

Μελέτη ποιοτικών και γενετικών χαρακτήρων τεσσάρων ποικιλιών μπάμιας

“Study of Genetic and qualitative characters in four okra
cultivars.”

Μαρία Τζάβελλου

2014



Τριμελής Επιτροπή

Επιβλέπων:

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας –

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Συνεπιβλέπων:

Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ,

Καθηγητής Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας – Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής

Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

Μέλος:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας –

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την εργασία αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη ηθική και υλική τους βοήθεια.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ των καθηγητή της Σχολής μου Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο που μου ανέθεσε την εκπόνηση της παρούσας εργασίας και που καθ' όλο το διάστημα στάθηκε πρόθυμος, πολύτιμος και ακούραστος καθοδηγητής, διευρύνοντας ουσιαστικά το επιστημονικό μου πεδίο.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον καθηγητή μου κ. Αβραάμ Ι. Χα, ο οποίος μου έκανε την τιμή να μου εμπιστευθεί την εκτέλεση μέρους των πειραμάτων της διδακτορική διατριβής του κ. Ghadir Mohammadi, εμπλουτίζοντας με υπομονή και επιμονή τις γνώσεις μου και την επιστημονική μου εμπειρία.

Ευχαριστώ την κα. Καλλιόπη Παπαδοπούλου καθηγήτρια μου και μέλος της τριμελούς επιτροπής για την συμβολή της στην συμπλήρωση των γνώσεων μου στο επιστημονικό αντικείμενο.

Ευχαριστώ τους υποψηφίους διδάκτορες κ.κ. Έφη Σαγρή, Ghadir Mohammadi και Mina Shidfar οι οποίοι κατά την συνεργασία μας υπήρξαν πολύτιμοι σύμβουλοι στην εκτέλεση των πειραμάτων.

Ευχαριστώ επίσης όλο το δυναμικό του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και του Εργαστηρίου Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος οι οποίοι πρόθυμα βοήθησαν στην όλη προσπάθεια.

Ξεχωριστά ευχαριστώ τον Κωνσταντίνο Αστρίδη για την συμπαράσταση, την υπομονή του και τη συμβολή του στην μορφοποίηση της παρούσας εργασίας.

ABSTRACT	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
Κεφάλαιο 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 Βοτανική Ταξινόμηση	13
1.2 Καταγωγή, ιστορία, εξάπλωση	13
1.3 Αναπτυξιακές Απαιτήσεις	13
1.4 Χημική σύσταση καρπού	14
1.5 Χρήσεις του φυτού της μπάμιας	14
1.6 Γενική ανασκόπηση ποιότητας σπόρου	14
1.7 Δομή σπόρου	15
1.8 Παράγοντες που επιδρούν στην ποιότητα του σπόρου	17
1.8.1 Επίδραση λιπάσματος στην ποιότητα του σπόρου	17
1.8.2 Επίδραση της περιόδου συγκομιδής στην βλάστηση του σπόρου και στα χαρακτηριστικά σπόρων και λοβών	18
1.8.3 Επίδραση της ημερομηνίας σποράς στην ποιότητα του σπόρου	18
1.8.4 Επίδραση της περιεκτικότητας του σπόρου σε υγρασία	19
1.8.5 Επίδραση τμημάτων του φυτού στη ποιότητα του σπόρου	19
1.8.6 Επίδραση αυξητικών παραγόντων στη σποροπαραγωγή και την ποιότητα του σπόρου.	19
1.8.7 Επίδραση του φορτίου του καρπού στην ποιότητα του σπόρου	19
1.8.8 Επίδραση της αποθήκευσης στην ποιότητα του σπόρου	20
1.9 Μέθοδοι βελτίωσης της βλαστικότητας του σπόρου ωσμοβελτίωση και σκαριφικάρισμα scarification	20
1.10 Γενότυπος, φαινότυπος και φαινοτυπική πλαστικότητα	20
1.11 Χαρακτηριστικά μοριακών δεικτών	21
1.12 Μεθοδολογίες μοριακών δεικτών	21
1.12.1 Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (RFLP)	21
1.12.2 Απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (SSRs)	22
1.12.3 Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD)	22
1.13 Σκοπός	23
Κεφάλαιο 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
2.1 Υλικά	25
2.1.1 Πειραματικές συνθήκες Κλιματικές συνθήκες	25
2.1.2 Εξαγωγή DNA με μέθοδο CTAB Φυτικά Υλικά Διαλύματα CTAB μεθόδου εξαγωγής DNA	26

2.1.3 RAPD ανάλυση	26
Αντίδραση PCR	
2.1.4 Παρασκευή gel αγαρόζης	27
2.2 Μέθοδοι	27
2.2.1 Σπορά	27
2.2.2 Μεταφύτευση	27
2.2.3 Επεμβάσεις	27
Εφαρμογή λιπάσματος	
Αρδευση και εφαρμογή ζιζανιοκτόνου.	
Συγκομιδή και καταγραφή άνθισης	
2.2.4 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	28
Τεστ βλαστικότητας	
Καταγραφή Δεδομένων	
Στατιστική ανάλυση	
2.2.5 Εξαγωγή DNA με μέθοδο CTAB	29
Παρασκευή Διαλυμάτων	
Πειραματική διαδικασία εξαγωγής DNA	
2.2.6 RAPD ανάλυση	29
Κεφάλαιο 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
3.1 Αριθμός ανθέων ανά φυτό	31
3.2 Αριθμός λοβών ανά φυτό (Pot set)	31
3.3 Μέσος αριθμός σπόρων ανά λοβό	35
Πείραμα 1	
Πείραμα 2	
3.4 Μέσο βάρος 100 σπόρων	37
Πείραμα 1	
Πείραμα 2	
3.5 Μέση βλαστικότητα	39
Πείραμα 1	
Πείραμα 2	
3.6 Αποτελέσματα RAPD ανάλυσης	40
Κεφάλαιο 4. Συζήτηση	49
Βιβλιογραφία	53

ABSTRACT

Okra (*Abelmoschus Esculentus* L.) is an important vegetable crop in Greece. In the present study, the effect of nitrogen(N) application (F1 (control): 150 mg L⁻¹ N, F2: 300 mg L⁻¹ N, F3: 450 mg L⁻¹) on the seed quality of four okra cultivars was examined (Boyatiou, Veloudo, Pylaias και Clemson) in relation to harvest time (T1: 30 days after anthesis (DAA), T2: 35 DAA, T3: 40 DAA, T4: 50 DAA) and sowing dates (experiment 1: 1st May, experiment 2: 20th May). Seeds of four cultivars were sown in seed trays and transplanted to the experimental field of the university of Thessaly, in Velestino during the growing season of 2011. Throughout the experiment the following data were recorded: flower number per plant, number of pod set per plant, 100 seed weight and mean seed germination. The number of seeds per pod tended to decrease during the later harvest (40-50 DAA) but was not consistently affected from nitrogen application. Both experiment 1 and experiment 2, the mean seed weight was decreased in relation to harvest time to all cultivars. The major decrease occurred between 35 and 40 DAA in experiment 1 and between 40 and 50 DAA in experiment 2. Increasing N levels tended to increase the percent seed germination but in no statistically important level. In experiment 1, maximum germination was recorded for seeds harvested at 30 and 40 DAA, whereas in experiment 2 germination was higher for seeds harvested at 40 DAA (Boyatiou, Veloudo, Pylaias) and 40-50 DAA (Clemson). Moreover, the existence of genetic differences among the 4 cultivars has been investigated. DNA from young leaves of those 4 cultivars has been extracted with the CTAB method. Then the genetic material has been checked with the use of 30 decameric primers with the random amplified DNA method (RAPD). From the results of the electrophoresis of PCR products, it was observed that the molecular marker GLB17 separates the "Boyatiou" cultivar from the rest 3 cultivars. Promising though are the results of the use of the molecular marker OPM16 that separates the "Boyatiou" from "Veloudo" and "Clemson". Similar occasions also appear in the results of the use of primers OBP16, OPV06, OPY02, UBC292, but a retest is essential to confirm the fidelity of the results.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μπάμια είναι σημαντική λαχανοκομική καλλιέργεια στην Ελλάδα. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση της εφαρμογής τριών επιπέδων αζώτου (F1 (control): 150 mg L⁻¹ N, F2: 300 mg L⁻¹ N, F3: 450 mg L⁻¹) στην ποιότητα του σπόρου σε τεσσάρων ποικιλιών μπάμιας (Μπογιατίου, Βελούδο, Πυλαίας και Clemson) από λοβούς που συγκομίστηκαν σε 4 περιόδους συγκομιδής (T₁ = 30 ημέρες μετά την άνθιση (HMA) T₂ = 35 HMA T₃ = 40 HMA T₄ = 50 HMA) σε σχέση με την ημερομηνία σποράς (πείραμα 1: 1^η Μαΐου, πείραμα 2 : 20^η Μαΐου). Σπόροι τεσσάρων ποικιλιών σπάρθηκαν σε δισκία σπόρων και τα νεαρά φυτά έπειτα μεταφυτεύθηκαν στον αγρό του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο κατά την αναπτυξιακή περίοδο του 2011. Κατά την διάρκεια του πειράματος καταγράφηκαν τα εξής δεδομένα: αριθμός ανθέων ανά φυτό, αριθμός λοβών ανά φυτό, μέσος αριθμός σπόρων ανά λοβό, βάρος σπόρων ανά 100 και μέση βλαστικότητα σπόρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αριθμός των σπόρων ανά λοβό έτεινε να μειωθεί κατά τις όνιμες συγκομιδές 40-50 HMA αλλά δεν επηρεάστηκε σταθερά από το επίπεδο εφαρμογής N. Στα δύο πειράματα, το μέσο βάρος εκατό σπόρων μειώθηκε σημαντικά με το χρόνο συγκομιδής σε όλες τις ποικιλίες. Η μεγαλύτερη μείωση σημειώθηκε μεταξύ 35 και 40 HMA στο πείραμα 1 και μεταξύ 40 και 50 HMA στο πείραμα 2. Δεν υπήρξε σταθερή επίδραση του N στο μέσο βάρος εκατό σπόρων. Σε αντίθεση αυξάνοντας τα επίπεδα N έτεινε να αυξήσει το ποσοστό βλαστικότητας των σπόρων αν και όχι απαραίτητα σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Στο πείραμα 1 η μέγιστη βλαστική ικανότητα καταγράφηκε για τους σπόρους που συγκομίστηκαν σε 35-40 HMA, ενώ στο πείραμα 2 η βλαστική ικανότητα ήταν υψηλότερη για σπόρους που συγκομίστηκα 40 HMA (Μπογιατίου, Βελούδο και Πυλαίας) και 40 με 50 HMA (Clemson). Επίσης διερευνήθηκε η ύπαρξη γενετικών διαφορών στις τέσσερις ποικιλίες. Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από νεαρά φύλλα των τεσσάρων ποικιλιών με τη μέθοδο CTAB. Έπειτα το γενετικό του υλικό ελέγχθηκε με την χρήση 30 δεκαμερών εκκινητών με τη μέθοδο του τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD). Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR παρατηρήθηκε ότι ο μοριακός δείκτης GLB17 διαχωρίζει την ποικιλία «Μπογιατίου» από τις υπόλοιπες 3. Πολλά υποσχόμενα όμως είναι και τα αποτελέσματα της χρήσης του μοριακού δείκτη OPM16 ο οποίος διαχωρίζει την Μπογιατίου από τις Βελούδο και Clemson. Παρόμοιες περιπτώσεις εμφανίζονται και στα αποτελέσματα του ελέγχου των εκκινητών OBP16 (η ζώνη 3 απουσιάζει από την ποικιλία «Μπογιατίου» και η 4 είναι παρούσα μόνο σε αυτή), OPV06, OPY02, UBC292, αλλά κρίνεται απαραίτητος ο επανέλεγχος για την επιβεβαίωση της πιστότητας των αποτελεσμάτων.

Κεφάλαιο 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βοτανική Ταξινόμηση

Η μπάμια (*Abelmoschus esculentus* [L.] Moench.) είναι ένα τροπικό φυτό, το οποίο απαντάται από την Αφρική ως την Ασία, την Νότια Ευρώπη και την Αμερική (Oyenuga, 1969, Oyelade et al. 2003). Ανήκει στην οικογένεια των Μαλαχωειδών (Malvaceae). Η μπάμια επισημάνθηκε για πρώτη φορά το 1216 π.Χ. στην Αίγυπτο (Ames and MacLeod, 1990). Τα λατινικά διώνυμα για την μπάμια είναι *Abelmoshus esculentus* και *Hibiscus esculentus* L. (Kumar et al., 2010). Στην Ινδία είναι ευρέως γνωστή ως bhiudi, στην Ταυλάνδη ως Krajab Kheaw, στην Νοτιανατολική Ασία ως ochro. Ωστόσο στη Μέση Ανατολή αναφέρεται ως bamia, bamya ή bamieh, στην Νότια Αμερική ως gumbo και στην Αγγλία ως lady's finger (Ndunguru & Rajabu 2004). Επιπροσθέτως, στην Πορτογαλία και στην Αγκόλα, η μπάμια είναι γνωστή ως quiabo και ως quimbombo στην Κούβα, στη Γαλλία mbamia και mbiaha στη Σουηδία και okura στην Ιαπωνία (Chauhan 1972, Lamont 1999). Τέλος, συναντάται στην Ταυλάνδη όπου ονομάζεται quikwi (Siemonsma & Kouame 2000).

Βασίλειο:	φυτά (Plantae)
Συνομοταξία :	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
Ομοταξία:	Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)
Τάξη :	Μαλαχώδη (Malvales)
Οικογένεια:	Μαλαχωειδή (Malvaceae)
Γένος :	<i>Abelmoschus</i>
Είδος :	<i>A. Esculentus</i> (Μπάμια)

Πίνακας 1 Συστηματική Ταξινόμηση

1.2 Καταγωγή, ιστορία, εξάπλωση

Παλαιότερα το φυτό της μπάμιας συμπεριλαμβανόταν στο γένος *Hibiscus*, έπειτα όμως ταυτοποιήθηκε ως *Abelmoschus* και διαχωρίστηκε από το γένος *Hibiscus* (Aladele et al. 2008). Το 1787, ο Μέδικος είχε προτείνει το γένος *Abelmoschus* να υψωθεί στη γραμμή της εξέλιξης ως ένα ευδιάκριτο γένος. Η μπάμια εκτιμάται ότι προερχόταν από την περιοχή της Αιθιοπίας, ωστόσο έχουν προταθεί και άλλες περιοχές καταγωγής συμπεριλαμβανομένης και της βορειοανατολικής Ασίας (van Bossum Waalkes, 1966). Η καλλιέργεια της μπάμιας εξαπλώθηκε διαμέσου της Μέσης Ανατολής και της Βόρειας Αφρικής (Tindall 1983, Lamont 1999). Σήμερα η μπάμια αναπτύσσεται σε πολλά μέρη του κόσμου, ιδιαίτερα όμως σε τροπικές και υποτροπικές χώρες (Arapitsas 2008, Saifullah & Rabbani 2009), τόσο σε μεγάλους εμπορικούς αγρούς όσο και σε μικρούς κήπους (Rubatzky & Yamaguchi 1997). Τα άγρια και καλλιεργήσιμα είδη μπάμιας κυριαρχούν ξεκάθαρα στην Νοτιανατολική Ασία, ενώ η Μεσόγειος, η Μέση Ανατολή και η νότια Αμερική θεωρούνται δευτερεύουσες περιοχές ποικιλομορφίας (Grubben, 1977).

1.3 Αναπτυξιακές Απαιτήσεις

Η φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη της μπάμιας απαιτεί θερμοκρασίες άνω των 20°C (Lamont 1999, Abd El-Kader et al., 2010). Μια μέση θερμοκρασία μεταξύ 20°C και 30°C θεωρείται ιδανική για την ανάπτυξη, την άνθιση και την καρποφορία (Akinyele & Temikotan 2007, Dada & Fayinminnu 2010). Η έναρξη άνθισης και η άνθιση καθυστερούν σε υψηλές θερμοκρασίες (>35°C) (Lamont 1999, Abd El-Kader et al., 2010). Η μπάμια θεωρείται ότι είναι ένα “short-day” φυτό με την άνθιση να εγκαθιδρύεται σε <11 ώρες ημερησίου φωτός, αλλά η μεγάλη γεωγραφική κατανομή του (πάνω από 34°-40° γεωγραφικό μήκος) δηλώνει ότι, οι ποικιλίες διαφέρουν ξεκάθαρα στην ευαισθησία. Παραδείγματος χάριν, όλες οι ελληνικές ποικιλίες μπάμιας ταξινομούνται ως day-neutral (Koutsos, 2009). Η μπάμια ανέχεται φτωχά εδάφη, αλλά προτιμά καλά στραγγισμένα και αργιλώδη εδάφη με pH 6-7 και υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικές ουσίες (Lamont 1999, Adilakshmi et al. 2008, Akanbi et al., 2010, Akande et al., 2010). Η μπάμια απαιτεί μέτρια βροχόπτωση (80–100 εκ), ομοιόμορφα κατανομημένη, ώστε να παράγει τους πρώτους βρώσιμους καρπούς σε μια σχετική μακράν περίοδο. Παρόλα αυτά είναι σχετικά ανεκτική στην ξηρασία. Στη Ελλάδα η ποικιλία «Μπογιατίου» αναπτύσσεται ακόμα και ως

ένα μη αρδευόμενο φυτό (Κουτσός, 2009). Το ποσοστό βλαστικότητας και η ταχύτητα ανάπτυξης του φυτού ευνοούνται στους 30⁰ – 35⁰ (Akande et al., 2003).

1.4 Χημική σύσταση καρπού

Η μπάμια περιέχει πρωτεΐνες, υδατάνθρακες φυτικές ίνες και σημαντική ποσότητα βιταμίνης C (πίνακας 2) με αποτέλεσμα να επιτελεί ζωτικό ρόλο στην διατροφή του ανθρώπου (Kahlon et al., 2007, Saifullah & Rabbani 2009). Οι υδατάνθρακες είναι κυρίως παρόντες με μορφή γλίσχραματος (πηκτώδης ουσία φυτών). Οι νεαροί καρποί αποτελούνται από βιολογικά μακρομόρια πρωτεϊνών και σακχάρων με μοριακό βάρος 170.000. Τα κύρια συστατικά τους είναι γαλακτόζη (25%), ραμνόζη (22%), γαλακτορουνικό οξύ (27%) και αμινοξέα (11%). Το γλίσχραμα είναι εξαιρετικά διαλυτό στο νερό. Οι σπόροι της μπάμιας περιέχουν 20% πρωτεΐνη και 20% έλαια (Tindall 1983, Charrier 1984).

Νερό	88.6 g
Ενέργεια	144.00 kJ (36 kcal)
Πρωτεΐνη	2.10 g
Υδατάνθρακες	8.20 g
Λίπη	0.20 g
Φυτικές ίνες	1.70 g
Ca	84.00 mg
P	90.00 mg
Fe	1.20 mg
B-Καροτένη	185.00 μg
Ριφοβλαβίνη	0.08 mg
Θειαμίνη	0.04 mg
Νιασίνη	0.60 mg
Ασκορβικό οξύ	47.00 mg

Πίνακας 2: Η σύσταση των λοβών μπάμιας ανά 100 g βρώσιμης μερίδας (Gopalan et al., 2007, Varmudy, 2011).

1.5 Χρήσεις του φυτού της μπάμιας

Οι καρποί καταναλώνονται σε πρώιμο στάδιο (3-6 ημέρες μετά την άνθιση), όταν είναι μαλακοί και μη ινώδεις. Εάν η συγκομιδή καθυστερήσει, οι ίνες αυξάνονται σημαντικά και οι καρποί παύουν να είναι βρώσιμοι.

Οι καρποί της μπάμιας μπορούν να διακινηθούν και να πωληθούν ως νωποί ή κατεψυγμένοι. Καταναλώνονται βραστοί, τηγανιστοί ή ψητοί (Akintoye et al., 2011)

Δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στη Κίνα προτείνουν ότι το εκχύλισμα φύλλων της μπάμιας σε αλκοόλη μπορεί να μειώσει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, να μειώσει την πρωτεϊνουρία και να βελτιώσει την νεφρική λειτουργία (Liu et al., 2005, Kumar et al., 2009). Τα φύλλα μπάμιας θεωρούνται καλή ζωοτροφή για βοοειδή αλλά το γεγονός αυτό είναι δευτερεύον σε σχέση με την πρωταρχική χρήση του φυτού. Οι οφθαλμοί και τα άνθη είναι επίσης βρώσιμοι (Doijode 2001). Επιπροσθέτως, το γλίσχραμα της μπάμιας είναι κατάλληλο για βιομηχανικές και φαρμακευτικές εφαρμογές (Akinyele & Temikotan 2007) στην παραγωγή χαρτιού γλασέ καθώς και στη ζαχαροπλαστική. Επιπροσθέτως, έχει προταθεί ως υποκατάστατο πλάσματος (Savello et al., 1980, Markose & Peter 1990, Lengsfeld et al., 2004, Adetuyiet al., 2008, Kumar et al., 2010).

1.6 Γενική ανασκόπηση ποιότητας σπόρου

Η βλαστικότητα των σπόρων μπορεί να οριστεί ως η πιθανότητα ενός τυχαίου σπόρου να βλαστήσει κάτω από ορισμένες συνθήκες (Black et al., 2006), ενώ λανθάνουσα βλάστηση (λήθαργος) είναι η απώλεια βλαστικότητας του σπόρου υπό επιλεκτικές συνθήκες (Hilhorst και Toorop, 1997). Η λανθάνουσα βλάστηση διακρίνεται σε ενδογενή λανθάνουσα βλάστηση και σε εξωγενή λανθάνουσα βλάστηση. Η ενδογενής λανθάνουσα βλάστηση αποδίδεται σε αναστολή της βλαστικότητας εξαιτίας ενός ανώριμου εμβρύου ή ενδογενών ανασταλτικών παραγόντων του σπόρου. Η εξωγενής λανθάνουσα βλάστηση αποδίδεται σε αναστολή που επιβάλλει το κάλυμμα του σπόρου.

Η σκληρότητα του σπόρου είναι μια μορφή εξωγενούς λανθάνουσας βλάστησης κατά την οποία το κάλυμμα του σπόρου δεν επιτρέπει την ενυδάτωση του και/ή την ανάδυση του ριζιδίου. Το ποσοστό της βλαστικότητας του σπόρου της μπάμιας είναι σχετικά χαμηλό εξαιτίας της εμφάνισης της σκληρότητας του σπόρου στο φυτό της (Luis Felipe et al., 2010). Το ποσοστό αυτό διαφέρει στις ποικιλίες της μπάμιας (Ellis et al., (1985) Standifer et al., (1989), El Balla et al., 2011).

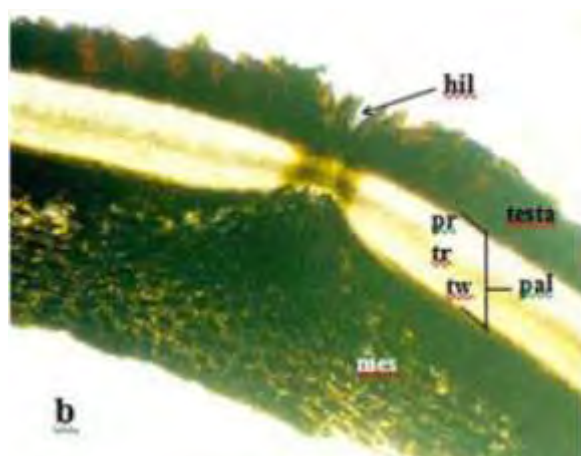
Τα χαρακτηριστικά των σπόρων και των λοβών και ειδικά η σκληρότητα του σπόρου οφείλεται στην επίδραση γενετικών ή/και περιβαλλοντικών παραγόντων. Υπάρχουν πολυάριθμες αναφορές σχετικά με τις επιδράσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών στην ικανότητα βλάστησης των σπόρων και στην λανθάνουσα βλάστηση τους (Fenner, 1991, 1992), (Hilhorst και Toorop, 1997), (Baskin, 1998), (Guterman, 2000).

1.7 Δομή σπόρου

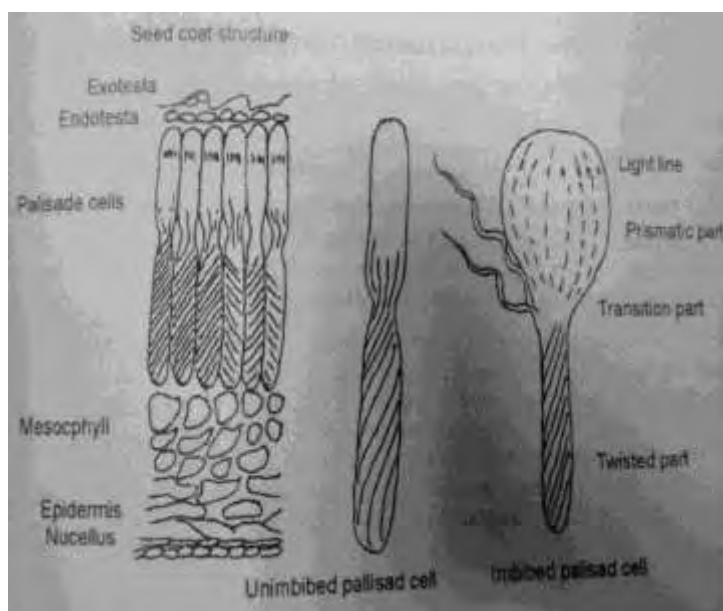
Οι σπόροι της μπάμιας είναι σχετικά μεγάλοι και βαρείς (εικόνα 1), με μέσο βάρος 15-20 gr (Bhatt και Srinivasa Rao, 2009, Martin και Rhodes, 1983). Οι σπόροι της μπάμιας περιγράφονται ως exotegmic γιατί ο ιστός αναπτύσσεται από την εξωτερική επιδερμίδα του καλύμματος. Το κάλυμμα του σπόρου της μπάμιας αποτελείται από: α) την επιδερμίδα, β) τα πασσαλώδη κύτταρα, γ) μεσόφυλλο, δ) fringe cells (εικόνα 2). Η περιοχή chalazar είναι το πολύπλοκο τμήμα του σπόρου (Bhatt και Srinivasa Rao, 2009).



Εικόνα 1: σπόροι μπάμιας

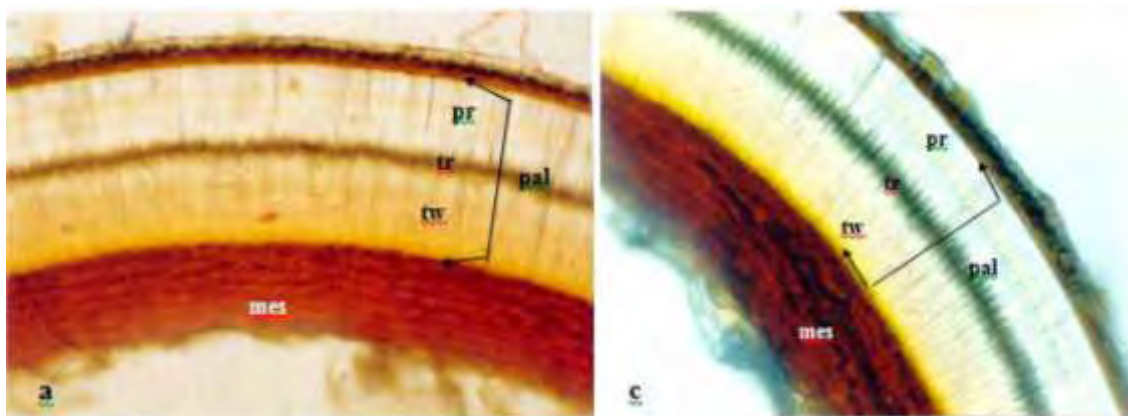


Εικόνα 2: Ferric Chloride βάφει την περιοχή hilar της Clemson με 5% mc, αποδεικνύοντας την παρουσία τανινών στις δομές. Pal: πασσαλώδης σειρά, mes: μεσόφυλλο (Maria et al., 2007).



Εικόνα 3: περιοχές καλύμματος σπόρου (Vanangamudi et al. 2006)

Οι Serrato-Valenti et al. (1992, 1989) και οι Egley et al. (1986) ανέφεραν ότι το νερό εισέρχεται στο σπόρο μέσω της περιοχής hilar του καλύμματος του σπόρου της μπάμιας (εικόνα 2). Οι Serrato et al., (1992) ανέφεραν ότι η περιοχή που ελέγχει την είσοδο του νερού είναι η περιοχή chalazar. Παρόλα αυτά, οι Maria et al., (2007) σημείωσαν ότι η μεσοφυλλική γραμμή που είναι υψηλά λιγνιτοποιημένη, μπορεί να συνεισφέρει στην σκληρότητα του σπόρου (εικόνα 3). Επιπλέον δίνουν έμφαση στο ότι οι ποικιλίες της μπάμιας διαφέρουν στην διαπερατότητα και κατ' επέκταση ο λήθαργος μπορεί να οφείλεται στην ποσότητα υποστρωμάτων όπως η λιγνίνη στο κάλυμμα των σπόρων και συγκεκριμένα στην περιοχή hilar. Λιγνίνη έχει βρεθεί ότι απουσιάζει από την μεσοφυλλική σειρά της περιοχής hilar και από άλλους τομείς του καλύμματος του σπόρου στις διάφορες ποικιλίες μπάμιας (Maria et al., 2007). Αυτά τα συστατικά έχουν υδρόφοβο χαρακτήρα και λειτουργούν σαν εμπόδια στην είσοδο του νερού διαμέσου του καλύμματος του σπόρου (Boesewinkel & Bouman 1995).



Εικόνα 4 (εγκάρσια τομή) Χρώση σπόρου με Phloroglucinol: Χρώση κόκκινη έως σκούρα κόκκινη: α. περιοχή καλύμματος σπόρου Clemson με 9% περιεκτικότητα σε υγρασία και σε κάλυμμα σπόρου Clemson με 5% περιεκτικότητα σε υγρασία. Pal πασσαλώδη σειρά κυττάρων, Mes – μεσοφυλλική σειρά, PR – πρισματική Tr – μεταφοράς TW – ελικοειδής

Αρκετοί συγγραφείς έχουν αναφέρει ότι, όταν η περιεκτικότητα του σπόρου σε υγρασία ήταν υψηλή, δεν παρατηρήθηκαν σκληροί σπόροι (Ellis et al. 1985, Standifer et al. 1989). Φαίνεται ότι μειώνοντας την περιεκτικότητα σε υγρασία των σπόρων, προκαλείται λιγνιτοποίηση της μεσοφυλλικής σειράς και το κάλυμμα του σπόρου γίνεται σκληρό και αδιαπέραστο στο νερό, κάτι που καλείται σκληρότητα. Όπως είναι προφανές από την εικόνα 4 η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε υγρασία (5% σε σύγκριση με εκείνη 9%) δημιουργεί το πολύ σκούρο κόκκινο χρώμα σε αυτή την περιοχή.

1.8 Παράγοντες που επιδρούν στην ποιότητα του σπόρου

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στους λοβούς της μπάμιας και στην ποιότητα του σπόρου συμπεριλαμβανομένου της εμφάνισης της σκληρότητας είναι: Η θερμοκρασία κατά την περίοδο ανάπτυξης του φυτού, η ανομβρία, το μήκος της ημέρας, η εφαρμογή λιπάσματος, οι φυτικοί αυξητικοί παράγοντες (όπως GA, CCC), τα στάδια ωριμότητας των σπόρων και των λοβών, οι συνθήκες ξήρανσης λοβών και σπόρων, αποθήκευση σπόρου και οι συνθήκες ξήρανσης λοβών. Μερικοί από τους παράγοντες αυτούς θα εξεταστούν παρακάτω.

1.8.1 Επίδραση λιπάσματος στην ποιότητα του σπόρου

Το λίπασμα είναι ένας επιπλέον παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την σκληρότητα του σπόρου. Αν και η μπάμια αποκρίνεται θετικά στα διάφορα φυτικά θρεπτικά συστατικά (Mishra και Singh, 2005), όμως στην περίπτωση της βλαστικότητας του σπόρου, η τελευταία δεν επηρεάζεται από την εφαρμογή λιπάσματος (Anjum and Amjad 1999, Amjad et al., 2001). Τα προτεινόμενα επίπεδα αζώτου ποικίλουν, πιθανότατα εξαιτίας των διαφορών στους γενότυπους, το χόμα και τις κλιματικές συνθήκες. Για παράδειγμα στην Ελλάδα τα προτεινόμενα επίπεδα λίπανσης είναι 25-30 kg/ha N, 30-35 kg/ha P και 55-60 kg/ha K (Ρεκούμη et al., 2003) τα οποία είναι όμοια με εκείνα που προτείνονται για την Αμερική από τον Lamont (1999).

Στο πείραμα τους οι Uwah et al. (2010) συμπέραναν ότι, ο μεγαλύτερος αριθμός λοβών ανά φυτό μπάμιας αποκτήθηκε με εφαρμογή N 80kg/h. Αντίθετα οι Ahmad και Tulloch-Reid (1968) παρατήρησαν ότι η εφαρμογή πάνω από 12kg /ha ποσοστό αζωτούχου λιπάσματος επηρέασε αρνητικά την σοδειά της μπάμιας. Σε πείραμα σποροπαραγωγής ο μέγιστος αριθμός λοβών ανά φυτό (10,69) και η μέγιστη απόδοση σπόρου (1374,9kg/ha) παρατηρήθηκαν σε αγροτεμάχια τα οποία είχαν προσλάβει 150kg/ha N και 90 kg/ha P (Sajid et al., 2012). Φαίνεται ότι ο μεγαλύτερος αριθμός λοβών ανά φυτό μπορεί να οφείλεται στη ζωτικότητα του φυτού και στο μεγαλύτερο αριθμό φύλλων από την ταυτόχρονη εφαρμογή νιτρικών και φωσφορικών. Ο Sadat (2000) συμπέρανε ότι ο αριθμός των λοβών ανά φυτό αυξήθηκε σημαντικά από την εφαρμογή λιπάσματος N, P και K. Η απόδοση σπόρου εξαρτάται από τον αριθμό των λοβών, από τον αριθμό των σπόρων και από το μέσο βάρος σπόρων ανά λοβό. Όπως οι ποικιλίες διαφέρουν σε αυτές τις παραμέτρους έτσι και η απόδοση σπόρου ανά φυτό ποικίλει ανάμεσα τους. Ο Sarnaik et al., (1986) πέτυχε τη μέγιστη απόδοση σπόρου με 120 kg ha⁻¹ N και 60kg ha⁻¹ P αντίστοιχα. Επίσης οι Lenka et al., (1989) πέτυχαν ικανοποιητική απόδοση σπόρου με 30kg P₂O₅ ha⁻¹. Οι Manga και Mohammed (2006) συμπέραναν ότι η εφαρμογή αζώτου αύξανε το ύψος του φυτού και τον αριθμό των καρπών ανά φυτό σε ποσότητα άνω των 120kg/ha.

Η αύξηση της ανάπτυξης εξαιτίας του αζώτου θα μπορούσε να οφείλετε στο ρόλο του αζώτου στην πρωτεϊνσύνθεση και στην οικοδόμηση των ιστών. Ο Saif et al. (2008) παρατήρησαν μέγιστο ύψος φυτού (99,5cm) μέσω εφαρμογής αζωτούχου λιπάσματος 120 kg/ha. Οι Humayun Khan et al., (2000) μέσω της μελέτης τους αποφάνθηκαν ότι το μέγιστο ύψος φυτού (185 cm), ο μέγιστος αριθμός λοβών ανά φυτό (24,59) και το μέγιστο μήκος λοβού (12,63cm) καταγράφηκαν σε αγροτεμάχια στα οποία είχε εφαρμοστεί λίπασμα σε αναλογία 120:90:60 Kg/ha N,P,K. Οι Humayun Khan et al., (2000) μέσω της μελέτης τους αποφάνθηκαν ότι το μέγιστο ύψος φυτού (185 cm), ο μέγιστος αριθμός λοβών ανά φυτό (24,59) και το μέγιστο μήκος λοβού (12,63cm) καταγράφηκαν σε αγροτεμάχια στα οποία είχε εφαρμοστεί λίπασμα σε αναλογία 120:90:60 Kg/ha. Η ποιότητα του σπόρου εκφρασμένη σε βάρος 100 σπόρων (μέγεθος σπόρου), σε ποσοστό και ζωτικότητα δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά εξαιτίας των επιπέδων αζώτου. Παρόλα αυτά, αυτές οι παράμετροι εμφανίζουν ξεκάθαρη βελτίωση με την αύξηση επιπέδων αζώτου πάνω από 160 kg/ha (Singh et al., 1999).

1.8.2 Επίδραση της περιόδου συγκομιδής στην βλάστηση του σπόρου και στα χαρακτηριστικά σπόρων και λοβών

Έχει παρατηρηθεί ότι, το ποσοστό της σκλήρυνσης του σπόρου αυξάνεται σημαντικά σε όλες τις ποικιλίες με την αύξηση της ωριμότητας των σπόρων. Αυτό είναι πιθανό να οφείλετε στην εναπόθεση ή ανάπτυξη σκληρής επιδερμίδας ή αδιαπέραστης κυτταρικής ζώνης του καλύμματος του σπόρου κατά την διάρκεια των τελευταίων σταδίων ανάπτυξης του σπόρου (El Balla et al., 2011). Ομοίως ο Egley και Elmore (1987) σημείωσε ότι η μη διαπερατότητα των σπόρων *crotalaria* (*Crotalaria spectabilis*) είχε αποκτηθεί κατά την διάρκεια των τελευταίων σταδίων ωρίμανσης στα πατρικά φυτά.

Οι Chauhan και Bhandri (1971) ανέφεραν ότι οι σπόροι που συλλέγονταν από φυτά μπάμιας 30 ημέρες μετά την άνθιση (DAA) είχαν το μέγιστο ποσοστό βλαστικότητας. Επίσης, ο El Balla (2011) ανέφερε ότι η βλαστικότητα του σπόρου της μπάμιας είχε το μέγιστο ποσοστό 27 με 30 ημέρες μετά την άνθιση (DAA). Ο Marcia Maria et al., (2008) συμπέρανε ότι οι σπόροι της μπάμιας που συλλέχτηκαν από 34 έως 41 ημέρες μετά την άνθιση είχαν την μέγιστη βλαστικότητα. Ενώ, ο Devir (1997) ανέφερε ότι, οι σπόροι της μπάμιας που συλλέχτηκαν μέχρι και την 32^η DAA απέτυχαν να βλαστήσουν σύντομα ξεκίνησαν να βλαστάνουν αυτοί που συλλέχτηκαν από την 36^η DAA, μετέπειτα το ποσοστό σκλήρυνσης του σπόρου άρχισε να αυξάνεται. Ωστόσο, στη Βραζιλία, ο Setubal et al. (1994) παρατήρησε ότι η αναλογία των σκληρών σπόρων αυξήθηκε σημαντικά όταν η συγκομιδή καθυστέρησε μέχρι την γήρανση του φυτού. Οι Passam et al., (1998) ανέφεραν ότι, η πρώιμη ή η όψιμη συγκομιδή των λοβών είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της βλαστικότητας των σπόρων.

Μελετώντας το «Ambrette» (*Abelmoschus moschatus* Medic.), οι Sundareswaran et al. 2011 συμπέραναν ότι το μήκος και η περίμετρος των λοβών αυξάνονταν ραγδαία μέχρι και την 28 ημέρα μετά την άνθιση. Μετέπειτα η αλλαγή σ' αυτές τις παραμέτρους ήταν ασήμαντη. Σημείωσαν επίσης ότι, ο αριθμός των σπόρων ανά λοβό κυμαίνονταν από 105 (14 DAA) μέχρι 89 (42 DAA). Επιπλέον η σημαντική αύξηση του βάρους 100 σπόρων μέχρι τις 35 DAA (1468 g) ενίσχυσε το γεγονός η ανάπτυξη του σπόρου συνεχίζεται μέχρι τις 30DAA. Στη μπάμια το βάρος του λοβού, το μήκος και ο αριθμός των σπόρων ανά λοβό, αυξήθηκαν βαθμιαία και προσέγγισαν το μέγιστο στις 18 – 24 ημέρες μετά την άνθιση και μετέπειτα μειώθηκαν (Dhankhar and Singh, 2009). Η ραγδαία ανάπτυξη του λοβού σε πρώιμα στάδια (9-13 HMA) συνοδεύεται από αύξηση της ποσότητας των σακχάρων όταν η μείωση στο βάρος των λοβών με την ολοκλήρωση της ανάπτυξης οφείλονταν στην αφυδάτωση και συρρίκνωση τους.

1.8.3 Επίδραση της ημερομηνίας σποράς στην ποιότητα του σπόρου

Η ημερομηνία σποράς και/ή ημερομηνία φύτευσης είναι ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να επιδράσει στην ποιότητα του σπόρου και στα χαρακτηριστικά των λοβών. Η ημερομηνία σποράς δεν επηρεάζει μόνο την βλαστικότητα του σπόρου και την emergence της μπάμιας στον αγρό αλλά και από την ανάπτυξη του φυτού (Yadav and Dhankhar, (1999), Amjad et al, (2001), Anjum and Amjad, (1999), Passau et al., 1998). Στο Μπαγκλαντές, οι Moniruaaman et al. (2007) συμπέραναν ότι η καλύτερη ποιότητα σπόρου μπάμιας αποκτήθηκε όταν οι σπόροι φυτευτήκαν στις 16 Φεβρουαρίου (88,7% ποσοστό βλαστικότητας) και στις 15 Μαρτίου (83,7% βλαστικότητα). Οι Dilruba et al., (2009) κατέγραψαν το μέγιστο αριθμό λοβών ανά φυτό (46,6) σε φυτά που η σπορά τους έγινε στις 6 Απριλίου. Παρομοίως, στην Νιγηρία οι Irimerin και οι Okey

(1986) ανέφεραν ότι η πρόωπη σπορά της μπάμιας οδηγεί σε περισσότερο ζωτικά φυτά συγκριτικά με την καθυστερημένη σπορά.

Dhankhar και Singh (2009) συμπέραναν ότι η περίοδος σποράς της μπάμιας για την σποροπαραγωγή ποικίλει στις διάφορες περιοχές και εξαρτάται από τις τοπικές αγροκλιματικές συνθήκες και συγκεκριμένα από την θερμοκρασία, το υψόμετρο και την βροχόπτωση. Επίσης Grewal et al., (1972) ανέφεραν μείωση στην απόδοση σπόρου στη ποικιλία μπάμιας Pusa Sawani η οποία σπάρθηκε μετά τις 20 Ιουνίου στην Ludhiana της Ινδίας ή μετά τις 15 Ιουλίου στο Μπαγκλαντές (Islam et al., 2000).

1.8.4 Επίδραση της περιεκτικότητας του σπόρου σε υγρασία

Η περιεκτικότητα του σπόρου σε υγρασία είναι ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να επιδρά στην σκλήρυνση του σπόρου. Καθώς ο σπόρος ωριμάζει και μειώνεται η περιεκτικότητα του σε υγρασία, το ποσοστό σκλήρυνσης του αυξάνει (El Balla et al., (2011); Quinlivan (1971); Ellis et al., (1985); Standifer et al., (1989) and Demir (2001). Οι El Balla et al., (2011) σημείωσαν ότι οι σπόροι της μπάμιας με 13% περιεκτικότητα σε υγρασία τείνουν να εμφανίζουν ελάχιστη ή καθόλου σκλήρυνση. Αντίθετα όταν οι σπόροι αφυδατώθηκαν και η περιεκτικότητα τους σε υγρασία μειώθηκε στο 4 - 6%, η σκλήρυνση έγινε κυρίαρχη. Παρομοίως ο Demir (1997), σημείωσε ότι, όταν η περιεκτικότητα των σπόρων που συγκομίσθηκαν 50 DAA μειώθηκε στο 10%, η σκλήρυνση του σπόρου αυξήθηκε στο 52 %.

Σύμφωνα με τον Seretto Valenti., (1991), το αδιαπέραστο στο νερό κάλυμμα του σπόρου και συγκεκριμένα τα εσωτερικά εφαιπτόμενα τοιχώματα των κυττάρων της ενδοδερμίδας εμποδίζουν την είσοδο του νερού τόσο στους σπόρους που εμφανίζουν σκλήρυνση όσο και σε εκείνους που δεν εμφανίζουν. Η μοναδική περιοχή από την οποία είναι εφικτή η είσοδος του νερού είναι η σχισμή chalazal η οποία καλύπτεται από ένα περιβλήμα φτιαγμένο από διαπερατό μητρικό ιστό. Το νερό εισέρχεται από το κάλυμμα του μητρικού ιστού εσωτερικά. Η διόγκωση των κυττάρων του τοιχώματος οδηγεί σε σπάσιμο του καλύμματος του σπόρου (Vanangamudi, et al., 2006).

1.8.5 Επίδραση τμημάτων του φυτού στη ποιότητα του σπόρου

Η θέση του λοβού στο φυτό έχει επίσης βρεθεί ότι μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του σπόρου. Οι Yadan και Dhankhar (2001) παρατήρησαν υψηλότερες τιμές στον αριθμό σπόρων ανά καρπό, μεγαλύτερο βάρος σπόρου, καλύτερη βλαστικότητα και απόδοση σπόρου σε καρπούς που συλλέχθηκαν από χαμηλότερη θέση στο φυτό. Αντίθετα χαμηλότερες τιμές σε αυτές τις παραμέτρους παρατηρήθηκαν σε σπόρους που συλλέχθηκαν από ανώτερα τμήματα του φυτού. Η μέγιστη ποιότητα σπόρων παρατηρήθηκε σε σπόρους που συλλέχθηκαν από λοβούς που αναπτύχθηκαν στα κατώτερα γόνата (μέχρι τον 8° γόνάτο) (Naik et al., (2004) Prabhakar et al., 1985). Αντιθέτως οι Perquerio et al., 2010 και Malik et al., (2000) ανέφεραν ότι σπόροι από λοβούς που εδράζονταν στο μέσο του φυτού είχαν υψηλότερη βλαστικότητα.

1.8.6 Επίδραση αυξητικών παραγόντων στη σποροπαραγωγή και την ποιότητα του σπόρου.

Οι φυτικοί αυξητικοί παράγοντες (αυξίνη, γεββερίλίνη, αμπσιζικό οξύ) χρησιμοποιούνται συχνά στην φυτική παραγωγή για την διέγερση και τον συγχρονισμό της άνθισης και της καρπόδεσης, την προώθηση του ριζικού συστήματος ή την πτώση των φύλλων (Briant 1974 και Ilias et al., 2007). Η εφαρμογή αυξητικών παραγόντων έχει βρεθεί ότι ενισχύει την βλαστική ικανότητα και ποιότητα των σπόρων της μπάμιας. Οι Ilias et al., 2007 σημείωσαν ότι το μήκος του βλαστού της μπάμιας ενισχύθηκε σημαντικά κατόπιν εφαρμογής εξωγενούς GA3.

1.8.7 Επίδραση του φορτίου του καρπού στην ποιότητα του σπόρου

Αφήνοντας διαφορετικό αριθμό καρπών στα μητρικά φυτά είναι μια ενέργεια που μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του σπόρου. Ο χειρισμός αναπαραγωγικών οργάνων (με απομάκρυνση ανθέων και καρπών) κινητοποιεί την ισορροπία αποθέματος και ζήτησης των αφομοιώσιμων στα φυτά τα οποία με την σειρά τους επηρεάζουν φυσιολογικές διαδικασίες όπως η φωτοσύνθεση, η αύξηση και η ανάπτυξη (Dhankar et al. 2009).

Η στοχευμένη απομάκρυνση αναπαραγωγικών οργάνων οδηγεί σε μεγαλύτερα αναπτυξιακά ποσοστά στα εναπομείναντα αναπαραγωγικά όργανα (καρποί) (Batt και Srinivasa Rao, 1993a).

1.8.8 Επίδραση της αποθήκευσης στην ποιότητα του σπόρου

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι λοβοί της μπάμιας εμφανίζουν υψηλό ποσοστό μεταβολισμού αλλά επειδή είναι ευπαθείς σε χαμηλές θερμοκρασίες δεν μπορούν να αποθηκευθούν σε θερμοκρασίες κάτω των 7 °C (Ryall και Lipton, 1979, Rekoumi et al., 2012). Οι μεγάλοι λοβοί (π.χ. Clemson Spineless) μπορούν να αποθηκευθούν ικανοποιητικά για 7-10 ημέρες στους 7-10 °C και 90-95% σχετική υγρασία (Lutz και Hardenburg, 1977). Παρόλο που η τροποποιημένη ατμόσφαιρα μπορεί να παρατείνει τον χρόνο ζωής κατά την αποθήκευση (Baxter και Waters, 1990a) και να βελτιώσει την ποιότητα του καρπού μειώνοντας την σκληρότητα και την εμφάνιση μικροβιακής αποσύνθεσης (Roy και Behera, 2009). Ακόμα και σε αερόβιες συνθήκες οι μεγάλοι λοβοί μπορούν να αποθηκευθούν μέχρι και 7 ημέρες χωρίς ουσιαστική αλλοίωση (Ryall και Lipton, 1979) ενώ οι μικροί λοβοί των Μεσογειακών ποικιλιών αλλοιώνονται μέσα σε 2-3 μέρες μετά την αποθήκευση (Passam και REkoumi, 2009, Rekoumi et al., 2012).

1.9 Μέθοδοι βελτίωσης της βλαστικότητας του σπόρου ωσμοβελτίωση και σκαριφικάρισμα scarification

Η επεξεργασία σπόρου ωσμοβελτίωση και άλλες επεξεργασίες (όπως σκαριφικάρισμα) έχουν χρησιμοποιηθεί στην φυτική παραγωγή με σκοπό να βελτιώσουν την βλαστική ικανότητα των σπόρων και την ανάρδοση των ριζιδίων κάτω από δυσμενείς συνθήκες (Heydekker et al., 1973, Rumpel και Szudyga 1978, Georgiou et al., 1982, Bradford, 1986). Δεν υπάρχει μόνο μία μέθοδος ωσμοβελτίωσης και η αποτελεσματικότητα της κάθε μεθόδου ποικίλει ανάμεσα στα είδη, τις ποικιλίες και στους σπόρους της ίδιας ποικιλίας.

Το σκαριφικάρισμα είναι μια άλλη μέθοδος, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για να αυξήσει την βλαστικότητα των σπόρων μπάμιας ελαχιστοποιώντας την σκληρότητά τους. Η χρήση H₂SO₄ (80%) ώστε να εξασθενήσει η επιδερμίδα των σκληρών σπόρων μπάμιας και να αυξηθεί η βλαστικότητα τους, έχει συχνά αναφερθεί (El-Siddig et al., 2001, Hermansen et al. 2000, Najdafi et al., 2006, Dankhar και Singh, 2009). Σύμφωνα με Hermansen και Baskin (1999), όσο περισσότερο χρόνο επωάζονται οι σπόροι στο οξύ τόσο πιο διαπερατή στο νερό γίνεται η επιδερμίδα. Είναι γνωστό ότι το πυκνό θειικό οξύ διαβρώνει τις βραχυσκληρίδες και τις οστεοσκληρίδες στην περιοχή των μικροπυλών. Σαν αποτέλεσμα το νερό περνάει διαμέσου της επιδερμίδας μέσω της μικροπύλης και επιτρέπει στον σπόρο να βλαστήσει.

1.10 Γενότυπος, φαινότυπος και φαινοτυπική πλαστικότητα

Το 1909 ο Wilhelm Johannsen διατύπωσε το θεμελιώδη διαχωρισμό του γενότυπου από τον φαινότυπο. Γενότυπος είναι το σύνολο των γονιδίων που κατέχει ένα άτομο ενώ ο φαινότυπος είναι το σύνολο των μορφολογικών, φυσιολογικών βιοχημικών και συμπεριφορικών χαρακτηριστικών ενός ατόμου. Η ποικιλομορφία των ατόμων προκύπτει ως αποτέλεσμα των συνδυαστικών επιδράσεων γενετικών διαφορών και επιρροών του περιβάλλοντος. Η φαινοτυπική ποικιλότητα δεν κληρονομείται απαραίτητα με τον κλασικό Μεντελικό τρόπο. Συγγενικά είδη (εκείνα που έχουν προέλθει πρόσφατα από έναν κοινό πρόγονο) δίνουν παραδείγματα όπου γενετική διαφοροποίηση έχει συμβεί πολύ συχνά με ελάχιστη μορφολογική αλλαγή. Παρόλα αυτά, σε κάποιες περιπτώσεις μορφολογική και μοριακή εξέλιξη έχει ξεκάθαρα συμβεί ταυτόχρονα. Ισχυρή κάθετη επιλογή μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλες μορφολογικές διαφοροποιήσεις με πολύ μικρή γενετική αλλαγή. Αντιθέτως μπορεί να υπάρξει μεγάλη γενετική διαφοροποίηση με ελάχιστη μορφολογική αλλαγή, αναγεννώντας τα επονομαζόμενα «κρυφά είδη».

Σε πολλές περιπτώσεις η φαινοτυπική ποικιλότητα επηρεάζεται από το περιβάλλον. Η φαινοτυπική πλαστικότητα, η οποία αποτελεί την ικανότητα του γονότυπου ενός ατόμου να αποκρίνεται στις περιβαλλοντικές επιδράσεις και έτσι να αναγεννά διαφορετικούς φαινότυπους σύμφωνα με τις τοπικές συνθήκες, είναι πιθανότατα αποτέλεσμα φυσικής επιλογής. Αυτή η κατάσταση μπορεί να είναι ένας σημαντικός

μηχανισμός επιβίωσης. Η μοριακή βάση της φαινοτυπικής πλαστικότητας σε μερικές περιπτώσεις οφείλεται σε διαφοροποιήσεις στο πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης. Οι πολυμορφικοί μορφολογικοί χαρακτήρες δεν μπορούν να αποτελέσουν τους ιδανικούς χαρακτήρες για την διερεύνηση πληθυσμιακών διαδικασιών γιατί μπορούν να επηρεάζονται ισχυρά από την φυσική επιλογή, και /ή το τοπικό περιβάλλον.

Στη μοριακή οικολογία για την παρακολούθηση αυτών των φαινομένων χρησιμοποιούνται ουδέτεροι γενετικοί δείκτες. Πρόκειται για περιοχές στο γονιδίωμα οι οποίες μπορούν να προσφέρουν πληροφορίες που έχουν αντιστοιχία στη δομή και στην ιστορία του πληθυσμού χωρίς να επηρεάζονται από τις περίπλοκες επιδράσεις περιβαλλοντικών παραγόντων και επιλογής. Οι μοριακές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία που διευκολύνουν τις οικολογικές ταυτοποιήσεις, αντιμετωπίζοντας δύο κύρια προβλήματα την αποσαφήνιση των ταξινομικών μονάδων και την ταυτοποίηση και ταξινόμηση των ατόμων στο επίπεδο του είδους έως και σε χαμηλότερες ταξινομικά επίπεδα (υποείδος, ποικιλία κτλ). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη χρήση μοριακών μεθόδων πολλές φορές δεν συμφωνούν με τα μορφολογικά και αυτό μπορεί να περιπλέξει περισσότερο την προσπάθεια για ταξινόμηση. Παρόλα αυτά όμως ο συνδυασμός μοριακών και δεδομένων άλλης μορφής οδηγεί σε ένα πιο ισχυρό συμπέρασμα σχετικά με την ταξινόμηση ή την ταυτοποίηση ατόμων.

1.11 Χαρακτηριστικά μοριακών δεικτών

Οι μοριακοί δείκτες για να είναι χρήσιμοι θα πρέπει να συγκεντρώνουν τα εξής γνωρίσματα:

- Παρουσία πολυμορφισμού (η δυνατόν η ύπαρξη πολλών αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο).
- Απλή κληρονομικότητα, που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχους αλληλομόρφους.
- Υψηλός συντελεστής κληρονομικότητας. Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων .
- Διασπορά και στην καλύτερη περίπτωση ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα .
- Ανεξαρτησία της βιωσιμότητας και του φαινότυπου των φυτών.
- Η μεθοδολογία αναγνώρισης να μην κοστίζει πολύ, να μην έχει αρνητικές συνέπειες στο φυτό και να είναι εύκολη και δυνατή κατά τα νεαρά στάδια ανάπτυξης των φυτών και συγκεκριμένα τα φυτά να αναπτυχθούν τόσο ώστε να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA.

Οι μοριακοί δείκτες λοιπόν διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: οι κυρίαρχοι (dominant) και οι συγκυρίαρχοι (co-dominant). Οι συγκυρίαρχοι μας δίνουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουμε όλα τα αλληλόμορφα που είναι παρόντα σε ένα γενετικό τόπο, ενώ οι κυρίαρχοι αποκαλύπτουν μόνο το επικρατές. Αυτό βέβαια έχει ως αποτέλεσμα, τα δεδομένα των συγκυρίαρχων δεικτών να είναι πιο ακριβή από τα αντίστοιχα των κυρίαρχων, αν και οι κυρίαρχοι δείκτες απαιτούν λιγότερο χρόνο ανάπτυξης και ως εκ τούτου είναι πιο κατάλληλοι για την γρήγορη συγκέντρωση δεδομένων.

1.12 Μεθοδολογίες μοριακών δεικτών

Η φύση των μοριακών δεικτών εξαρτάται άμεσα από τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για την αξιοποίησή τους σε προγράμματα βελτίωσης όπως και σε προγράμματα ταυτοποίησης και πιστοποίησης γενετικού υλικού. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθοδολογίες είναι οι εξής:

1.12.1 Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (RFLP)

Οι RFLP χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στην κατασκευή γενετικών χαρτών από τους Botstein et al., 1980 οι συγκυρίαρχοι δείκτες RFLP μπορούν να ανιχνεύσουν τμήματα DNA από όλα τα ομόλογα χρωμοσώματα. Είναι πολύ αξιόπιστοι δείκτες στη γενετική σύνδεση και breeding και μπορούν εύκολα να προσδιορίσουν αν ένα συνδεδεμένο χαρακτηριστικό είναι παρόν σε ομόζυγη ή ετερόζυγη κατάσταση σε ένα άτομο, μια πληροφορία που είναι ιδιαίτερα επιθυμητή σε υπολειπόμενους χαρακτήρες. Παρόλα αυτά η χρησιμότητα της, παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς εξαιτίας την μεγάλης ποσότητας DNA που απαιτεί για την πέψη με περιοριστικά ένζυμα καθώς και την εφαρμογή της τεχνικής Southern Blotting. Επιπλέον η μεθοδολογία RFLP

χαρακτηρίζεται από υψηλό κόστος και είναι αρκετά χρονοβόρα και μόνο ένας δείκτης ανάμεσα σε πολλούς που ελέγχονται μπορεί να είναι πολυμορφικός με αποτέλεσμα αυτό να μην οδηγεί σε αξιόπιστα συμπεράσματα ειδικά για στενά συγγενικά είδη. Η ανικανότητα τους να καθορίσουν αλλαγή μίας μόνο βάσης περιορίζει την χρήση τους σε ανιχνεύσεις σημειακών μεταλλάξεων που συμβαίνουν σε επίπεδο πληθυσμού στους οποίους εξετάζονται οι πολυμορφισμοί.

Τα RFLPs ανιχνεύονται με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων τα οποία κόβουν το γονιδιωματικό DNA σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και έτσι παράγουν ποίκιλα μεγέθη τμημάτων DNA. Η ταυτοποίηση των τμημάτων DNA πραγματοποιείται με ανάλυση κατά Southern, μια διαδικασία κατά την οποία τα τμήματα DNA αφού διαχωριστούν σε πήκτωμα αгарόζης με ηλεκτροφόρηση μεταφέρονται σε φίλτρο νιτροκυταρίνης. Το φίλτρο στη συνέχεια αφήνεται να υβριδοποιηθεί με ραδιενεργά σημασμένο ανιχνευτή DNA (κλωνοποιημένα τμήματα γενωμικού DNA ή cDNA 500-3000bp). Το πρότυπο ζωνών παρατηρείται με αυτοραδιογραφία.

Η PCR-RFLP αποτελεί μια τροποποίηση της βασικής μεθόδου που περιγράφεται πιο πάνω. Το πρώτο βήμα της ανάλυσης είναι η ενίσχυση του τμήματος που περιέχει τον πολυμορφισμό. Έπειτα ακολουθεί πέψη του ενισχυμένου τμήματος DNA με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού. Η παρουσία ή η απουσία της περιοχής που αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιορισμού οδηγεί στον σχηματισμό περιοριστικών τμημάτων διαφορετικού μεγέθους και η αναγνώριση των αλληλομόρφων μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση. Μερικά από τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ο εύκολος σχεδιασμός της, το μικρό κόστος και η χρήση απλού εξοπλισμού. Από την άλλη πλευρά όμως απαιτεί συγκεκριμένα ένζυμα περιορισμού και υπάρχει δυσκολία στην ταυτοποίηση της ακριβούς ποικιλομορφίας από την στιγμή που πολυάριθμα SNPs επηρεάζουν την ίδια περιοχή αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού.

1.12.2 Απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (SSRs)

SSRs είναι μικρές επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες. Οι επαναλαμβανόμενες περιοχές αποτελούνται από μικρές συνεχείς επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 2, 3 ή 4 νουκλεοτιδίων. Το μήκος της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας ποικίλει σημαντικά, με τα διάφορα αλληλομόρφα να ποικίλουν στον αριθμό των μονάδων των επαναλαμβανόμενων μοτίβων. Η ποικιλομορφία στον αριθμό των επαναλαμβανόμενων μονάδων είναι και τυπικά η βάση των παρατηρούμενων πολυμορφισμών. Οι επαναλαμβανόμενες αυτές αλληλουχίες παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό σε πολλά γονιδιώματα και συχνά έχουν αρκετά ευδιάκριτη αλληλομορφία ανά τόπο και επίσης υψηλή συχνότητα ετεροζυγωτίας στους διάφορους πληθυσμούς. Οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται με την ενίσχυση γνωστών γενετικών τόπων με συγκεκριμένους εκκινητές συμπληρωματικούς των αλληλουχιών εκατέρωθεν των άκρων τους. Εμφανίζονται σαν ζώνες ηλεκτροφόρησης διαφορετικού μεγέθους που οφείλονται στις διαφορές των επαναλαμβανόμενων απλών αλληλουχιών και χαρακτηρίζονται από συγκυριαρχία. Το πλεονέκτημα αυτό επιτρέπει την εύκολη διάκριση των ετεροζυγωτών ατόμων. Η ταυτοποίηση κατάλληλων γενετικών τόπων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες με τις μεθοδολογίες αυτές απαιτεί εξειδικευμένες διαδικασίες κλωνοποίησης τμημάτων DNA και προσδιορισμό της αλληλουχίας εκατέρωθεν των άκρων ώστε να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές. Αυτό αποτελεί σοβαρό μειονέκτημα γιατί απαιτεί: α) αυξημένο κόστος, β) απαιτεί σχετικά σημαντικό χρόνο.

1.12.3 Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD)

Το 1991 οι Welsh και McClelland ανακαλύπτουν μια νέα μεθοδολογία που εμπλέκει την PCR το τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA. Η μέθοδος του τυχαίου πολυμορφικού DNA (RAPD) βασίζεται στην ανάπτυξη μοριακών δεικτών με την χρήση τυχαίων εκκινητών, κυρίως δεκαμερών και με την βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Σε αντίθεση με την παραδοσιακή PCR ανάλυση η RAPD δεν απαιτεί συγκεκριμένη γνώση της αλληλουχίας DNA του οργανισμού που μελετάται και χρησιμοποιείται ένας μόνο εκκινητής ανά αντίδραση. Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA δημιουργούνται μόνο στις περιοχές του γονιδιώματος που υβριδίζεται ο εκκινητής με κατάλληλο προσανατολισμό σε μια απόσταση 300 έως 3000 βάσεις. Πιο συγκεκριμένα τα μονόκλωνα μόρια του γονιδιώματος μετά από αποδιάταξη υβριδίζονται κατά προτίμηση με τον εκκινητή λόγω αυξημένης συγκέντρωσης του. Ένας εκκινητής έχει μια καθορισμένη αλληλουχία αλλά η αλληλουχία αυτή είναι τυχαία. Έτσι υπάρχει δυνητικά ένας απεριόριστος αριθμός εκκινητών RAPD με συγκεκριμένες αλληλουχίες. Ο εκκινητής μπορεί να υβριδίζεται σε εκατοντάδες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα, όμως μόνο εκείνοι που υβριδίζονται σε δύο θέσεις στις αντίθετες αλυσίδες του DNA μέσα σε 300-3000 βάσεις έχουν σαν αποτέλεσμα τη παραγωγή και εμφάνιση ζωνών μετά το πέρας της PCR. Ουσιαστικά ο

κάθε εκκινητής οδηγεί σε ενίσχυση αρκετών τόπων στο γονιδίωμα, κάνοντας την τεχνική χρήσιμη για οπτικοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ανάμεσα στα είδη. Παρόλα αυτά εξαιτίας της ενίσχυσης του DNA με τυχαίους εκκινητές είναι σημαντικό να βελτιστοποιούνται και να παραμένουν οι συνθήκες της αντίδρασης σταθερές για την επαναληψιμότητα του ενισχυμένου DNA. Οι RAPD δείκτες είναι κυρίαρχοι δείκτες και γι αυτό έχουν ορισμένους περιορισμούς στην χρήση τους στην χαρτογράφηση. Εμφανίζονται σε ομόζυγη ή ετερόζυγη κατάσταση στη επόμενη γενία που περιέχει το αλληλόμορφο που ενισχύεται και δεν εμφανίζεται στη γενία που είναι ομόζυγη για το αλληλόμορφο που δεν ενισχύεται. Ο κύκλος υβριδισμού, αποδιάταξης και πολυμερισμού επαναλαμβάνεται με αποτέλεσμα τη λογαριθμική αύξηση της συγκέντρωσης του τμήματος του γονιδιώματος που ενισχύθηκε. Τέλος τα προϊόντα της ενίσχυσης του πολυμερισμού διαχωρίζονται σε gel αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης.

1.13 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστούν σε 4 ποικιλίες μπάμιας κάποιοι από τους παράγοντες που επιδρούν στην απόδοση και ποιότητα του σπόρου. Γι αυτό το σκοπό μελετήθηκε η επίδραση της εφαρμογής διαφορετικών επιπέδων αζώτου στη ποιότητα του σπόρου συναρτήσει της περιόδου συγκομιδής και της ημερομηνίας σποράς. Επιπρόσθετα διερευνήθηκε η ύπαρξη γενετικών διαφορών στο DNA των 4^{ων} ποικιλιών με χρήση μοριακών δεικτών RAPD.

Κεφάλαιο 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

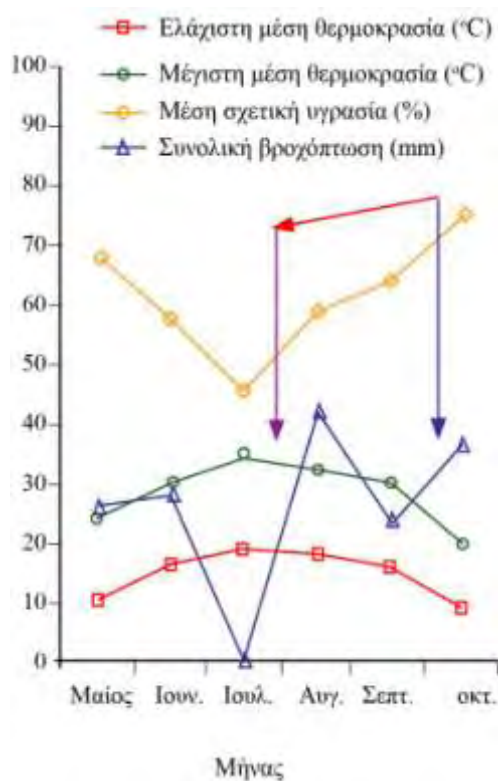
2.1 Υλικά

2.1.1 Πειραματικές συνθήκες

Το πείραμα διεξήχθη στον πειραματικό αγρό του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο, κατά την αναπτυξιακή περίοδο του 2011. Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν σπόροι μπάμιας τεσσάρων διαφορετικών ποικιλιών «Μπογιατίου», «Βελοούδο», «Πυλαίας», «Clemson». Η σύσταση του χώματος στο οποίο πραγματοποιήθηκε το πείραμα αποτελούνταν από 48% S, 29% Si, 23% C και 1.3% οργανική ύλη με pH 7.9.

Οι κλιματικές συνθήκες

Οι κλιματικές συνθήκες στον πειραματικό αγρό παρουσιάζονται στο διάγραμμα 1. Από το Μάιο έως τον Ιούνιο η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά και έπειτα μειώθηκε έως τον Οκτώβριο. Παρατηρήθηκε διαφορά 12-16 °C μεταξύ ελάχιστης και μέγιστης θερμοκρασίας κατά την πειραματική περίοδο. Δεν υπήρξε καθόλου βροχόπτωση κατά τον Ιούλιο αλλά τους υπόλοιπους μήνες κυμάνθηκε 23 μέχρι 43 mm. η σχετική υγρασία ήταν ελαχίστη τον Ιούλιο αλλά μετέπειτα αυξήθηκε προοδευτικά και δεν παρατηρήθηκε καθόλου βροχόπτωση. Αυτό σημαίνει ότι με το πέρασμα των ημερών από την χρονική στιγμή της άνθισης (από 30-50 HMA) οι λοβοί εκτίθονταν σταδιακά σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αλλά υψηλότερη υγρασία.



Διάγραμμα 1. Κλιματικές συνθήκες στο πειραματικό αγρό κατά την διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου (τα βέλη δείχνουν την διάρκεια της συγκομιδής λοβών)

2.1.2 Εξαγωγή DNA με μέθοδο CTAB

Φυτικά Υλικά

Σπόροι τεσσάρων ποικιλιών μπάμιας (Μπογιατίου, Βελούδο, Πυλαίας και Clemson), φυτεύτηκαν σε πλαστικά γλαστράκια. Με την πάροδο τριών εβδομάδων πραγματοποιήθηκε συλλογή νεαρών φύλλων από την κορυφή του φυτού από τα οποία έγινε η εξαγωγή του DNA.

Διαλύματα CTAB μεθόδου εξαγωγής DNA

1) CTAB extraction Buffer το οποίο περιέχει:

- α) 10% CTAB w/v
- β) 75 mM Tris-HCl pH 8 (stock 1M)
- γ) 15 mM EDTA pH 8 (stock 500mM)
- δ) 1M NaCl (stock 5M)
- ε) 1% v/v b-mercaptoethanol

2) CTAB precipitation Buffer το οποίο περιέχει:

- α) 1% CTAB w/v
- β) 50 mM Tris-HCl pH 8
- γ) 10 mM EDTA pH 8

3) CTAB in water

- α) 10% w/v CTAB

2.1.3 RAPD ανάλυση

Αντίδραση PCR

Για την διεξαγωγή της μεθόδου PCR χρησιμοποιήθηκε το KAPATaq™ PCR kit της εταιρείας KAPA BIOSYSTEMS το οποίο περιελάμβανε: 5x KAPATaq Buffer, 25mM MgCl₂, dNTPs mix (10mM each), 1U/μl KAPATaq DNA πολυμεράση (5U/μl).

Η ενίσχυση του DNA των τεσσάρων ποικιλιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 30 δεκαμερείς μονομερείς εκκινητές (πίνακας 3).

primers	5' to 3'	primers	5' to 3'
OPX 17	GACACGGACC	OPT 01	GGGCCACTCA
OPX 18	GAC TAG GTG G	OPT 02	GGAGAGACTC
OPX 14	ACAGGTGCTG	OPT 04	CACAGAGGGA
OPB 15	GGAGGGTGTT	OPD 05	TGAGCGGACA
OPB 16	TTTGCCCGGA	OPAN01	ACT CCA CGT C
OPB 07	GGTGACGCAG	OPAE03	CAT AGA GCG G
OPY 18	GACTAGGTGG	GL K02	GTCTCCGCAA
OPY 02	CATCGCCGCA	GL K08	GAACACTGGG
OPY 03	ACAGCCTGCT	GL J20	AAGCGGCCTC
OPM 16	GTAACCAGCC	GL J14	CACCCGGATG
OPM 18	CACCATCCGT	GL A09	GGGTAACGCC
OPV 08	GGACGGCGTT	GL B17	AGGGAACGAG
OPV 06	ACGCCCAGGT	UBC 54	GTC CCA GAG C
OPV 07	GAAGCCAGCC	UBC292	AAA CAG CCC G
OPA 02	TGCCGAGCTG	UBC210	GCA CCG AGA G

Πίνακας 3: αλληλουχία μονομερών εκκινητών

2.1.4 Παρασκευή gel αгарόζης

Για τη παρασκευή του gel αгарόζης χρησιμοποιήθηκε:

- 0.5x TBE (Tris Base, Boric acid, EDTA),
- 1.5% αгарόζη και
- Βρωμιούχο Αιθίδιο

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Σπορά

Σπόροι από τις τέσσερις ποικιλίες μπάμιας (Μπογιατίου, Βελούδο, Πυλαίας και Clemson) φυτεύτηκαν σε κιβώτια σποράς την 1η και 20η Μάιου αντίστοιχα (πείραμα 1 και πείραμα 2 αντίστοιχα). Τα κιβώτια τοποθετήθηκαν σε ελεγχόμενη θερμοκρασία (20°C) μέχρι να μεταφυτευθούν στον αγρό.

2.2.2 Μεταφύτευση

Τα νεαρά φυτά του πειράματος 1 και 2 στο στάδιο των 3-4 φύλλων, με την πάροδο των 20 ημερών από την σπορά στα κιβώτια σποράς, μεταφυτεύθηκαν στον πειραματικό αγρό του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο. Η μεταφύτευση των νεαρών φυτών έγινε σε σειρές οι οποίες απείχαν μεταξύ τους 1 μέτρο. Τα νεαρά φυτά κάθε σειράς μεταφυτευθήκαν σε απόσταση 20 εκατοστών το ένα από το άλλο.

2.2.3 Επεμβάσεις

Εφαρμογή λιπάσματος

Για την μελέτη της επίδρασης της αζωτούχας λίπανσης στα χαρακτηριστικά λοβών και σπόρων (πείραμα 1 και πείραμα 2) τόσο συναρτήσει της περιόδου συγκομιδής όσο και συναρτήσει της συγκομιδής από διαφορετικά τμήματα του φυτού χρησιμοποιήθηκαν τρία επίπεδα λιπάσματος τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου, με σταθερή όμως συγκέντρωση καλίου και φώσφορου:

- F₁ (control): 150 mg L⁻¹ N, 150 mg L⁻¹ P και 150 mg L⁻¹ K
- F₂: 300 mg L⁻¹ N, 150 mg L⁻¹ P και 150 mg L⁻¹ K
- F₃: 450 mg L⁻¹ N, 150 mg L⁻¹ P και 150 mg L⁻¹ K

Η εφαρμογή του λιπάσματος επαναλαμβανόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (μία φορά την εβδομάδα) σε δόση του 0.5 L ανά φυτό.

Αρδευση και εφαρμογή ζιζανιοκτόνου.

Η καλλιέργεια αρδεύτηκε κανονικά σε εβδομαδιαία βάση με αρδευτικό σύστημα σταγόνας, ενώ για τον έλεγχο των ζιζανίων εφαρμόστηκε Fusilade Herbicide (fluazifop-P-butyl, 800 ml/1000 m²) όταν αυτό κρινόταν απαραίτητο.

Συγκομιδή και καταγραφή άνθισης

Για την μελέτη της επίδρασης της περιόδου συγκομιδής στα χαρακτηριστικά λοβών και σπόρων πραγματοποιήθηκε συγκομιδή λοβών σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές ως εξής:

- T₁ = 30 ημέρες μετά την άνθιση (HMA)
- T₂ = 35 ημέρες μετά την άνθιση
- T₃ = 40 ημέρες μετά την άνθιση
- T₄ = 50 ημέρες μετά την άνθιση

Για κάθε χρονική περίοδο 5 λοβοί από κάθε φυτό επιλέχθηκαν τυχαία και καταγράφηκε ο μέσος αριθμός σπόρων ανά λοβό και το βάρος 100 σπορών. Η πρώτη άνθιση καταγράφηκε στις 33 και στις 26 ημέρες μετά την μεταφύτευση για το πείραμα 1 και 2. Κάθε άνθος καταγραφόταν σε καθημερινή βάση με τοποθέτηση ετικέτας όπου αναγραφόταν η ημερομηνία άνθισης, η θέση του άνθους στο φυτό κλπ.

2.2.4 Μετρήσεις

Τεστ βλαστικότητας

Το τεστ βλαστικότητας σχεδιάστηκε χρησιμοποιώντας 100 σπόρους ανά εφαρμογή, με τέσσερις επαναλήψεις των 25 σπόρων η μία (ISTA, 2009). Οι σπόροι αποστειρώθηκαν με υδροχλωρικό οξύ (46%). Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δισκία Petri πάνω σε διπλής σειράς διηθητικό χαρτί Wathman No 1. Κατόπιν προστέθηκε αποσταγμένο νερό και μυκητοκτόνο Mancozeb. Τέλος όλα τα δισκία Petri τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25°C για 21 ημέρες. Κάθε δύο μέρες πραγματοποιούνταν έλεγχος στα Petri δισκία. Οι σπόροι που βλάστουν καταμετρούνταν και απομακρύνονταν. Σε περίπτωση απώλειας υγρασίας, γινόταν προσθήκη νερού. Οι σπόροι θεωρείται ότι έχουν βλαστήσει όταν η άκρη της ρίζας έχει αναπτυχθεί ελεύθερα από το κάλυμμα του σπόρου. Σπόροι με σκληρότητα θεωρούνται αυτοί οι οποίοι δεν έχουν βλαστήσει μετά την πάροδο των 21 ημερών στο θάλαμο επώασης, σύμφωνα με την αναφορά της ISTA για τα χαρακτηριστικά των σκληρών σπόρων. Το ποσοστό βλαστικότητας υπολογίστηκε από τον ακόλουθο τύπο (εικόνα 5) (ISTA 2009):

$$\text{Βλαστικότητα (\%)} = \frac{\text{αριθμός των σπόρων που βλάστησαν}}{\text{αριθμός των σπόρων που ελέγχθηκαν}} \times 100$$

Εικόνα 5. Τύπος υπολογισμού ποσοστού βλαστικότητας

Καταγραφή Δεδομένων

Κατά την διάρκεια του πειράματος καταγράφηκαν τα ακόλουθα δεδομένα:

- Αριθμός ανθέων ανά φυτό
- Αριθμός λοβών ανά φυτό
- Μέσος αριθμός σπόρων ανά λοβό
- Βάρος σπόρων ανά 100
- Μέση βλαστικότητα σπόρου

Στατιστική ανάλυση

Τα δύο πειράματα διεξήχθησαν με την χρήση πλήρους τυχαιοποιημένου σχεδιασμού κατά Blocks με 3 επαναλήψεις (n=3), (3x12=36 plots(2*2m) και 10 φυτά σε κάθε plot. Η Στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του S.A.S στατιστικού πακέτου (SAS Institute Inc., USA) και της σύγκρισης των μέσων σύμφωνα με το Duncan Multiple Range Test (DMRT) και τη μέθοδο LSD (Least Significant Difference) σε $p < 0,05$. Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με τη χρήση Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA).

2.2.5 Εξαγωγή DNA με μέθοδο CTAB

Παρασκευή Διαλυμάτων

Για την εξαγωγή του DNA απαιτήθηκε η παρασκευή τριών διαλυμάτων. Το διάλυμα CTAB extraction Buffer παρασκευάστηκε από τα εξής διαλύματα: 10% CTAB w/v, 75 mM Tris-HCl pH 8 (stock 1M), 15 mM EDTA pH 8 (stock 500mM), 1M NaCl (stock 5M) σε τελικό όγκο 20 mL 1% v/v b-mercaptoethanol. Έπειτα τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο για 5 λεπτά. Το διάλυμα CTAB precipitation Buffer παρασκευάστηκε από τα εξής διαλύματα: 1% CTAB w/v, 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8 σε τελικό όγκο 20 mL. Το διάλυμα CTAB water παρασκευάστηκε από 10% w/v CTAB σε τελικό όγκο 5 mL. Τέλος τοποθετήθηκε για 5 λεπτά στο υδατόλουτρο.

Πειραματική διαδικασία εξαγωγής DNA

Από τα φύλλα που συλλέχθηκαν από τις τέσσερις ποικιλίες μπάμιας ζυγίσαμε 1g φύλλο κάθε ποικιλίας. Έπειτα τα φύλλα κόπηκαν σε πολύ μικρά κομμάτια με την χρήση ενός ψαλιδιού. Τοποθετήθηκαν σε τέσσερα σκεύη και προστέθηκε σταδιακά υγρό άζωτο πιέζοντας ταυτόχρονα με το γουδί μέχρις ότου γίνουν σκόνη. Σκόνη από τα τέσσερα δείγματα τοποθετήθηκαν σε τέσσερα σωληνάκια erpendorf και το κάθε δείγμα ζυγίστηκε. Έπειτα σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 750 μ l από το διάλυμα CTAB extraction Buffer έτσι ώστε η σκόνη να διαλυθεί πλήρως και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο στους 65°C για περίπου 90 λεπτά. Στο διάστημα αυτό γινόταν ήπια ανάδευση κάθε 15 λεπτά. Κατόπιν αφού ισομοιράστηκε η ποσότητα κάθε δείγματος σε δύο νέα σωληνάκια erpendorf προστέθηκε ίση ποσότητα χλωροφόρμιο με την ποσότητα κάθε νέου δείγματος. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 14.000 rpm. Το υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάκι erpendorf των 2 ml και η διαδικασία επαναλήφθηκε μία επιπλέον φορά. Στο τελικό υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος έγινε προσθήκη 0,1 του υπερκείμενου όγκου του 10% CTAB water και τα δείγματα ανακινήθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστέθηκε στα δείγματα 1,5 του υπερκείμενου όγκου CTAB precipitation Buffer και ανακινήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Κατόπιν τα δείγματα τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο για 20 λεπτά στις 14.000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα κάθε δείγματος ξηράνθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 200 μ l H₂O, 20 μ l 3M CH₃COONa και 200 μ l ισοπροπανόλη σε κάθε δείγμα και κατόπιν φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 rpm για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Στο ίζημα ξεπλύθηκε προσεκτικά με 70% αιθανόλη και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά και απομακρυνθήκαν οι τελευταίες σταγόνες αιθανόλης. Το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Τέλος επαναδιαλύθηκε το ίζημα κάθε δείγματος με προσθήκη 50 μ l TE Buffer.

2.2.6 RAPD ανάλυση

Η ενίσχυση του DNA των τεσσάρων ποικιλιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 30 δεκαμερείς μονομερείς εκκινητές (πίνακας εκκινητών). Για την ενίσχυση του DNA της ποικιλίας «Μπογιατίου» και «Clemson» η αντίδραση PCR σχεδιάστηκε σε τελικό όγκο 20 μ l και περιείχε: 1x KAPATaq Buffer (4 μ l) (stock 5x), 2.5mM MgCl₂ (2 μ l) (stock 25mM), 0.1 mM dNTPs (0,2 μ l), 1U/ μ l KAPATaq DNA pol (0.2 μ l) (stock 5U), primer 2 μ l, DNA 2.5 μ l, 9.1 μ l H₂O. Για την ενίσχυση του DNA της ποικιλίας «Βελούδο» και «Πυλαίας» η αντίδραση PCR σχεδιάστηκε σε τελικό όγκο 20 μ l και περιείχε: 1x KAPATaq Buffer (4 μ l) (stock 5x), 2.5mM MgCl₂ (2 μ l) (stock 25mM), 0.1 mM dNTPs (0,2 μ l), 1U/ μ l KAPATaq DNA pol (0.2 μ l) (stock 5U), primer 2 μ l, DNA 1.5 μ l, 10.1 μ l H₂O. Η ενίσχυση έλαβε χώρα στον θερμοκυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίστηκε με τα εξής δεδομένα 94°C για 4 λεπτά, (94°C για 1 λεπτό, 37°C για 1 λεπτό 72°C για ένα λεπτό) επί 34 κύκλους, 72°C για 5 λεπτά και τέλος στους 4°C για συντήρηση. Στα προϊόντα της αντίδρασης προστέθηκε 6x loading buffer και στην συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε 1.5% gel αгарόζης που περιείχε 10 μ l βρωμιούχο αιθίδιο. Τα προϊόντα αφέθηκαν να διαχωριστούν στην ηλεκτροφόρηση για 1 ώρα. Τέλος τα gel παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν στο UV.

Κεφάλαιο 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

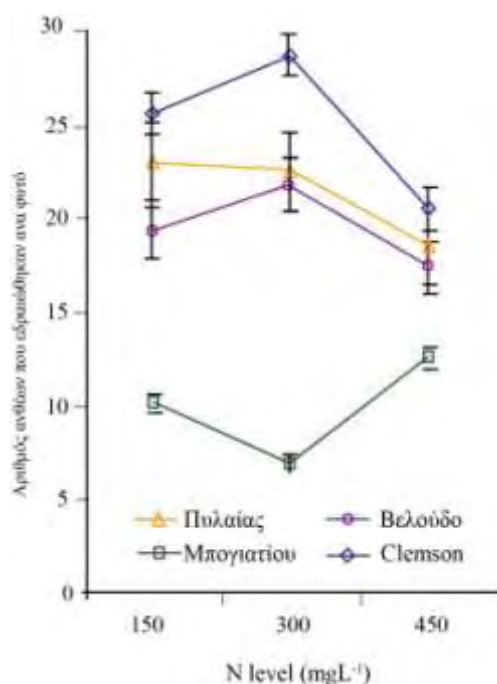
3.1 Αριθμός ανθέων ανά φυτό

Τα επίπεδα αζώτου που εφαρμόστηκαν στα φυτά και των 2 ημερομηνιών σποράς, επηρέασαν σημαντικά τον αριθμό ανθέων ανά φυτό σε όλες τις ποικιλίες που μελετήθηκαν με εξαίρεση την ποικιλία «Πυλαίας» (πίνακας 4). Αναφορικά με τα επίπεδα αζώτου που εφαρμόστηκαν, η ποικιλία «Clemson» παρήγαγε μεγαλύτερο αριθμό ανθέων σε σύγκριση με τις άλλες ποικιλίες. Η ποικιλία «Μπογιατίου» παρήγαγε το χαμηλότερο αριθμό ανθέων σε σύγκριση με τις άλλες ποικιλίες κατά την εφαρμογή μεσαίου (300mg L^{-1}) επιπέδου N (διάγραμμα 2), ενώ και στα 2 πειράματα η ο αριθμός ανθέων ανά φυτό ήταν μεγαλύτερος στα φυτά που εφαρμόστηκε 150 και 450 mg L^{-1} N. Αναφορικά με τις ποικιλίες, η «Μπογιατίου» ήταν εκείνη που παρήγαγε το μικρότερο αριθμό ανθέων σε αντίθεση με την ποικιλία «Clemson» που παρήγαγε το μεγαλύτερο (Διάγραμμα 2).

Πίνακας 4. Επίδραση επιπέδων N στον αριθμό ανθέων ανά φυτό και στον αριθμό λοβών ανά φυτό 4 ποικιλιών μπάμιας που σπάρθηκαν σε 2 διαφορετικές ημερομηνίες

Ποικιλία(C)	Επίπεδο N (mg L^{-1}) (F)	Ολική εδραίωση άνθους(άνθη/φυτό)		Αριθμός λοβών /φυτό	
		Πείραμα 1	Πείραμα 2	Πείραμα 1	Πείραμα 2
Μπογιατίου	150 (F ₁)	14.8 ^a	13.0 ^a	5.5 ^b	4.8 ^b
	300 (F ₂)	8.6 ^b	7.0 ^b	5.0 ^b	4.2 ^b
	450 (F ₃)	13.4 ^a	11.8 ^a	11.5 ^a	10.0 ^a
<i>Mean</i>		12.2	10.6	7.3	6.3
<i>LSD</i>		2.6	2.7	2.5	2.4
‘Βελούδο	150 (F ₁)	20.5 ^{ab}	18.9 ^{ab}	18.4 ^{ab}	15.0 ^a
	300 (F ₂)	22.9 ^a	21.0 ^a	20.9 ^a	16.9 ^a
	450 (F ₃)	17.8 ^b	16.0 ^b	16.8 ^b	13.8 ^a
<i>Mean</i>		20.4	18.6	18.7	15.2
<i>LSD</i>		4.3	4.4	2.7	3.4
Πυλαίας	150 (F ₁)	23.9 ^a	21.0 ^a	22.6 ^a	19.9 ^a
	300 (F ₂)	23.3 ^a	21.0 ^a	21.9 ^a	17.9 ^a
	450 (F ₃)	18.9 ^a	16.4 ^a	18.0 ^a	14.9 ^a
<i>Mean</i>		22.0	19.4	20.8	17.5
<i>LSD</i>		7.5	7.6	4.7	6.2
‘Clemson’	150 (F ₁)	26.8 ^a	24.8 ^a	24.8 ^{ab}	21.6 ^b
	300 (F ₂)	29.6 ^a	26.9 ^a	28.0 ^a	23.7 ^a
	450 (F ₃)	20.5 ^b	18.7 ^b	20.3 ^b	18.5 ^b
<i>Mean</i>		25.6	23.4	24.3	21.2
<i>LSD</i>		6.0	5.9	3.9	5.1
C x F					
(C x F ₁)		*	*	*	*
(C x F ₂)		*	*	*	*
(C x F ₃)		*	*	*	*

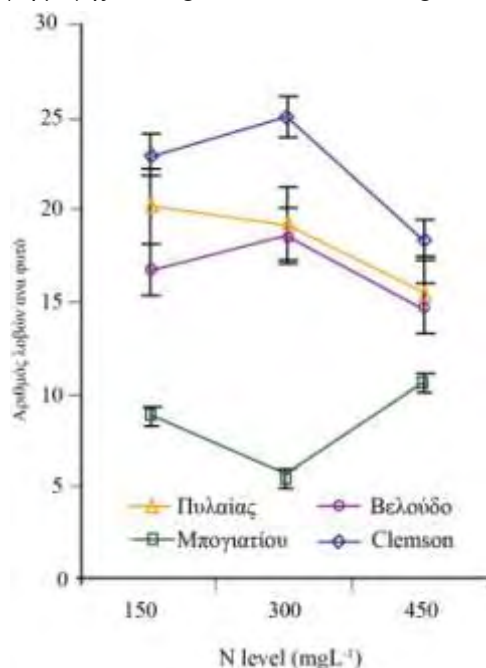
Μέσος διαχωρισμός από LSD. Οι μέσες τιμές σε κάθε στήλη για κάθε ποικιλία που συνοδεύονται ξεχωριστά από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε $p=0.05$. *= στατιστικά σημαντικό ($p<0.05$)



Διάγραμμα 2. Επίδραση των N επιπέδων στον αριθμό ανθέων ανά φυτό σε 4 ποικιλίες μπάμιας

3.2 Αριθμός λοβών ανά φυτό (Pot set)

Και στα δύο πειράματα, το επίπεδο N είχε σημαντική επίδραση στον αριθμό λοβών ανά φυτό σε όλες τις ποικιλίες με εξαίρεση την ποικιλία «Πυλαίας» (πείραμα 1 και 2) και την ποικιλία «Βελούδο» (πείραμα 2). Στην ποικιλία «Μπογιατίου» ο αριθμός λοβών ανά φυτό ήταν μέγιστος στα φυτά που εφαρμόστηκε 450 mg L⁻¹ N, ενώ στις άλλες ποικιλίες μειώθηκε σε αυτή την συγκέντρωση αζώτου, όχι όμως σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (πίνακας 1). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στον αριθμό λοβών ανά φυτό κατόπιν εφαρμογής 150 και 300 mg L⁻¹ N σε όλες τις ποικιλίες με εξαίρεση την «Clemson» όπου στο πείραμα 2 ο αριθμός λοβών ανά φυτό ήταν ο μεγαλύτερος κατόπιν εφαρμογής 300 mg L⁻¹ N από ότι 150 mg L⁻¹ N (πίνακας 1, Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3. Επίδραση των N επιπέδων στον αριθμό λοβών ανά φυτό σε 4 ποικιλίες μπάμιας

Πίνακας 5. Ανάπτυξη λοβών και σπόρων της ποικιλίας «Μπογιατίου» σε σχέση με την εφαρμογή N και την περίοδο συγκομιδής, πείραμα 1.

Χαρακτηριστικά	Λίπανση	Περίοδος Συγκομιδής				LSD
		30	35	40	50	
Αριθμός σπόρων ανά λοβό	F ₁	76.0	74.5 ^{a(a)}	61.1 ^{a(b)}	62.4 ^{b(b)}	5.3
	F ₂	78.5 ^{a(a)}	65.6 ^{b(b)}	62.6 ^{a(b)}	59.6 ^{b(b)}	7.6
	F ₃	69.4 ^{b(ab)}	75.2 ^{a(a)}	61.0 ^{a(c)}	66.6 ^{a(bc)}	6.1
LSD		7.1	2.7	8.6	6.1	
Βάρος 100 σπόρων (g)	F ₁	38.0 ^{ab(a)}	34.0 ^{a(ab)}	19.7 ^{a(b)}	19.3 ^{a(b)}	16.2
	F ₂	34.2 ^{b(a)}	31.9 ^{a(a)}	19.7 ^{a(a)}	18.1 ^{b(a)}	16.7
	F ₃	41.1 ^{a(a)}	30.1 ^{a(ba)}	19.6 ^{a(b)}	19.5 ^{a(b)}	16.3
LSD		2.2	3.9	0.8	1.1	
Βλαστικότητα (%)	F ₁	36.6 ^{a(b)}	43.8 ^{a(ab)}	58.3 ^{a(a)}	30.4 ^{a(b)}	16.1
	F ₂	36.7 ^{a(b)}	46.8 ^{a(b)}	62.0 ^{a(a)}	35.7 ^{a(b)}	14.2
	F ₃	39.2 ^{a(bc)}	49.8 ^{a(b)}	63.8 ^{a(a)}	36.2 ^{a(c)}	13.5
LSD		6.9	10.5	1.9	6.6	

Μέση διαφορά από LSD. Οι μέσες τιμές σε κάθε στήλη για κάθε περίοδο συγκομιδής συνοδεύονται ξεχωριστά από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε $p=0.05$. Οι μέσες τιμές στην ίδια σειρά για κάθε χαρακτηριστικό και επίπεδο λιπάσματος συνοδεύονται ξεχωριστά από διαφορετικά γράμματα σε παρένθεση διαφέρουν στατιστικά σε $p=0.05$

Πίνακας 6. Ανάπτυξη λοβών και σπόρων της ποικιλίας «Βελούδο» σε σχέση με την εφαρμογή N και την περίοδο συγκομιδής, πείραμα 1.

Χαρακτηριστικά	Λίπανση	Περίοδος Συγκομιδής				LSD
		30	35	40	50	
Αριθμός σπόρων ανά λοβό	F ₁	52.2 ^{b(b)}	74.3 ^{a(a)}	57.1 ^{ab(b)}	53.0 ^{a(b)}	12.4
	F ₂	56.6 ^{b(b)}	78.4 ^{a(a)}	64.8 ^{a(b)}	38.6 ^{b(c)}	9.4
	F ₃	69.2 ^{a(ab)}	76.2 ^{a(a)}	47.4 ^{b(c)}	64.5 ^{a(b)}	8.8
LSD		7.5	5.3	14.3	12.1	
Βάρος 100 σπόρων (g)	F ₁	36.1 ^{b(a)}	41.3 ^{a(a)}	29.0 ^{a(a)}	33.4 ^{a(a)}	15.4
	F ₂	42.1 ^{ab(a)}	43.0 ^{a(a)}	27.5 ^{a(ab)}	23.7 ^{b(b)}	15.7
	F ₃	46.2 ^{a(a)}	39.8 ^{a(b)}	25.1 ^{a(bc)}	23.0 ^{b(c)}	15.5
LSD		7.3	3.5	4.2	6.9	
Βλαστικότητα (%)	F ₁	40.5 ^{b(b)}	64.0 ^{a(a)}	64.6 ^{b(a)}	55.8 ^{a(ab)}	16.0
	F ₂	50.2 ^{a(b)}	62.8 ^{a(b)}	76.4 ^{a(a)}	57.0 ^{a(b)}	16.4
	F ₃	49.5 ^{a(b)}	58.4 ^{a(b)}	72.1 ^{ab(a)}	57.8 ^{a(b)}	11.5
LSD		8.6	12.4	8.0	19.3	

Μέση διαφορά από LSD. Οι μέσες τιμές σε κάθε στήλη για κάθε περίοδο συγκομιδής συνοδεύονται ξεχωριστά από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε $p=0.05$. Οι μέσες τιμές στην ίδια σειρά για κάθε χαρακτηριστικό και επίπεδο λιπάσματος συνοδεύονται ξεχωριστά από διαφορετικά γράμματα σε παρένθεση διαφέρουν στατιστικά σε $p=0.05$

Πίνακας 7. Ανάπτυξη λοβών και σπόρων της ποικιλίας «Πυλαίας» σε σχέση με την εφαρμογή N και την περίοδο συγκομιδής, πείραμα 1.

Χαρακτηριστικά	Λίπανση	Περίοδος Συγκομιδής				LSD
		30	35	40	50	
Αριθμός σπόρων ανά λοβό	F ₁	86.8 ^{a(a)}	86.5 ^{a(a)}	65.5 ^{a(b)}	62.3 ^{a(b)}	18.4
	F ₂	65.5 ^{b(b)}	88.7 ^{a(a)}	62.3 ^{a(b)}	79.3 ^{a(ab)}	18.0
	F ₃	74.4 ^{ab(a)}	74.0 ^{a(a)}	62.7 ^{a(a)}	73.8 ^{a(a)}	16.5
LSD		17.5	15.6	13.4	23.5	
Βάρος 100 σπόρων (g)	F ₁	34.9 ^{b(a)}	35.0 ^{b(a)}	24.7 ^{a(a)}	24.1 ^{a(a)}	15.5
	F ₂	42.0 ^{a(a)}	43.9 ^{a(a)}	23.0 ^{a(b)}	22.2 ^{b(b)}	16.2
	F ₃	40.0 ^{ab(a)}	42.5 ^{a(a)}	25.2 ^{a(b)}	22.3 ^{b(b)}	16.1
LSD		5.7	5.0	4.4	1.7	
Βλαστικότητα (%)	F ₁	49.1 ^{c(c)}	57.6 ^{b(b)}	78.8 ^{b(a)}	74.1 ^{b(a)}	7.7
	F ₂	51.5 ^{b(b)}	58.3 ^{b(b)}	81.5 ^{b(a)}	81.0 ^{a(a)}	6.9
	F ₃	54.8 ^{a(c)}	61.0 ^{a(c)}	96.4 ^{a(a)}	88.4 ^{a(b)}	7.1
LSD		2.3	1.7	4.9	4.9	

Μέση διαφορά από LSD. Οι μέσες τιμές σε κάθε στήλη για κάθε περίοδο συγκομιδής συνοδεύονται ξεχωριστά από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε $p=0.05$. Οι μέσες τιμές στην ίδια σειρά για κάθε χαρακτηριστικό και επίπεδο λιπάσματος συνοδεύονται ξεχωριστά από διαφορετικά γράμματα σε παρένθεση διαφέρουν στατιστικά σε $p=0.05$

Πίνακας 8. Ανάπτυξη λοβών και σπόρων της ποικιλίας “Clemson” σε σχέση με την εφαρμογή N και την περίοδο συγκομιδής, πείραμα 1.

Χαρακτηριστικά	Λίπανση	Περίοδος Συγκομιδής				LSD
		30	35	40	50	
Αριθμός σπόρων ανά λοβό	F ₁	102.0 ^{a(a)}	100.5 ^{a(a)}	67.5 ^{a(b)}	81.1 ^{a(b)}	15.6
	F ₂	88.2 ^{ab(ab)}	105.6 ^{a(a)}	72.7 ^{a(b)}	84.5 ^{a(b)}	17.6
	F ₃	78.2 ^{b(ab)}	88.2 ^{b(a)}	67.8 ^{a(b)}	81.7 ^{a(a)}	18.9
LSD		18.2	6.4	20.6	19.9	
Βάρος 100 σπόρων (g)	F ₁	37.7 ^{ab(ab)}	41.7 ^{a(a)}	22.0 ^{a(bc)}	20.1 ^{b(c)}	16.1
	F ₂	35.1 ^{b(a)}	35.0 ^{b(a)}	23.5 ^{a(a)}	22.0 ^{a(a)}	15.7
	F ₃	38.9 ^{a(a)}	35.8 ^{b(ab)}	22.2 ^{a(b)}	20.3 ^{b(b)}	16.2
LSD		3.7	2.6	2.5	1.1	
Βλαστικότητα (%)	F ₁	56.5 ^{a(b)}	62.2 ^{b(b)}	88.5 ^{b(a)}	91.6 ^{a(a)}	7.2
	F ₂	56.1 ^{a(b)}	62.0 ^{b(b)}	90.5 ^{b(a)}	86.6 ^{b(a)}	7.2
	F ₃	55.8 ^{a(c)}	64.8 ^{a(b)}	95.3 ^{a(a)}	93.7 ^{a(aa)}	7.2
LSD		2.0	1.5	4.0	3.5	

Μέση διαφορά από LSD. Οι μέσες τιμές σε κάθε στήλη για κάθε περίοδο συγκομιδής συνοδεύονται ξεχωριστά από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε $p=0.05$. Οι μέσες τιμές στην ίδια σειρά για κάθε χαρακτηριστικό και επίπεδο λιπάσματος συνοδεύονται ξεχωριστά από διαφορετικά γράμματα σε παρένθεση διαφέρουν στατιστικά σε $p=0.05$

3.3 Μέσος αριθμός σπόρων ανά λοβό

Πείραμα 1

Ο μέσος αριθμός σπόρων ανά λοβό δεν επηρεάστηκε από το ποσοστό αζωτούχας εφαρμογής στις ποικιλίες «Μπογιατίου» (πίνακας 5), «Βελούδο» (πίνακας 6) και «Πυλαίας» (πίνακας 7), αλλά ήταν μικρότερος στην ποικιλία «Clemson» όταν εφαρμόστηκε το μέγιστο επίπεδο N και η συγκομιδή έγινε στις 30-35 HMA όχι όμως και στις μετέπειτα συγκομιδές (πίνακας 8). Στην ποικιλία «Μπογιατίου» ο αριθμός σπόρων ανά λοβό ήταν μικρότερος στις καθυστερημένες συγκομιδές (40-50 HMA) από ότι στις πρώιμες (30-35 HMA) (πίνακας 5), αλλά δεν υπήρξε καμία επίδραση της περιόδου συγκομιδής στον αριθμό σπόρων ανά λοβό των υπόλοιπων ποικιλιών (πίνακες 6-8). Εξαίρεση αποτέλεσαν οι «Πυλαίας» (πίνακας 7), «Clemson» (πίνακας 8) κατόπιν εφαρμογής χαμηλών επιπέδων αζώτου, όπου αριθμός των σπόρων μειώθηκε στις καθυστερημένες συγκομιδές.

Πείραμα 2

Συνολικά ο μέσος αριθμός σπόρων ανά λοβό δεν επηρεάστηκε από το ποσοστό εφαρμογής της αζωτούχας λίπανσης αναφορικά με την ποικιλία (πίνακας 9-12), με εξαίρεση την μείωση στο μέσο αριθμό σπόρων ανά λοβό στους λοβούς της «Μπογιατίου» που συγκομίστηκαν στις 30 και 40 HMA (πίνακας 9), της «Clemson» που συγκομίστηκαν στις 35 HMA (πίνακας 12) και μία αύξηση στους λοβούς της «Πυλαίας» που συγκομίστηκαν στις 30 και 40 HMA (πίνακας 11). Σε όλες τα ποικιλίες η καθυστερημένη συγκομιδή είχε ως αποτέλεσμα μικρότερο μέσο αριθμό σπόρων ανά λοβό αναφορικά με το επίπεδο N αλλά όχι απαραίτητα σε σημαντικά στατιστικό επίπεδο (πίνακες 9-12).

Πίνακας 9. Ανάπτυξη λοβών και σπόρων της ποικιλίας «Μπογιατίου» σε σχέση με την εφαρμογή N και την περίοδο συγκομιδής, πείραμα 2.

Χαρακτηριστικά	Λίπανση	Περίοδος Συγκομιδής				LSD
		30	35	40	50	
Αριθμός σπόρων ανά λοβό	F ₁	69.6 ^{a(ab)}	58.0 ^{a(b)}	85.6 ^{a(a)}	64.0 ^{a(b)}	19.8
	F ₂	69.6 ^{a(a)}	63.0 ^{a(b)}	72.3 ^{ab(a)}	67.3 ^{a(ab)}	5.8
	F ₃	63.0 ^{b(a)}	67.3 ^{a(a)}	63.0 ^{b(a)}	67.0 ^{a(a)}	12.1
LSD		6.4	13.8	22.1	7.7	
Βάρος 100 σπόρων (g)	F ₁	37.2 ^{b(a)}	29.4 ^{a(b)}	25.5 ^{a(bc)}	20.9 ^{b(c)}	5.0
	F ₂	38.0 ^{ab(a)}	32.2 ^{a(b)}	27.8 ^{ab(c)}	19.7 ^{b(d)}	2.3
	F ₃	39.7 ^{a(a)}	32.6 ^{a(b)}	30.6 ^{a(b)}	25.4 ^{a(c)}	4.4
LSD		1.2	5.5	5.2	3.2	
Βλαστικότητα (%)	F ₁	38.8 ^{b(c)}	48.4 ^{a(b)}	63.0 ^{b(b)}	40.5 ^{a(c)}	2.9
	F ₂	40.7 ^{a(c)}	51.0 ^{a(b)}	65.2 ^{b(a)}	40.7 ^{a(c)}	2.2
	F ₃	44.5 ^{a(c)}	56.5 ^{a(b)}	72.1 ^{a(a)}	42.7 ^{a(c)}	6.0
LSD		4.9	3.5	4.5	3.2	

Μέση διαφορά από LSD. Οι μέσες τιμές σε κάθε στήλη για κάθε περίοδο συγκομιδής συνοδεύονται ξεχωριστά από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε $p=0.05$. Οι μέσες τιμές στην ίδια σειρά για κάθε χαρακτηριστικό και επίπεδο λιπάσματος συνοδεύονται ξεχωριστά από διαφορετικά γράμματα σε παρένθεση διαφέρουν στατιστικά σε $p=0.05$

Πίνακας 10. Ανάπτυξη λοβών και σπόρων της ποικιλίας «Βελούδο» σε σχέση με την εφαρμογή N και την περίοδο συγκομιδής, πείραμα 2.

Χαρακτηριστικά	Λίπανση	Περίοδος Συγκομιδής				LSD
		30	35	40	50	
Αριθμός σπόρων ανά λοβό	F ₁	84.0 ^{a(a)}	64.3 ^{b(b)}	59.3 ^{a(bc)}	58.6 ^{a(c)}	14.0
	F ₂	75.0 ^{a(ab)}	85.6 ^{a(a)}	64.6 ^{a(bc)}	60.0 ^{a(c)}	14.2
	F ₃	71.0 ^{a(a)}	66.3 ^{b(a)}	70.0 ^{a(a)}	71.6 ^{a(a)}	8.7
LSD		14.4	9.2	11.2	15.1	
Βάρος 100 σπόρων (g)	F ₁	45.5 ^{b(a)}	38.0 ^{ab(b)}	44.6 ^{a(a)}	24.1 ^{a(c)}	6.0
	F ₂	45.6 ^{b(b)}	33.2 ^{b(c)}	49.7 ^{a(a)}	24.4 ^{a(d)}	2.5
	F ₃	50.2 ^{a(a)}	42.8 ^{a(b)}	47.1 ^{a(ab)}	25.1 ^{a(c)}	4.9
LSD		2.5	6.7	5.6	2.7	
Βλαστικότητα (%)	F ₁	43.6 ^{b(c)}	51.2 ^{b(b)}	70.8	51.8 ^{b(b)}	4.1
	F ₂	44.7 ^{b(c)}	53.4 ^{b(b)}	74.7 ^{ab(b)}	55.3 ^{b(b)}	5.9
	F ₃	50.2 ^{a(d)}	57.5 ^{a(c)}	76.8 ^{a(a)}	63.8 ^{a(b)}	4.1
LSD		4.3	3.6	5.1	6.1	

Μέση διαφορά από LSD. Οι μέσες τιμές σε κάθε στήλη για κάθε περίοδο συγκομιδής συνοδεύονται ξεχωριστά από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε $p=0.05$. Οι μέσες τιμές στην ίδια σειρά για κάθε χαρακτηριστικό και επίπεδο λιπάσματος συνοδεύονται ξεχωριστά από διαφορετικά γράμματα σε παρένθεση διαφέρουν στατιστικά σε $p=0.05$

3.4 Μέσο βάρος 100 σπόρων

Πείραμα 1

Το μέσο βάρος ανά 100 σπόρους δεν επηρεάστηκε από την εφαρμογή των επιπέδων N με κάποιες εξαιρέσεις: μία αύξηση συναρτήσει του επιπέδου N στους λοβούς που συγκομίστηκαν 30 HMA (Βελούδο και Πυλαίας) και μία μείωση στους λοβούς που συγκομίστηκαν 50 HMA (Βελούδο και Πυλαίας) ή στις 35 HMA (Clemson) (πίνακες 5-8). Σε όλες τις ποικιλίες υπήρξε μια σημαντική μείωση στο μέσο βάρος ανά 100 σπόρους σε σχέση με την περίοδο συγκομιδής. Στην «Μπογιατίου» αυτή η μείωση ήταν 35-43% μεταξύ 35 και 40 HMA (μειωνόταν καθώς αυξάνονταν τα επίπεδα N) ενώ για την «Βελούδο» αυτή η μείωση ήταν 30-37%, την Πυλαίας 30-48% και την Clemson 33-47%.

Πείραμα 2

Η εφαρμογή αζώτου έτεινε να αυξήσει το μέσο βάρος ανά 100 σπόρους της «Μπογιατίου» (πίνακας 9) και της «Clemson» (πίνακας 12) όταν οι λοβοί συγκομίστηκαν 30 ή 50 HMA και της «Βελούδο» (πίνακας 10) όταν συγκομίστηκαν 30 HMA. Σε αντίθεση, το μέσο βάρος ανά 100 σπόρους της «Πυλαίας» ήταν μικρότερο στο υψηλότερο επίπεδο αζώτου όταν η συγκομιδή έγινε στις 30 ή 50 HMA (πίνακας 11). Ωστόσο, όπως και στο πείραμα 1, ο χρόνος συγκομιδής είχε μεγαλύτερη επίδραση από ότι το επίπεδο N στο μέσο σε όλες τις ποικιλίες, αλλά με την κύρια μείωση στις 50 HMA (πίνακας 9-12) παρά στις 40 HMA όπως συνέβη στο πείραμα 1. Παραδείγματος χάριν, συγκριτικά με τις 40 και 50 HMA, το μέσο βάρος ανά 100 σπόρους μειώθηκε κατά 17-30% («Μπογιατίου»), 40-51% «Βελούδο», 14-44% «Πυλαίας» και 28-34% «Clemson».

Πίνακας 11. Ανάπτυξη λοβών και σπόρων της ποικιλίας «Πυλαίας» σε σχέση με την εφαρμογή N και την περίοδο συγκομιδής, πείραμα 2.

Χαρακτηριστικά	Λίπανση	Περίοδος Συγκομιδής				LSD
		30	35	40	50	
Αριθμός σπόρων ανά λοβό	F ₁	77.0 ^{b(a)}	65.0 ^{b(b)}	70.6 ^{ab(ab)}	64.6 ^{a(b)}	11.5
	F ₂	72.3 ^{b(b)}	74.6 ^{b(ab)}	80.6 ^{a(a)}	70.6 ^{a(b)}	6.7
	F ₃	88.3 ^{a(a)}	94.0 ^{a(a)}	64.3 ^{b(b)}	60.3 ^{a(b)}	15.7
LSD		10.5	14.5	11.6	11.2	
Βάρος 100 σπόρων (g)	F ₁	46.8 ^{a(a)}	30.0 ^{b(b)}	35.4 ^{ab(b)}	23.7 ^{a(c)}	6.2
	F ₂	47.1 ^{a(a)}	39.7 ^{a(b)}	27.9 ^{b(c)}	24.0 ^{a(c)}	5.7
	F ₃	38.9 ^{b(a)}	30.5 ^{b(b)}	38.1 ^{a(a)}	21.3 ^{a(c)}	7.5
LSD		3.7	8.6	9.2	1.6	
Βλαστικότητα (%)	F ₁	52.4 ^{a(d)}	61.0 ^{a(c)}	85.4 ^{b(a)}	78.2 ^{a(b)}	3.1
	F ₂	53.2 ^{a(d)}	60.6 ^{a(c)}	89.5 ^{ab(a)}	81.6 ^{a(b)}	3.1
	F ₃	52.0 ^{a(d)}	61.7 ^{a(c)}	92.7 ^{a(a)}	81.8 ^{a(b)}	4.9
LSD		2.8	2.5	4.6	5.0	

Μέσος διαχωρισμός από LSD. Οι μέσες τιμές σε κάθε στήλη για κάθε περίοδο συγκομιδής συνοδεύονται ξεχωριστά από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε $p=0.05$. Οι μέσες τιμές στην ίδια σειρά για κάθε χαρακτηριστικό και επίπεδο λιπάσματος συνοδεύονται ξεχωριστά από διαφορετικά γράμματα σε παρένθεση διαφέρουν στατιστικά σε $p=0.05$

Πίνακας 12 Ανάπτυξη λοβών και σπόρων της ποικιλίας “Clemson” σε σχέση με την εφαρμογή N και την περίοδο συγκομιδής, πείραμα 2.

Χαρακτηριστικά	Λίπανση	Περίοδος Συγκομιδής				LSD
		30	35	40	50	
Αριθμός σπόρων ανά λοβό	F ₁	92.3 ^{b(b)}	92.0 ^{a(b)}	107.0 ^{a(a)}	86.3 ^{a(b)}	12.6
	F ₂	102.0 ^{a(a)}	83.0 ^{ab(b)}	84.3 ^{b(b)}	84.0 ^{a(b)}	11.8
	F ₃	94.6 ^{b(a)}	76.0 ^{b(bc)}	92.3 ^{ab(ab)}	68.6 ^{a(c)}	16.8
LSD		4.9	12.0	17.4	18.1	
Βάρος 100 σπόρων (g)	F ₁	37.2 ^{a(a)}	30.2 ^{a(b)}	29.6 ^{a(b)}	21.1 ^{b(c)}	3.6
	F ₂	41.3 ^{a(a)}	32.2 ^{a(b)}	31.4 ^{a(b)}	22.6 ^{ab(c)}	5.5
	F ₃	41.0 ^{a(a)}	26.3 ^{a(b)}	35.4 ^{a(a)}	23.3 ^{a(b)}	7.4
LSD		3.2	5.9	9.4	1.1	
Βλαστικότητα (%)	F ₁	48.0 ^{b(c)}	56.4 ^{a(b)}	87.1 ^{b(a)}	85.1 ^{a(a)}	7.8
	F ₂	47.3 ^{b(c)}	58.0 ^{a(b)}	91.5 ^{a(a)}	93.4 ^{a(a)}	3.7
	F ₃	52.0 ^{a(c)}	60.4 ^{a(b)}	91.3 ^{a(a)}	94.6 ^{a(a)}	4.9
LSD		4.0	4.6	2.6	9.5	

Μέσος διαχωρισμός από LSD. Οι μέσες τιμές σε κάθε στήλη για κάθε περίοδο συγκομιδής συνοδεύονται ξεχωριστά από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε $p=0.05$. Οι μέσες τιμές στην ίδια σειρά για κάθε χαρακτηριστικό και επίπεδο λιπάσματος συνοδεύονται ξεχωριστά από διαφορετικά γράμματα σε παρένθεση διαφέρουν στατιστικά σε $p=0.05$

3.5 Μέση βλαστικότητα

Πείραμα 1

Η αυξανόμενη εφαρμογή του ποσοστού αζωτούχας λίπανσης, φάνηκε να αυξάνει την βλαστικότητα της ποικιλίας «Μπογιατίου» ανεξάρτητα από την ημερομηνία συγκομιδής, αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (πίνακας 5). Στην ποικιλία «Βελούδο» (πίνακας 6) υψηλά επίπεδα αζώτου αύξησαν σημαντικά την βλαστικότητα των σπόρων που συγκομίστηκαν 30 HMA αλλά όχι μετέπειτα, ενώ στην «Πυλαίας» (πίνακας 7) η βλαστικότητα ήταν σταθερά μεγαλύτερη στο μέγιστο επίπεδο αζώτου ανεξάρτητα από την περίοδο συγκομιδής ενώ στην «Clemson» (πίνακας 8) μεγαλύτερη σε σπόρους που συγκομίστηκαν 35 ή 40 HMA. Στην «Μπογιατίου» (πίνακας 5) η βλαστικότητα ήταν μέγιστη σε σπόρους που συγκομίστηκαν 35-40 HMA ενώ στις υπόλοιπες ποικιλίες (με ελάχιστες εξαιρέσεις) η βλαστικότητα ήταν μεγαλύτερη σε σπόρους που συγκομίστηκαν 40-50 HMA (πίνακας 6-8).

Πείραμα 2

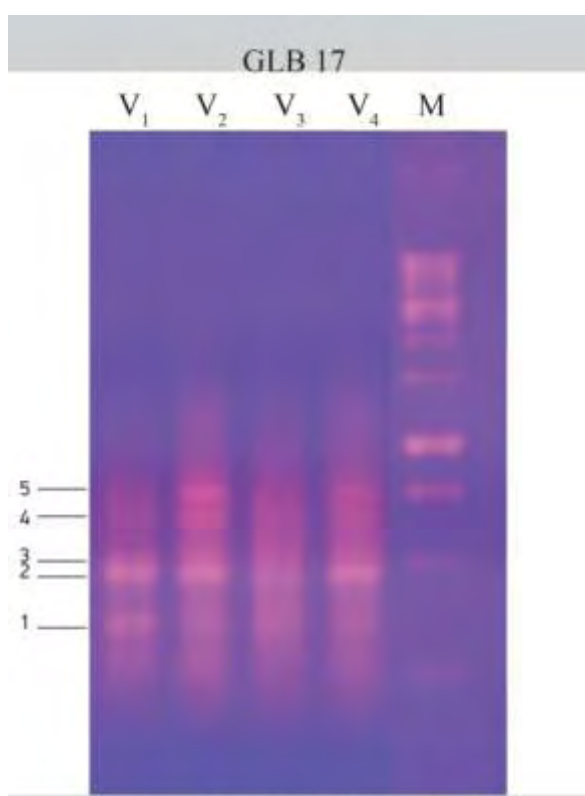
Η βλαστικότητα των σπόρων έτεινε να αυξηθεί με το αυξανόμενο επίπεδα αζώτου, αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις (πίνακας 10-12). Για παράδειγμα, η βλαστικότητα της «Μπογιατίου» (πίνακας 9) ήταν μεγαλύτερη στα υψηλότερα επίπεδα αζώτου μόνο στους σπόρους που συγκομίστηκαν 30 με 35 HMA ενώ στην «Βελούδο» (πίνακας 10) η βλαστικότητα ήταν μέγιστη στο μέγιστο επίπεδο αζώτου ανεξάρτητα από την περίοδο συγκομιδής. Σε αντίθεση, η βλαστικότητα της ποικιλία «Πυλαίας» (πίνακας 11) αυξήθηκε σημαντικά στο μέγιστο επίπεδο N μόνο στους σπόρους που συγκομίστηκαν 40 HMA ενώ στην «Clemson» (πίνακας 12) παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στους σπόρους που συγκομίστηκαν 30 ή 40 HMA. Όπως και στο πείραμα 1 η βλαστικότητα επηρεάστηκε σημαντικά στατιστικά από τον χρόνο συγκομιδής όντας η μέγιστη στις 40 HMA («Μπογιατίου», «Βελούδο», «Πυλαίας») και στις 40-50 HMA («Clemson»).

3.6 Αποτελέσματα RAPD ανάλυσης

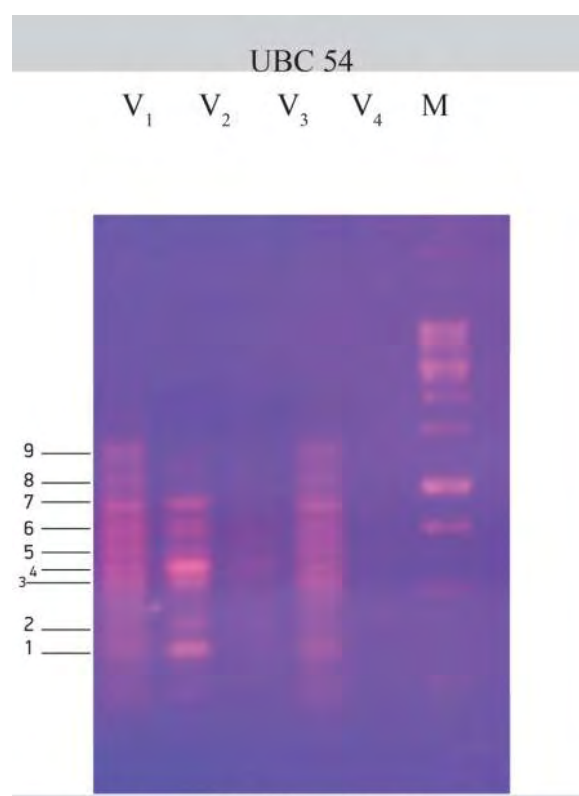
Τα αποτελέσματα της RAPD ανάλυσης καταγράφηκαν με την παρουσία ή την απουσία ενισχυμένου τμήματος DNA. Οι μονομερείς εκκινητές GLA 09, OPAN 01, OPB 15, OPX 17 δεν ενίσχυσαν κανένα τμήμα του DNA των 4^{ων} ποικιλιών μπάμιας.

Στην εικόνα **6 (GLB 17)** εμφανίζονται συνολικά 5 ζώνες στην ποικιλία Μπογιατίου (V₁). Η μπάντα με τον αριθμό 1 είναι παρούσα στην ποικιλία Βελούδο (V₂) και Clemson (V₄) αλλά απουσιάζει στις ποικιλίες Πυλαίας (V₃). Η ζώνη με τον αριθμό 3 είναι παρούσα μόνο στις ποικιλίες V₁ και απουσιάζει από τις άλλες 3 γι' αυτό μπορεί και να χαρακτηριστεί ως πολυμορφική. Η ζώνη 4 και 5 απουσιάζει μόνο στην ποικιλία V₃.

Στην εικόνα **7 (UBC 54)** παρατηρούνται συνολικά 9 ζώνες, ο εκκινητής πιθανόν δεν ενισχύθηκε στην V₃. Η μπάντες με τους αριθμούς 1,3,5,6,7, είναι παρούσες στις ποικιλίες V₁, V₂, V₄. Η ζώνη 2 είναι παρούσα μόνο στην V₂. Η ζώνη 4 είναι παρούσα σε όλες τις ποικιλίες. Οι ζώνες 8 και 9 είναι παρούσες στην V₁ και στη V₄.

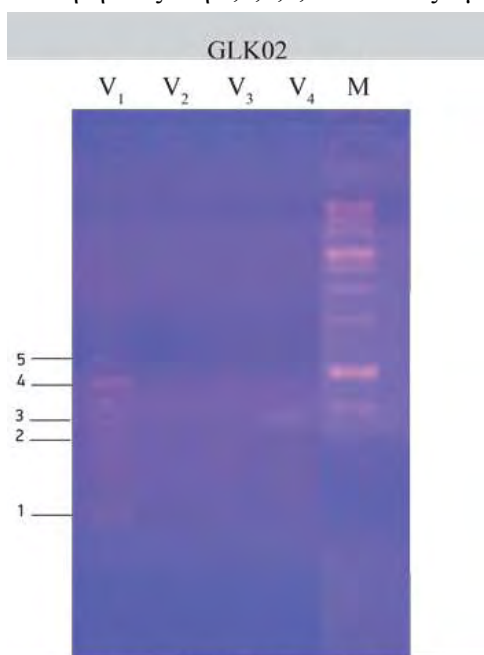


Εικόνα 6

V₁:Μπογιατίου V₂:Βελούδο V₃:Πυλαίας V₄: Clemson

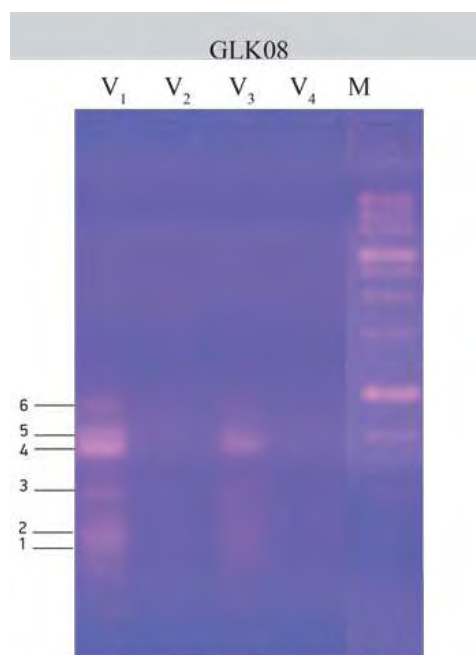
Εικόνα 7

Στην εικόνα 8 (**GLK 02**) εμφανίζονται συνολικά 5 ζώνες. Η ποικιλία V_2 δεν ενισχύθηκε από τον συγκεκριμένο εκκινητή. Στην ποικιλία V_1 είναι παρούσες όλες οι ζώνες. Η ζώνη 3 είναι παρούσα στην V_1 και V_4 και η ζώνη 4 είναι παρούσα στην V_1 και V_3 η ζώνη 1, 2 και 5 είναι παρούσα μόνο στην V_1 . Στην εικόνα 9 (**GLK 08**) εμφανίζονται 6 ζώνες. Η V_2 και V_4 δεν ενισχύθηκαν από τον συγκεκριμένο εκκινητή. Η ζώνη 1,2,3,5,6 απουσιάζει μόνο στη V_3 .



Εικόνα 8

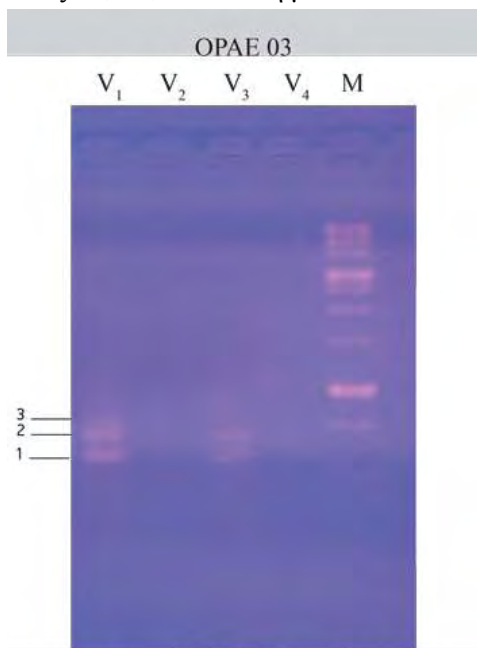
V_1 : Μπογιατίου V_2 : Βελοούδο V_3 : Πυλαίας V_4 : Clemson



Εικόνα 9

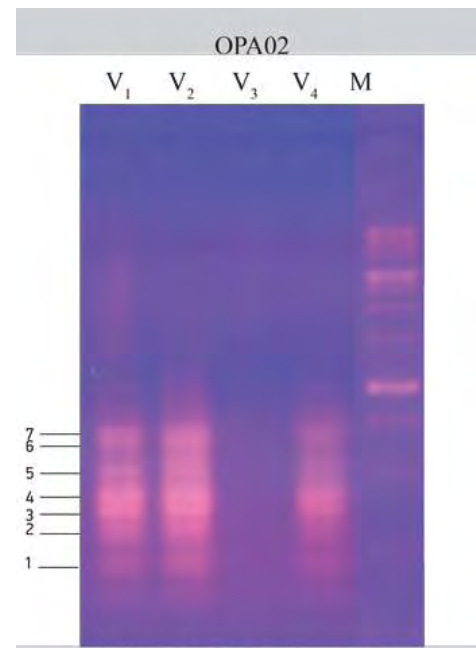
Στην εικόνα 10 ο εκκινητής (**OPAE 03**) δεν ενισχύθηκε στις V_2 και V_4 . Η ζώνη 1,2 είναι παρούσες στην V_1 και V_3 και η ζώνη 3 είναι παρούσα στην V_1 .

Στην εικόνα 11 ο εκκινητής (**OPA 02**) δεν ενισχύθηκε στην V_3 . Οι ζώνες 1,3,4,5,6,7 είναι παρούσες στις V_1 , V_2 , V_4 . Ενώ η μπάντα 2 είναι παρούσα μόνο στις V_1 και V_2 .



Εικόνα 10

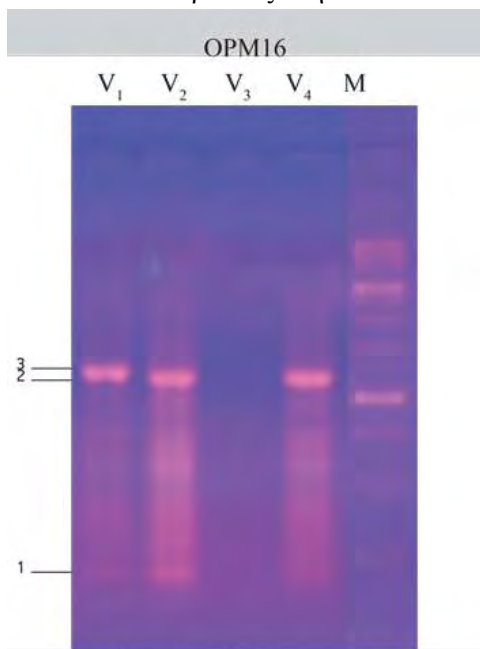
V_1 : Μπογιατίου V_2 : Βελοούδο V_3 : Πυλαίας V_4 : Clemson



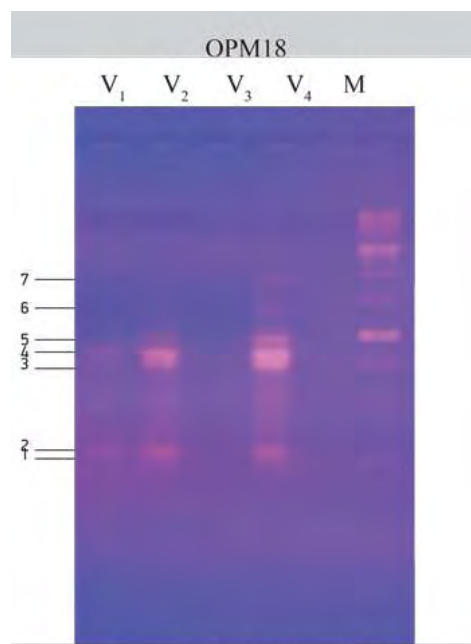
Εικόνα 11

Στην εικόνα 12 ο εκκινητής (**OPM16**) δεν ενισχύθηκε στην V₃. Οι ζώνες 1 και 2 είναι παρούσες στις V₂ και V₄ ενώ η ζώνη 3 μόνο στο V₁.

Στην εικόνα 13 ο εκκινητής (**OPM18**) δεν ενισχύθηκε στην V₃. Οι ζώνες 1,3,5 είναι παρούσες στις V₂ και V₄. Η ζώνη 2 είναι παρούσα μόνο στην V₁. Η ζώνη 4 είναι παρούσα στην V₁, V₂, V₄. Οι ζώνες 6 και 7 είναι παρούσες στη V₄.



Εικόνα 12

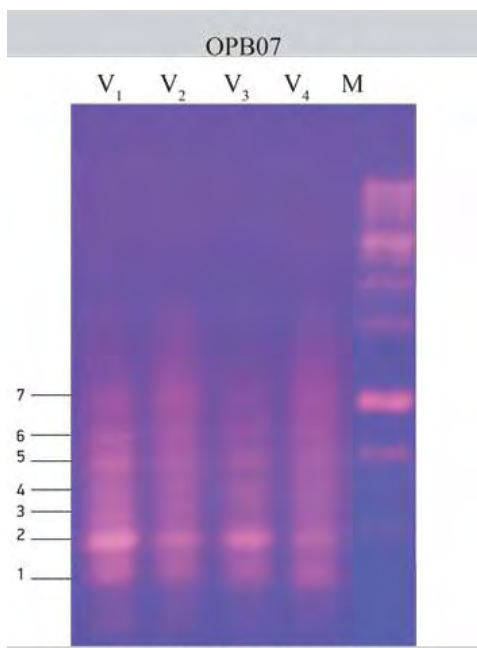


Εικόνα 13

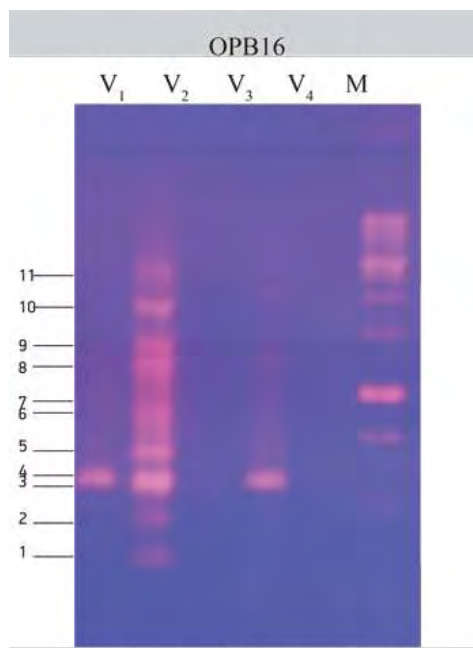
V₁: Μπογατίου V₂: Βελούδο V₃: Πυλαίας V₄: Clemson

Στην εικόνα 14 (**OPB 07**) οι ζώνες 1 και 2 είναι παρούσες σε όλες τις ποικιλίες. Οι μπάντες 3,4,5,6, απουσιάζουν μόνο στην V₄. Η ζώνη 7 είναι παρούσα μόνο στις V₁ και V₂.

Στην εικόνα 15 ο εκκινητής (**OPB 16**) δεν ενισχύθηκε στην V₃. Οι ζώνες 1,2,6,7 είναι παρούσες μόνο V₂. Οι μπάντες 3,5,8,9,10,11 είναι παρούσες στις V₂ και V₄.



Εικόνα 14

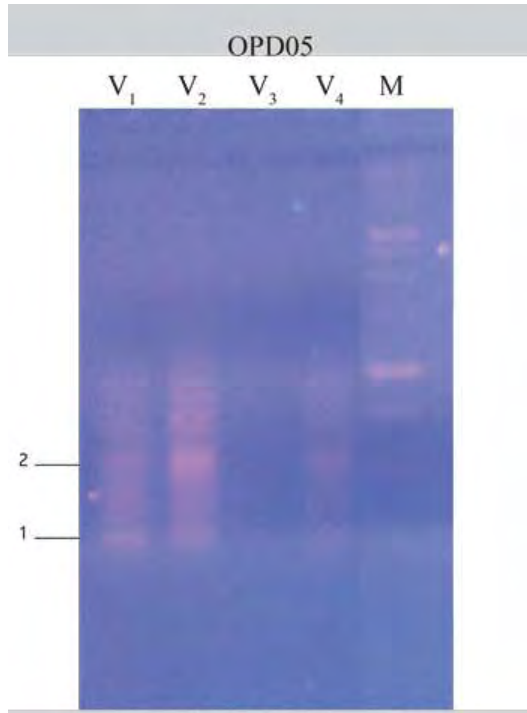


Εικόνα 15

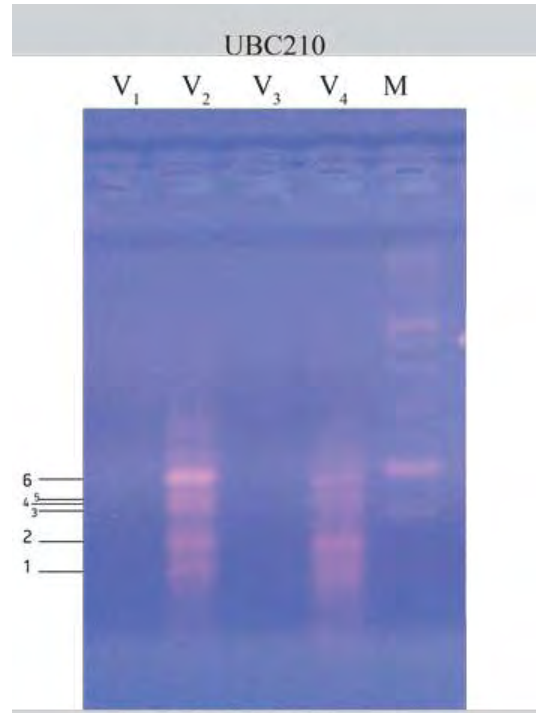
V₁: Μπογατίου V₂: Βελούδο V₃: Πυλαίας V₄: Clemson

Στην εικόνα 16 ο εκκινητής (**OPD 05**) δεν ενισχύθηκε στην V_3 . Οι ζώνες 1 και 2 είναι παρούσες στις υπόλοιπες ποικιλίες.

Στην εικόνα 17 ο εκκινητής (**UBC 210**) δεν ενισχύθηκε στις ποικιλίες V_1 και V_3 . Οι ζώνες 1,2,6 είναι παρούσες στις άλλες 2 ποικιλίες. Οι ζώνες 3,4,5 είναι παρούσες μόνο στην V_2 .



Εικόνα 16

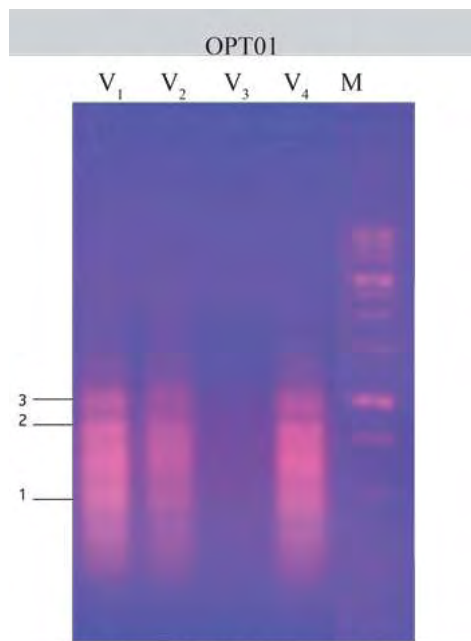


Εικόνα 17

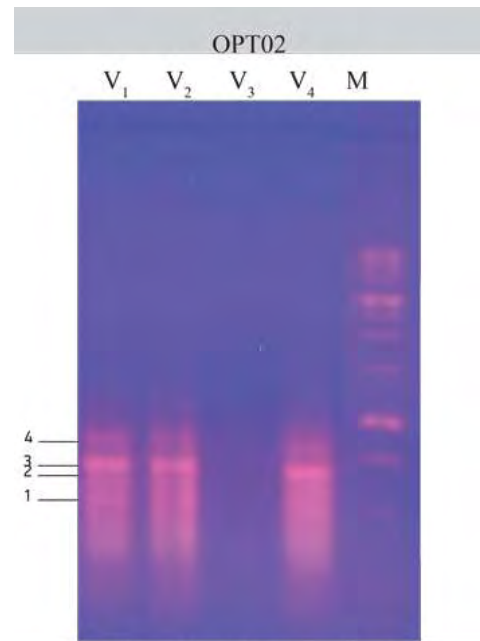
V_1 : Μπογιατίου V_2 : Βελοούδο V_3 : Πυλαίας V_4 : Clemson

Στην εικόνα 18 ο εκκινητής (**OPT 01**) δεν ενισχύθηκε στην V_3 . Οι ζώνες 1,2,3 είναι παρούσες στις υπόλοιπες ποικιλίες.

Στην εικόνα 19 ο εκκινητής (**OPT 02**) δεν ενισχύθηκε στην V_3 . Η ζώνη 1 είναι παρούσα μόνο στη V_1 . Η ζώνη 2 μόνο στη V_4 , η ζώνη 3 στη V_1 και V_2 . Η ζώνη 4 στην V_1 και V_4 .



Εικόνα 18

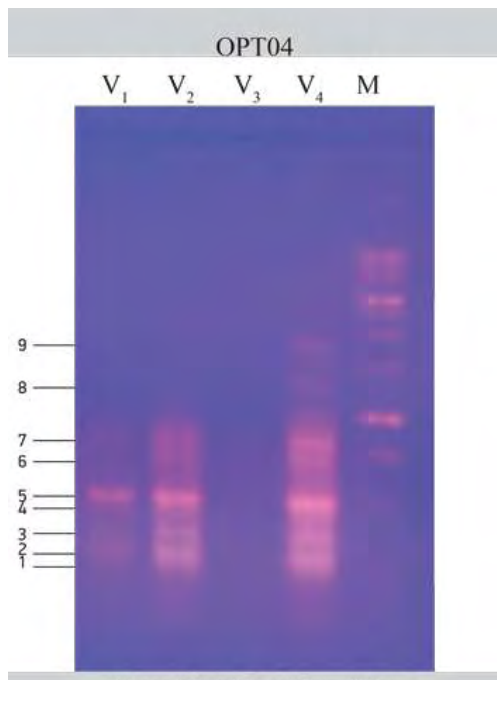


Εικόνα 19

V_1 : Μπογιατίου V_2 : Βελοούδο V_3 : Πυλαίας V_4 : Clemson

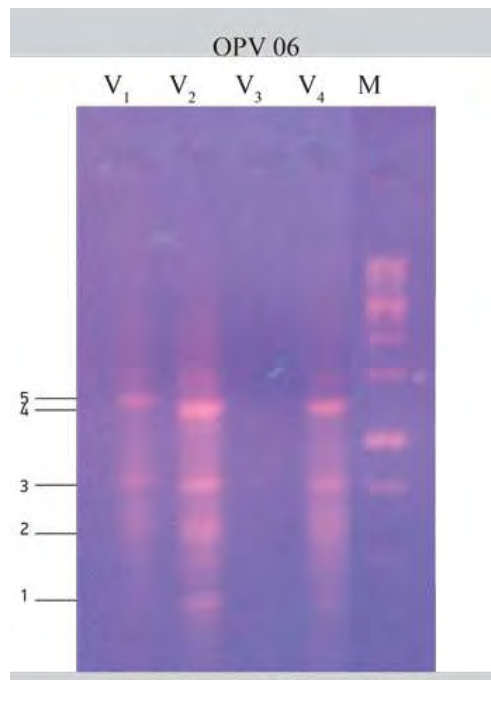
Στην εικόνα 20 ο εκκινητής (**OPT 04**) δεν ενισχύθηκε στην V_3 . Οι ζώνες 1,3,4,6,7 είναι παρούσες στην V_2 και V_4 . Η μπάντα 2 είναι παρούσα στις V_1 , V_2 , V_4 . Η ζώνη 5 είναι παρούσα μόνο στην V_1 . Οι ζώνες 8 και 9 είναι παρούσες μόνο στην V_4 .

Στην εικόνα 21 ο εκκινητής (**OPV 06**) δεν ενισχύθηκε στην V_3 . οι ζώνες 1 και 4 είναι παρούσες στις V_2 και V_4 ενώ οι ζώνες 2 και 3 είναι παρούσες στις V_1 , V_2 , V_4 . Τέλος η ζώνη 5 είναι παρούσα μόνο στην V_1 .



Εικόνα 20

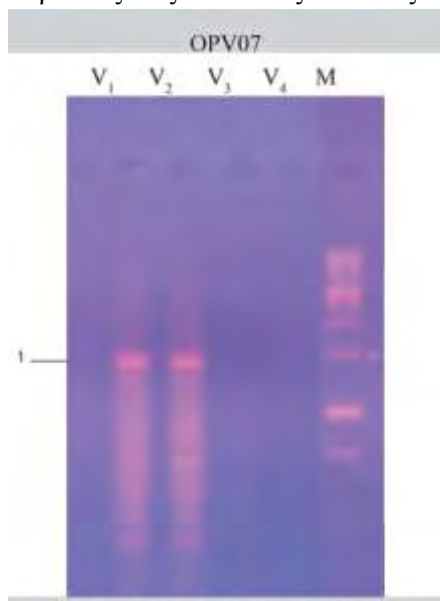
V_1 :Μπογιατίου V_2 :Βελούδο V_3 :Πυλαίας V_4 : Clemson



Εικόνα 21

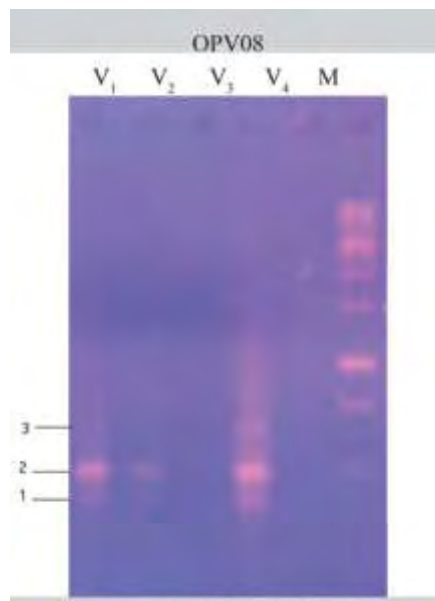
Στην εικόνα 22 ο εκκινητής (**OPV 07**) δεν ενισχύθηκε στις ποικιλίες V_3 και V_4 . Η ζώνη 1 εμφανίζεται στις V_1 και V_2 .

Στην εικόνα 23 ο εκκινητής (**OPV 08**) δεν ενισχύθηκε στην ποικιλία V_3 . Οι ζώνες 1 και 2 είναι παρούσες στις υπόλοιπες ποικιλίες ενώ η ζώνη 3 μόνο στην V_4 .



Εικόνα 22

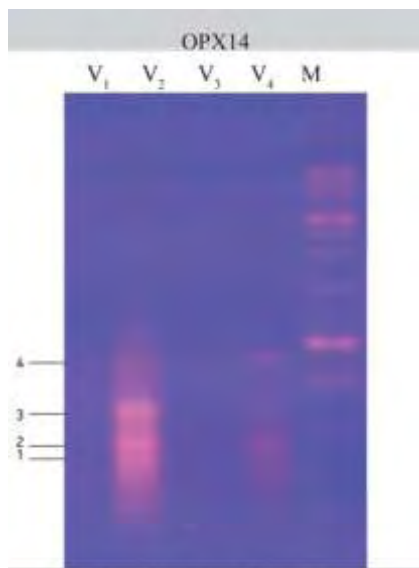
V_1 :Μπογιατίου V_2 :Βελούδο V_3 :Πυλαίας V_4 : Clemson



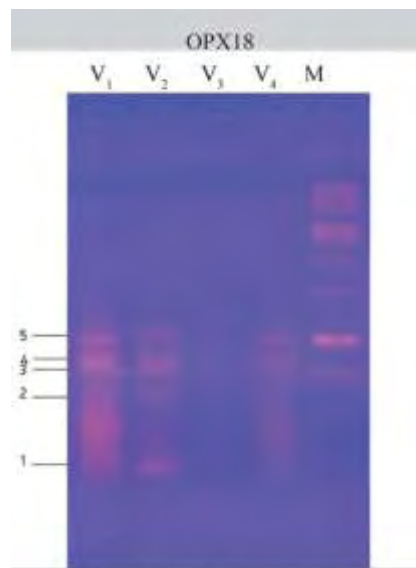
Εικόνα 23

Στην εικόνα 24 ο εκκινητής (**OPX 14**) δεν ενισχύθηκε στην ποικιλία V_1 και V_3 . Οι ζώνες 2 και 4 είναι παρούσες στις άλλες 2 ποικιλίες. Ενώ οι ζώνες 1 και 3 είναι παρούσες μόνο στην V_2 .

Στην εικόνα 25 ο εκκινητής (**OPX 18**) δεν ενισχύθηκε στην ποικιλία V_3 . Οι ζώνες 1 και 2 είναι παρούσες μόνο στην V_2 . Οι μπάντες 3,4,5 είναι παρούσες και στις 3 ποικιλίες στις οποίες ενισχύθηκε ο εκκινητής.



Εικόνα 24

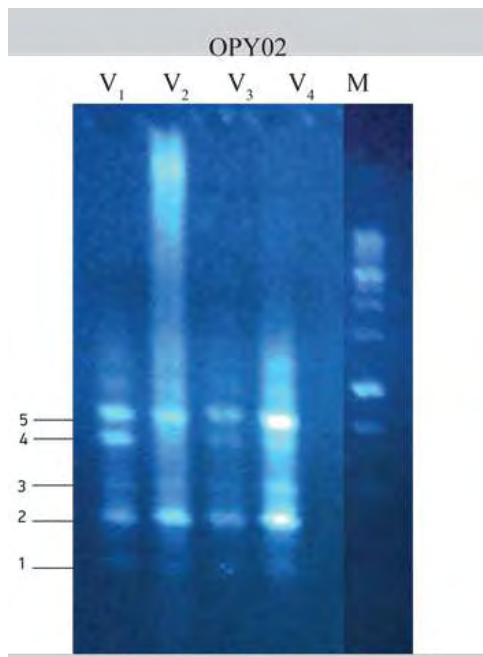


Εικόνα 25

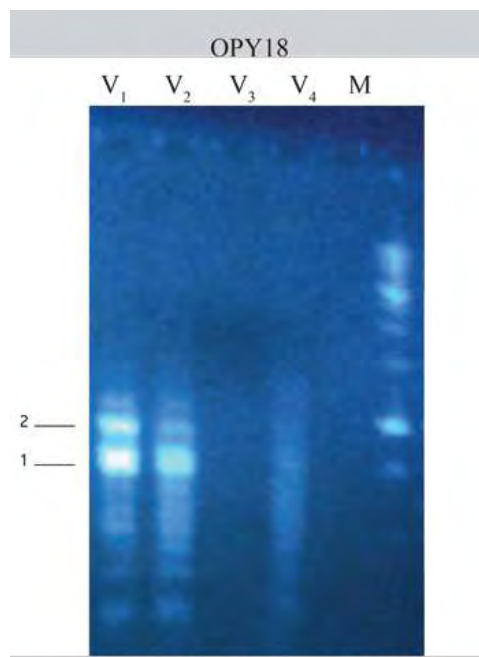
V_1 : Μπογιατίου V_2 : Βελούδο V_3 : Πυλαίας V_4 : Clemson

Στην εικόνα 26 (**OPY 02**) η ζώνη 1 απουσιάζει μόνο από την V_3 . Οι ζώνες 3 και 4 είναι παρούσες μόνο στις V_1 και V_4 . Η ζώνες 2 και 5 είναι παρούσες σε όλες τις ποικιλίες.

Στην εικόνα 27 ο εκκινητής (**OPY 18**) δεν ενισχύθηκε στις ποικιλίες V_3 και V_4 . Η ζώνη 1 και 2 εμφανίζονται στις V_1 και V_2 .



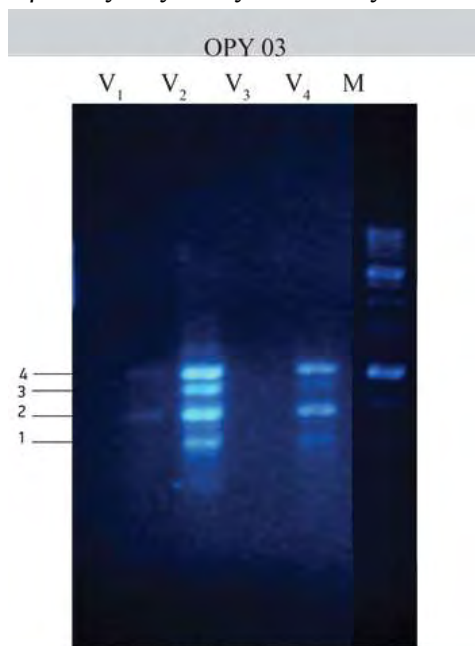
Εικόνα 26



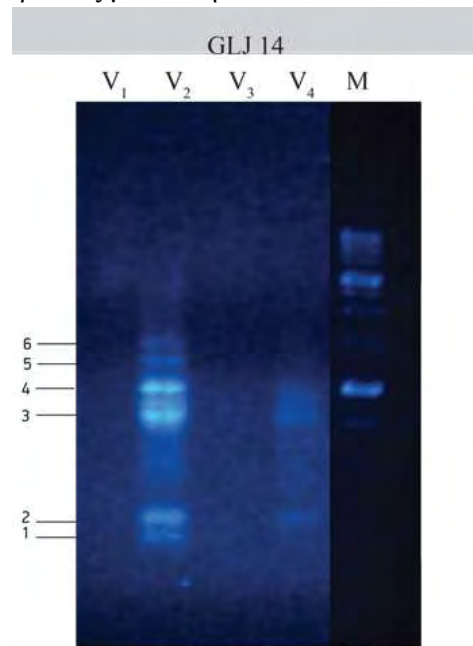
Εικόνα 27

V_1 : Μπογιατίου V_2 : Βελούδο V_3 : Πυλαίας V_4 : Clemson

Στην εικόνα 28 ο εκκινητής (**OPY 03**) δεν ενισχύθηκε στην ποικιλία V₃. Οι ζώνες 1 και 3 είναι παρούσες μόνο στις V₂ και V₄. Οι ζώνες 2 και 4 είναι παρούσες σε όλες τις ποικιλίες. Στην εικόνα 29 ο εκκινητής (**GLJ 14**) δεν ενισχύθηκε στην ποικιλία V₁ και V₃. Οι ζώνες 2,3,4 είναι παρούσες στις άλλες 2 ποικιλίες. Ενώ οι ζώνες 1,5,6 είναι παρούσες μόνο στην V₂.

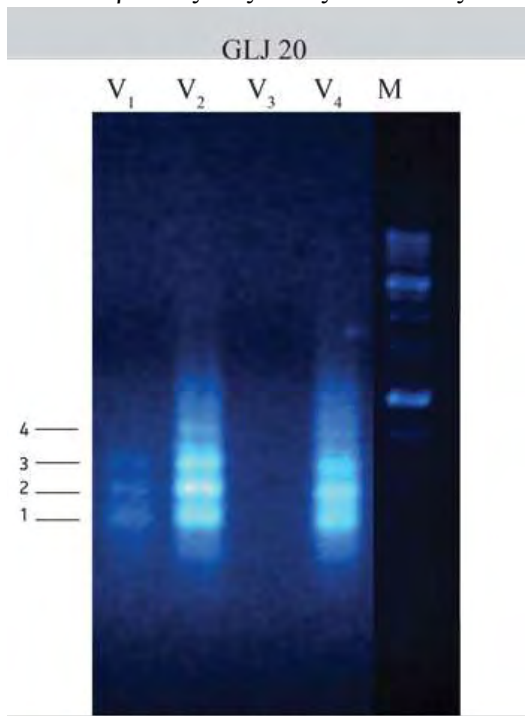


Εικόνα 28

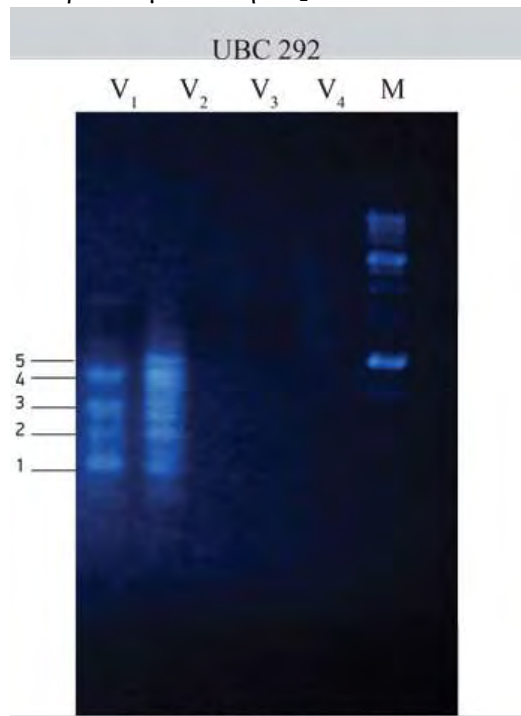
V₁:Μπογιατίου V₂:Βελούδο V₃:Πυλαίας V₄: Clemson

Εικόνα 29

Στην εικόνα 30 ο εκκινητής (**GLJ 20**) δεν ενισχύθηκε στην ποικιλία V₃. Οι ζώνες 1,2,3 είναι παρούσες στις υπόλοιπες ποικιλίες. Η ζώνη 4 είναι παρούσα μόνο στη V₂. Στην εικόνα 31 ο εκκινητής (**UBC 292**) δεν ενισχύθηκε στην ποικιλία V₃ και V₄. Οι ζώνες 1,2,3,4 είναι παρούσες στις άλλες 2 ποικιλίες. Ενώ η ζώνη 5 είναι παρούσα μόνο στην V₂.



Εικόνα 30

V₁:Μπογιατίου V₂:Βελούδο V₃:Πυλαίας V₄: Clemson

Εικόνα 31

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα RAPD ανάλυσης

ΜΟΝΟΜΕΡΕΙΣ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΜΙΛΑΝΤΕΣ	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ			
		V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
GLA 09		?	?	?	?
GLB 17	1	+	+	-	-
	2	+	+	+	+
	3	+	-	-	-
	4	+	+	-	+
	5	+	+	-	+
UBC 54	1	+	+	-	+
	2	-	+	-	-
	3	+	+	-	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	-	+
	6	+	+	-	+
	7	+	+	-	+
	8	+	-	-	+
	9	+	-	-	+
GLK 02	1	+	?	-	-
	2	+	?	-	-
	3	+	?	-	+
	4	+	?	+	-
	5	+	?	-	-
GLK 08	1	+	?	-	?
	2	+	?	-	?
	3	+	?	-	?
	4	+	?	+	?
	5	+	?	-	?
	6	+	?	-	?
OPAN 01		?	?	?	?
OPAE 03	1	+	?	+	?
	2	+	?	+	?
	3	+	?	-	?
OPA 02	1	+	+	?	+
	2	+	+	?	+
	3	+	+	?	+
	4	+	+	?	+
	5	+	+	?	+
	6	+	+	?	+
	7	+	+	?	+
OPM 16	1	-	+	?	+
	2	-	+	?	+
	3	+	-	?	-
OPM 18	1	-	+	?	+
	2	+	-	?	-
	3	-	+	?	+
	4	+	+	?	+
	5	-	+	?	+
	6	-	-	?	+
	7	-	-	?	+
OPB 07	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	-
	4	+	+	+	-
	5	+	+	+	-
	6	+	+	+	-
	7	+	+	-	-
OPB 15		?	?	?	?
OPB 16	1	-	+	?	-
	2	-	+	?	-
	3	-	+	?	+
	4	+	-	?	-
	5	-	+	?	+
	6	-	+	?	+
	7	-	+	?	-
	8	-	+	?	+
	9	-	+	?	+
	10	-	+	?	?
	11	-	+	?	+

ΜΟΝΟΜΕΡΕΙΣ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΜΙΛΑΝΤΕΣ	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ			
		V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
OPD 05	1	+	+	?	+
	2	+	+	?	+
UBC 210	1	?	+	?	+
	2	?	+	?	+
	3	?	+	?	-
	4	?	+	?	-
	5	?	+	?	-
	6	?	+	?	+
OPT 01	1	+	+	?	+
	2	+	+	?	+
	3	+	+	?	+
OPT 02	1	+	-	?	-
	2	-	-	?	+
	3	+	+	?	-
	4	+	-	?	+
OPT 04	1	-	+	?	+
	2	+	+	?	+
	3	-	+	?	+
	4	-	+	?	+
	5	+	-	?	-
	6	?	+	?	+
	7	-	+	?	+
	8	-	-	?	+
	9	-	-	?	+
OPV 06	1	-	+	?	+
	2	+	+	?	+
	3	+	+	?	+
	4	+	+	?	+
	5	+	-	?	-
OPV 07	1	+	+	?	?
OPV 08	1	+	+	?	+
	2	+	+	?	+
	3	-	-	?	+
OPX 14	1	?	+	?	-
	2	?	+	?	+
	3	?	+	?	-
	4	?	+	?	+
OPX 17		?	?	?	?
OPX 18	1	-	+	?	-
	2	?	+	?	+
	3	+	+	?	+
	4	+	+	?	+
	5	+	+	?	+
OPY 02	1	?	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	-	-	+
	4	+	-	-	+
	5	+	+	+	+
OPY 18	1	+	+	?	?
	2	+	+	?	?
OPY 03	1	-	+	?	+
	2	+	+	?	+
	3	-	+	?	+
	4	+	+	?	+
GLJ 14	1	?	+	?	-
	2	?	+	?	+
	3	?	+	?	+
	4	?	+	?	+
	5	?	+	?	-
	6	?	+	?	-
GLJ 20	1	+	+	?	+
	2	+	+	?	+
	3	+	+	?	+
	4	-	+	?	-
UBC 292	1	+	+	?	?
	2	+	+	?	?
	3	+	+	?	?
	4	+	+	?	?
	5	-	+	?	?

⊕ Παρουσία μπάντας

⊖ Απουσία μπάντας

? Μη ενίσχυση εκκινήτη ή κακής ποιότητας DNA

Κεφάλαιο 4. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη οι επιδράσεις της εφαρμογής του Ν διέφεραν ανάλογα με την ποικιλία και την περίοδο συγκομιδής. Το ποσοστό εφαρμογής Ν δεν επηρέασε τον αριθμό σπόρων ανά λοβό, αν και ο αριθμός αυτός έτεινε να μειώνεται στην όψιμη συγκομιδή (40-50 HMA). Παρόμοια στα δύο πειράματα, το μέσο βάρος ανά 100 σπόρους επηρεάστηκε σημαντικά από την περίοδο συγκομιδής σε όλες τις ποικιλίες, όχι όμως και από την εφαρμογή αζώτου. Η κύρια μείωση στο βάρος ανά 100 σπόρους συνέβη μεταξύ 35 και 40 HMA στο πείραμα 1 και 40 και 50 HMA στο πείραμα 2 αντίστοιχα. Η μείωση αυτή συνδέεται με την ωριμότητα των σπόρων (Dutta και Naik, 2009), κατά την οποία πραγματοποιείται απώλεια νερού. Η πρόωγη ωρίμανση των σπόρων που παρατηρήθηκε στο πείραμα 1 πιθανόν να είναι αποτέλεσμα των υψηλών θερμοκρασιών που επικρατούσαν κατά την αναπτυξιακή περίοδο σε σύγκριση με εκείνη του πειράματος 2. Το γεγονός ότι η εφαρμογή αζώτου δεν παρουσιάζει καμία επίδραση στον αριθμό σπόρων ανά λοβό και στο βάρος ανά 100 σπόρους είχε ήδη καταγραφεί και από τον Sajid et al., (2012). Η μείωση στον αριθμό σπόρων ανά λοβό (π.χ. Μπογιατίου), κατά τα όψιμα στάδια της ωρίμανσης θεωρητικά συμβαίνει από τον εσωτερικό ανταγωνισμό των σπόρων εκείνη την περίοδο. Είναι ευρέως γνωστό ότι η παραμονή ώριμων λοβών στο φυτό επιδρά ανασταλτικά στην αύξηση των καρπών και επομένως στον αριθμό λοβών ανά φυτό (Dhingra, 2009) και αυτό εκτείνεται και στους σπόρους διαμέσου αυτών των λοβών. Αν και οι Manjabu et al., (1985) και οι Moniruzzaman και Quamruzzaman, (2009) ανέφεραν μια θετική επίδραση του Ν στον αριθμό σπόρων ανά λοβό, στο πείραμα μας αυτό δεν συνέβη. Αυτές οι διαφορές πιθανόν να σχετίζονται με τις ποικιλίες που μελετώνται σε κάθε περίπτωση ή σε διαφορά στις κλιματικές συνθήκες. Ανάμεσα στις ποικιλίες, υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον αριθμό ανθέων και στον αριθμό λοβών ανά φυτό. Παρόλα αυτά η εφαρμογή Ν λίπανσης επηρέασε ελάχιστα ή καθόλου αυτά τα δύο χαρακτηριστικά και στα δύο πειράματα. Ο αριθμός των ανθέων ανά φυτό ήταν μέγιστος στην ποικιλία “Clemson” και ελάχιστος στην ποικιλία «Μπογιατίου». Η εφαρμογή 450 ppm Ν στην ποικιλία Μπογιατίου αύξησε τον αριθμό λοβών ανά φυτό όχι όμως και τον αριθμό στις άλλες ποικιλίες. Θα πρέπει να τονιστεί ότι ο αριθμός λοβών ανά φυτό στην ποικιλία Μπογιατίου ήταν μικρότερος σε σχέση με εκείνων των άλλων ποικιλιών (μέσος αριθμός λοβών ανά φυτό στην Μπογιατίου 7.3 και 6.3 και στην Clemson 24.3 και 21.2 για το πείραμα 1 και 2 αντίστοιχα). Αυτό το αποτέλεσμα προκαλεί εντύπωση γιατί η «Μπογιατίου» είναι μια τοπική ποικιλία (Koutsos, 2009) και αναμένεται να προσαρμόζεται στις τοπικές κλιματικές συνθήκες καλύτερα από ότι η Αμερικάνικη ποικιλία “Clemson”.

Ίσως η πιο σημαντική επίδραση του αυξημένου ποσοστού αζώτου στα χαρακτηριστικά των σπόρων της μπάμιας ήταν η αύξηση στο ποσοστό βλαστικότητα του σπόρου αν και όχι απαραίτητα σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Στο πείραμα 1 μέγιστη βλαστικότητα καταγράφηκε σε σπόρους που συγκομίστηκαν 35-40 HMA, ενώ στο πείραμα 2 σε σπόρους που συγκομίστηκαν 40 HMA (Μπογιατίου, Βελούδο και Πυλαίας) και 40-50HMA (Clemson). Η μειωμένη βλαστικότητα των σπόρων που συγκομίστηκαν πρώιμα στο πείραμα 2, προέκυψε από την καθυστέρηση της ωρίμανσης τους, ενώ η μείωση που παρατηρήθηκε στην «Μπογιατίου» και «Βελούδο» συνέβη πιθανόν λόγω της αύξησης της σκληρότητας του σπόρου. Η συχνότητα εμφάνισης της σκληρότητας στους σπόρους της μπάμιας είναι ένα ποιοτικό χαρακτηριστικό της, το οποίο επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως ο γενότυπος, η λίπανση, ο χρόνος συγκομιδής και οι κλιματικές συνθήκες κατά την διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου. Από τις ποικιλίες που εξετάστηκαν η «Μπογιατίου» παρουσίασε το μέγιστο ποσοστό σκληρότητας(μετά η Βελούδο) και ειδικά όταν οι λοβοί συγκομίστηκαν 50 HMA αναφορικά με το πείραμα και το ποσοστό λιπάσματος. Αντίθετα η Clemson δεν εμφάνισε σκληρούς σπόρους. Η εμφάνιση της σκληρότητας σπόρου στη «Μπογιατίου» είχε καταγραφεί (Passam και Πολύζου) και αυτό συνδέεται στενά με την περιεκτικότητα σε υγρασία του σπόρου (Demir, 1997). Η χαμηλή βλαστικότητα της «Μπογιατίου» στο πείραμα 1 σε σχέση με το πείραμα 2 αντανάκλα τις υψηλές θερμοκρασίες (ταχεία απώλεια υγρασίας των σπόρων) και τη χαμηλή μέση υγρασία συνθήκες κάτω από τις οποίες ωρίμασαν οι λοβοί του πειράματος 1 (Ιούλιος) σε σύγκριση με εκείνους του πειράματος 2 (Αύγουστος). Σύμφωνα με τους Passam et al., (1998), το ποσοστό σκληρότητας της Μπογιατίου είναι μεγαλύτερο κατά τη διάρκεια περιόδων με υψηλή θερμοκρασία(Ιούλιος/Αύγουστος) και ο Demir (1997) ανέφερε ότι η σκληρότητα του καλύμματος του σπόρου αυξήθηκε με την ταχεία απώλεια υγρασίας των σπόρων. Η τάση να αυξάνεται το ποσοστό εφαρμογής αζώτου οδηγεί σε αύξηση της βλαστικότητας λόγω της επίδρασης του Ν στην σκληρότητα του σπόρου (Rekouni et al., 2003). Πιθανώς η πολύ αυξημένη ποσότητα Ν να καθυστερεί την ωριμότητα των σπόρων της «Μπογιατίου» και γι αυτό να μην εμφανίζεται μεγάλο ποσοστό σκληρότητας. Η επίδραση αυτή μπορεί να ποικίλει ανάμεσα στις ποικιλίες και ανάλογα με την περίοδο συγκομιδής. Σε άλλα είδη το Ν καθυστερεί την άνθιση και την απώλεια

υγρασίας του σπόρου (George 1987). Σε ορισμένες μελέτες είτε δεν παρατηρήθηκε επίδραση του N στην βλαστικότητα είτε παρατηρήθηκε θετική επίδραση.

Η ποικιλία «Μπογιατίου» σε σύγκριση με τις άλλες ποικιλίες είναι αυτή που εμφανίζει το χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας και συνεπώς η ποιότητα του σπόρου είναι υποβαθμισμένη έναντι των υπολοίπων ποικιλιών.

Η ποιότητα του σπόρου όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, επηρεάζεται τόσο από τον γενότυπο όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Έτσι αναζητήσαμε γενετικές διαφορές, με την χρήση μοριακών δεικτών RAPD, αποσκοπώντας στην πιθανή ταύτιση φαινοτυπικών χαρακτήρων με γενετικών. Βάσει των αποτελεσμάτων που αποκτήθηκαν θα πρέπει να καταστεί σαφές ότι, μερικές από τις αντιδράσεις PCR θα πρέπει να επαναληφθούν ώστε να ελεγχτεί η επαναληψιμότητα των προτύπων των ζωνών τόσο στο ίδιο το DNA, όσο και στο DNA άλλων ατόμων κάθε ποικιλίας ξεχωριστά. Επιπλέον με αυτές τις επαναλήψεις θα διαλευκανθεί αν η απουσία ζωνών υπόκειται σε χαμηλής ποιότητας DNA λόγω προσμίξεων από άλλα συστατικά των κυττάρων ή αν υπόκειται σε μερική υβριδοποίηση των εκκινητών λόγω νουκλεοτιδικών διαφορών στη αλληλουχία του DNA που ενισχύθηκαν.

Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι, στην εικόνα () ο μοριακός δείκτης GLB17 διαχωρίζει την ποικιλία «Μπογιατίου» από τις υπόλοιπες 3 δεδομένου ότι η ζώνη 3 είναι παρούσα μόνο σε αυτήν. Σε ένα επόμενο στάδιο η ζώνη 3 θα μπορούσε να κλωνοποιηθεί με σκοπό να πραγματοποιηθεί αλληλούχιση της και να κατανοηθεί το γονιδιακό περιεχόμενο της ώστε να καταστεί δυνατή η σχεδίαση ειδικών εκκινητών που θα έχουν την δυνατότητα να ενισχύουν μόνο την συγκεκριμένη ζώνη. Η απόκτηση αυτών των εκκινητών θα ήταν εργαλείο για οποιονδήποτε επιθυμούσε να τους χρησιμοποιήσει στην πραγματοποίηση διαγνωστικής PCR έτσι ώστε να επιτύχει ταυτοποίηση ποικιλίας. Πολλά υποσχόμενα όμως είναι και τα αποτελέσματα της χρήσης του μοριακού δείκτη OPM16 όπου εμφανίζεται ξεκάθαρα η ζώνη 3 στην ποικιλία «Μπογιατίου» αλλά απουσιάζει από τις ποικιλίες Βελούδο και Clemson. Στην ποικιλία Βελούδο όμως δεν εμφανίζεται καμία ζώνη επομένως θα πρέπει να επιβεβαιωθεί η παρουσία ή η απουσία της ζώνης 3 και σ αυτή την ποικιλία για να μπορέσει κανείς να συμπεράνει με βεβαιότητα την ύπαρξη της συγκεκριμένης διαφοράς. Παρόμοιες περιπτώσεις εμφανίζονται και στα αποτελέσματα του ελέγχου των εκκινητών OBP16 (η ζώνη 3 απουσιάζει από την ποικιλία «Μπογιατίου» και η 4 είναι παρούσα μόνο σε αυτή), OPV06 (για τις ζώνες 4 και 5), OPY02 (για την ζώνη 4), UBC292(για την ζώνη 5), αλλά κρίνεται απαραίτητος ο επανέλεγχος για να διερευνηθεί η παρουσία ή όχι των ζωνών και στις ποικιλίες που δεν εμφανίζεται καμία ζώνη. Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι, μια μικρή διαφορά μεγέθους ανάμεσα σε δύο ζώνες, όπως παραδείγματος χάρη οι ζώνες 2 και 3 αποτέλεσμα της εξέτασης του εκκινητή OPM16 συνεπάγεται ότι: α) η διαφορά τους είναι αποτέλεσμα μία έλλειψης στην ζώνη 3 ή ότι οι δύο ζώνες προκύπτουν από τελείως διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος και δεν σχετίζονται μεταξύ τους.

Συνοψίζοντας, η γενετική ανάλυση που πραγματοποιήσαμε δείχνει ότι υπάρχει γενετική διαφοροποίηση ανάμεσα στις ποικιλίες που εξετάσαμε. Αν εξετάζονταν πάρα πολλοί δείκτες, κάποιος από αυτούς πιθανόν να ταυτιζόταν με κάποια γονίδια που ελέγχουν τις διαφορές, που παρατηρήθηκαν από το γεωπονικό πείραμα και καταγράφηκαν παραπάνω, ή να βρίσκονταν σε γειτονικά αυτών των γονιδίων σημεία με αποτέλεσμα οι γειτονικές διαφορές που παρατηρούνται να είναι αποτέλεσμα συγκληρονομής (Hitch- Hiking phenomenon).

Βιβλιογραφία

1. Adetunji, I.A. and Chheda, H.R. 1989. Seed yield stability of okra as influenced by planting date. Plant Breeding 103, 212-215 . Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg.
2. Adetuyi, FO., Osagie, AU. And Adekunle, AT. 2008. Effect of Postharvest Storage Techniques on the Nutritional Properties of Benin Indigenous Okra *Abelmoschus esculentus* (L) Moench. Pakistan J. Nutrit. 7: 652-657
3. Adilakshmi, A., Korat, DM. and Vaishnav, PR. 2008. Effect of organic manures and inorganic fertilizers on insect pests infesting okra. Karnataka J. Agric. Sci. 21: 287-289
4. Akande, MO., Oluwatoyinbo, Fl., Adediran, JA., Buari, KW. And Yusuf, IO. 2003. Soil amendments affect the release of P from rock phosphate and the development and yield of okra. J. Veg. Crop Product. 9:3-9.
5. Akande, MO., Oluwatoyinbo, Fl., Makinde, EA., Adepoju, AS. And Adepoju, IS. 2010. Response of okra to organic and inorganic fertilization. Nature Sci. 8:261-266.
6. Akintoye, HA Adebayo, AG. And Aina, OO. 2011. Growth and yield response of okra intercropped with live mulches. Asian J. Agric. Res. 5: 146-153.
7. Akinyele, BO. And Temikotan, T. 2007. Effect of variation in soil texture on the vegetative and pod characteristics of okra (*Abelmoschus esculentus*) (L) Moench. Intern. J. Agric. Res. 2:165-169
8. Ames, J. M. and MacLeod, G. 1990. Volatile components of okra. Phytochemistry 29 (4), 1201 – 1207.
9. Amjad, M., M.A. Anjum and S. Hussain. 2001. Effect of different sowing dates and various doses of fertilizer on juvenility and productivity of okra. Pak. J. Agric. Sci., 38: 29-32.
10. Anjum, M.A. and Amjad, M. 1999, Response of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) to different levels of N, P and K fertilizers. Pak. J. Biol. Sci, 2:794-796.
11. Arapitsas, P. 2008. Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. Food Chem. 110: 1041-1045.
12. Baskin, C.C. and Baskin J. M. 1998. Seeds: Ecology , Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination . Academic Press, New York.
13. Batt, R.M. and Srinivasa, Rao, N.K. 2002. Source manipulation induced variation in dry-matter partitioning to reproductive sink in okra (*Abelmoschus esculentus* L.). Indian J. Hort. 59:57-61.
14. Baxter, L. and Waters, L.Jr. 1990a. Chemical changes in okra stored in air and controlled atmosphere. J. Amer. Soc. Hort. Sci, 115, 452-454
15. Beebe T.J.C, Grahm Rowe. An introduction to molecular ecology. Oxford University Press, second edition, 2008.
16. Bhatt, R.M. and Srinivasa Rao, N.K. 2009. Physiology, crop growth development and yield. In (Okra Hand Book) Ed. Dhankhar, B.S. and Singh, R., HNB Publishing p. 37-60.
17. Bhatt, R.M. and Srinivasa Rao, N.K. 1998. Germination response to fruit position and temperature in okra (*Abelmoschus esculentus* L.). Indian J. Hort. 55:81-84.
18. Black, M., Bewley, J.D. and Halmer, P. 2006. The encyclopedia of seeds: science, technology and uses. CAB International Wallingford, UK.
19. Boesewinkel, FD. And Bouman, F. 1995. The Seed: Structure and Function. In: Kigel J. and G. Galili (eds.). Seed Development and Germination. 270 madison Ave., New York. New York. USA: Marcel Dekker Inc. 853 pp.
20. Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M, and Davis R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. AM.J. Hum . Genet. 32:314-331.
21. Bradford, K.J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress condition. Hort Sci, 21, 1105-1112.
22. Briant<R.E. 1974. An analysis of the effects of gibberellic acid on tomato leaf growth. J Exp Bot 25:764-771
23. Charrier, A. 1984. Genetic resources of Abelmoschous (okra) . IBPGR Secretarial, Paris , France
24. Chauhan, DVS. 1972. Vegetable production in India, Ram Prasad nd Sons, India
25. Chauhan, K.S. and Bhandari, Y. M. 1971. Pod development and germination studies in okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench). Indian J. Agri. Sci. 41 (10):852-856.

26. Demir, I., 1997. Occurrence of hardseededness in relation to seed development in okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench). Plant Vr. Seeds 10:7-13.
27. Dhankhar, B.S. and Ram . Singh. 2009. Okra Hand Book, global production, processing and crop improvement. USNB Publishing.
28. Dhankhar, B.S. Singh, RKumar, R. and Kumar, S. 2009. Genetic improvement. In: “Okra Handbook” Ed. Dhankhar, B.S. and Singh, R ., HNB Publishing, N.Y., p. 115-158.
29. Dhingra, H.R. 2009. Morfological reaturea and reproductive biology. Inc: “Okra Handbook” Ed. Dhankhar, B.S. and Singh, R ., HNB Publishing, N.Y., p. 25-36.
30. Dilruba, S., Hasanuzzaman, M., Karim R. and Nahar, K. 2009. Yield response of okra to different sowing time and application of growth hormones. J. hort. Sci. Ornamental Plants 1:10-14
31. Doijode, SD. 2001. Seed storage of horticultural crop. Food Product Press, New York, USA>
32. Dutta, O.P. and Naik, L.B. 2009. Seed production, technology. In “Okra Handbook” Ed. Dhankhar, B.S. and Singh, R ., HNB Publishing, N.Y., p. 227-246.
33. El Balla, M.M.A., Saidahmed, A.I. and Makkawi, M. 2011. Effect of moisture content and maturity on hardseededness and germination in okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench). International Journal of Plant Physiology and Biochemistry Vol. 3 (6), p.102-107.
34. Ellis, RH., Hong, TD. And Roberts, EH. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. Compendium of specific germination information and test recommendations. Int. Board Plant Genet. Resour., Rome, II: 211-667
35. Ellis, RH., Hong, TD. And Roberts, EH. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. Compendium of specific germination information and test recommendations. Int. Board Plant Genet. Resour., Rome, p.667
36. Fenner, M. 1991. The effects of the parent environment on seed gerninability. Seed Science Research 1:75-84
37. Fenner, M. 1992. Environmental influences on seed size and composition. Horticultural J. 78-80
38. George , R.A.T. 1987. Technical guidelines of vegetable seed technology. Food and Agriculture Organization of the United Nation , Rome
39. Georgiou, K. Thanos, C.A., Tafas, T.P. and Mitrakos, K. 1982. Tomato seed germination. Osmotic pretreatment and far red inhibition, J. Exp. Bot . 33:1068-1075
40. Grewal, B.S. , Nandpuri, K.S. and Kumar, J.C. 1972. Effect of date of sowing, spacing and picking of green pods on seed production of okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench). Punjab Hort. J. 12(4):248-254.
41. Grubben, G.J.H., 1977. Tropical vegetables and their genetic resources. International Board for Plant Genetic Resources. F.A.O., Rome.
42. Gutterman, Y. 2000. Maternal effects on seeds during development, p. 59-84. In M. Fenner (ed.). Seeds: the ecologyof regeneration in plant communities. 2nd edition.
43. Hermansen, L/A., Duryea, M.L. and White, T.L. 2000. Viability in seed coat dormancy in *Dimorphandra mollis*. Seed Sci. Technol., 28:567-580.
44. Heydekker, W. and J. Higgins, R.L. 1973. Gulliver, Accelerated germination by osmotic seed treatment, Nature 246, 42-44.
45. Hilhorst, H.W. and Toorop, P.E. 1997. Review on dormancy, germinability , and germination in crop and weed seeds. Advances in Agronomy 61:111-165.
46. Humayun, Khan., Mazullah, Khan., Khalid, Rasul., Abdul, Majeed and Fayaz, Ahmad Safi. 2000. Effect of different levels of nitrogen alone and in combination with constant doses of phosphorus and potassium on growth and yield of okra(*Abelmoschus esculentus* (L)).cv. T-13 under the agro-climatic conditions of Mingora, Swat. Pakistan Journal of Biological Sciences 3(12):2101-2104.
47. Ilias, I., Ouzounidou, G., Giannakoula, A. Papadopoulou, A. 2007. Effects of gibberellic acid and prohexadione – calcium on growth, chlorophyll flouorescence and quality of okra plant. Biologia Planatarum 51 (3):575-578.
48. Iremiren, g. O. and Okiy, D.A. 1986. Effects of sowing dte on the growth, yield and quality of okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench). In southern Nigeria. J. Agric. Sci. (UK) 106:21-26.
49. Islam, M.S. Rahman, M.M. and Choudhary, A.K. 2000, off season performance of okra for edible pod and seed production . Thai J. Agric. Sci. 33(3/4):107-113.

50. Kahlon, TS., Chapman, MH. And Smith, GE. 2007. In vitro binding of bibe acids by okra beets asparagus eggplant turnips green beans carrots and cauliflower. Food Chem. 103?: 676-680.
51. Koutsos, T.V. 2009. Greek okra cultivars – sustainable agriculture systems. In: Okra Handbook (ed. Dhankhar, B.S. and Singh, R.) UNB publishing New York, p. 361-373
52. Kumar, R., Patil, MB., SR. and Paschapur, MS. 2009. Evaluation of (*Abelmoschus esculentus* Mucilage as suspending gent in paracetamol suspension. Intern. J. Pharm Tech Res. I:658-665.
53. Kumar, S. Dagnoko, S., Haougui, A., Ratnadass, A., Pasternak, D. and Kouame, C. 210. Okra (*Abelmoschus spp.*) in West and Central Africa: potential and progress on its improvement. African J. Agric. Res. 5:3590-3598.
54. Lamont, W. 1999. Okra a versatile vegetable crop. Hort. Technol. 9: 179-184
55. Lengsfeld, C., Titgemeyer, F., Faller, G. and Hensel, A. 2004. Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. J. Agrac. Food Chem. 52: 1495-1503.
56. Lenka, P.C., Das, D.K. and Mishra, H.N. 1989. Effect of nitrogen and phosphorus on seed yield of Bhindi cv. Parbhanikranti. Orissa J. Agri, Res. 2: 125-127.
57. Liu, IM., Liou, SS., Lan, TW., Hsu, FL. and Cheng, Jt. 2005. Myricetin as the active principle of *Abelmoschus moschatus* to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. Planta Medica 71:617-621.
58. Luis Felipe, V Purquerio., Antonio, A do Lago and Francisco, Antonio Passos. 2010. Germination and hardseedness of seeds in okra elite lines. Horticultura Brasileira 28: 232-235.
59. Lutz, J.M. and Hardenburg, R.E. 1977. The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks. Agric. Handb. 66, ARS-USDA (reprinted).
60. Majanbu, IS., Ogunlela, VB., Ahmed, MK. and Olarewaju, JD. 1985. Response of two okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). Varieties to fertilizers: yield and yield components as influenced by nitrogen and phosphorus application. Fertilizer Research 6: 257-267.
61. Malik, Y.S., Singh, N., Nehra, B.K., Khurana, S.C., Dahiya, M.S. and Singh, N. 2000. Okra seed quality as influenced by position of pod on mother plant, ripening stage of pod and ambient storage conditions. Haryana J. Hort. Sci. 29: 229-232.
62. Manga, A.A. and Mohammed, S.G. 2006. Effect of plant population and nitrogen levels on growth and yield of okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]. Adv. Hort. Sci. 20, 137-139.
63. Maria Lea, H. Villavicencio., Nestor, C. Altoveros and Teresita, H. Borromeo. 2007. Histochemical Changes in the Seed Coats Structure of Three Species of *Abelmoschus* (Medik.) Under Different Moisture Content Levels. Philippine Journal of Science, 136 (2): 109-118, December.
64. Markose, BL. and Peter, KV. 1990. Okra review of research on vegetable and tuber crops. Kerala Agricultural University Press, Kerala, India.
65. Martin, F. W., and Rhodes, A. M. 1983. Seed characteristics of okra and fruiting pattern as affected by growth regulators. Hort. Sci. 25:431-433.
66. Mishra, R.K. and Ganesh, Singh. 2005. Effect of sources of nutrients on performance of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). Sri Lankan J. Agric. Sci. Vol. 42, 52-57.
67. Moniruzzaman, M. and Quamruzzaman, A.K.M. 2009. Effect of nitrogen levels and picking of green fruits on the fruit and seed production of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). J. Agric. Rural Dev., 7: 99-106.
68. Moniruzzaman, M., Uddin, M.Z. and Choudhury, A.K. 2007. Response of okra seed crop to sowing time and plants spacing in south eastern hilly region of Bangladesh. Bangladesh J. Agric. Res., 32: 393-402.
69. Naik, L.B., Vogeisha, H.S., Bhanuprakash, K. and Padmini, K. 2004. Production of open pollinated seed in okra. In: Annual Report, 2003-04. Indian Institute of Horticultural Research, Bangalore, India, p.44.
70. Najdafi, F., Bannanyan, M., Tabrizi, L. and Rastgoo, M. 2006. Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. J. Arid Environ., 64: 542-547.
71. Ndunguru, J., Rajabu, AC. 2004. Effect of okra mosaic virus disease on the above-ground morphological yield components of okra in Tanzania. Scientia Horticulturae 99: 225-235.
72. Nwagburuka C. C., Kehinde O. B., Ojo D. K., Popoola A. R., Oduwaye O., Denton O. A. & Adekoya M. 2011. Molecular characterization of twenty nine okra accession using the random amplified polymorphic DNA molecular Marker.

73. Oyelade, O. J., Ade-Omowaye, B.I.O. and Adeomi, V.F. 2003. Influence of variety on protein, fat contents and some physical characteristics of okra seeds. *Journal of Food Engineering*, 57, 111-114.
74. Oyenuga, V.A. 1969. *Nigeria's foods and foodstuffs: Their chemistry and nutritive values* (3rd ed.). Ibadan, Nigeria: Ibadan University Press. Page: 704-707.
75. Passam, H.C. and Polyzou, P. 1997. Improvement of okra seed germination by acid, osmoconditioning and hot water treatments. *Pl. Var. Seeds*. 10:135-140.
76. Passam, H.C. and Rekoumi, K. 2009. Okra in Greece. Production and Constraints. In: Dhankhar B.S., Singh R (Eds). *Okra Handbook: Global Production, Processing and Crop Improvement*. HNB Publishing, N.Y. pp. 347-359.
77. Passam, H.C., Akoumiankis, K and Sarigiannidi, A. 1998. The effect of time of sowing on the production of okra (*Hibiscus esculentus* L.) seed in the Mediterranean region. *Plant varieties and seeds*. 11, 145-150.
78. Prabhakar, B.S., Hegde, D.M., Srinivas, K. and Doijode, S.C. 1985. Seed quality and productivity of okra in relation to nodal position of pod. *S. Indian Hort*. 33(2):115-117.
79. Prakash K., Pitchaimuthu M. and K.V. Ravishankar 2011. Assessment of genetic relatedness among okra genotypes (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) using rapid markers
80. Purquerio, L.F.V., Lago, A.A. and Passos, F.A 2010. Germination and hardseedness of seeds in okra elite lines. *Hortic. Brasil.*, 28: 232-235.
81. Quinlivan, B.J. 1971. Seed coat impermeability in legumes. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 37, 283-286.
82. Rekoumi, K., Karapanos, I.C., Akoumianakis, K.A. and Passam, H.C. 2012. Nitrogen application affects yield and postharvest quality of okra (*Hibiscus esculentus* L. cv. 'Boyatiou'). *International Journal of Plant Production* 6 (1).
83. Rekoumi, K., Moustakas, N., Passam, H. and Akoumianakis, K. 2013. The effect of nitrogen fertilization on the concentration of inorganic nutrients in okra (*Hibiscus esculentus*) cv. Boyatiou. *Proc. Greek Soc. Hort. Sci.* 10, 424-426.
84. Roy, S.K. and Behera, T.K. 2009. Postharvest management. In: Dhankhar B.S., Singh R. (Eds). *Okra Handbook: Global Production, Processing and Crop Improvement*. HNB Publishing, N.Y. pp. 211-225.
85. Rumpel, J. and Szudyga, I. 1978. The influence of pre-sowing seed treatment on germination and emergence of tomato 'New Yorker' at low temperatures, *Sci. Hort.* 9: 119-125.
86. Ryall, A.L. and Lipton, W.J. 1979. Handling, transportation and storage of fruits and S. Sundareswaran., S. Sathish and A. Vijayakumar. 2011. Seed Development and Maturation Studies in Ambrette (*Abelmoschus moschatus* Medic.). *Madras Agric. J.*, 98 (1-3): 29-32.
87. Sadat, M.S.I. 2000. Studies on the effects of different levels of nitrogen, phosphorous and potassium on the growth yield and seed production of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) M S. Thesis, Dept. of Horticulture, Bangladesh Agril. Univ., Mymensingh, Bangladesh.
88. Saif, U.R., Kashif, R., Yaseen, M., Arshad, M. and Ayub, M. 2008. Response of okra (*Hibiscus esculentus* L.) to soil given encapsulated calcium carbide. *Pak. J. Bot.*, 40(1): 175-181.
89. Saifullah, M. and Rabbani, MG. 2009. Evaluation and characterization of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench.) genotypes. *SAARC J. Agric.* 7: 92-99.
90. Sajid, M., Khan, M.A., Rab, A., Shah, S.N.M., Arif, M., Jan, I., Hussain, Z. and Mukhtiar, M. 2012. Impact of nitrogen and phosphorus on seed yield and yield components of okra cultivars. *J. Anim. Plant Sci.* 22(3): 704-707.
91. Sarnaik, D.A., Begael, B.S. and Singh, K. 1986. response of okra seed crop to major nutrients. *Research and Development Report*, 3: 10-12.
92. Savello, Ph., Martin, FW. and Hill, JM, 1980. Nutritional composition of okra seed meal. *J. Agric. Food Chem.* 28: 1163-1166.
93. Serrato-valenti, G., Cornara, L., Lototo, S. and Quagliotti, L. 1991. Seed coat structure and histochemistry of *Abelmoschus esculentus*. Chalazal region and water entry. *Ann. Bot. Lond.*, 69: 313-321.
94. Serrato-valenti, G., Cornara, L., Lototo, S. and Quagliotti, L. 1992. Seed coat structure and histochemistry of *Abelmoschus esculentus*. Chalazal region and water entry. *Annu. Bot.* 69: 313-321.
95. Setubal, JW., Zanin, ACW. and Nakagawa, J. 1994. Efeitos de metodos de colheita e da localizacao dos frutos na planta sobre a ocorrencia de sementes duras em quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* L. Moench.). *Scientia Agricola* 51: 490-493.

96. Siemonsma, JS. and Kouame, C. 2000. *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Netherlands.
97. Standifer, LC., Wilson, PW. and Drummond, A. 1989. The effect of seed moisture content on hardseededness and germination in four cultivars of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench.) Plant Varieties Seeds., 2: 149-154.
98. Sunday E. Aladele1, O. J. Ariyo2 and Robert de Lapena 2008. Genetic relationships among West African okra (*Abelmoschus caillei*) and Asian genotypes (*Abelmoschus esculentus*) using RAPD African Journal of Biotechnology Vol. 7 (10), pp. 1426-1431.
99. Tindall, HD. 1983. Vegetables in the tropics. Macmillan Education Limited, London, UK.
100. Uwah, D.F., Nwagwu, F.A. and Iwo, G.A. 2010. Response of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench.) to different rates of nitrogen and lime on an acid soil. International Journal of Agriculture Sciences, Volume 2, Issue 2, pp-14-20
101. Van Borssum Waalkes, J., 1966. Malesian Malvaceae revised. Bulmea, 14, 1-251.
102. Vanangamudi, K., Natarajan, N., Srimathi, P., Natarajan, K., Saravanan, T., Bhaskaran, M., Bharathi, A., Natesan, P. and Malarkodi, K. 2006. Advances in seed science and technology (Volume 2) quality seed production in vegetables. Published by: Agrobios (India).
103. Yadav, S.K. and Dhankar, B.S. 2001. Seed production and quality of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) as affected by sowing time and position of fruit on plant. Seed Res., 29(1): 47-51.
104. Yadav, S.K. and Dhankar, B.S. 1999. Performance of Varsha Uphar cultivar of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) as affected by the sowing dates and plant geometry. Veg. Sci., 26: 180-182.
105. Yadav, S.K., Dhankar, B.S., Deshwal, D.P. and Tomer, R.P.S. 2001. Effect of sowing date and plant geometry on seed production and quality of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) cv. Varsha Uphar. Seed Res. 29 (2): 149-152.
106. Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Βιοτεχνολογία Φυτών, Αθήνα 2001

