητικά με κάποιο άλλο χαρακτηριστικό.

Όσον αφορά κάθε πληθυσμό χωριστά και τις σχέσεις των χαρακτηριστικών στον πληθυσμό αυτό έχουμε να παρατηρήσουμε ότι στις περισσότερες σχέσεις, ο μεγαλύτερος συντελεστής συσχέτισης εμφανίζεται στον πληθυσμό 30/GR-OP-165. Η ηλεκτροχωρητικότητα του ριζικού συστήματος δεν σχετίζεται με κάποιο άλλο χαρακτηριστικό εκτός από το ύψος στον πληθυσμό 28/GR-OP-183 ($r=-0.37$).

Στο δεύτερο πείραμα οι μετρήσεις αντιπροσωπεύουν δύο βλαστικά στάδια: του 3^{ου} φύλλου και του 5^{ου} φύλλου.

Οι μετρήσεις SPAD συνδέονται μεταξύ τους με μέτριους ως μεγάλους συντελεστές συσχέτισης (0.33 ως 0.74). Οι υψηλότεροι αυτών συναντώνται μεταξύ μετρήσεων ημέρας-νύχτας του ίδιου βλαστικού σταδίου ενώ ελαφρώς μικρότεροι αφορούσαν τις μετρήσεις διαφορετικού σταδίου.

Η ηλεκτρική χωρητικότητα του ριζικού συστήματος δεν παρουσιάζει συσχέτιση με τα περισσότερα των χαρακτηριστικών. Υπάρχει μια μικρή τάση συσχέτισης με το βάρος (5^ο φύλλο) και τις δύο μετρήσεις του ύψους.

Το ύψος συσχετίζεται κάπως με τις μετρήσεις SPAD (της τάξεως του 0.20). Η 1^η μέτρηση ύψους συσχετίζεται ισχυρά με τη 2^η μέτρηση ύψους (συντελεστής συσχέτισης μεταξύ ύψους 1^{ης}-2^{ης} μέτρησης=0.77) καθώς και με το βάρος ($r=0.76$ και 0.85).

Τέλος το βάρος παρουσιάζει μικρή συσχέτιση της τάξεως του $r=0.22$ με όλες τις μετρήσεις SPAD.

Ειδικά για κάθε πληθυσμό φαίνεται ότι την καλύτερη συσχέτιση SPAD-βάρους παρουσιάζει ο 30/GR-OP-165. Υψηλή συσχέτιση της τάξεως του $r=0,75$ για τα χαρακτηριστικά βάρος και ύψος μοιράζονται οι: 30/GR-OP-165 και 163/GR-OP-85.

Γενικά για τις συσχετίσεις των χαρακτηριστικών μεταξύ τους μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα:

Οι μετρήσεις SPAD συσχετίζονται μεταξύ τους από μέτρια ως ισχυρά..

Το βάρος χλωρής βιομάζας συσχετίζεται μέτρια με τις μετρήσεις SPAD όλων των βλαστικών σταδίων και πολύ καλά με το ύψος υπέργειου τμήματος ως το μίσχο του ανώτατου φύλλου.

Το ύψος, επιπλέον, συσχετίζεται μέτρια με τις μετρήσεις SPAD σε όλα τα στάδια ανάπτυξης.

Η ηλεκτρική χωρητικότητα του ριζικού συστήματος δεν έδωσε αποτελέσματα όσον αφορά τις συσχετίσεις της με τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά και γι' αυτό δεν είναι δυνατή η εξαγωγή αποτελεσμάτων. Παρόλα αυτά φαίνεται πως τουλάχιστον για τα συγκεκριμένα στάδια τα οποία μελετήθηκαν δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του χαρακτηριστικού αυτού με τα υπόλοιπα εκτός από το ύψος με το οποίο εμφανίζει μικρούς συντελεστές συσχέτισης. Οι αρνητικές τιμές των συντελεστών συσχέτισης που παρατηρήθηκαν στο 1^ο πείραμα πιθανόν οφείλονται στην εφαρμογή λίπανσης που αύξησε την περιεκτικότητα ιόντων μέσα στο ριζικό σύστημα με αποτέλεσμα την επίδραση και στις μετρήσεις της ηλεκτροχωρητικότητας.

Παρατίθενται τα διαγράμματα με τους συντελεστές προσδιορισμού μεταξύ των χαρακτηριστικών.

4.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Από τους 20 εκκινητές παρήχθησαν συνολικά 206 ζώνες μοριακού βάρους 2000-400 bp περίπου, με μέσο όρο 10.3 ζώνες ανά εκκινητή. Από αυτές, οι 164 εξέφραζαν πολυμορφισμό (ποσοστό 79.6%) ενώ 42 (20.4%) ζώνες ήταν κοινές σε όλα τα δείγματα κάθε εκκινητή. Σε κάποιους εκκινητές δεν ενισχύθηκαν όλα τα δείγματα, αποτέλεσμα ίσως διαφορετικής συγκέντρωσης πρότυπου DNA από τη αναμενόμενη.

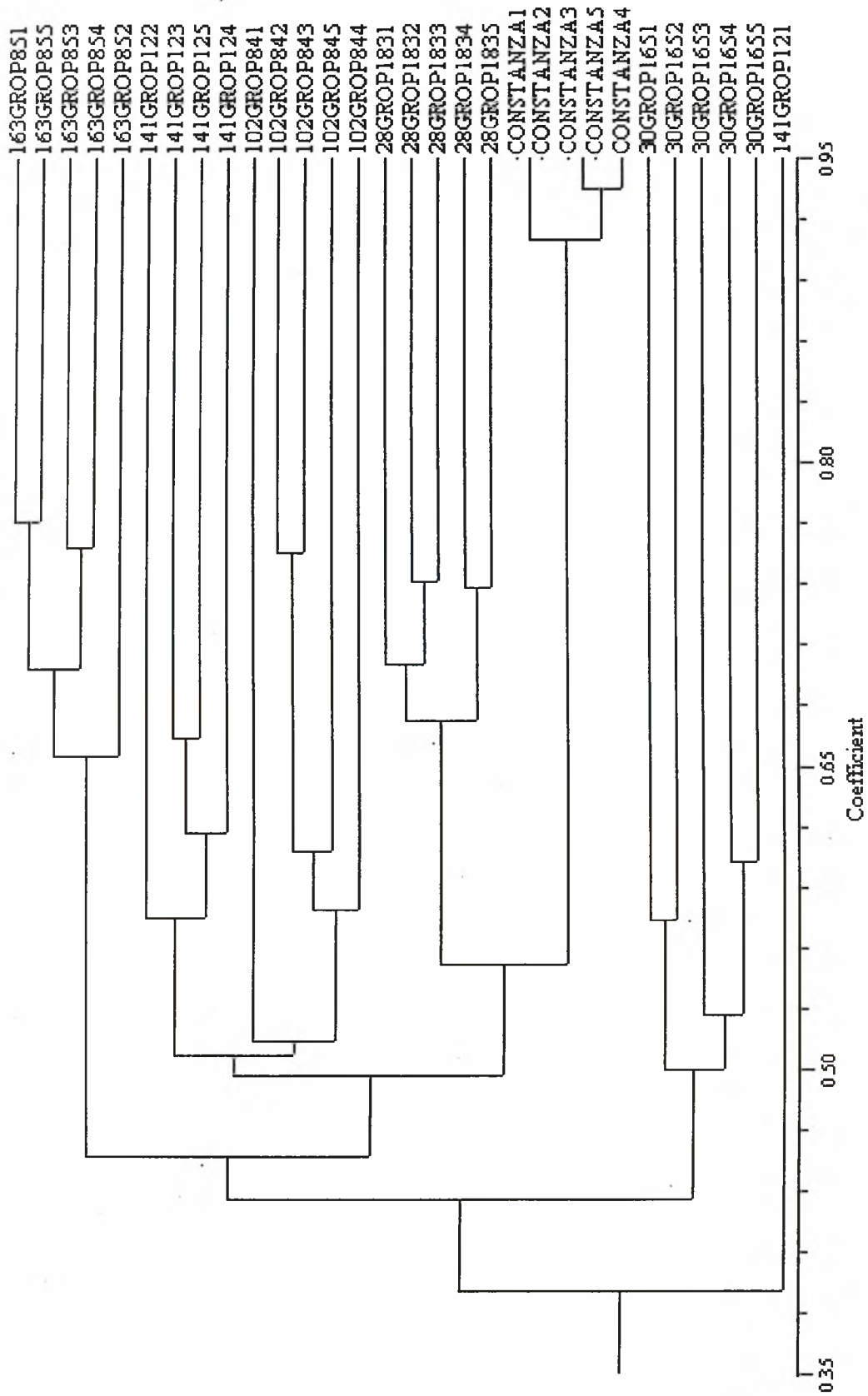
Κατά την ανάλυση των μοριακών πινάκων που παρήχθησαν διαμορφώθηκε το παρακάτω δενδρόγραμμα (1):

Κάθε πληθυσμός διαχωρίζεται σαφώς από τους υπολοίπους καθώς τα φυτά του ομαδοποιούνται με μόνη εξαίρεση ένα άτομο του πληθυσμού 141/GR-OP-12 το οποίο φαίνεται απομακρυσμένο από οποιονδήποτε από τους γενοτύπους που εξετάστηκαν.

Επίσης από τα δεδομένα φάνηκε μια ομαδοποίηση των πληθυσμών: ο 141/GR-OP-12 και ο 102/GR-OP-84 φαίνεται να έχουν μικρότερη γενετική απόσταση μεταξύ τους από ότι από τους άλλους γενοτύπους ενώ 4 ομαδοποιούνται σε μια γενικότερη κλάση (163/GR-OP-85, 141/GR-OP-12, 102/GR-OP-84, 28/GR-OP-183). Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα στις ελεγχόμενες συνθήκες φαίνεται ότι:

Από τις 18 μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε 5 συνολικά χαρακτηριστικά, οι δύο αυτοί πληθυσμοί διέφεραν σημαντικά σε 8 μετρήσεις. Συγκεκριμένα διέφεραν στο 1^ο πείραμα στην 1^η μέτρηση SPAD ημέρας-νύχτας, τη 2^η μέτρηση SPAD ημέρας και στο ύψος ενώ στο 2^ο πείραμα διέφεραν στους μέσους όρους της βλαστικής ικανότητας, της 1^{ης} και 2^{ης} μέτρησης SPAD ημέρας, καθώς και στη 2^η μέτρηση της ηλεκτρικής χωρητικότητας της ρίζας. Αυτό ίσως σημαίνει ότι πράγματι μοιράζονται κάποιο γενετικό υλικό σε μεγαλύτερο βαθμό από τους υπολοίπους.

Ο πληθυσμός που παρουσίασε γενετική εγγύτητα με το υβρίδιο ήταν ο 28/GR-OP-183 ενώ ο πιο απομακρυσμένος από όλους τους γενοτύπους ήταν ο 30/GR-OP-165. Οι πληθυσμοί με τη μεγαλύτερη ομοιομορφία εντός φαίνεται να είναι ο 28/GR-OP-183 και ο 163/GR-OP-85. Αξιοπερίεργο είναι το φαινόμενο μικρής αλλά υπαρκτής γενετικής παραλλακτικότητας στο υβρίδιο. Ως πιο πιθανό αίτιο προβάλλεται η αμφισβήτηση της αξιοπιστίας της μεθόδου των RAPDs, όμως υπάρχουν άλλες δύο πιθανότητες: είναι δυνατόν το υβρίδιο να μην προέρχεται από δύο καθαρές σειρές αλλά η μία ίσως να προήλθε από αδελφές σειρές ή να υφίσταται υπολειπόμενη ετεροζυγωτία (residual heterozygosity). Οι Sun et al (2001), συγκρίνοντας τη μέθοδο RAPD με



μικροδορυφόρους απέδειξαν ότι μπορεί να υπάρξει γενετική διακύμανση μεταξύ των ατόμων εμπορικών υβριδίων καλαμποκιού. Μάλιστα η γενετική παραλλακτικότητα που εμφανίστηκε με τη μέθοδο των μικροδορυφόρων ήταν μεγαλύτερη από αυτή των RAPDs.

Κατά τη δημιουργία του αντίστοιχου δενδρογράμματος με τους πληθυσμούς και το υβρίδιο ως σύνολα σχηματίστηκε το παρακάτω διάγραμμα (2):

Οι γενετικές ομοιότητες των γενοτύπων που μελετήθηκαν φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίν.36 γενετικές ομοιότητες των γενοτύπων όπως υπολογίστηκαν με τον αλγόριθμο του Nei (1979) (κάτω τριγωνική μήτρα) και τον αλγόριθμο του Jaccard (Sneath & Sokal, 1973) (άνω τριγωνική μήτρα)

ΓΕΝΟΤΥΠΟΙ	163/GR- OP-85	30/GR-OP- 165	141/GR- OP-12	102/GR- OP-84	28/GR- OP-183	Constanza
163/GR-OP- 85		0.4233	0.4620	0.4274	0.4566	0.4782
30/GR-OP- 165	0.5948		0.4469	0.4432	0.4595	0.3952
141/GR-OP- 12	0.6320	0.6177		0.5062	0.4861	0.4762
102/GR-OP- 84	0.5988	0.6142	0.6721		0.5048	0.4507
28/GR-OP- 183	0.6269	0.6296	0.6542	0.6709		0.5449
Constanza	0.6470	0.5665	0.6452	0.6213	0.7054	

Η γενετική ομοιότητα των γενοτύπων εμφανίζεται μεγαλύτερη όταν υπολογίζεται με τον αλγόριθμο των Nei & Li (1979) σε σχέση με την αντίστοιχη του Jaccard (Sneath & Sokal, 1973) λόγω του διαφορετικού τρόπου υπολογισμού αφού στον αλγόριθμο των Nei-Li το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων που είναι ταυτόχρονα παρόντα μεταξύ δύο τμημάτων διπλασιάζεται. Παρόλα αυτά η διαμόρφωση των δενδρογραμμάτων που κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο UPGMA από τις μήτρες γενετικής ομοιότητας είναι ταυτόσημη.

Έτσι κατά Nei-Li τη μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα παρουσιάζει ο πληθυσμός 28/GR-OP-183 με το Constanza (0.70) ενώ τη μικρότερη ο πληθυσμός 30/GR-OP-165 πάλι με το υβρίδιο (0.57).

Κατά Jaccard η μεγαλύτερη ομοιότητα εμφανίζεται μεταξύ 141/GR-OP-12 και 102/GR-OP-84 (0.506) ενώ η μικρότερη παρουσιάζεται ξανά από τον 30/GR-OP-165 με το υβρίδιο (0.395). Γενικά, δεν φαίνεται να υπάρχει μεγάλη διακύμανση όσον αφορά τις αποστάσεις μεταξύ των γενοτύπων ή μεγάλη γενετική ομοιότητα.

Ο Kulakow (1999) επεσήμανε ότι οι μοριακοί δείκτες θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας εντός και μεταξύ πληθυσμών. Η γνώση της γενετικής αυτής παραλλακτικότητας θα επέτρεπε στους βελτιωτές να επιλέξουν γονικούς πόρους που θα παρήγαγαν κατάλληλους πληθυσμούς προς επιλογή. Γνώση της κατανομής της ενδοειδικής παραλλακτικότητας θα επέτρεπε επίσης την ιδανική στρατηγική διατήρησης γενετικού υλικού με τη μελλοντική δειγματοληψία να επικεντρώνεται σε περιοχές μέγιστης παραλλακτικότητας. Με το πρόγραμμα Popgene32 εκτιμήθηκε η γονιδιακή παραλλακτικότητα του Νει για κάθε γενότυπο καθώς και το ποσό των πολυμορφικών θέσεων σε καθένα από αυτούς (Πίνακας 27).

Πίνακας 37.

ΓΕΝΟΤΥΠΟΙ	ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΩΝ ΘΕΣΕΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ % ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΩΝ ΘΕΣΕΩΝ
163/GR-OP-85	0.1224±0.1876	55	26.70
30/GR-OP-165	0.1896±0.2027	85	41.26
141/GR-OP-12	0.1957±0.2066	85	41.26
102/GR-OP-84	0.2046±0.2105	87	42.23
28/GR-OP-183	0.1604±0.2051	68	33.01
Constanza	0.0357±0.1139	16	7.77

Εξαιρώντας το υβρίδιο το οποίο ήταν αναμενόμενο να παρουσιάζει τους λιγότερους πολυμορφισμούς, ο πληθυσμός με τη μικρότερη παραλλακτικότητα ήταν ο 163/GR-OP-85, ο οποίος γενικά στα πειράματα ελεγχόμενων συνθηκών εμφάνισε τους χαμηλότερους μέσους όρους χαρακτηριστικών πρώτης ανάπτυξης. Ο πληθυσμός με τη μεγαλύτερη παραλλακτικότητα είναι ο 102/GR-OP-84, ένα γεγονός το οποίο επαληθεύεται από τα πειράματα.

Για την μοριακή ανάλυση μέσω της AMOVA (Πίνακες 38-39) χρησιμοποιήθηκαν δύο τρόποι εξαγωγής αποτελεσμάτων: όταν κατά την επεξεργασία λήφθηκε υπόψη και το υβρίδιο παρουσιάστηκε, μεταξύ των γενοτύπων, ένα ποσοστό γενετικής παραλλακτικότητας της τάξεως του 47,5% ενώ εντός των γενοτύπων εμφανίστηκε ένα 52.5%. Όταν η επεξεργασία έγινε με δεδομένα μόνο από τους πληθυσμούς και την παραλλακτικότητα του υβριδίου τη θεωρήσαμε σφάλμα της τεχνικής RAPD, η παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών αυξήθηκε στο 63.7% με ταυτόχρονη μείωση στη μεταξύ των πληθυσμών παραλλακτικότητα στο 36.3%. Η αύξηση της εντός των πληθυσμών παραλλακτικότητας ήταν αναμενόμενη αφού δεν υπήρχε ο συντελεστής-υβρίδιο ο οποίος λόγω εξαιρετικής ομοιομορφίας κατέβαζε πολύ το μέσο όρο. Γενικά

η παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών συμβαδίζει με το γεγονός ότι το καλαμπόκι είναι φυτό σταυρογονιμοποιούμενο και το γενετικό μας υλικό αποτελείται από πληθυσμούς. Βέβαια έχουν παρουσιαστεί άλλες εργασίες παρουσιάζουν αρκετά υψηλότερες τιμές παραλλακτικότητας εντός πληθυσμών για σταυρογονιμοποιούμενα είδη (84 % από τους Kaundun and Park,2002 για το εντομόφιλο τσάι), έτσι φαίνεται ότι το μειωμένο ποσοστό της εντός παραλλακτικότητας προκαλείται λόγω αρκετά μεγάλων διαφορών μεταξύ των πληθυσμών. Από τον πίνακα φαίνεται ότι και στις δύο περιπτώσεις είναι σημαντικές οι διαφορές μεταξύ των γενοτύπων.

Πίνακας 38. ΑΜΟΝΑ με 5 πληθυσμούς και την Constanza

ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	ΒΕ	ΜΕΣΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΑ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	% ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Μεταξύ πληθυσμών	5	195.9	6.42	47.47
Εντός πληθυσμών	24	170.4	7.10	52.53
Σύνολο	29	366.3	13.52	100
P-value=0.00000				

Πίνακας 39. ΑΜΟΝΑ με 5 πληθυσμούς

ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	ΒΕ	ΜΕΣΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΑ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	% ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Μεταξύ πληθυσμών	4	126.88	4.70	36.30
Εντός πληθυσμών	20	164.80	8.24	63.70
Σύνολο	24	291.68	12.94	100
P-value=0.00000				

5 ΓΕΝΙΚΕΥΜΕΝΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μέσω της αξιολόγησης των 5 ελληνικών παραδοσιακών πληθυσμών σε σχέση με το εμπορικό υβρίδιο Constanza βρέθηκε μια άξια περαιτέρω μελέτης γενετική παραλλακτικότητα που εκφράζεται μέσα από χαρακτηριστικά πρώτης βλαστικής ανάπτυξης και μοριακής ανάλυσης.

Συνοψίζοντας, όσον αφορά τα πειράματα στο θάλαμο ανάπτυξης, παρατηρήθηκε μια αξιοσημείωτη συμπεριφορά δύο τουλάχιστον πληθυσμών που φαίνεται να επαληθεύεται και από τις μοριακές μεθόδους. Ο πληθυσμός με τους περισσότερους καλύτερους μέσους όρους αγρονομικών χαρακτηριστικών ήταν ο 141/GR-OP-12. Πολλές φορές σε καλύτερη θέση ακόμα και από το υβρίδιο, εμφανίζεται αρκετά απομακρυσμένος από αυτό στο δενδρόγραμμα και με υψηλή γενετική παραλλακτικότητα. Όλες αυτές οι ιδιότητες σκιαγραφούν μια αξιολογητή πηγή νέου γενετικού υλικού με δυνατότητες επιλογής.

Στον αντίποδα, ο πληθυσμός 163/GR-OP-85 μοιράζεται τους μικρότερους μέσους όρους με τον 28/GR-OP-183. Ειδικά στο χαρακτηριστικό της ηλεκτρικής χωρητικότητας του ριζικού συστήματος οι μικρότεροι μέσοι όροι προέρχονται από τον 28/GR-OP-183. Οι θέσεις των πληθυσμών αυτών στη μοριακή ανάλυση φανερώνουν μικρή γενετική παραλλακτικότητα και παρόλη την ένταξή τους σε ομάδα δενδρογράμματος, είναι αρκετά απομονωμένοι από τους άλλους γενοτύπους.

Τέλος εξάγονται κάποια συμπεράσματα για τα παρατηρούμενα χαρακτηριστικά κατά τη διεξαγωγή των συμβατικών πειραμάτων που αφορούν τις μεταξύ τους σχέσεις:

Οι μετρήσεις SPAD συσχετίζονται σε οποιοδήποτε βλαστικό στάδιο.

Το βάρος χλωρής βιομάζας συσχετίζεται μέτρια με τις μετρήσεις SPAD και πολύ καλά με το ύψος υπέργειου τμήματος ως το μίσχο του ανώτατου φύλλου.

Το ύψος, επιπλέον, συσχετίζεται μέτρια με τις μετρήσεις SPAD σε οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης.

Η ηλεκτρική χωρητικότητα του ριζικού συστήματος δεν παρουσίασε κάποια συσχέτιση με τα υπόλοιπα εξεταζόμενα χαρακτηριστικά ενώ εμφάνισε δυσκολίες στην απόδοση του συντελεστή κληρονόμησης, γίνεται όμως φανερό ότι υπάρχει γενετική παραλλακτικότητα προς αξιοποίηση μέσα στους πληθυσμούς.

6 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τοπικοί πληθυσμοί καλαμποκιού πάντα παρουσίαζαν ενδιαφέρον ως πηγή γενετικής παραλλακτικότητας. 5 ελληνικοί τοπικοί πληθυσμοί καλαμποκιού αξιολογήθηκαν σε ελεγχόμενες συνθήκες θαλάμου στα πρώτα βλαστικά στάδια ως προς τα χαρακτηριστικά SPAD, βάρος χλωρής βιομάζας, ύψος κολεού ανώτατου φύλλου και ηλεκτρικής χωρητικότητας του ριζικού συστήματος και διαχωρίστηκαν με τη μοριακή μέθοδο των RAPDs και 20 εκκινητές.

Κατά την επεξεργασία των δεδομένων ο πληθυσμός 141/GR-OP-12 παρουσίασε αξιόλογους μέσους όρους όσον αφορά τα μελετώμενα χαρακτηριστικά, καθώς και αξιοποιήσιμη γενετική παραλλακτικότητα που επαληθεύτηκε από τη μοριακή προσέγγιση. Ο πληθυσμός 163/GR-OP-85 και ο πληθυσμός 28/GR-OP-183 μοιράζονται τους μικρότερους μέσους όρους και τη μικρότερη γενετική παραλλακτικότητα.

Τέλος βρέθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ:

- SPAD και βάρους χλωρής βιομάζας
- SPAD και ύψους ανώτατου κολεού
- βάρους και ύψους στα αρχικά στάδια

- Allard, R.W.1956. "Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity". *Hilgardia* 24:235-278.
- Arnheim, N., C. Strange, and H. Erlich.1985. "Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease: Studies of the HLA class II loci". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6970-6974.
- Arnold, M.L., C.M. Buckner, and J.J. Robinson.1991. "Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1398-1402.
- Balasubramanian, V., A.C. Morales, R.T. Cruz, and S. Abdulrachman.1999. "On-farm adaptation of knowledge-intensive nitrogen management technologies for rice systems". *Nutr. Cycling Agroecosyst.* 53:93-101.
- Batchelder, A.R., D.R. Bouldin.1972. "Technique for determining root elongation rates through soil layers of different physical and chemical properties". *Agron. J.* 64:49-52.
- Bauman, L. F. 1981. Review of methods used by breeders to develop superior corn inbreds. *Proc. Corn Sorghum Industry Res. Conf.* 36:199-208
- Blackmer, T.M., J.S. Schepers, and G.E. Vevel.1994. "Light reflectance compared with other nitrogen stress measurements in corn leaves". *Agron. J.* 86:934-939.
- Böhm, W.1979. "Methods of studying root systems". Eds Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
- Boppenmaier, J., A.E. Melchinger, E. Brunklaus-Jung, H.H. Geiger, and R.G. Hermann.1992. "Genetic diversity for RFLPs in European maize inbreds: I. relation to performance of flint x dent crosses for forage yield". *Crop Sci.* 32:895-902.
- Brown, W.L. 1983. Genetic diversity and genetic vulnerability: An appraisal. *Econ. Bot.* 37:4-12
- Caetano-Anollés, G., B.J. Bassm, and P.M. Gresshoff.1991a. "High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers". *Bio/Technology* 9:553-557.
- Caetano-Anollés, G., B.J. Bassm, and P.M. Gresshoff.1991b. "DNA amplification fingerprinting: A strategy for genome analysis". *Plant Mol. Biol. Rptr.* 4:294-307.
- Carlson, J.E., L.K. Tulsieram, J.C. Glaubitz, V. Luk, C. Kauffeldt, and R. Rutledge. 1991. "Segregation of random amplified DNA markers in F₁ progeny of conifers" *Theor. Applied Genet.* 83: 194-200.
- Cassman, K.G., M.J. Kropff, J. Gaunt, and S. Peng.1993. "Nitrogen use efficiency of rice reconsidered: What are the key constraints". *Plant Soil* 156:359-362.
- Chaparro, J., P. Wilcox, D. Grattapaglia, D. O'Malley, S. McCord, R. Sederoff, L. McIntyre, and R. Whetten.1992. "Genetic mapping of pine using RAPD markers: Construction of a 191 marker map and development of half-sib genetic analysis. *Advances in gene technology: feeding the world in the 21st century*". Miami Winter Symp., Miami, Fla.2
- Chapmann, S.C., H.J. Barreto.1997. "Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth". *Agron. J.* 89:557-562.
- Chloupek, O.1972a. "The relationship between electrical capacitance and some other parameters of plant roots". *Biol. Plant.* 14:227-230.
- Chloupek, O.1972b. "Der Anteil der Wurzeln an der Ertragsbildung des Winterweizens bei verschiedener Düngung". *Z. Acker-Pflanzenbau* 136:164-169.
- Chloupek, O.1976a. "Die Bewertung und mit Rücksicht auf den Endertrag". *Biol. Plant.* 18:44-49.
- Chloupek, O.1976b. "The size of the root system of tetraploid red clover and its relation to the chemical composition of the herbage produced". *J. Br. Grassl. Soc.* 31:23-27.
- Chloupek, O.1977. "Evaluations of the size of a plant's root system using its electrical capacitance". *Plant Soil* 48:525-532.
- Committee. 1972. Genetic vulnerability of major crops. National Academy of Sciences, Wasington, D. C.
- Dalton, F.N.1995. "In situ root extent measurements by electrical capacitance methods". *Plant Soil* 173:157-165.
- Davis, R.G., W.C. Johnson.1970. "A growth sensor for sugarbeet roots". *Agron. J.* 62:837-838.
- Debner, T., F. Salamine, and C. Gebhardt.1990. "Phylogeny of wild and cultivated *Solanum* species based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs)". *Genetics* 79:360-368.
- Excoffier, L., R. Smouse, and J. Quattro.1992. "Analysis of molecular variance inferred for metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data". *Genetics* 131:944-952.
- Fleming, A.A., and J.H. Palmer.1975. "Variation in chlorophyll content in maize lines and hybrids". *Crop Sci.* 15:617-620.
- Follett, R.H., R.F. Follett, and A.D. Halvorson.1992. "Use of a chlorophyll meter to evaluate the nitrogen status of dryland winter wheat". *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 23(7 and 8):687-697.
- Geadelmann, J.L. 1984. Using exotic germplasm to improve northern corn. *Proc. Annu. Corn Sorghum Ind. Res. Conf.* 39:98-110
- Giovannoni, J.J., R.A. Wing, M.W. Ganai, and S.D. Tanksley.1991. "Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations". *Nucleic Acids Res.* 19:6553-6558.

- González-Candelas F., & C. Palacios. 1995. "Analyzing molecular data for studies of genetic diversity". Molecular genetic techniques for plant genetic resources (Report of an IPGRI Workshop -11 October 1995, Rome, Italy).
- Goodman, M.M., and W.L. Brown. 1988. "Races of corn". P. 33-79. In G.F. Sprague and J.W. Dudley (ed.). Corn and corn improvement. 3rd ed. Agron. Monogr. 18. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, Wisconsin.
- Gower, J.C. 1985. "Measures of similarity, dissimilarity, and distance" p.397-405. In. Kotz, S. and N.L. Johnson. Encyclopedia of statistical sciences. Vol.5. Wiley, New York.
- Grattapaglia, D., J. Chaparro, P. Wilcox, S. McCord, D. Werner, H. Amerson, S. McKeand, F. Bridgewater, R. Whetten, D. O'Malley, and R. Sederoff. "Mapping in woody plants with RAPD markers: Application to breeding in forestry and horticulture". Applications of RAPD technology to plant breeding, Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992 Minneapolis, Minnesota.
- Greef, J.M. 1994. "Productivity of maize (*Zea mays* L.) in relation to morphological physiological characteristics under varying amounts of nitrogen supply". J. Agron. Crop Sci. 172:317-326.
- Greenham, C.G., D.J. Cole. 1949. "Diagnosis of death in roots". Nature (London) 164:699.
- Hadrys, H., M. Balick, and B. Schierwater. 1992. "Applications of RAPD fingerprinting in molecular ecology". Mol. Ecol. (In press).
- Hallauer, A. R. 1990. Methods used in developing maize inbreds. Maydica 35:1-16
- Hallauer, A.R. 1978. Potential of exotic germplasm for maize improvement. p. 229-247. in D. B. Walden (ed.) Proc. Int. Maize Sym.: Breeding and Genetics. John Wiley and sons, New York
- Hallauer, A.R., and J.B. Miranda, Fo. 1988. Quantitative genetics in maize breeding. 2nd ed. Iowa State Univ. Press. Ames.
- Hedrick, P. 1992. "Shooting the RAPDs". Nature (London) 355:679-680.
- Holley, R.N. and M.M. Goodman. 1988. "Yield potential of tropical hybrid maize derivatives". Crop Sci. 28:213-218
- Hu, J. And C. F. Quiros. 1991. "Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers". Plant Cell Rpts 10:505-511.
- Hussain, F., K.F. Bronson, Y. Singh, B. Singh, and S. Peng. 2000. "Use of chlorophyll meter sufficiency indices for nitrogen management of irrigated rice in Asia". Agron. J. 92:875-879.
- Jackson, D.A., K.M. Somers, and H.H. Harvey. 1989. "Similarity coefficients: measures of co-occurrence and association or simply measures of occurrence?" Amer. Nat. 133:436-453.
- Jenkins, M. T. 1978. Maize breeding during the developments and early years of hybrid maize. P. 13-28 in D. B. Walden (ed.) Proc. Int. Maize Sym.: Breeding and Genetics. John Wiley and sons, New York
- Jondle, R.J. 1992. "Legal aspects of varietal protection using molecular markers". Applications of RAPD technology to plant breeding, Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992 Minneapolis, Minnesota.
- Johnson, W.C., R.G. Davis. 1971. "Growth patterns of irrigated sugarbeet roots and tops". Agron. J. 63:649-652.
- Kampe, K. 1929. "Studien über Bewurzelungsstärke und Wurzeindringungsvermögen verschiedener Kulturpflanzen". Wissenschaftl. Arch. Landwirtsch. Abt. A Pflanzenbau 2, 1-48.
- Karp A., and K.J. Edwards. 1995. "Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity". (Report of an IPGRI Workshop -11 October 1995, Rome, Italy).
- Καρακαζάς, Β., Χ. Γούλας και Μ. Πανάγου, 1998. Γενετικό δυναμικό τοπικών ποικιλιών σιταριού και καλαμποκιού και δυνατότητα αξιοποίησής σε προγράμματα βελτιώσεως. Γεωπονικά, Έκδοση Γεωπονικού Συλλόγου Μακεδονίας-Θράκης, Τεύχος 373, σελ. 11-15
- Kaundun S. S. and Y. G. Park. 2002. "Genetic Structure of Six Korean Tea Populations as Revealed by RAPD-PCR Markers". Crop Science 42:594-601
- Kendall, W.A., G.A. Pederson, and R.R. Hill. 1982. "Root size estimates of red clover and alfalfa on electrical capacitance and root diameter measurements". Grass Forage Sci. 37:253-256.
- Kesseli, R.V., I. Paran and R.W. Michelmore. 1992. "Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and the tagging of these regions with reliable PCR-based genetic markers". Applications of RAPD technology to plant breeding, Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992 Minneapolis, Minnesota.
- Kesseli, R.V., I. Paran and R.W. Michelmore. 1994. "Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (Lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers". Genetics 136:1435-1446.
- Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharska, and P. Zabel. 1991. "Isolation of molecular markers for tomato (*Lycopersicon esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD)". Theor. Applied Genet. 83: 108-114.
- Κορκόβελος Α., Χ. Γούλας, Μ. Βασιλάκης, και Α. Αγοραστός. 2000. "Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας δεικτών μικροδορυφορικού DNA ως προς την ικανότητα αποτύπωσης, αναγνώρισης και ταυτοποίησης γενοτύπων του γένους *ACTINIDIA*". Πρακτικά 8^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου «Προστασία και Βελτίωση

Φυτικών Γενετικών Πόρων: Απολογισμός-Προοπτικές στην Απαρχή του 21^{ου} Αιώνα» Άρτα, 23-25 Οκτωβρίου 2000, p:272-279.

- Korokbelos A.2003. "Η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη ως κριτήριο επιλογής στην βελτίωση πληθυσμών καλαμποκιού (*Zea mays* L.)". Διδακτορική Διατριβή.
- Kresovich, S., J.G.K. Williams, J.R. McFerson, E.J. Routman, and B.A. Schaal.1992. "Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via random amplified polymorphic DNA assay". *Theor. Applied Genet.* (In press).
- Kropff, M.J., K.G. Cassman, H.H. Vanlaar, and S. Peng.1993. "Nitrogen and yield potential of irrigated rice". *Plant Soil* 156:391-394.
- Krugh, B., L. Bickham, and D. Miles.1994. "The solid-state chlorophyll meter: A novel instrument for rapidly and accurately determining the chlorophyll concentrations in seedling leaves". *Maize Genet. Coop. Newsl.* 68:25-27.
- Kulakow, P.A. 1999. Variation in Illinois bundleflower (*Desmanthus illinoensis* (Michaux) MacMillan): A potential perennial grain legume. *Euphytica* 110:7-20
- Lafitte, H.R., and G.O. Edmeades.1994. "Improvement for tolerance to low soil nitrogen in tropical maize: I. Selection criteria". *Field Crops Res.* 39:1-14.
- Lark, K.G., J.Evans, F. Basha, R. Bogden, R. Copeland, R. Ellison, D. Horne, K. Lee, K. McDonald, J. Pierson, W. Schuster, P. Wilhelm, and Y. Yu.1992. "Molecular phylogeny as a genetic tool for soybean breeding". *Soybean Genet. Nwslt.* (In press).
- Lebreton, C., V. Lazic-Jancic, A. Steed, S. Pekic, and S.A. Quarrie.1995. "Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits". *J. Exp. Bot.* 46:853-865.
- Lee M., E.B. Godshalk, K.R. Lamkey, W.W. Woodman.1989. "Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses". *Crop Sci.* 29:1067-1071.
- Leinhos, V., and H. Bergmann.1995. "Influence of auxin producing rhizobacteria on root morphology and nutrient accumulation of crops:II. Root growth promotion and nutrient accumulation of maize (*Zea mays* L.) by inoculation with indole-3-acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* strains and by exogenously applied IAA under different water supply condition". *Angew. Bot.* 69:37-41.
- Lynch, M., and B.G. Milligan.1994. "Analysis of population genetic structure with RAPD markers". *Mol Ecol* 3:91-99.
- Malvar, R. A., A. Ordas, P. Revilla and M. E. Carrea. 1996. Estimates of genetic variances in two Spanish populations of maize. *Crop Sci.* 36:291-295
- Marek, J. H. And C. O. Gardner. 1979. Response to mass selection in maize and stability of resulting populations. *Crop Sci.* 19:779-783
- Martin, G.B., J.G.K. Williams, and S.D. Tanksley.1991. "Rapid identification of markers linked to *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random amplified primers and near isogenic lines". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2336-2340.
- Melchinger, A.E., M. Lee, K.R. Lamkey, A.R. Hallauer, and W.L. Woodman.1990. "Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms and heterosis for two diallel sets of maize inbreds". *Theor. Applied Genet.* 80:488-496.
- Michelmore, R.W., I. Paran, and R.V. Kesseli.1991. "Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9828-9832.
- Montgomery, E.G.1916. "The corn crops". Macmillan, New York.
- Mochow, R.C., and T.R. Sinclair.1995. "Effect of nitrogen supply on maize yield: II. Field and model analysis". *Agron. J.* 87:642-648.
- Moll, R.H., J.H. Lonnquist, J.V. Fortuna, and C.E. Johnson.1965. "The relationship of heterosis and genetic divergence in maize". *Genetics* 52:283-292.
- Muchow, R.G.1988. "Effect of nitrogen supply on the comparative productivity of maize and sorghum in a semi-arid tropical environment: I. Leaf growth and leaf nitrogen". *Field Crops Res.* 18:1-16.
- Muchow, R.C., and R. Davis.1988. "Effect of nitrogen supply on the comparative productivity of maize and sorghum in a semi-arid tropical environment: II. Radiation interception and biomass accumulation". *Field Crops Res.* 18:17-30.
- Nei, M.1972. "Genetic distance between populations". *Amer. Nat.* 106:283-292.
- Nei, M. And W. Li.1979. "Mathematical models for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5256-73.
- Nienhuis, J., M.K. Slocum, D.A. De Vos, and R. Muren.1993. "Genetic similarity among *Brassica oleracea* genotypes as measured by restriction fragment length polymorphisms". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* (In press).

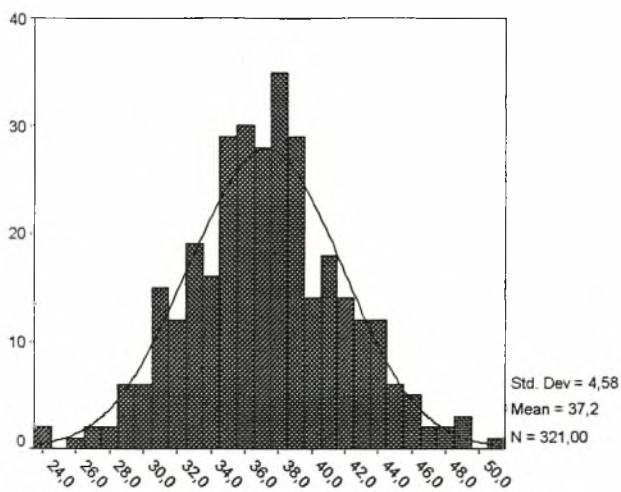
- O'Regan, B.P., W.A. Cress, and J. Van Staden.1993. "Root growth, water relations, abscisic acid, and proline levels of drought-resistant and drought-sensitive maize cultivars in response to water stress". *S. Afr. J. Bot.* 59:98-104.
- Paran, I., R. Kesseli, and R. Michelmore.1991. "Identification of restriction-fragment-length-polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines". *Genome* 34:1021-1027.
- Parks, C., L.S. Chang, and T. Shenk.1991. "A polymerase chain reaction mediated by a single primer: Cloning of genomic sequences adjacent to a serotonin receptor protein coding region". *Nucleic Acids Res.* 19: 7155-7160.
- Peng, S., F.V. Garcia, R.C. Laza, and K.G. Cassman.1993. "Adjustment for specific leaf weight improves chlorophyll meter's estimate of rice leaf nitrogen content". *Agron. J.* 85:987-990.
- Perez-Velasquez, N. Cebbalos, S. Pandey, and C. Diaz-Amaris.1995. "Analysis of diallel crosses among Columbian landraces and improved populations of maize". *Crop Sci.* 35:572-578.
- Peterson, T.A., T.M. Blackmer, D.D. Francis, and J.S. Schepers.1993. "Using a chlorophyll meter to improve N management". Nebguide G93-117A. Coop. Ext. Serv., Univ. of Nebraska, Lincoln.
- Pfarr, D.G., and K.R. Lamkey.1992. "Comparison of methods for identifying populations for genetic improvement of maize hybrids". *Crop Sci.* 32:670-677.
- Reidell, W.E., and P.D. Evenson.1993. "Rootworm feeding tolerance in single-cross maize hybrids from different eras". *Crop Sci.* 33:951-955.
- Reiter, R.S., J. Williams, K.A. Feldmann, J.A. Rafalski, S.V. Tingey, and P.A. Scolnik.1992. "Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1477-1481.
- Richner, W., A. Soldati and P. Stamp. "Shoot-to-Root relations in field-grown maize seedlings".1996. *Agronomy Journal* 88:56-61.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1. Exeter Software, Setauket, NY.
- Rogers, J.S.1972. "Measures in genetic similarity and genetic distance". *Studies in Genetics VII.* University of Texas Publ. 7213:145-153.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich.1988. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science*, January 1988, V 239:487-491.
- Schneider S., D. Roessli, and L. Excoffier.2000. Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Σέμος, Α.Β., Φ.Ι. Καρυπίδης.2000. "Η συμβολή της τεχνολογίας στη μείωση του κόστους παραγωγής στη γεωργία: Η περίπτωση του ελληνικού αραβοσίτου". *Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα*, Τόμος 11, τεύχος 2/2000:176-183.
- Σφήκας Α.Γ. *Ειδική Γεωργία: Ι. Σιτηρά, Ψυχανθή και Χορτοδοτικά φυτά*. Θεσσαλονίκη, 1991.
- Sinclair, T.R., R.C. Mochow.1995. "Effect of nitrogen supply on maize yield: I. Modeling physiological responses". *Agron. J.* 87:632-641.
- Singh, B., Y. Singh, J.K. Ladha, K.F. Bronson, V. Balasubramanian, J. Singh, and C.S. Khind.2002. "Chlorophyll-meter-and leaf color chart-based Nitrogen management for rice and wheat in Northwestern India". *Agronomy Journal* 94 4:821-829.
- Skroch P., J. Tivang, and J. Nienhuis.1992. "Analysis of genetic relationships using RAPD marker data". Applications of RAPD technology to plant breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992 Minneapolis, Minnesota.
- Smith, P.E., and A.H.Millet.1964. "Germinating and sprouting responses of the tomato at low temperatures". *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 84:480-484.
- Smith O.S., J.S.C. Smith, S.L. Bowen, R.A. Tenborg, and S.J. Wall.1990. "Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree F₁ grain yield, grain yield, heterosis, and RFLPs". *Theor. Applied Genet.* 80:833-840.
- Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal.1973. "Numerical taxonomy". W. H. Freeman and Company.
- Stiles J.I., C. Lemme, S. Sondur, M.B. Morshidi, and R. Manshardt.1992. "Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships: Analysis of the relationship among 'Solo' and other papaya cultivars". *Theor. Applied Genet.* (In press).
- Stuber, C.W. 1978. Exotic sources for broadening genetic diversity in corn breeding programs. *Proc. Annu. Corn Sorghum Ind. Res. Conf.* 33:34-47
- Sun G.L., M. William, J. Liu, K.J. Kasha, and K.P.Pauls.2001. "Microsatellite and RAPD polymorphisms in Ontario corn hybrids are related to the commercial sources and maturity ratings". *Molecular Breeding.* 7 (1):13-24.

- Thormann C.E., and T.C. Osborn.1992. "Use of RAPD and RFLP markers for germplasm evaluation". Applications of RAPD technology to plant breeding, Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992 Minneapolis, Minnesota.
- Tingey, S.V., A.J. Rafalski, J.G.K. Williams.1992. "Genetic analysis with RAPD markers" Applications of RAPD technology to plant breeding, Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992 Minneapolis, Minnesota.
- Tivang, J., O.S. Smith, and J. Niehuis.1992. "Sampling variance of molecular marker data using the bootstrap". Theor. Applied Genet. (Submitted).
- Troyer, A. F. 1999. "Background of U.S. Hybrid Corn". *Crop Sci.* 39: 601-625
- Uelger, A.C., G. Kahnt, and H.C. Becker.1987. "Root characteristics of maize inbred lines and single crosses in controlled environments and in field trials". *J. Agron. Crop Sci.* 158:333-339.
- Van Beem, J., M. E. Smith, R. W. Zobel. 1998. "Estimating root mass in maize using a portable capacitance meter". *Agronomy Journal*, 90:566-670.
- Vales, M.I., R.A. Malvar, P. Revilla, and A. Ordás.2001. "Recurrent selection for grain yield in two Spanish maize synthetic populations". *Crop Sci.* 41:15-19.
- Weedeln N.F., G.M. Timmerman, M. Hemmat, B.E. Kneen, and M.A. Lodhi.1992. "Inheritance and reliability of RAPD markers". Applications of RAPD technology to plant breeding, Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992 Minneapolis, Minnesota.
- Weerathaworn, P., A. Soldati, and P. Stamp.1992. "Seedling root development of tropical maize cultivars at low water supply". *Angew. Bot.* 66:93-96.
- Welsh, J., C. Petersen, and M. McClelland.1991. "Polymorphisms generated by arbitrary primed PCR in the mouse: Applications to strain identification and genetic mapping". *Nucleic Acids Res.* 19:303-306.
- Wilde, J., R. Waugh, and W. Powell.1992. "Genetic fingerprinting of Theobroma clones using randomly amplified polymorphic DNA markers". *Theor. Applied Genet.* 83:871-877.
- Williams, J.G.K., J.A. Rafalski, and S.V. Tingey.1992. "Genetic analysis using RAPD markers". *Methods Enzymol.* (In press).
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey.1990. "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers". *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Wöstemeyer, J., C. Schäfer, M. Kellner, and M. Weisfeld.1991. "DNA polymorphisms detected by random primer dependent PCR as a powerful tool for molecular diagnostics of plant pathogenic fungi". *Advances in molecular genetics.* Hüthig-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Yeh, F.C., and T.J.B. Boyle. 1997. Population genetic analysis of co-dominant markers and qualitative traits. *Belgian J. Bot.* 129:157.
- Young, N.D. and S.D. Tanksley.1989. "RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding". *Theor. Applied Genet.* 77:353-359.

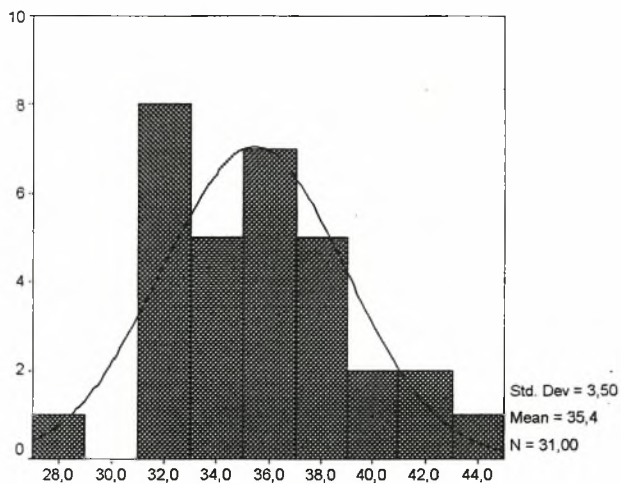
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1^ο ΠΕΙΡΑΜΑ

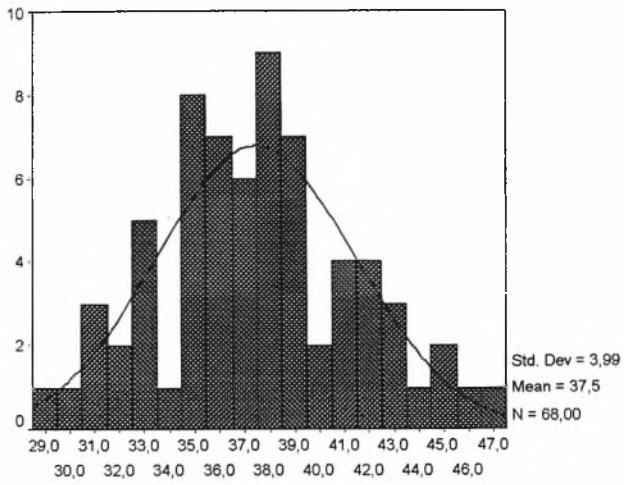
- (1st pop= πληθυσμός 163/GR-OP-85)
- (2nd pop= πληθυσμός 30/GR-OP-165)
- (3rd pop= πληθυσμός 102/GR-OP-84)
- (4th pop= πληθυσμός 28/GR-OP-183)
- (5th pop= πληθυσμός 141/GR-OP-12)



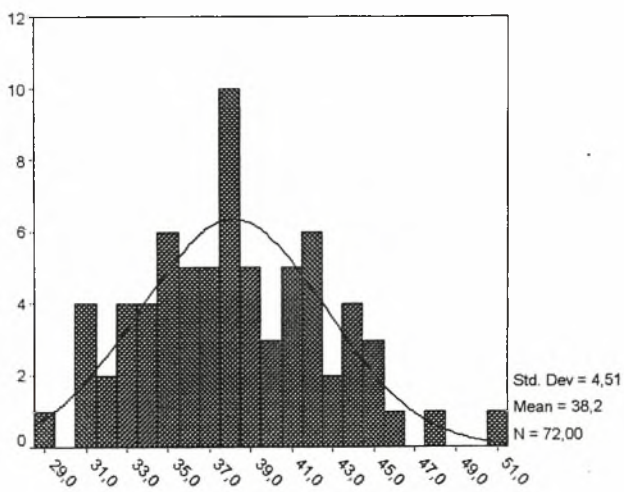
1spad day



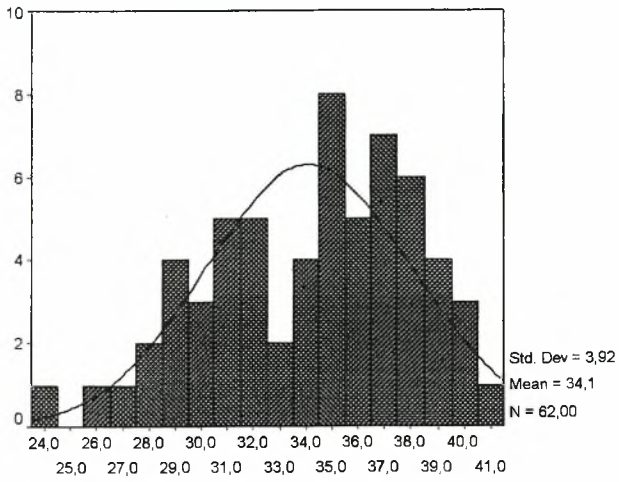
1st pop/1spad day



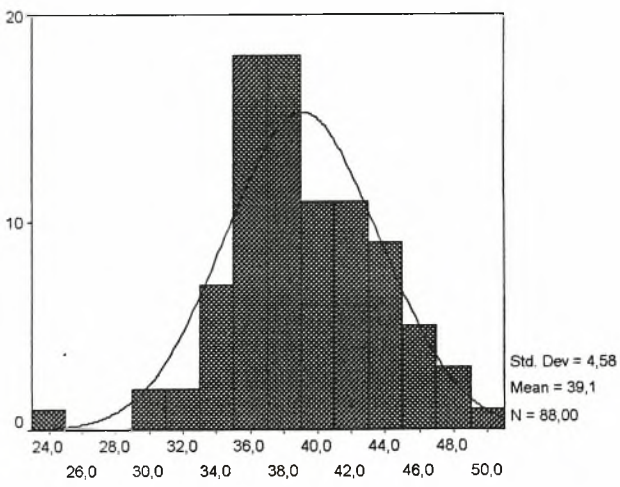
2nd pop/1spad day



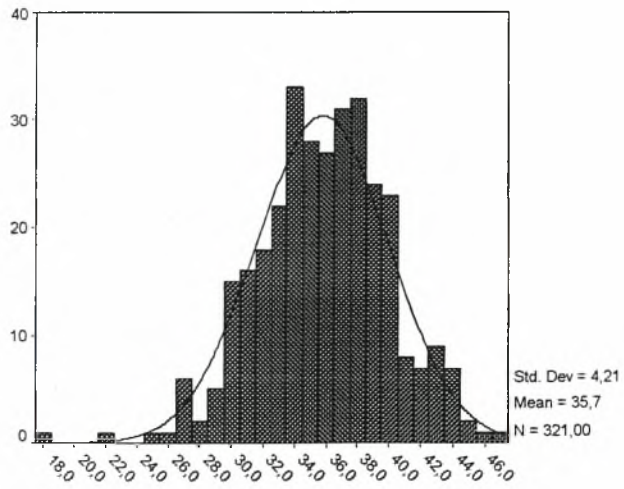
3rd pop/1spad day



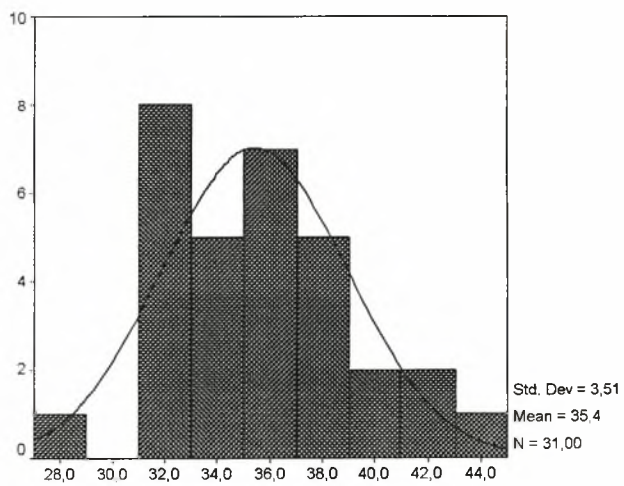
4th pop/1spad day



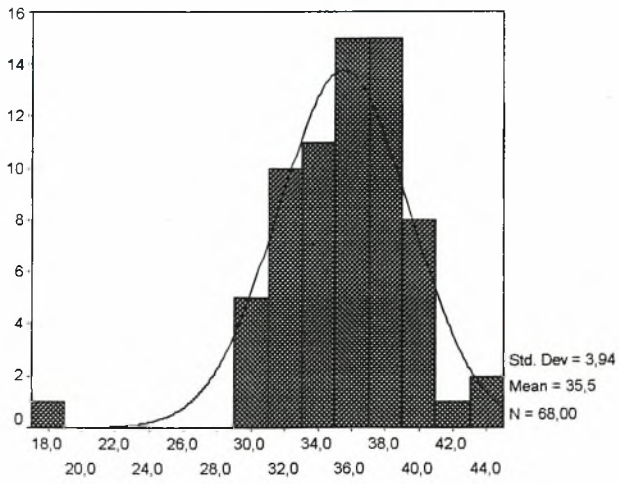
5th pop/1spad day



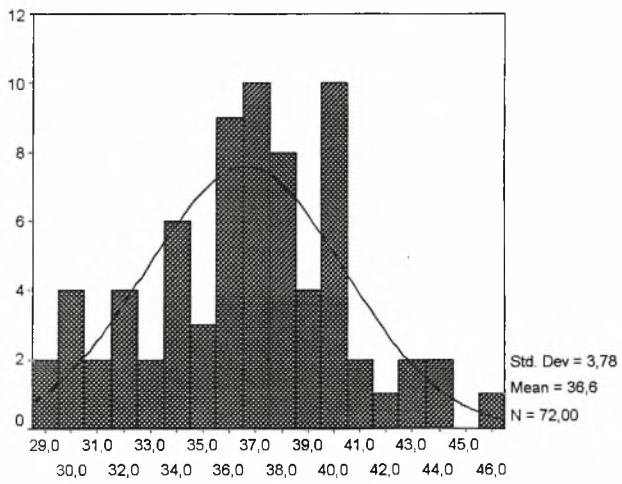
1spad night



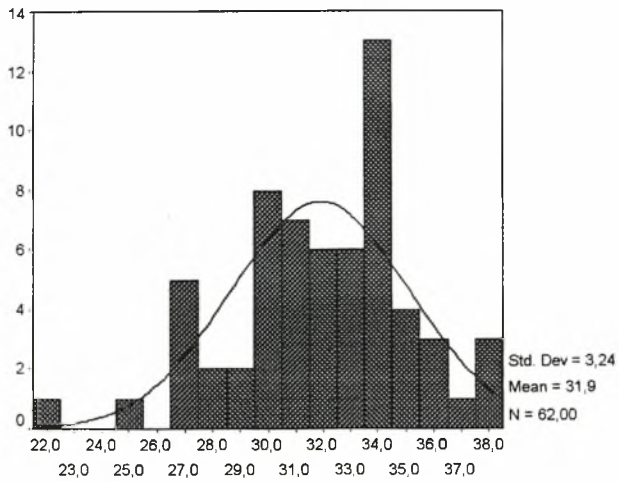
1st pop/1spad night



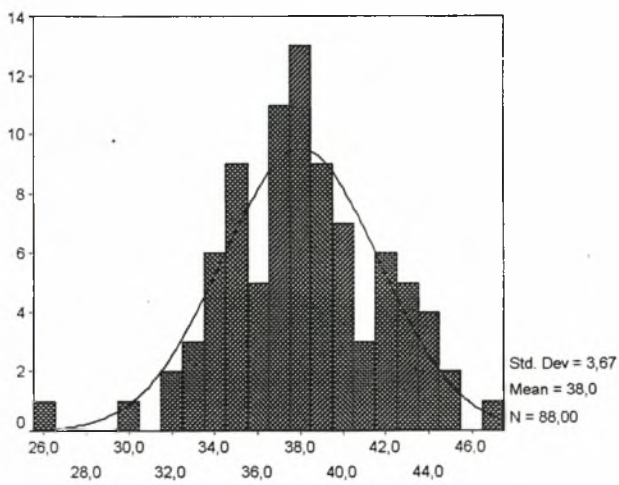
2nd pop/1spad night



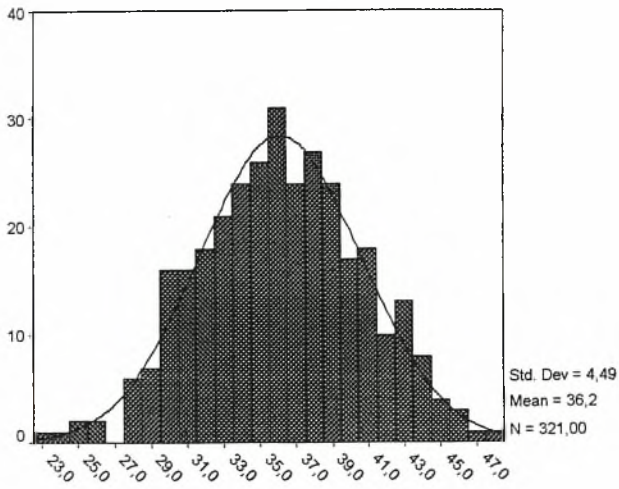
3rd pop/1spad night



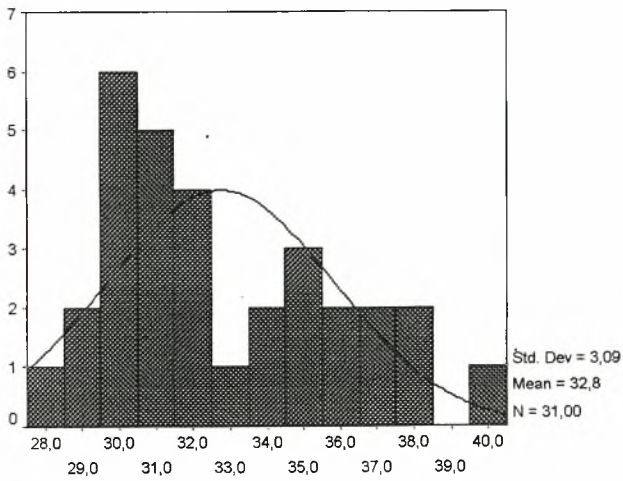
4th pop/1spad night



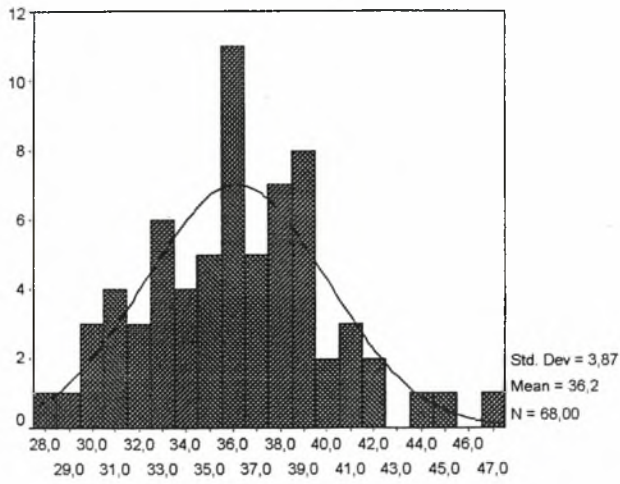
5th pop/1spad night



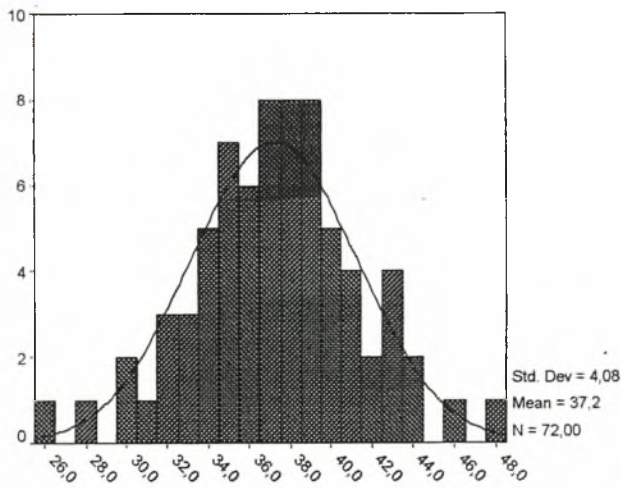
2spad day



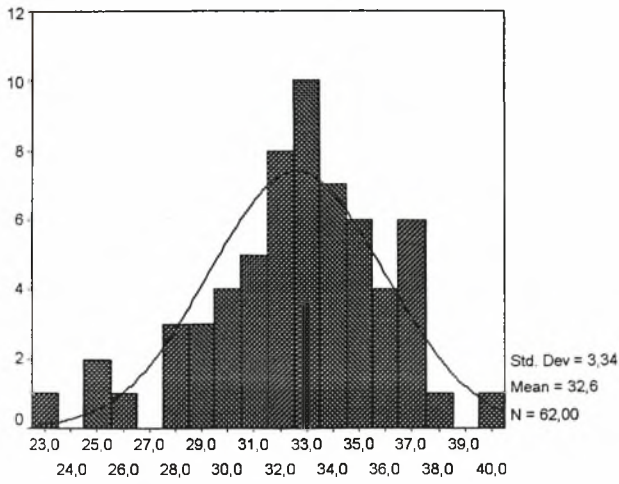
1st pop/2spad day



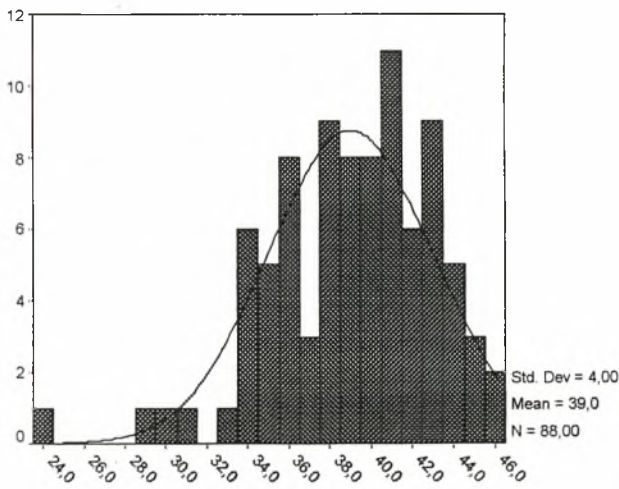
2nd pop/2spad day



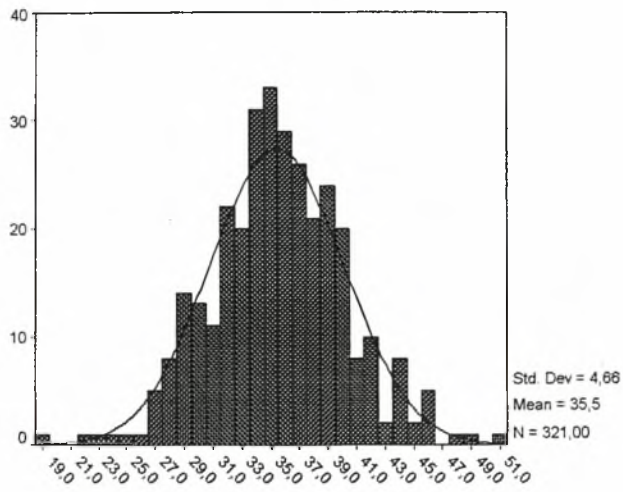
3rd pop/2spad day



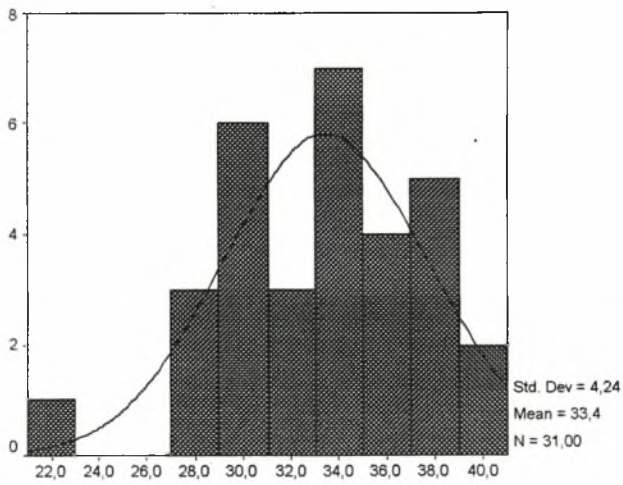
4th pop/2spad day



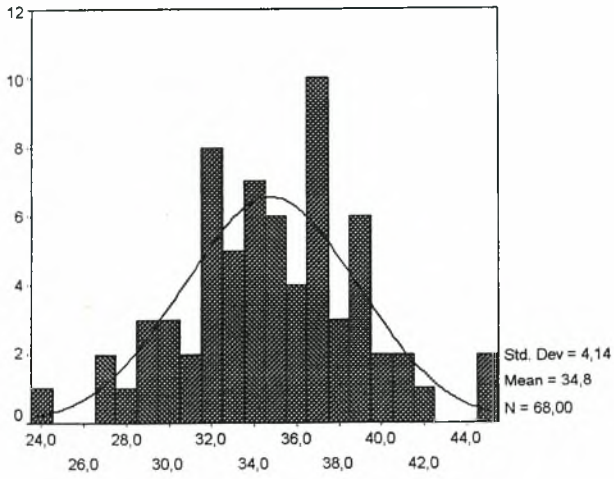
5th pop/2spad day



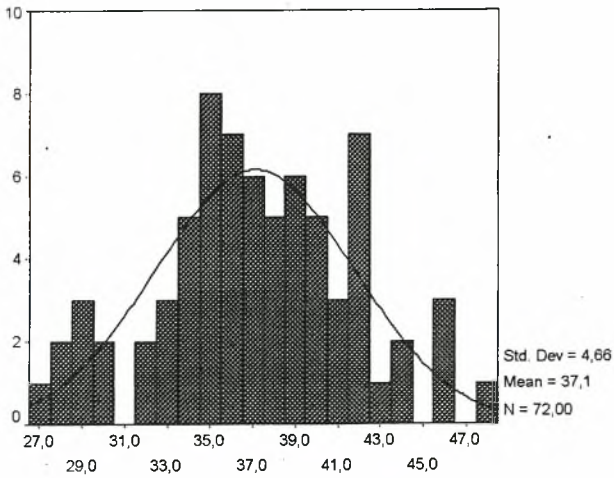
2spad night



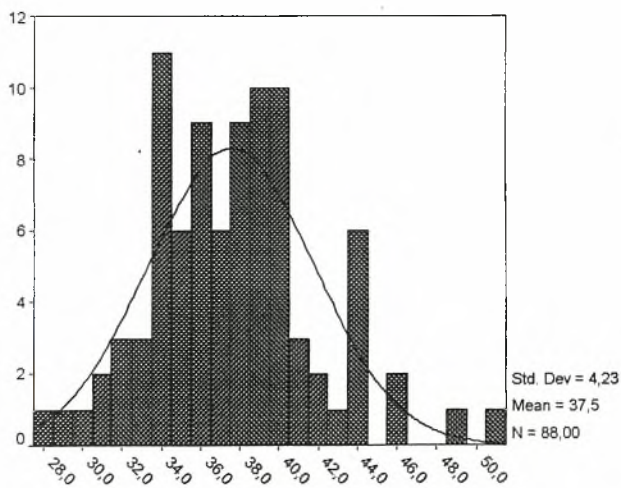
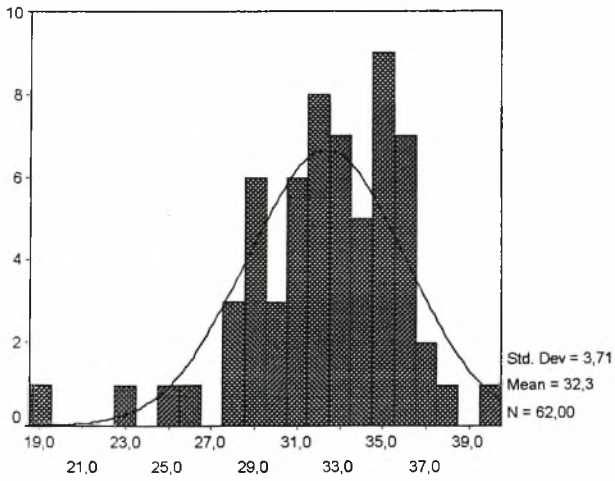
1st pop/2spad night

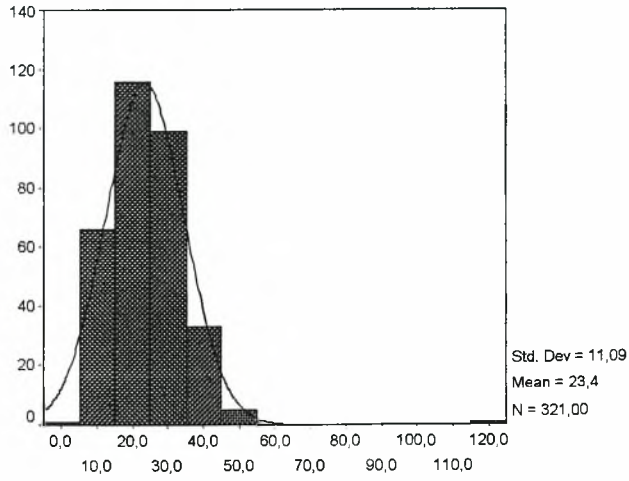


2nd pop/2spad night

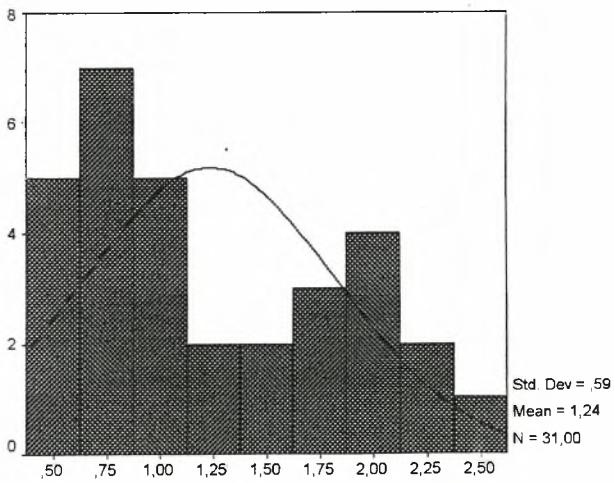


3rd pop/2spad night

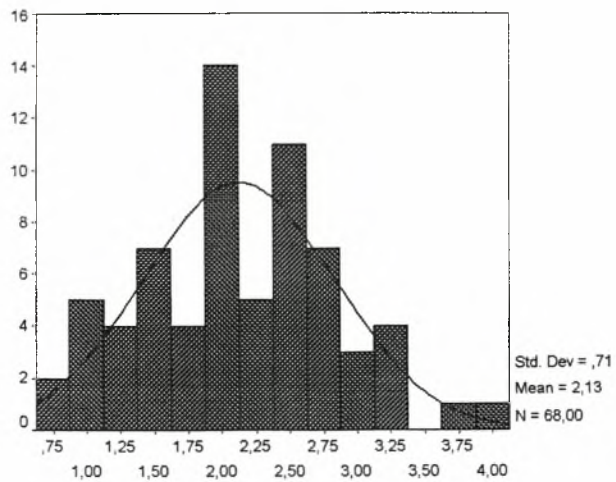




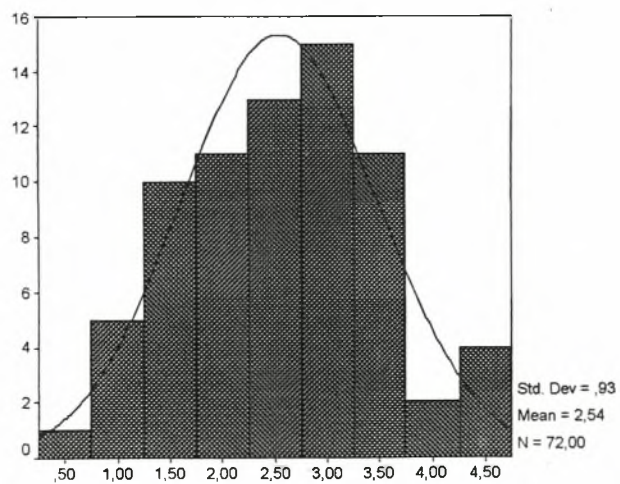
WEIGHT



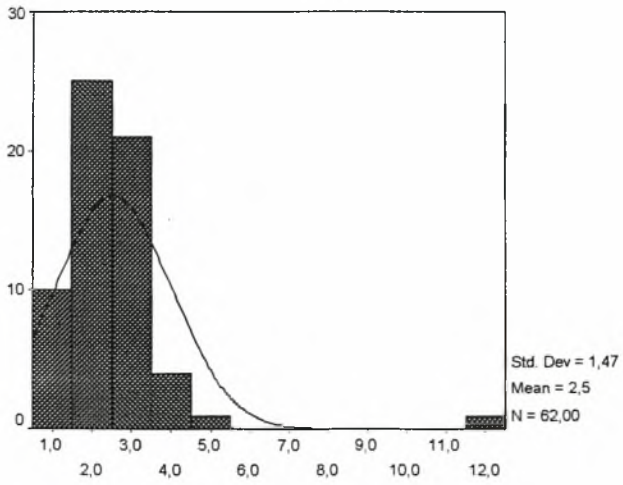
1st pop/weight



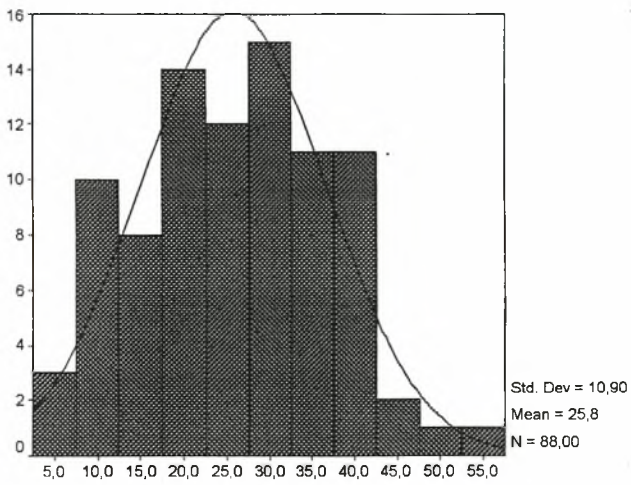
2nd pop/weight



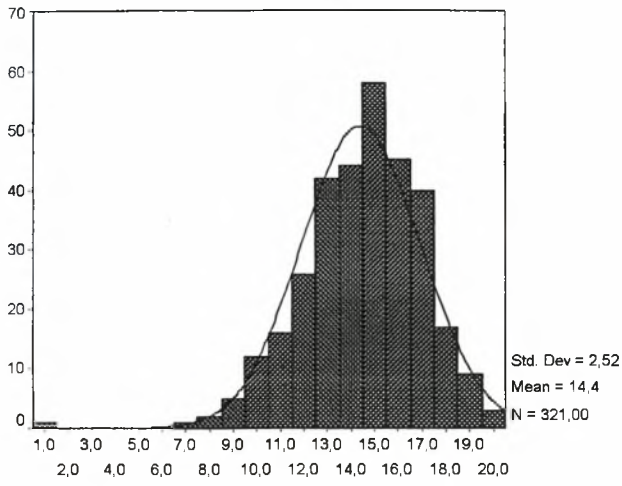
3rd pop/weight



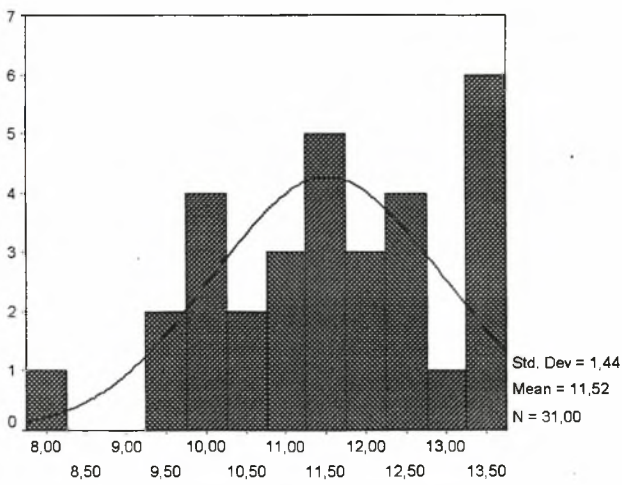
4th pop/weight



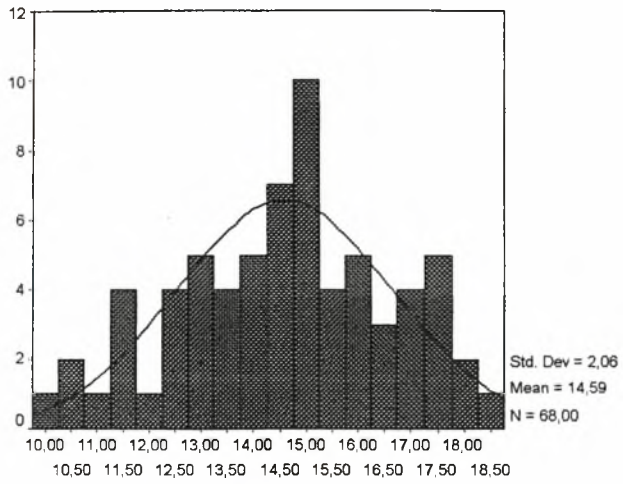
5th pop/weight



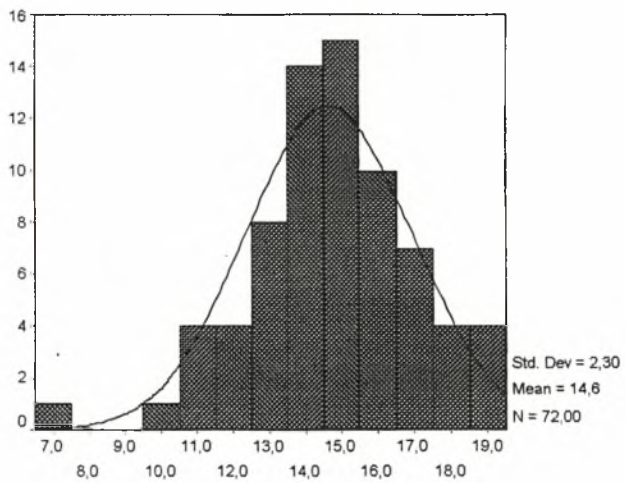
HEIGHT



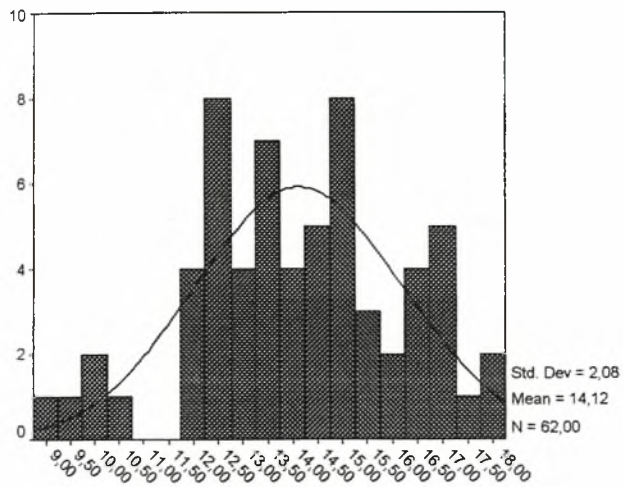
1st pop/height



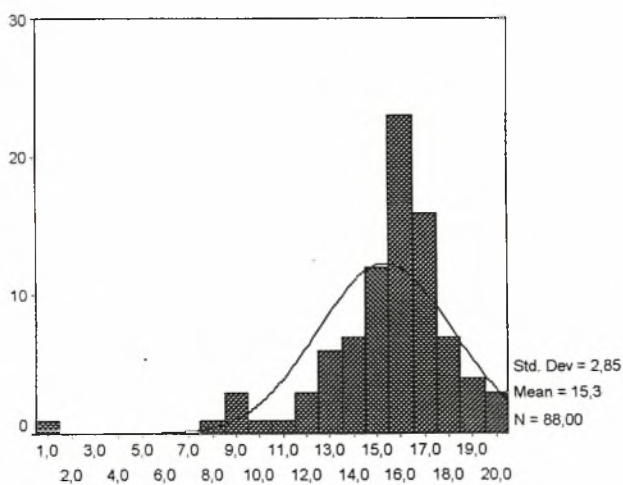
2nd pop/height



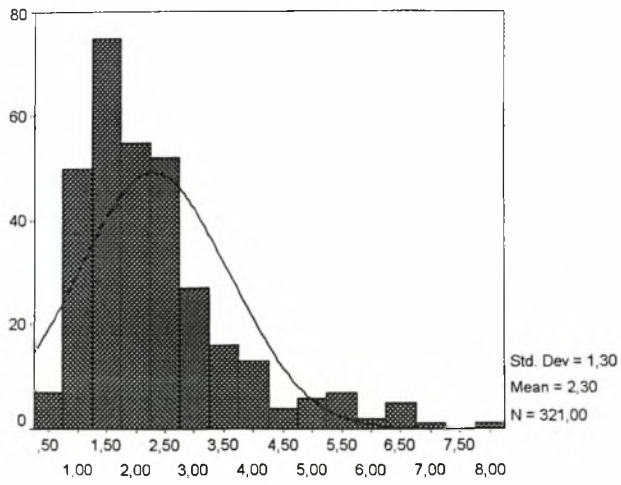
3rd pop/height



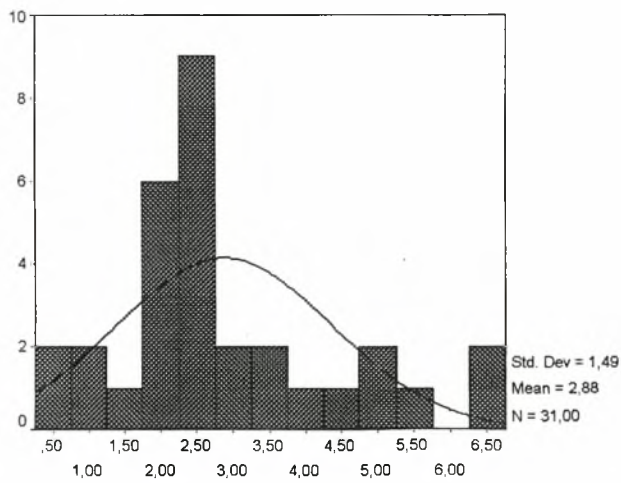
4th pop/height



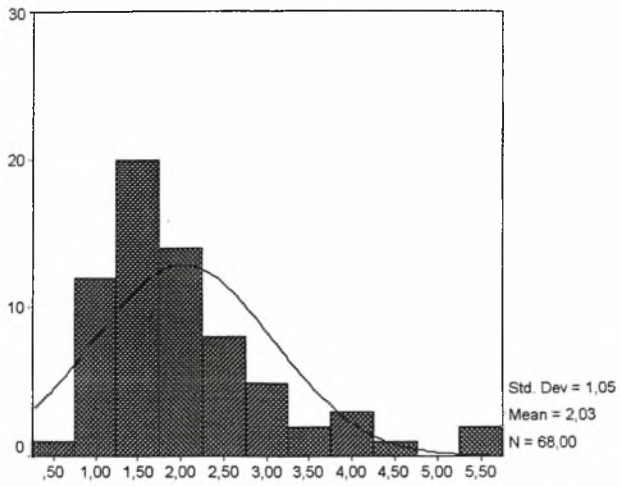
5th pop/height



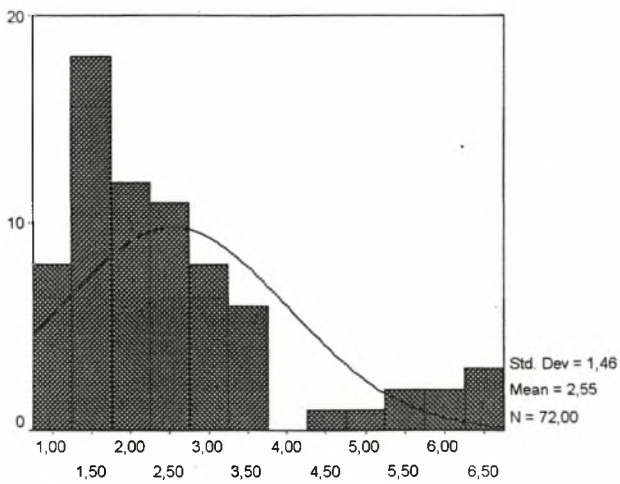
root capacitance



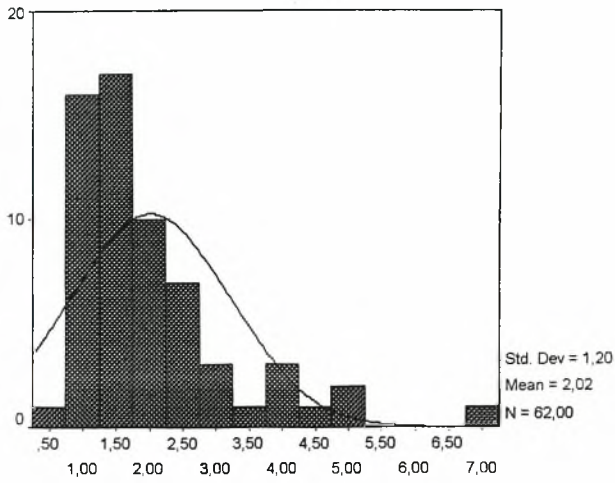
1st pop/root capacitance



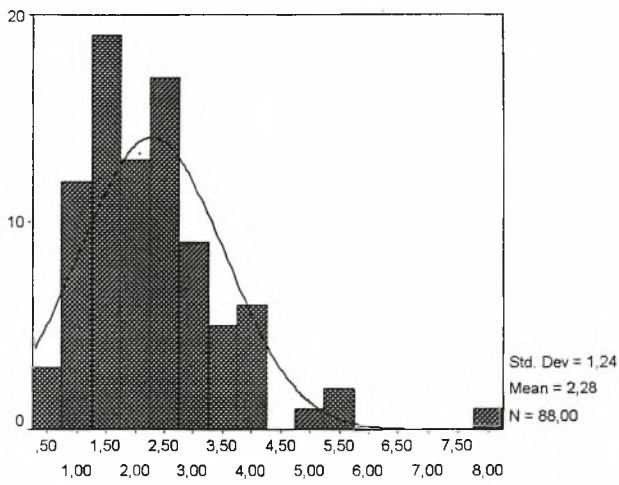
2nd pop/root capacitance



3rd pop/root capacitance



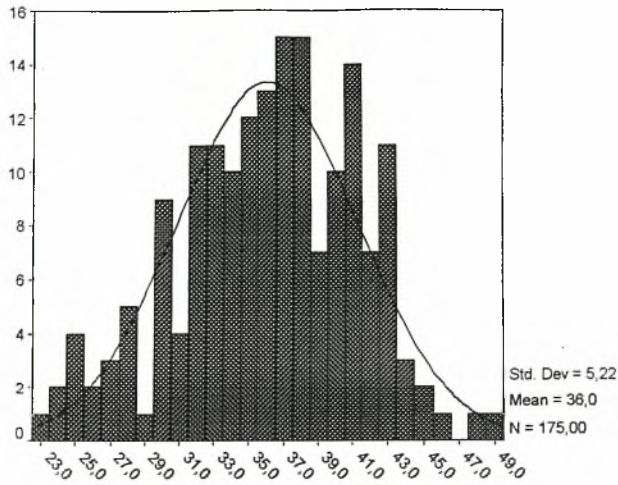
4th pop/root capacitance



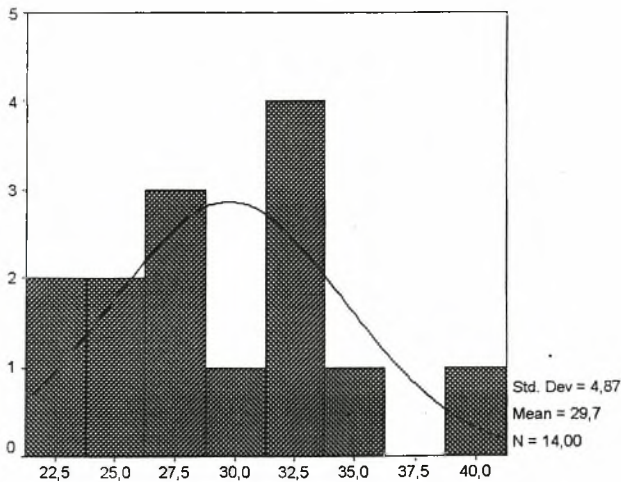
5th pop/root capacitance

2° ΠΕΙΡΑΜΑ

- (1st pop= πληθυσμός 163/GR-OP-85)
- (2nd pop= πληθυσμός 30/GR-OP-165)
- (3rd pop= πληθυσμός 102/GR-OP-84)
- (4th pop= πληθυσμός 28/GR-OP-183)
- (5th pop= πληθυσμός 141/GR-OP-12)

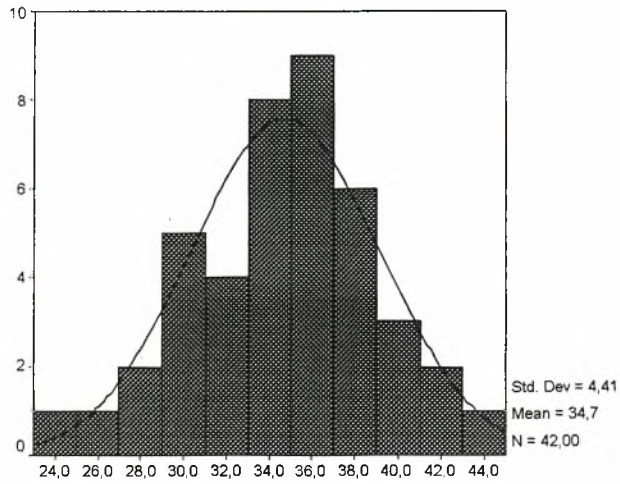


1spad day (3rd leaf)

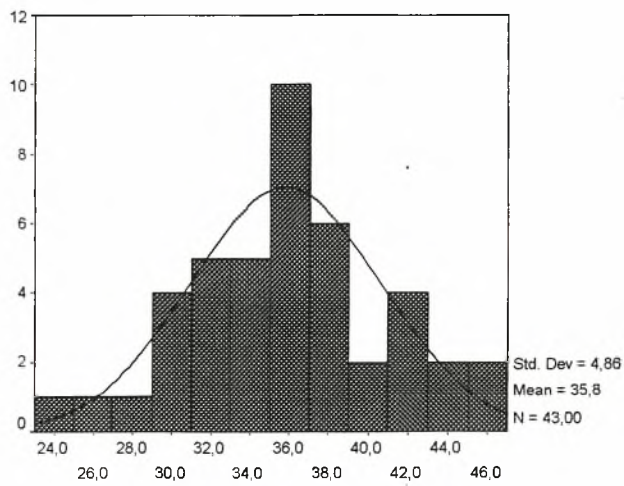


1st pop/1spad day (3rd leaf)

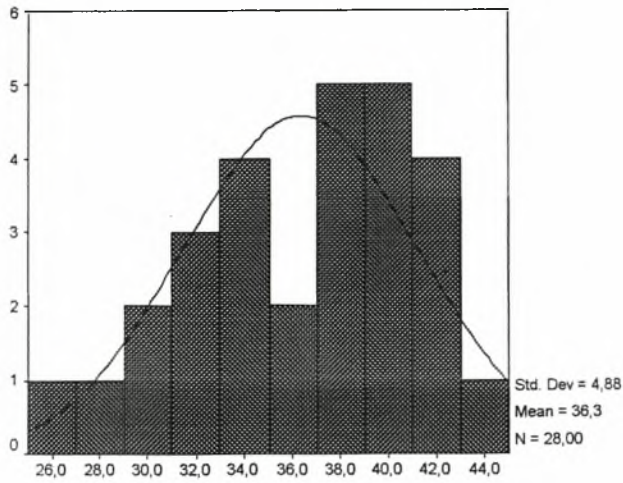
Graph



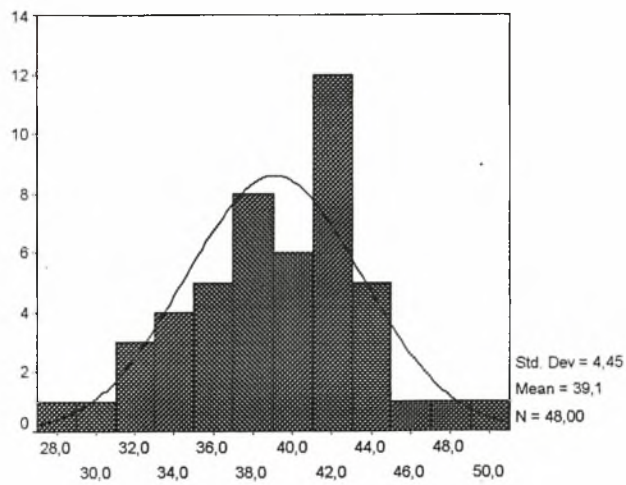
2nd pop/1spad day (3rd leaf)



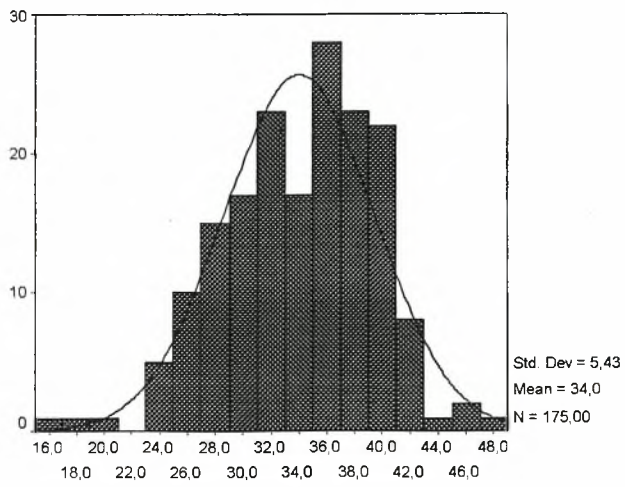
3rd pop/1spad day (3rd leaf)



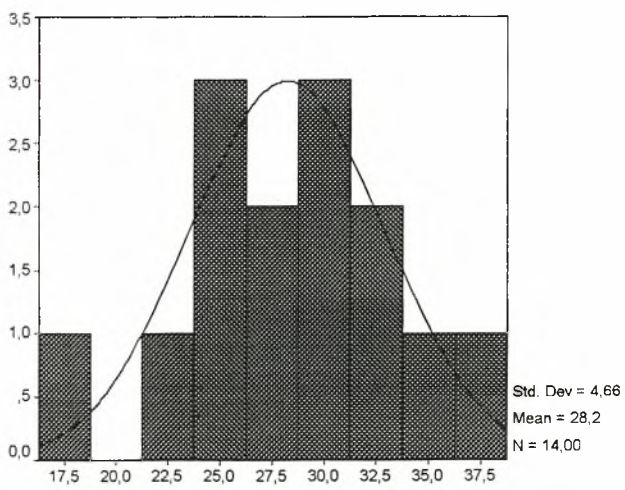
4th pop/1spad day (3rd leaf)



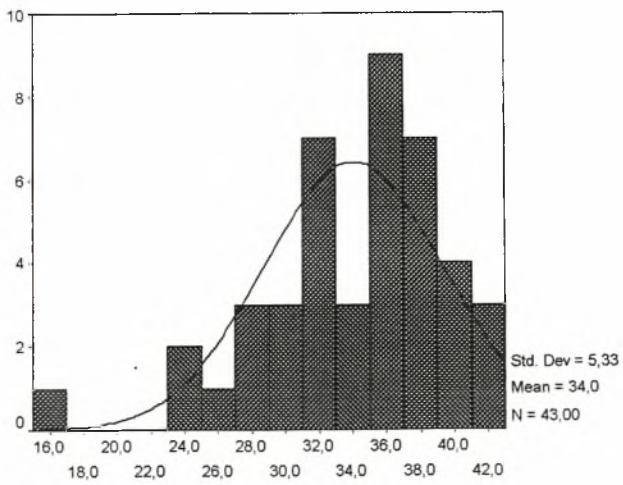
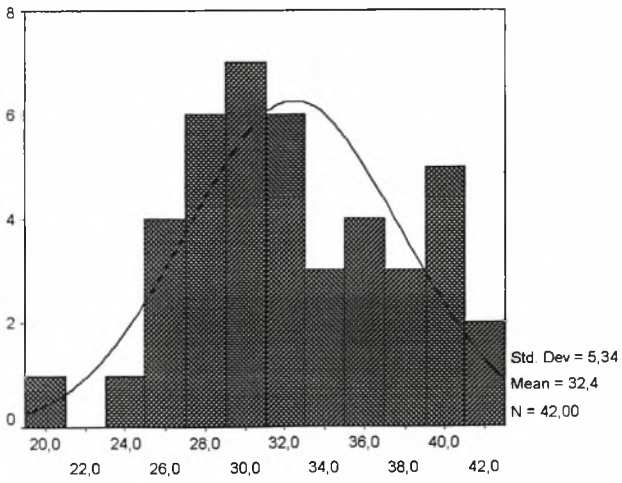
5th pop/1spad day (3rd leaf)

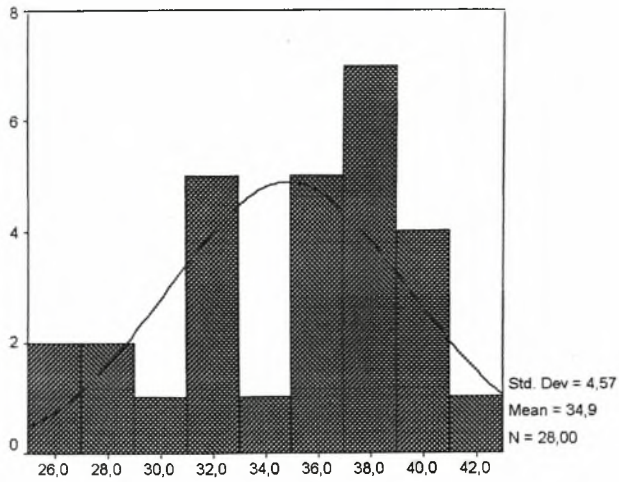


1spad night (3rd leaf)

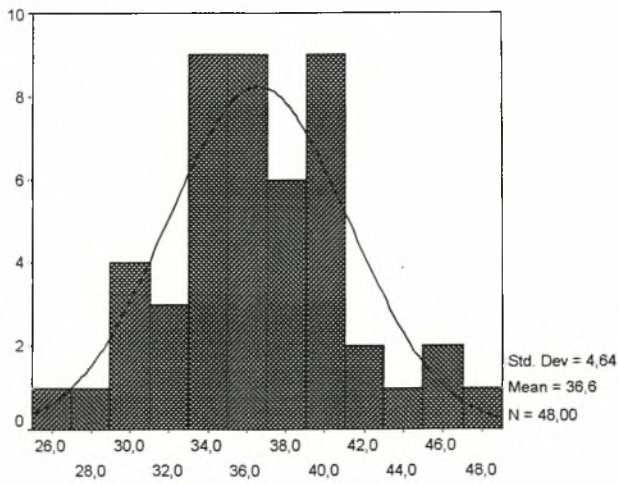


1st pop/1spad night (3rd leaf)

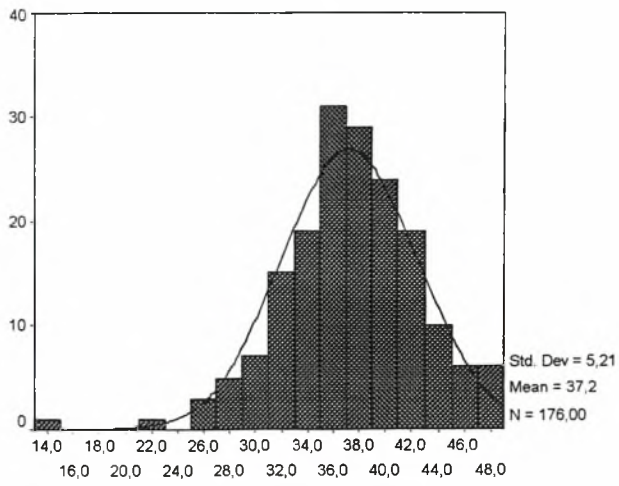




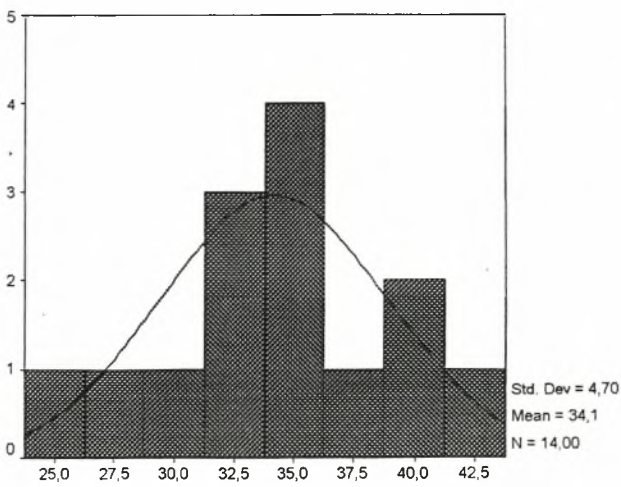
4th pop/1spad night (3rd leaf)



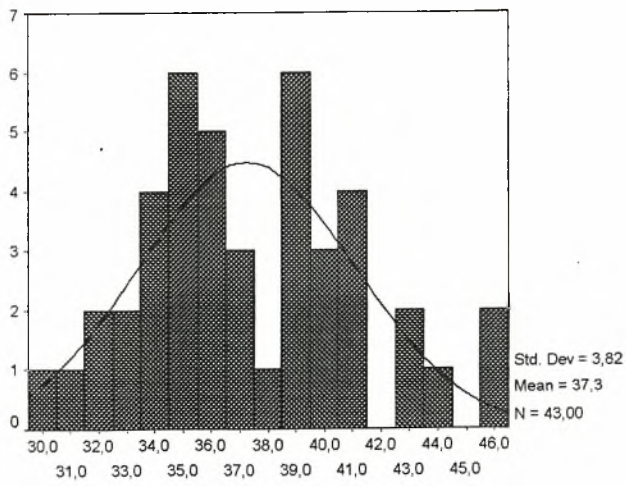
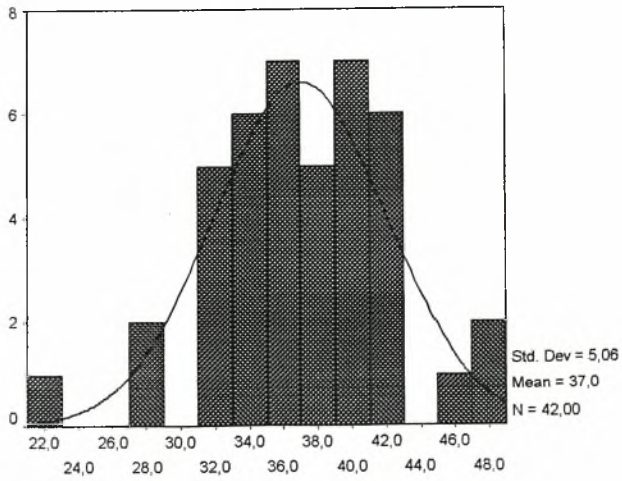
5th pop/1spad night (3rd leaf)

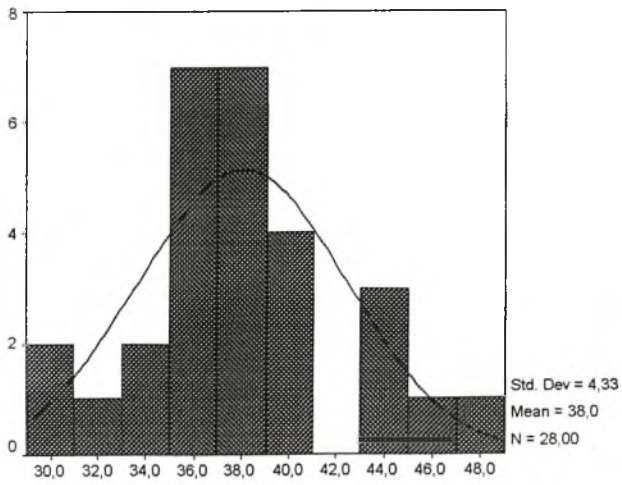


2spad day (5th leaf)

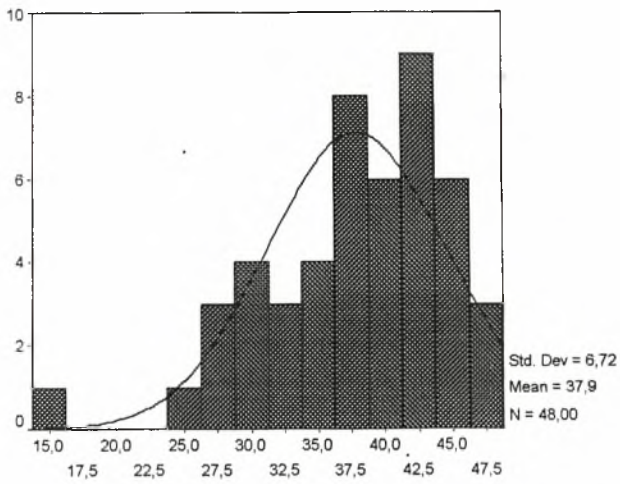


1st pop/2spad day (5th leaf)

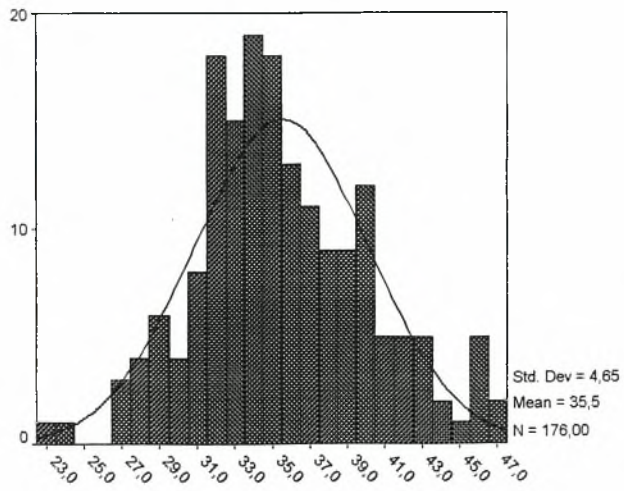




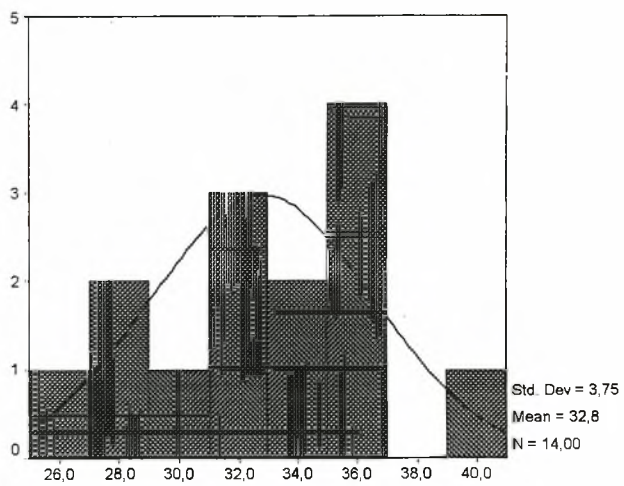
4th pop/2spad day (5th leaf)



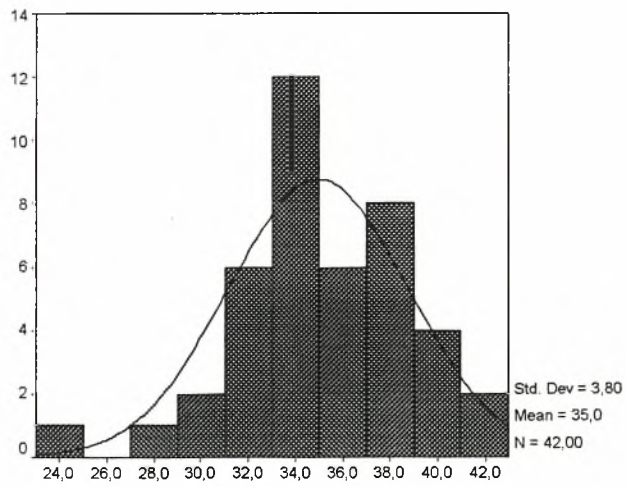
5th pop/2spad day (5th leaf)



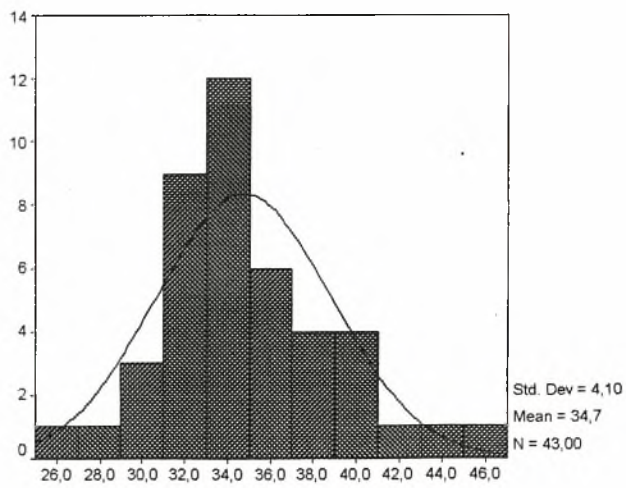
2spad night (5th leaf)



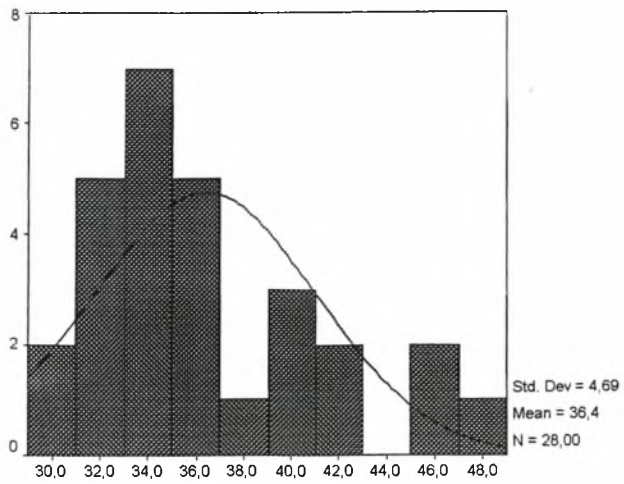
1st pop/2spad night (5th leaf)



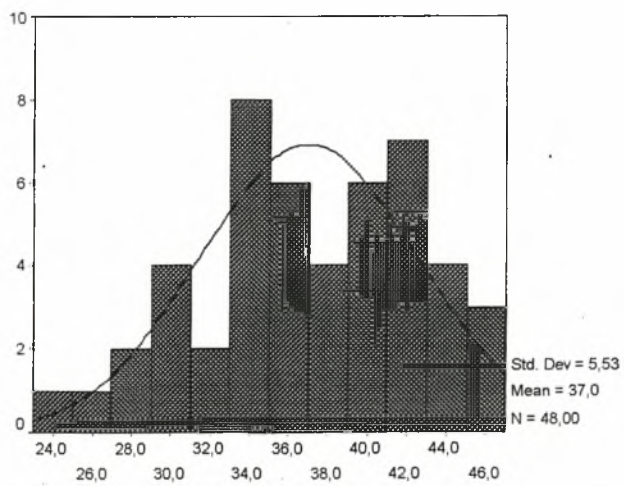
2nd pop/2spad night (5th leaf)



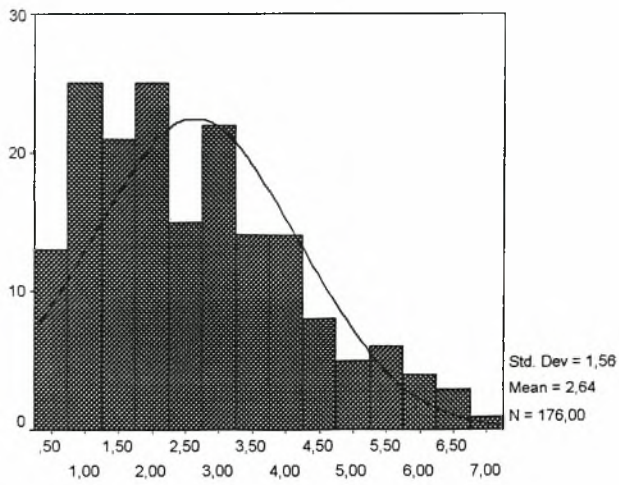
3rd pop/2spad night (5th leaf)



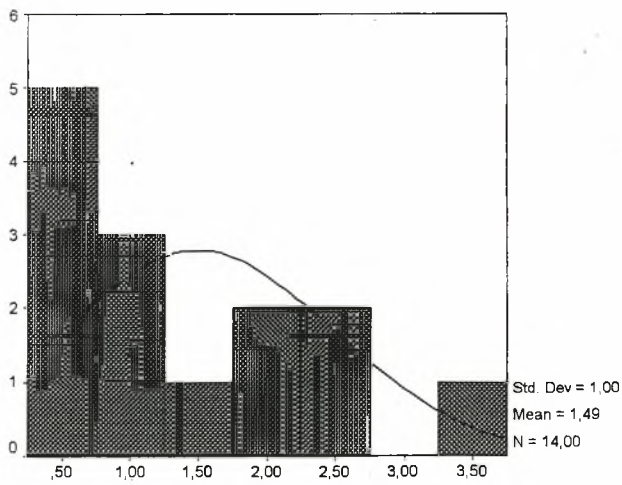
4th pop/2spad night (5th leaf)



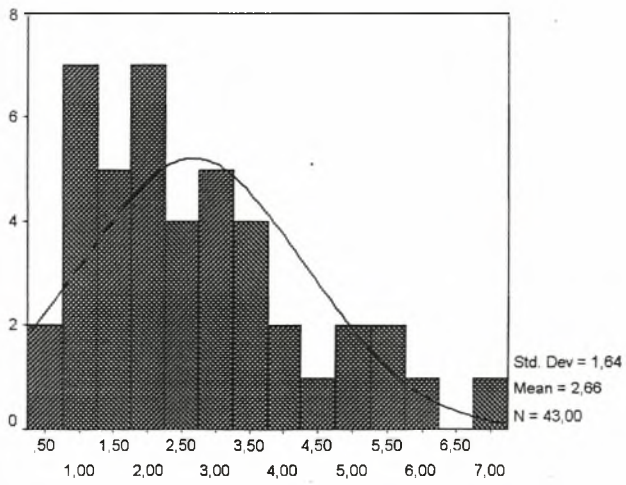
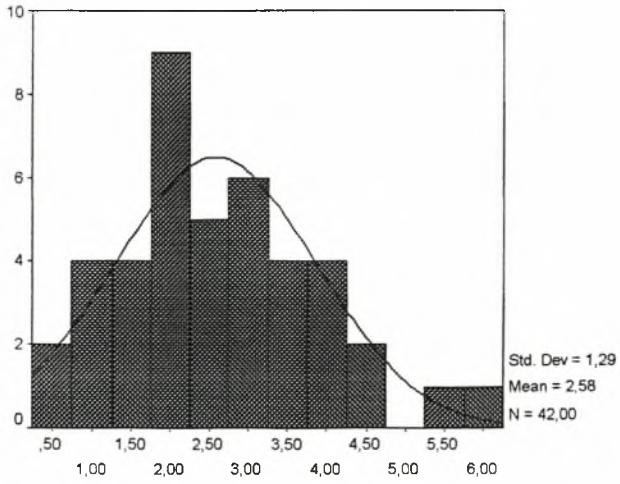
5th pop/2spad night (5th leaf)

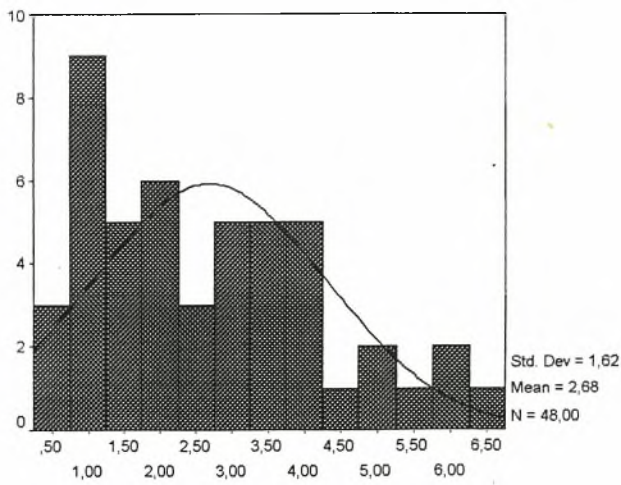
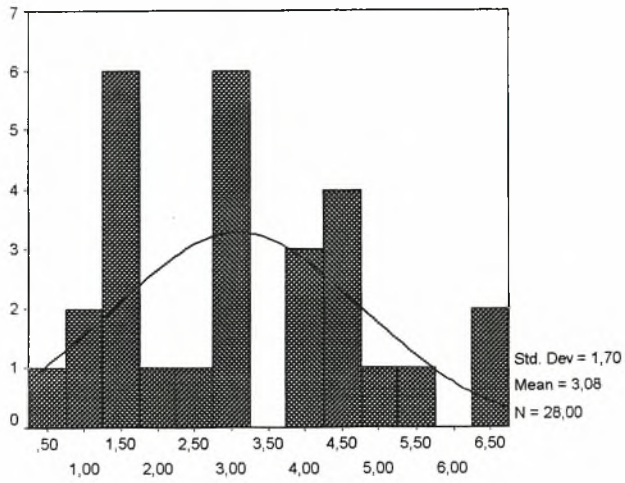


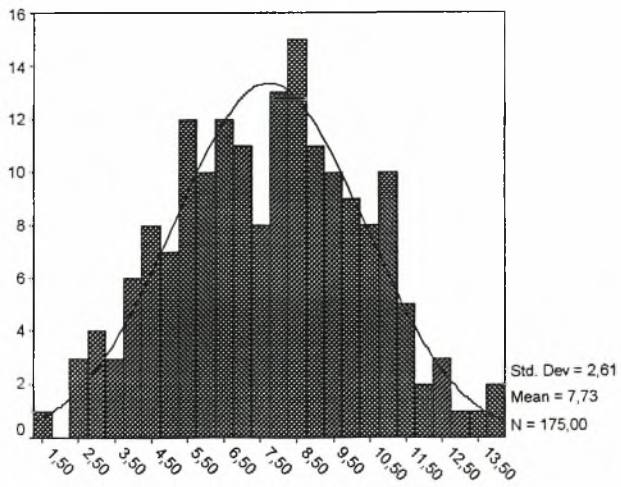
weight (5th leaf)



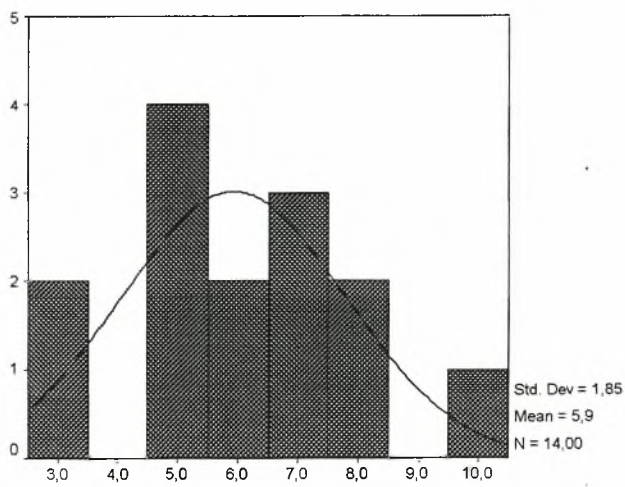
1st pop/weight (5th leaf)



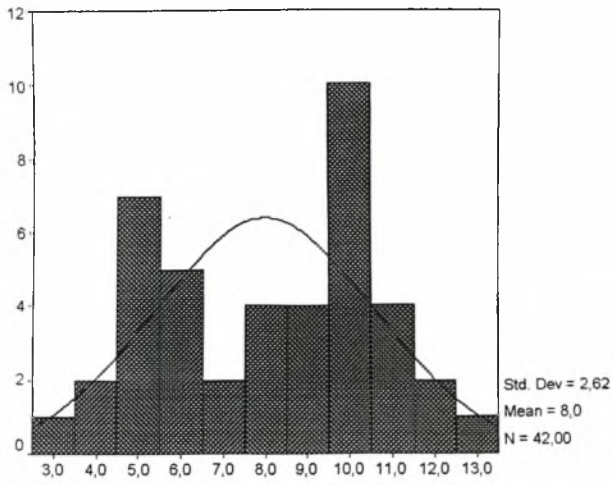




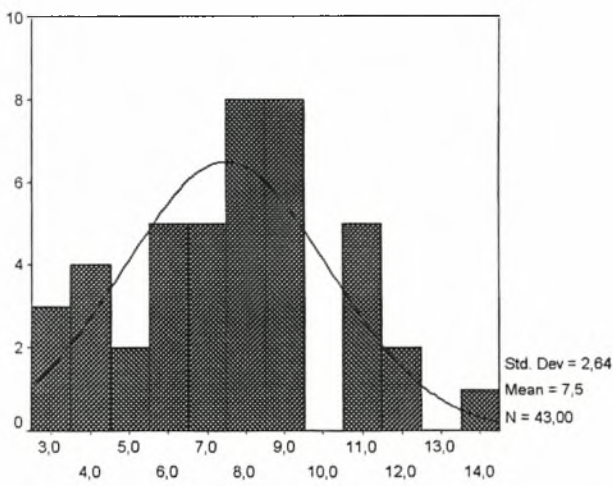
1 height (3rd leaf)



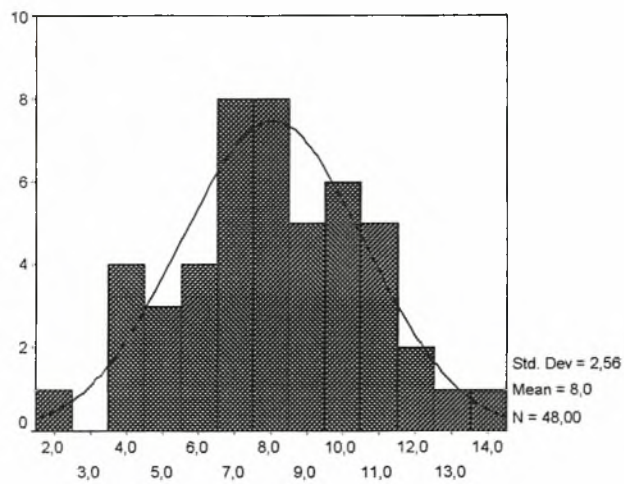
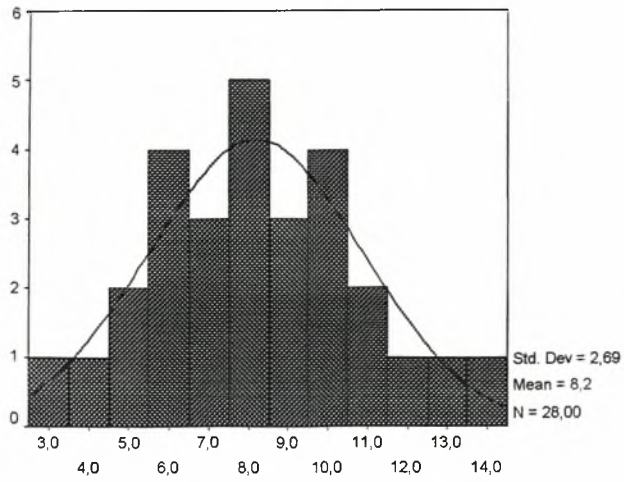
1st pop/1 height (3rd leaf)

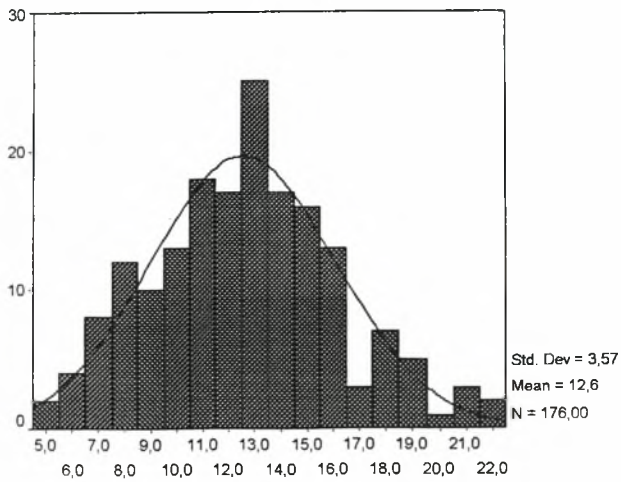


2nd pop/1 height (3rd leaf)

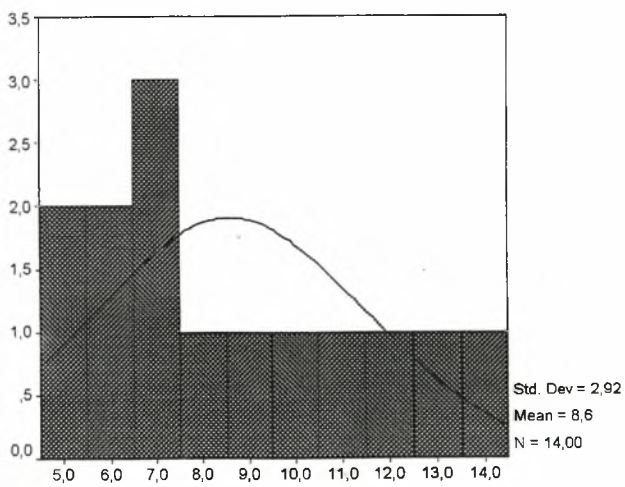


3rd pop/1 height (3rd leaf)

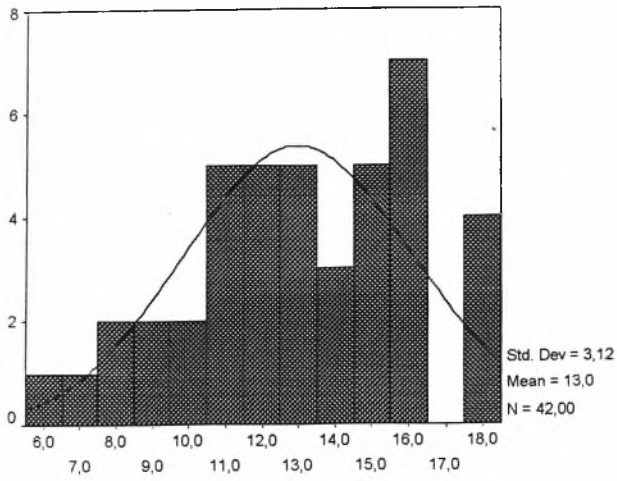




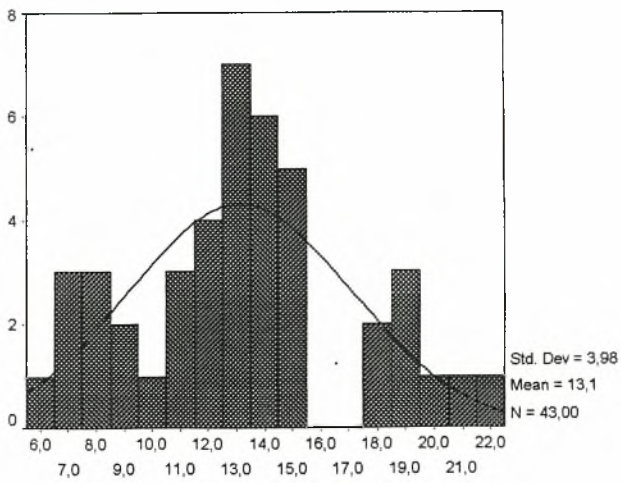
2 height (5th leaf)



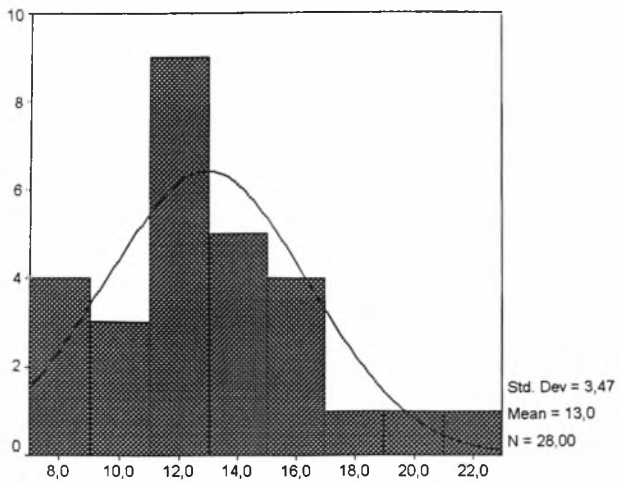
1st pop/2 height (5th leaf)



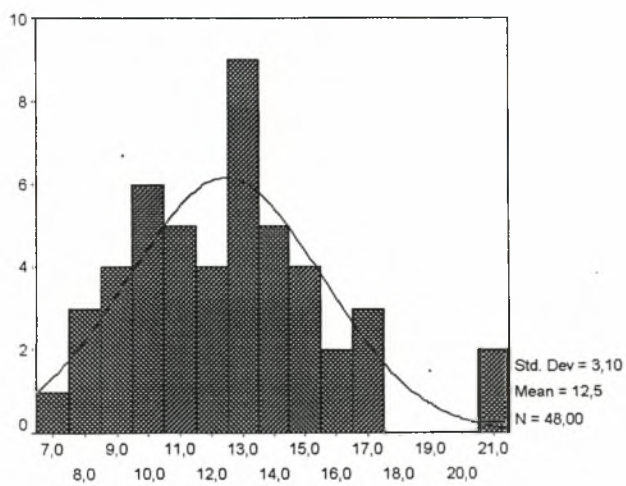
2nd pop/2 height (5th leaf)



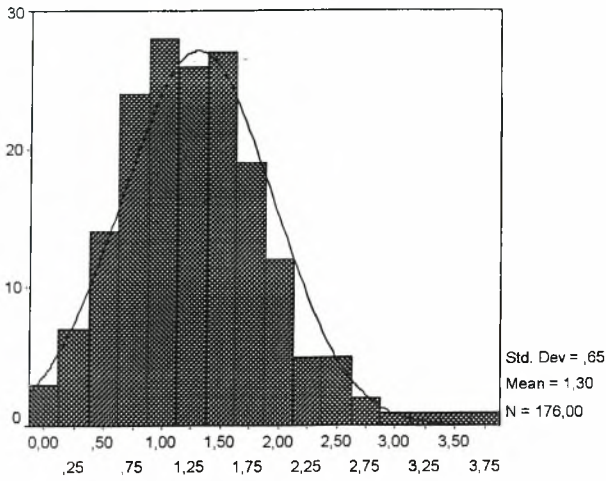
3rd pop/2 height (5th leaf)



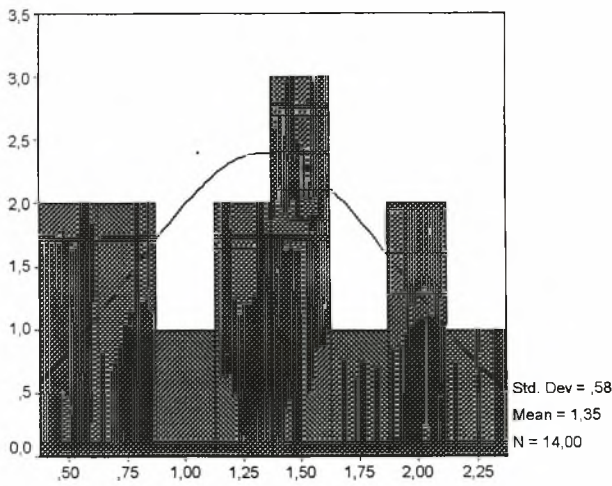
4th pop/2 height (5th leaf)



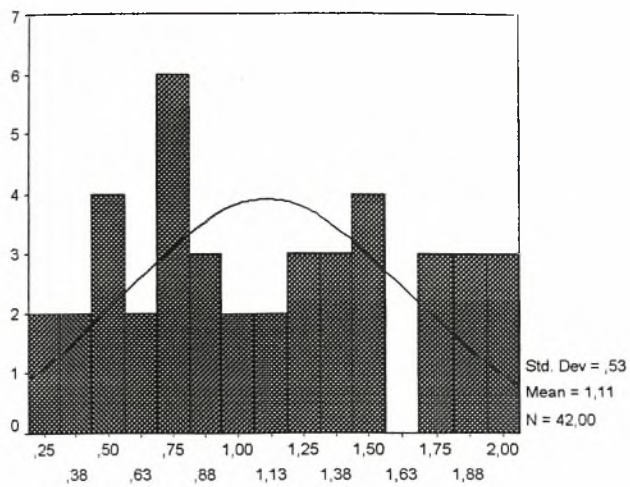
5th pop/2 height (5th leaf)



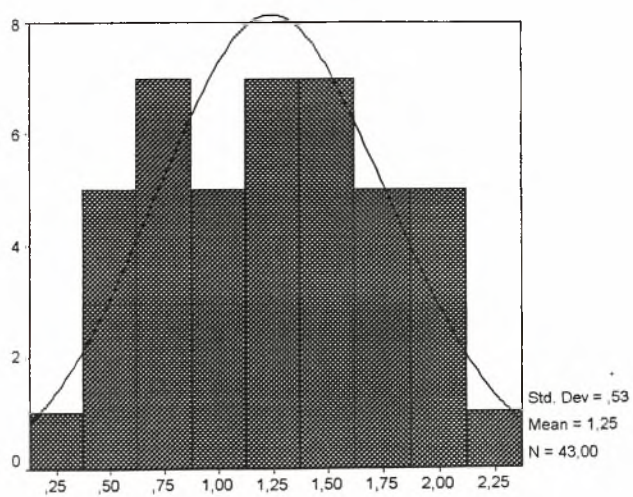
1 r capacitance (3rd leaf)



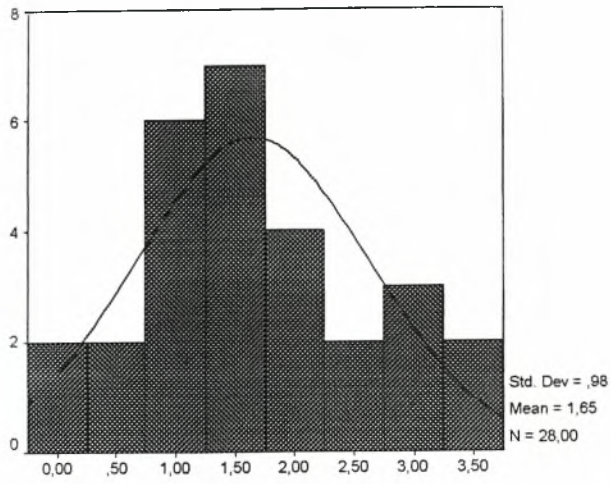
1st pop/1 r capacitance (3rd leaf)



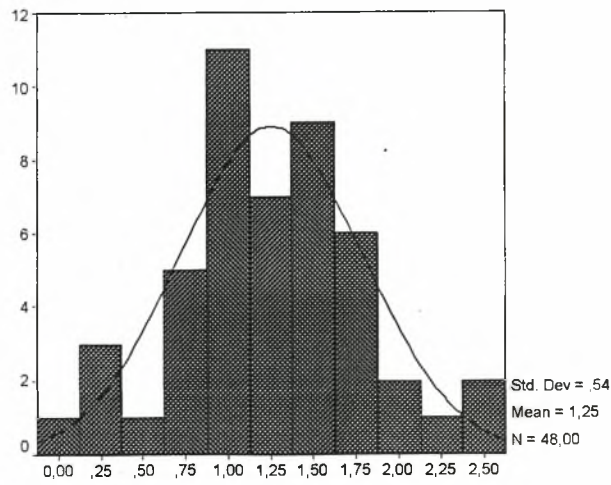
2nd pop/1 r capacitance (3rd leaf)



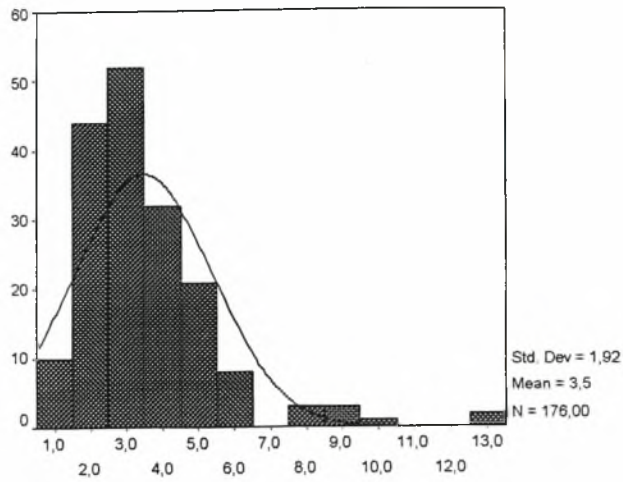
3rd pop/1 r capacitance (3rd leaf)



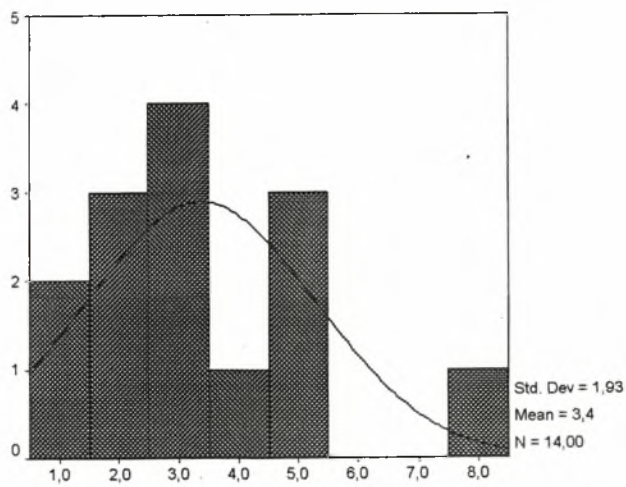
4th pop/1 r capacitance (3rd leaf)



5th pop/1 r capacitance (3rd leaf)



2 r capacitance (5th leaf)



1st pop/2 r capacitance (5th leaf)

