

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Πτυχιακή διατριβή

**«Αξιολόγηση ποικιλιών σόγιας (*Glycine max* (L.) Merr.) σε επίσπορη
καλλιέργεια και μελέτη των γενετικών σχέσεων τους με τη
χρήση μοριακών δεικτών SSR»**

Καρανίκα Χρυσοβαλάντου



Επιβλέπων:

Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ, Καθηγητής

ΒΟΛΟΣ 2016



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 16325/1

Ημερ. Εισ.: 12/06/2017

Δωρεά: Συγγραφέα

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΦΠΑΠ

2016

ΚΑΡ

Πτυχιακή διατριβή

«Αξιολόγηση ποικιλιών σόγιας (*Glycine max* (L.) Merr.) σε επίσπορη καλλιέργεια και μελέτη των γενετικών σχέσεων τους με τη χρήση μοριακών δεικτών SSR»

Εξεταστική επιτροπή:

1. Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.
2. Μαυρομάτης Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας, Σχολή Γεωπονίας, Δασολογίας & Φυσικού Περιβάλλοντος, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μέλος.
3. Παυλή Ουρανία, Λέκτορας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους βοήθησαν και συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της παρούσας Πτυχιακής Εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή εξεταστική επιτροπή, τον επιβλέποντα Καθηγητή της πτυχιακής μου διατριβής κύριο Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ, τον Επίκουρο Καθηγητή κύριο Μαυρομάτη Αθανάσιο και την κυρία Παυλή Ουρανία Λέκτορα του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Χρύσα Φώτη Υποψήφια διδάκτορα του Π. Θ. που με βοήθησε στο εργαστηριακό μέρος της πτυχιακής μου, την Μαρίνα Αθανασούλη μεταπτυχιακή φοιτήτρια του ΓΠΑ καθώς και τον κύριο Βλαχοστέργιο Δημήτριο, ερευνητή του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών Λάρισας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια και τους φίλους μου και ιδιαίτερα τον φίλο μου Οικονόμου Γεώργιο Υποψήφιο Διδάκτωρ του Π. Θ. τόσο για την αμέριστη βοήθεια του στην εκπόνηση της πτυχιακής διατριβής μου, όσο και για την στήριξη του καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτήν την εργασία, μελετήθηκαν δέκα εμπορικές, μη γενετικά τροποποιημένες ποικιλίες σόγιας (*Glycine max*) σε επίσπορη καλλιέργεια με σκοπό την αξιολόγηση τους, με βάση την απόδοση σε σπόρο, τα χαρακτηριστικά που συνδέονται με αυτή (φυτρωτικότητα, ύψος φυτών, αριθμός λοβών/φυτό, ύψος 1^{ου} λοβού) και την συνδυαστικότητα τους σε διασταυρώσεις. Επίσης έγινε έλεγχος των γενετικών σχέσεων των ποικιλιών με μοριακούς δείκτες SSR που συνδέονται με την πρωτεΐνη και με το γονίδιο *Ti* των αναστολέων θρέψης τρυψίνης, ώστε να ελεγχθεί το κατά πόσο είναι συγγενικές ή μη. Το πρώτο μέρος του πειράματος αφορούσε την καλλιέργεια των φυτών στον αγρό και την λήψη των ζητούμενων παρατηρήσεων και το δεύτερο την μοριακή ανάλυση με δείκτες SSR στο εργαστήριο. Οι ποικιλίες που αξιολογήθηκαν ήταν οι Fortuna, Zora, PR92B63, PR91M10, Sphera, Shama, Atlantic, Kondor, PR92M22, Mercury. Η καλλιέργεια τους έγινε στο αγρόκτημα του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών & Βοσκών στη Λάρισα το 2013.

Μετά το πέρας των πειραμάτων τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την κάθε μια ποικιλία σόγιας ήταν τα εξής: η ποικιλία Fortuna είχε άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, είναι ψηλή ποικιλία και η απόσταση του πρώτου λοβού στα φυτά της από το έδαφος είναι μεγάλη. Η ποικιλία Zora, είχε άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, είναι μέτριου ύψους και ο πρώτος λοβός εμφανίζεται σε αρκετή απόσταση από το έδαφος. Η ποικιλία PR92B63 είχε άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, είναι ψηλή ποικιλία και η απόσταση του πρώτου λοβού από το έδαφος είναι μέτρια. Η ποικιλία PR91M10 δεν είχε σταθερή φυτρωτικότητα και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες. Έχει μέτριο ύψος και η απόσταση του πρώτου λοβού από το έδαφος είναι μικρή, το οποίο οδηγεί σε απώλειες κατά την συγκομιδή καθώς οι λοβοί που είναι πολύ κοντά στο έδαφος δεν συγκομίζονται. Η ποικιλία Sphera είχε σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, όμως το 25% των σπόρων της δεν φύτρωσαν. Είναι πολύ ψηλή ποικιλία, η ψηλότερη σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες του πειράματος και λόγω αυτού τα φυτά της πλαγιάζουν. Επίσης εμφανίζει τον πρώτο λοβό σε μεγάλη απόσταση από το έδαφος. Η ποικιλία Shama είχε άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, είναι μέτριου ύψους και η απόσταση του πρώτου λοβού στα φυτά της από το έδαφος είναι

μικρή. Η ποικιλία Atlantic δεν είχε σταθερή φυτρωτικότητα και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες. Ακόμη, ο πρώτος λοβός στα φυτά της εμφανίζεται σε αρκετή απόσταση από το έδαφος. Η Kondor παρουσίασε προβλήματα τόσο στο ποσοστό όσο και στην σταθερότητα της φυτρωτικότητας. Είναι ψηλή ποικιλία και εμφανίζει τον πρώτο λοβό σε μικρή απόσταση από το έδαφος. Η ποικιλία PR92M22 είχε άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, είναι μέτριου ύψους και ο πρώτος λοβός εμφανίζεται σε αρκετή απόσταση από το έδαφος. Τέλος, η Mercury δεν είχε σταθερή φυτρωτικότητα και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, είναι ψηλή ποικιλία και εμφανίζει τον πρώτο λοβό σε μικρή απόσταση από το έδαφος, το οποίο οδηγεί σε απώλειες κατά την συγκομιδή.

Τους περισσότερους λοβούς ανά φυτό εμφάνισαν οι ποικιλίες Atlantic, Zora, Kondor και Mercury, ενώ η ποικιλία Shama είχε τους λιγότερους. Τις υψηλότερες αποδόσεις σε σπόρο είχαν οι ποικιλίες Sphera και PR92M22 και τις χαμηλότερες οι ποικιλίες Atlantic και Shama. Παρόλα αυτά το εύρος των αποδόσεων ήταν 213,1 – 393,6 kg/στρ, από το οποίο συμπεραίνουμε ότι και οι δέκα ποικιλίες είχαν σχετικά καλή απόδοση στην επίσπορη καλλιέργεια, εφόσον η παγκόσμια μέση απόδοση της σόγιας ως κύρια καλλιέργεια είναι 217 kg/στρ. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μ.ο. των αποδόσεων παρουσιάζονται μεταξύ των ποικιλιών Atlantic – Sphera (sig=0,014) και Atlantic - PR92M22 (sig=0,016). Η ποικιλία Atlantic παρόλο που είχε τους περισσότερους λοβούς ανά φυτό είχε την χαμηλότερη απόδοση σε σπόρο. Αυτό οφείλεται στο ότι η φυτρωτικότητα της δεν ήταν σταθερή για όλες τις επαναλήψεις. Η ποικιλία PR92M22 παρόλο που είχε τους λιγότερους λοβούς/φυτό, μετά από τις Shama και Fortuna, είχε την δεύτερη υψηλότερη απόδοση σε σπόρο. Το οποίο οφείλεται κυρίως στην άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα της σε όλες τις επαναλήψεις.

Επίσης από τις διασταυρώσεις που έγιναν για να ελεγχθεί το συνολικό ποσοστό επιτυχίας και η συνδυαστικότητα μεταξύ των ποικιλιών πέτυχαν οι εξής συνδυασμοί: Kondor x PR92B63 (2), Fortuna x Zora, Shama x PR92B63, Shama x Atlantic (2) και PR91M10 x Shama. Το ποσοστό των επιτυχημένων διασταυρώσεων ήταν 3,8%.

Όσον αφορά τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των ποικιλιών προκύπτει, με βάση το δένδρογραμμα των γενετικών αποστάσεων για τους SSR δείκτες που συνδέονται με το T1 locus, ότι όλες οι ποικιλίες είναι γενετικά κοντά εκτός από την ποικιλία Mercury. Ενώ από το δένδρογραμμα των γενετικών αποστάσεων για τους SSR δείκτες που συνδέονται με γονίδια πρωτεΐνης, προκύπτει ότι όλες οι ποικιλίες είναι γενετικά πολύ κοντά και οι ποικιλίες Shama και Atlantic ταυτίζονται.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Γενική περιγραφή των ψυχανθών	1
1.2 Ταξινόμηση.....	1
1.3 Σόγια (Glycine max)	2
1.3.1 Γενικά στοιχεία	2
1.3.2 Μορφολογία	2
1.3.3 Αύξηση και Ανάπτυξη	4
1.3.4 Αναπαραγωγή	6
1.4 Καλλιέργεια σόγιας.....	6
1.4.1 Άρδευση & Λίπανση	6
1.4.2 Σπορά & Συγκομιδή	7
1.4.3 Αποδόσεις.....	7
1.5 Επίσπορη καλλιέργεια	8
1.6 Γενετική ανάλυση σόγιας	8
1.6.1 Αλληλούχιση γονιδιώματος	8
1.6.2 Μοριακή ανάλυση.....	9
1.6.3 Βελτίωση.....	10
1.7 Σκοπός.....	10
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	11
2.1 Πείραμα στον αγρό	11
2.1.1 Σπορά και καλλιέργεια	11
2.1.2 Καταγραφή μορφολογικών χαρακτηριστικών κατά UPOV	12
2.1.3 Εφαρμογή διασταυρώσεων μεταξύ των ποικιλιών	14
2.2 Εργαστηριακά πειράματα	16
2.2.1 Απομόνωση DNA.....	16

2.2.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA.....	17
2.2.3 Μοριακή ανάλυση με δείκτες SSR.....	17
2.2.4 Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων - πήκτωμα αγαρόζης	20
2.3 Στατιστική ανάλυση.....	21
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	22
3.1 Καταγραφή μορφολογικών χαρακτηριστικών κατά UPOV	22
3.2 Καταγραφή χαρακτηριστικών που συνδέονται με την απόδοση σε σπόρο ..	27
3.3 Αποτελέσματα διασταυρώσεων.....	37
3.4 Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης.....	38
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενική περιγραφή των ψυχανθών

Τα ψυχανθή αποτελούν μια από τις σπουδαιότερες καλλιέργειες, καρποδοτικών φυτών. Καλλιεργούνται, για την παραγωγή: 1) καρπών οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην διατροφή των ανθρώπων και των ζώων, 2) χονδροειδών ζωοτροφών και 3) ως φυτά χλωράς λίπανσης. Οι καρποί των ψυχανθών είναι πλούσιοι σε υδατάνθρακες και πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας. Ορισμένα φυτά τα οποία ανήκουν στα ψυχανθή είναι η σόγια, ο βίκος, η μηδική κ.α. (Παπακόστα-Τασοπούλου, 2005).

1.2 Ταξινόμηση

Το όνομα *Glycine*, το χρησιμοποίησε για πρώτη φορά ο Linnaeus στην πρώτη έκδοση του *Genera Plantarum* το 1737. Το 1753 βασιζόμενος σε δείγματα που είχε και σε περιγραφές άλλων συγγραφέων περιέγραψε την καλλιεργούμενη σόγια ως δύο είδη το *Phaseolus max* και το *Dolichos soja*, αλλά αρκετά χρόνια αργότερα, συνειδητοποίησε ότι αυτές οι δυο περιγραφές ήταν το ίδιο φυτό (Hymowitz and Newell, 1981). Η ονομασία *Glycine max* προτάθηκε από τον Merrill το 1917 και έχει καθιερωθεί μέχρι σήμερα με την επιστημονική ονομασία *Glycine max* (L.) Merrill.

Η καλλιεργούμενη σόγια, από άποψη ταξινόμησης ανήκει στην κλάση Magnoliopsida, τάξη Fabales, οικογένεια Fabaceae και στο γένος *Glycine* (http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=26716). Το γένος αυτό υποδιαιρείται στα είδη *G. max* και *G. soja*, όμως μετά από μελέτες αποδείχθηκε ότι η *G. soja* είναι άγριος πρόγονος της *G. max* (Hymowitz and Newell, 1980).

1.3 Σόγια (*Glycine max*)

1.3.1 Γενικά στοιχεία

Η σόγια, *Glycine max*, είναι από τα σπουδαιότερα καρποδοτικά ψυχανθή. Είναι ετήσιο ποώδες φυτό των θερμών και εύκρατων κλιμάτων με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 28-30°C. Υπό ευνοϊκές συνθήκες η εμφάνιση των φυτών πάνω από το έδαφος αρχίζει 4-5 ημέρες μετά την σπορά. Η περιεκτικότητα του σπόρου σε υγρασία 50% είναι απαραίτητη για τη βλάστησή του.

Η σόγια προέρχεται από την Ασία και πιο συγκεκριμένα από την Κίνα. Εισήχθη, στην Ευρωπαϊκή Ένωση στις αρχές του 17^{ου} αιώνα, ενώ στις ΗΠΑ το 1765 από τον Samuel Bowen. Αρχικά στις ΗΠΑ δεν εκδηλώθηκε μεγάλο ενδιαφέρον για την καλλιέργειά της, καθώς χρησιμοποιούταν κυρίως ως καλλιέργεια για την δέσμευσή του αζώτου. Μέτα το 1940 η καλλιέργειά της επεκτάθηκε ταχύτατα και η ΗΠΑ σήμερα παράγουν περίπου το 50% της παγκόσμιας παραγωγής σόγιας (Brachfeld and Choate 2007).

Πλέον, καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο κυρίως για τους σπόρους της, οι οποίοι έπειτα από βιομηχανική επεξεργασία χρησιμοποιούνται στην διατροφή των ανθρώπων και των ζώων ως βασική πηγή πρωτεΐνης. Αυτό συμβαίνει διότι η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη μπορεί να φτάσει έως 40%. Επίσης, χρησιμοποιείται για την παραγωγή λαδιού και ως πρώτη ύλη για βιοκαύσιμα. Εκτός από την υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και λάδι, οι σπόροι της αποτελούνται κατά 33% από υδατάνθρακες, από τους οποίους το 16,6% είναι διαλυτά σάκχαρα (Hou et al., 2009). Παρόλο που είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, δεν ενδείκνυται η κατανάλωση της χωρίς να έχει υποστεί θερμική επεξεργασία, λόγω των αντιθρεπτικών παραγόντων που περιέχει, όπως είναι οι αναστολείς τρυψίνης, (Liener, 1981).

1.3.2 Μορφολογία

Η σόγια είναι δικότυλο, θαμνώδες φυτό με ετήσιο κύκλο καλλιέργειας. Τα φυτά μπορεί να φτάσουν σε ύψος 2 m αν και στις περισσότερες περιπτώσεις κυμαίνονται από 0,3-0,9 cm (<http://eol.org/pages/641527/overview>).

Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι με τους οποίους αναπτύσσονται τα φυτά της σόγιας: ο διακλαδιζόμενος, ο ημι-διακλαδιζόμενος και ο μη διακλαδιζόμενος (Bernard and Weiss, 1973). Ο πρώτος τύπος ανάπτυξης, έχει συνήθως λιγότερα γόνατα/φυτό και μικρότερο ύψος κατά την ωρίμανση (Whigham, 1983). Ο δεύτερος τύπος ανάπτυξης, εμφανίζει απότομη διακοπή της βλαστικής ανάπτυξης αμέσως μετά την ανθοφορία. Αυτός ο τύπος ανάπτυξης, περιλαμβάνει πολλά χαρακτηριστικά ενδιάμεσα από τον διακλαδιζόμενο και τον μη διακλαδιζόμενο τύπο. Ο μη διακλαδιζόμενος τύπος ανάπτυξης, συνεχίζει τη βλαστική δραστηριότητα καθ' όλη τη διάρκεια της άνθησης. Στην κορυφή των φυτών, η δομή των ανθέων και των φύλλων είναι μικρότερη και οι λοβοί είναι λιγότεροι σε αριθμό, σε σύγκριση με τον διακλαδιζόμενο τύπο. Γενικά, σε αυτόν τον τύπο ανάπτυξης τα φυτά είναι ψηλότερα, έχουν περισσότερα γόνατα ανά φυτό και τείνουν να πλαγιάζουν περισσότερο, όταν οι συνθήκες ευνοούν την ταχεία βλαστική ανάπτυξη (Whigham, 1983).

Το ριζικό της σύστημα χαρακτηρίζεται ως διάσπαρτο και αποτελείται από μια πασσαλώδη ρίζα, η οποία διακλαδίζεται στις πλευρικές ρίζες. Κατά τη βλαστική περίοδο μέχρι και την έναρξη της άνθησης, η ρίζα αυξάνεται ταχύτερα από το βλαστό και αποκτά σχεδόν διπλάσιο μέγεθος από αυτό βλαστού (Mayaki et al., 1976).

Τα φύλλα της διακρίνονται στους εξής τέσσερις τύπους: τις κοτυληδόνες, τα απλά, τα σύνθετα και τα πρόφυλλα. Οι κοτυληδόνες, χρησιμεύουν ως αποθήκες θρεπτικών συστατικών μέχρι τη δημιουργία των πρώτων πραγματικών φύλλων. Τα πρώτα φύλλα είναι απλά, αντίθετα και ωοειδή και αποτελούνται από το έλασμα και τον μίσχο, ο οποίος φέρει στη βάση του δυο παράφυλλα. Τα σύνθετα φύλλα αποτελούνται από τρία φυλλάρια και εκφύονται στο στέλεχος και στις διακλαδώσεις του φυτού, ένα σε κάθε γόνατο. Τα πρόφυλλα, είναι πολύ μικρά απλά φύλλα και βρίσκονται στη βάση κάθε πλευρικού κλάδου και στο κάτω μέρος του ποδίσκου του άνθους (Hicks, 1978).

Τα άνθη, εκφύονται σε ταξιανθίες από τις μασχάλες των φύλλων και το χρώμα τους μπορεί να είναι λευκό ή μωβ ανάλογα με την ποικιλία. Αποτελούνται από ένα σωληνωτό κάλυκα, με 5 σέπαλα, μια στεφάνη με 5 πέταλα, έναν ύπερο και 10 στήμονες. Στο τέλος μόνο το 20-40% των ανθέων θα δημιουργήσει λοβούς (Egli and Crafts-Brandner, 1996). Το μεγαλύτερο ποσοστό θα απορριφτεί, το οποίο

πιθανόν να οφείλεται σε παράγοντες όπως, η μεγάλη διάρκεια φωτοπεριόδου και οι αυξημένες ή οι χαμηλές θερμοκρασίες πριν την άνθηση (Whigham, 1983).

Ο λοβός αποτελείται από δυο καρπόφυλλα τα οποία ενώνονται μεταξύ τους και το μήκος του κυμαίνεται από 2-7εκ. (Carlson and Lersten, 1987). Ο αριθμός των λοβών σε μια απλή ταξιανθία κυμαίνεται από 2-20 και σε όλο το φυτό μπορεί να φτάσει τους 400 λοβούς (Τόλης, 1989). Οι λοβοί συνήθως περιέχουν 2-4 σπόρους (Magness et al., 1971) και το σχήμα του σπόρου μπορεί να διαφέρει, ανάλογα την ποικιλία, από σφαιρικό έως πεπλατυσμένο.

1.3.3 Αύξηση και Ανάπτυξη

Τα περισσότερα καλλιεργούμενα είδη σόγιας έχουν δυο μεγάλες περιόδους ανάπτυξης: το στάδιο της βλαστικής ανάπτυξης και το στάδιο της άνθισης ή το αναπαραγωγικό στάδιο (Fehr and Caviness, 1977).

Η βλάστηση της σόγιας (VE) είναι επίγεια και με τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες οι κοτυληδόνες εμφανίζονται 4-5 ημέρες μετά τη σπορά (Whigham, 1983). Έπειτα, εμφανίζονται τα πρώτα φύλλα (VC), κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου τα θρεπτικά αποθέματα στις κοτυληδόνες συμβάλλουν στη θρέψη του φυτού. Μετά, κάνουν την εμφάνισή τους τα τρίφυλλα φύλλα (V1, V2, Vn). Γενικά, το βλαστικό στάδιο, ξεκινά από την εμφάνιση των σποροφύτων στον αγρό έως το στάδιο R5, όπου αναπτύσσονται οι βλαστοί και το ριζικό σύστημα (Egli and Leggett, 1973).

Η σόγια είναι φωτοπεριοδικό φυτό που σημαίνει ότι για την μετάβαση από το βλαστικό στο ανθικό στάδιο απαιτούνται συγκεκριμένες συνθήκες φωτοημέρας και πιο συγκεκριμένα ορισμένες ώρες σκοταδιού στην διάρκεια του εικοσιτετραώρου. Οι περισσότερες ποικιλίες αρχίζουν να ανθίζουν αμέσως μόλις οι το μήκος της ημέρας αρχίζει να μικραίνει. Ανήκουν δηλαδή στα μικροήμερα φυτά. Οι ποικιλίες της σόγιας κατατάσσονται σε 13 Ομάδες Πρωιμότητας (Ο.Π.) οι οποίες σημειώνονται από 000 έως X. Το εύρος της πρωιμότητας μέσα στην ίδια ομάδα είναι 10 έως 18 ημέρες. Οι ποικιλίες της ομάδας 000 είναι οι πρωιμότερες ενώ οι V- X είναι όψιμες.

Πίνακας 1.1 Στάδια ανάπτυξης της σόγιας.

Βλαστικά στάδια ανάπτυξης		Αναπαραγωγικά στάδια ανάπτυξης	
VE	Βλάστηση σποροφύτων και κοτυληδόνων	R1	Έναρξη άνθησης
VC	Πλήρης ανάπτυξη κοτυληδόνων	R2	Πλήρης άνθηση
V1	Πρώτο γόνατο και πλήρη ανάπτυξη πρώτων φύλλων	R3	Έναρξη σχηματισμού λοβών
V2	Δύο γόνατα με πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα	R4	Πλήρης ανάπτυξη λοβών
Vn	Συνεχίζεται η βλαστική αύξηση, μέχρι την έναρξη της ανθοφορίας	R5	Έναρξη σχηματισμού σπόρων
		R6	Πλήρης γέμισμα των λοβών με σπόρους
		R7	Έναρξη ωρίμανσης λοβών
		R8	Πλήρης ωρίμανση λοβών

Fehr et al., 1971 (www.fao.org)

Συνήθως από τη στιγμή εμφάνισης του σπορόφυτου στην επιφάνεια του εδάφους μέχρι την εμφάνιση του πρώτου άνθους, περνάνε έξι με οχτώ περίπου εβδομάδες.

Το αναπαραγωγικό στάδιο ξεκινά από την έναρξη της άνθησης (R1). Η περίοδος της άνθησης μπορεί να διαρκέσει 3-5 βδομάδες (Carlson and Lersten, 1987), ενώ η πλήρης άνθηση περιγράφεται στο R2 στάδιο. Η εμφάνιση των λοβών (R3) ξεκινά περίπου ένα μήνα μετά το στάδιο R1 και ένα μήνα μετά το στάδιο R5, αρχίζει η ωρίμανση τους (R7 στάδιο). Ο σπόρος ξεκινά να μεγαθύνεται (στάδιο R5) και γεμίζει πλήρως στο στάδιο R6 (Board and Tan, 1995). Δύο ή τρεις εβδομάδες μετά το R7 στάδιο, το φυτό ξηραίνεται και είναι έτοιμο για συγκομιδή (R8 στάδιο).

1.3.4 Αναπαραγωγή

Η σόγια αναπαράγεται κυρίως με αυτογονιμοποίηση και κατά 1% με σταυρογονιμοποίηση (Caviness, 1966). Τα άνθη της είναι κλειστόγαμα και η αυτογονιμοποίηση τους γίνεται λίγο πριν ή μετά το άνοιγμα τους. Το στίγμα είναι υποδεκτικό στη γύρη, για 24 ώρες πριν και 48 ώρες μετά την άνθηση.

Η ωρίμανση των ανθών και της γύρης γίνεται μέσα στο άνθος και ακολουθεί γονιμοποίηση του στίγματος του ίδιου άνθους. Σε ψυχρές θερμοκρασίες μειώνεται η απελευθέρωση της γύρης και προκαλείται πρόωμη αυτεπικονίαση των ανθέων (Acquaah, 2007).

1.4 Καλλιέργεια σόγιας

1.4.1 Άρδευση & Λίπανση

Για καλή παραγωγή η σόγια χρειάζεται περίπου 480-720 χιλιοστά νερού, από τη σπορά μέχρι τη φυσιολογική ωρίμανση των φυτών (Cartier and Hartwig, 1963). Οι απαιτήσεις της καλλιέργειας σε νερό μέχρι το στάδιο της άνθησης δεν είναι μεγάλες όμως με την έναρξη της ανθοφορίας αρχίζουν να αυξάνουν και φτάνουν στο μέγιστο κατά την ωρίμανση των λοβών.

Η λίπανση γίνεται με ενσωμάτωση των λιπασμάτων στο έδαφος (βασική) και όπου απαιτείται γίνεται επιπλέον και επιφανειακή, συνήθως με νιτρική αμμωνία. Η καλλιέργεια της σόγιας είναι ιδιαίτερα απαιτητική σε άζωτο (χρειάζεται περίπου 22

μονάδες αζώτου το στρέμμα) όμως το μεγαλύτερο μέρος το προσλαμβάνει με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια από το έδαφος. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε εδάφη που έχουν χρόνια να καλλιεργηθούν με σόγια δε σχηματίζονται φυμάτια και γι' αυτό χρειάζεται να γίνει εμβολιασμός με το κατάλληλο ριζόβιο αζωτοδεσμευτικό βακτήριο (<http://olympus.gr/media/158205/ekthesi.pdf>).

Όσον αφορά την λίπανση σε φώσφορο συνιστώνται 6-9 μονάδες λιπάσματος, όταν κριθεί απαραίτητο από τις εδαφολογικές αναλύσεις και σε εδάφη που είναι φτωχά σε κάλιο συνιστάται η λίπανση με 8-12 μονάδες καλίου. Σε περίπτωση που υπάρχει έλλειψη σε ιχνοστοιχεία γίνονται διαφυλλικοί ψεκασμοί (<http://olympus.gr/media/158205/ekthesi.pdf>).

1.4.2 Σπορά & Συγκομιδή

Η σόγια σε αρδευόμενα χωράφια σπέρνεται από τις 10 Απριλίου και μετά, ενώ σε ξερικά όταν η υγρασία του εδάφους είναι στα επιθυμητά επίπεδα για την βλάστηση των σπόρων. Η σπορά γίνεται σε βάθος 3-4 εκ και οι σπόροι θα πρέπει να έχουν καλή βλαστική και φυτρωτική ικανότητα, να είναι άρτιοι, καθαροί και ισομεγέθεις, ώστε να δώσουν εύρωστα και με ομοιόμορφη ανάπτυξη φυτά.

Η συγκομιδή γίνεται με θεριζοαλωνιστικές μηχανές όταν οι λοβοί έχουν ωριμάσει πλήρως και η υγρασία των σπόρων είναι κάτω από 15%.

1.4.3 Αποδόσεις

Η μέση παγκόσμια παραγωγή σόγιας εκτιμάται στα 217 κιλά ανά στρέμμα (Masuda and Goldsmith, 2009). Την τελευταία δεκαετία οι αποδόσεις σε σπόρο στην Αμερική ξεπερνάνε τα 280 kg/στρ ενώ υπήρχαν και περιοχές που ξεπέρασαν τα 350 kg/στρ (Iowa State University, 2013). Σε πειράματα με συνθήκες πλήρους άρδευσης και λίπανσης, οι αποδόσεις σε σπόρο φτάνουν τα 569 kg/στρ (Gordon, 2008). Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι σε δροσερό καιρό με θερμοκρασίες 25-26 °C την ημέρα και 18 °C τη νύχτα και σε μέσης σύστασης εδάφη οι αποδόσεις είναι υψηλότερες.

Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να υπάρξουν απώλειες και κατά συνέπεια μείωση της παραγωγής. Στο στάδιο της συγκομιδής παρατηρούνται

απώλειες πριν και κατά τη διάρκεια του θεριζοαλωνισμού. Οι απώλειες πριν το θεριζοαλωνισμό οφείλονται στο ότι ορισμένες ποικιλίες τινάζουν το σπόρο όταν ωριμάζουν. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να επιλέγονται ποικιλίες που δεν τινάζουν το σπόρο και η συγκομιδή να γίνεται πριν η υγρασία του σπόρου πέσει κάτω από το 15%. Οι απώλειες κατά το θεριζοαλωνισμό οφείλονται στο ύψος που είναι ρυθμισμένο να συγκομίζει το μαχαίρι και στο πλάγιασμα των φυτών. Για την αποφυγή απωλειών θα πρέπει να επιλέγονται ποικιλίες που δεν πλαγιάζουν πολύ και σχηματίζουν τους πρώτους λοβούς σε ικανοποιητικό ύψος από το έδαφος.

1.5 Επίσπορη καλλιέργεια

Η σόγια μπορεί να καλλιεργηθεί και ως επίσπορη μετά από τη συγκομιδή των σιτηρών. Για καλύτερα αποτελέσματα πρέπει να έχει σπαρθεί μέχρι αρχές Ιουλίου, ανάλογα με τον βιολογικό κύκλο των ποικιλιών. Σε πρώιμη σπορά χρησιμοποιούνται οι συνιστώμενες για την περιοχή ποικιλίες της κανονικής καλλιέργειας, ενώ για οψιμότερη σπορά συνιστώνται πρωιμότερες ποικιλίες.

Πριν τη σπορά πρέπει να προηγηθεί πότισμα γιατί με τις ξηροθερμικές συνθήκες δεν επιζούν τα αζωτοβακτήρια.

1.6 Γενετική ανάλυση σόγιας

1.6.1 Αλληλούχιση γονιδιώματος

Το γονιδίωμα της σόγιας αποτελείται από 1100 Mb και ο αριθμός των χρωμοσωμάτων της είναι $2n=40$.

Οι πρώτες προσπάθειες για την πλήρη αλληλούχιση του γονιδιώματος της σόγιας, ξεκίνησαν το 2006 και ολοκληρώθηκαν το 2008 με την αλληλούχιση της ποικιλίας Williams 82 (Soybean Genome Project, www.phytozome.net). Συνολικά βρέθηκαν 46,430 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 70% περισσότερα από το *Arabidopsis* (Schmutz et al., 2010).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι το 57% της γονιδιωματικής αλληλουχίας της επαναλαμβάνεται, σε χαμηλού ανασυνδυασμού ετεροχρωματικές περιοχές γύρω από τα κεντρομερή.

1.6.2 Μοριακή ανάλυση

Οι Kim et al. (2006) μελέτησαν 1000 εκκινητές RAPD, 342 σετ εκκινητών AFLP και 35 SSR εκκινητές προκειμένου να βρουν markers που σχετίζονται με Ti locus. Η ανάλυση έγινε σε δύο πληθυσμούς, όπου ο πρώτος προερχόταν από την διασταύρωση των ποικιλιών Jinpumkong2 (TiTi) και C242 (titi) και ο δεύτερος από την διασταύρωση των Clark (TiTi) και C242. Η F1 γενιά καλλιεργήθηκε σε θερμοκήπιο και λήφθηκαν οι σπόροι (F2) στους οποίους έγινε ανάλυση με ηλεκτροφόρηση προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει η πρωτεΐνη Soybean kunitz trypsin inhibitor (SKTI). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι 4 RAPD, 4 AFLP και 3 SSR markers συνδεόταν γενετικά με το Ti locus στον πρώτο πληθυσμό. Οι τρεις SSR markers που συνδεόταν με το Ti locus ήταν οι Satt409, Satt228 και Satt429, με την απόσταση της γενετικής σύνδεσης στα 10 cM. Τέλος, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ειδικά ο SSR marker Satt228 είναι στενά συνδεδεμένος με το Ti locus με απόσταση γενετικής σύνδεσης 0 – 3,7 cM και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές μελέτες.

Ανάλυση με SSR έχει χρησιμοποιηθεί για να βρεθούν οι γενετικές σχέσεις και η ποικιλομορφία μεταξύ ποικιλιών σόγιας. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι γενετικές αποστάσεις και οι συσχετίσεις 25 γενότυπων σόγιας στην Ταϊλάνδη. Χρησιμοποιήθηκαν έντεκα ζεύγη εκκινητών SSR markers με τα οποία ανιχνεύτηκαν 53 αλληλόμορφα γονίδια, με μέσο όρο 4,82 αλληλόμορφα σε κάθε locus. Από τα αποτελέσματα της έρευνας οι Tantasawat et al. (2011) διαπίστωσαν ότι οι δείκτες SSR είναι αποτελεσματικοί για την μέτρηση της γενετικής ποικιλότητας, της συγγένειας και τον προσδιορισμό των ποικιλιών σόγιας.

1.6.3 Βελτίωση

Οι βελτιωτές στοχεύουν στην βελτίωση των αγρονομικών χαρακτηριστικών και της ποιότητας της σόγιας. Τα χαρακτηριστικά προς βελτίωση, αφορούν την απόδοση, την ποιότητα (περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και λάδι, σύνθεση λιπαρών οξέων, περιεκτικότητα σε ισοφλαβόνες) και την σταθερότητα των χαρακτηριστικών προσαρμογής. Τα χαρακτηριστικά που συνδέονται με την προσαρμοστικότητα της καλλιέργειας περιλαμβάνουν, την ανθεκτικότητα σε ασθένειες, την ανθεκτικότητα στο περιβαλλοντικό στρες, τη βελτίωση της σταθερότητας της συγκομιδής (αντοχή στο πλάγιασμα ή μεγαλύτερο ύψος λοβών) και τη βελτίωση των χαρακτηριστικών απόδοσης (Beverdorf, 1993).

Ένας ακόμη σημαντικός στόχος των βελτιώσεων είναι η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των ποικιλιών σε ότι αφορά την περιεκτικότητα σε λάδι, σε πρωτεΐνη, λιπαρά οξέα (Rennie and Tanner, 1989), σε αντιθρεπτικούς παράγοντες (Orf, 1989) και σε χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την κατανάλωση της σόγιας από τον άνθρωπο (Wilson, 1989).

1.7 Σκοπός

Η πτυχιακή εργασία είχε ως σκοπό την αξιολόγηση δέκα εμπορικών, μη γενετικά τροποποιημένων ποικιλιών σόγιας σε επίσπορη καλλιέργεια ως προς την απόδοση σε σπόρο, τα χαρακτηριστικά που συνδέονται με αυτή και την συνδυαστικότητα τους σε διασταυρώσεις. Και τον έλεγχο των γενετικών σχέσεων μεταξύ των ποικιλιών με μοριακούς δείκτες SSR που συνδέονται με την πρωτεΐνη και με το γονίδιο *Ti* των αναστολέων θρέψης τρυψίνης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

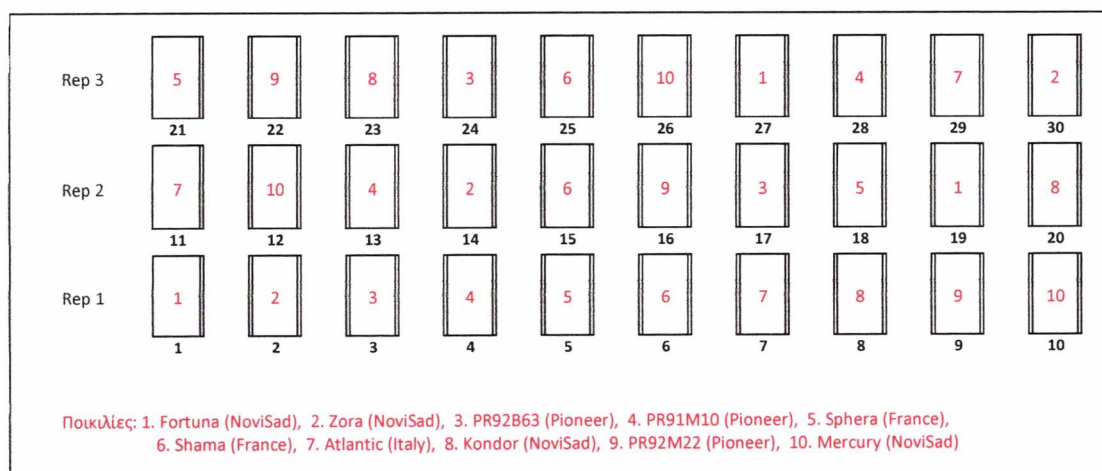
2.1 Πείραμα στον αγρό

Οι ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος ήταν 10 μη-γενετικά τροποποιημένες, εμπορικές ποικιλίες που κυκλοφορούν στη χώρα μας και ελήφθησαν από το ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. Λάρισας. Οι ποικιλίες που μελετήθηκαν ήταν οι Fortuna, Zora, PR92B63, PR91M10, Sphera, Shama, Atlantic, Kondor, PR92M22, Mercury. Τα πειράματα αγρού πραγματοποιήθηκαν στο αγρόκτημα του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών & Βοσκών (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.), στην Λάρισα.

2.1.1 Σπορά και καλλιέργεια

Η σπορά των ποικιλιών έγινε την 1^η εβδομάδα του Ιουλίου το 2013. Αρχικά σπάρθηκαν οι όψιμες ποικιλίες και αργότερα, με διαφορά λίγων ημερών, οι πρωιμότερες με σκοπό τον συγχρονισμό της άνθισης για την πραγματοποίηση των διασταυρώσεων.

Για την καλλιέργεια εφαρμόστηκε το πειραματικό σχέδιο των τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων (Randomized complete blocks ή RCBD) με τρεις επαναλήψεις. Ο πειραματικός αγρός διαιρέθηκε σε 30 τεμάχια και κάθε επανάληψη είχε 10 τεμάχια. Σε κάθε τεμάχιο, μετά από τυχαία κλήρωση, αντιστοιχούσε και μία ποικιλία σόγιας (Εικόνα 2.1). Εντός των τεμαχίων οι ποικιλίες σπάρθηκαν σε 3 γραμμές με αποστάσεις μεταξύ των γραμμών 75cm και επί των γραμμών 3,5cm (περίπου 135 σπόροι/γραμμή). Οι ακραίες χρησιμοποιήθηκαν για τις διασταυρώσεις μεταξύ των ποικιλιών και η κεντρική γραμμή για την καταγραφή των μορφολογικών και αγρονομικών χαρακτηριστικών.



Εικόνα 2.1 Κατανομή των ποικιλιών σόγιας στα πειραματικά τεμάχια του αγρού.

Πριν από την σπορά των ποικιλιών σόγιας έγινε φρεζάρισμα και ισοπέδωση του αγρού για την δημιουργία κατάλληλης σποροκλίνης. Κατά την σπορά εφαρμόστηκε βασική λίπανση με 4 μονάδες μικτού λιπάσματος 15-15-15. Επίσης στο στάδιο της πλήρης άνθησης έγινε επιφανειακή λίπανση με 6,9 μονάδες νιτρικής αμμωνίας.

Η άρδευση της καλλιέργειας γινόταν με μπεκ και συνολικά, μέχρι το πέρας της καλλιέργειας, εφαρμόστηκαν περίπου 480 χιλιοστά νερού.

Ο έλεγχος των ζιζανίων γινόταν με σκαλίσματα, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, πάνω και ανάμεσα στις γραμμές.

Η συγκομιδή έγινε με το χέρι, από τις μεσαίες γραμμές κάθε πειραματικού τεμαχίου, το πρώτο δεκαήμερο του Οκτώβρη. Δηλαδή όταν τα φύλλα των φυτών είχαν κιτρινίσει και τα περισσότερα άρχιζαν να πέφτουν και η υγρασία των σπόρων ήταν κάτω από 15%.

2.1.2 Καταγραφή μορφολογικών χαρακτηριστικών κατά UPOV

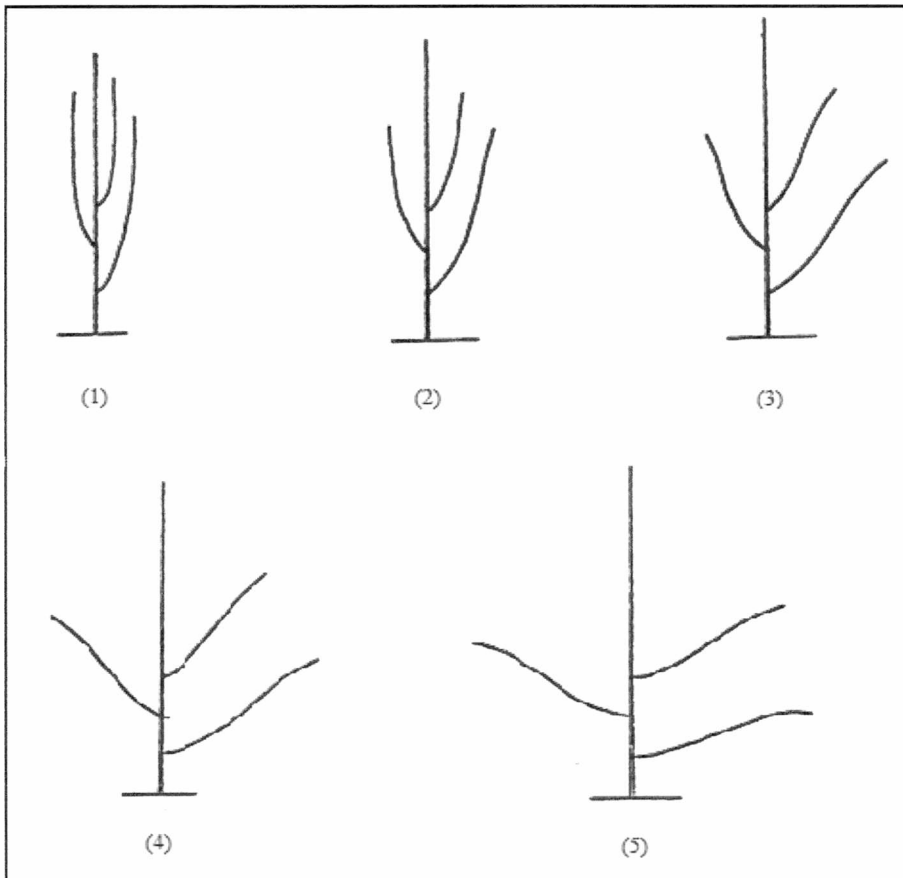
Η μελέτη και καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών κατά UPOV*, έγινε σε 30 φυτά για κάθε ποικιλία, από τις μεσαίες γραμμές των πειραματικών τεμαχίων. Αντίστοιχα για τις μορφολογικές παρατηρήσεις που αφορούσαν το σπόρο, επιλέχθηκαν τυχαία 20 σπόροι ανά ποικιλία.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα εξής:

- Υποκοτύλη: εμφάνιση κόκκινου χρώματος - ανθοκυανίνη (1*)
- Υποκοτύλη: ένταση ανθοκυανίνης (2*)
- Τύπος ανάπτυξης φυτού (3*)
- Τρόπος ανάπτυξης φυτού (4*)
- Χρώμα τριχών κύριου στελέχους (5*)
- Ύψος φυτού (6*)
- Σχήμα πλευρικών φύλλων (8*)
- Μέγεθος πλευρικών φύλλων (9*)



Εικόνα 2.2 Τύποι ανάπτυξης φυτού σόγιας σύμφωνα με τον UPOV, παρατήρηση (3*).
Αριστερά: διακλαδιζόμενος, Δεξιά: μη- διακλαδιζόμενος.



Εικόνα 2.3 Τρόπος ανάπτυξης φυτού σόγιας σύμφωνα με τον UPOV, παρατήρηση (4*).

- Ένταση πράσινου χρώματος στα φύλλα (10*)
- Χρώμα άνθους (11*)
- Λοβός – ένταση καφέ χρώματος (12*)
- Μέγεθος σπόρου (13*)
- Σχήμα σπόρου (14*)
- Σπόρος: χρώμα περιβλήματος (15*)
- Σπόρος: χρώμα ουλής σπόρου (17*)

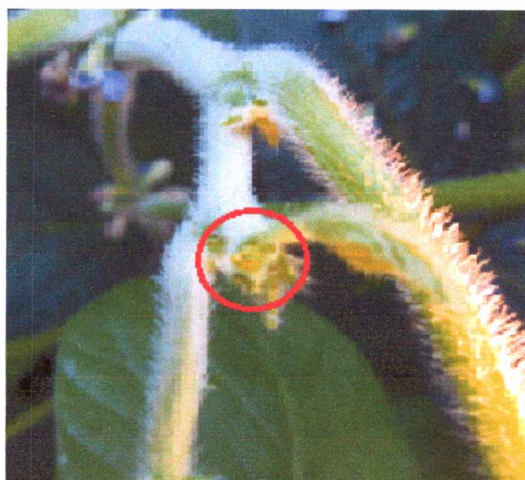
Τα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν και συνδέονται με την τελική απόδοση των φυτών σόγιας σε σπόρο ήταν, φυτρωτική ικανότητα του σπόρου, το ύψος εμφάνισης του πρώτου λοβού, ο αριθμός των λοβών ανά φυτό και το τελικό ύψος των φυτών. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά ελήφθησαν από 30 φυτά ανά ποικιλία.

2.1.3 Εφαρμογή διασταυρώσεων μεταξύ των ποικιλιών

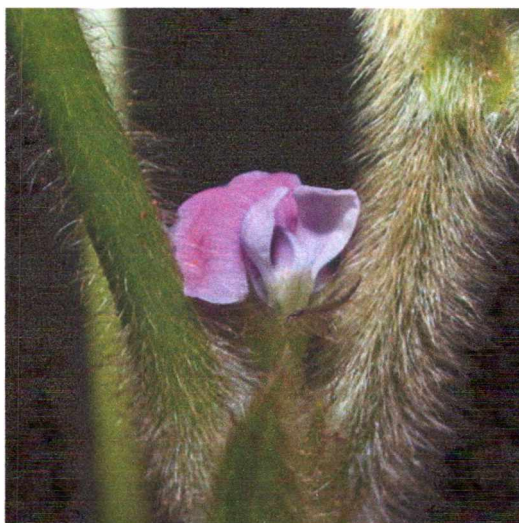
Με σκοπό τον έλεγχο της συνδυαστικής ικανότητας των ποικιλιών και την παραγωγή υβριδίων, εφαρμόστηκαν διαλληλικές διασταυρώσεις μεταξύ και των δέκα ποικιλιών.

Για την πραγματοποίηση των διασταυρώσεων χρησιμοποιήθηκαν λαβίδες, καρτελάκια σημειώματος, κλωστή, μολύβι και αλκοόλη για απολύμανση των λαβίδων μετά από κάθε διασταύρωση.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής, αρχικά γινόταν επιλογή των φυτών-γονέων προς διασταύρωση. Τα άνθη που θα αποτελούσαν τον θηλυκό γονέα έπρεπε να έχουν κλειστά πέταλα, δηλαδή να είναι ανώριμα, ώστε να μην είχε προηγηθεί αυτογονιμοποίηση. Ενώ τα άνθη που θα χρησιμοποιούνταν ως δότες γύρης (άρρεν γονέας) έπρεπε να έχουν ανοιχτά πέταλα, με έντονο χρώμα και η γύρη τους να είναι στεγνή (ώριμη). Στη συνέχεια με τη χρήση λαβίδας, αποκόπτονταν τα άνθη που θα χρησιμοποιούνταν ως δότες γύρης και γινόταν έλεγχος της ώστε να βρίσκεται στο επιθυμητό στάδιο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Έπειτα ανοιγόταν τα σέπαλά του θηλυκού άνθους, αφαιρούταν τα πέταλα και οι ανθήρες και έμενε μόνο ο ύπερος του.



Εικόνα 2.4 Κατάλληλο στάδιο άνθους σόγιας, για επιλογή ως θηλυκός γονέας σε διασταυρώσεις



Εικόνα 2.5 Κατάλληλο στάδιο άνθους σόγιας, για δότης γύρης (αρσενικός γονέας) σε διασταυρώσεις.

Τέλος γινόταν επικονίαση με εναπόθεση της γύρης, που συλλέχθηκε από το αρσενικό άνθος, στον ύπερό του θηλυκού άνθους και αφαιρούνταν τα υπόλοιπα μπουμπούκια που βρίσκονταν δίπλα του. Μετά το τέλος της διαδικασίας, τοποθετούνταν καρτελάκι γύρω από το άνθος με σημειωμένους τους κωδικούς των διασταυρούμενων ποικιλιών και την ημερομηνία διασταύρωσης.

2.2 Εργαστηριακά πειράματα

Τα εργαστηριακά πειράματα (μοριακή ανάλυση) πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π.Θ.

Οι δέκα ποικιλίες που μελετήθηκαν στα πειράματα αγρού χρησιμοποιήθηκαν και ως γενετικό υλικό για την μοριακή ανάλυση.

2.2.1 Απομόνωση DNA

Για την μοριακή ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα για κάθε ποικιλία, το οποίο είχε προέλθει από νεαρά φύλλα (φυτικός ιστός) 5 φυτών της ποικιλίας (bals DNA).

Η απομόνωση του γενετικού υλικού (DNA) έγινε με την χρήση του DNeasy kit της εταιρίας Qiagen και ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- i. Φυτικός ιστός 1,5 g ομογενοποιήθηκε με υγρό άζωτο σε γουδί.
- ii. Έπειτα τοποθετήθηκε σε tube του 1 ml και προστέθηκαν 400 μl Buffer AP1 και 4 μl αρενάση.
- iii. Ανακίνηση και τοποθέτηση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 10 λεπτά (για να γίνει λύση των κυττάρων).
- iv. Προσθήκη 130 μl Buffer AP2, ανακίνηση και τοποθέτηση σε πάγο για 5 λεπτά (σε αυτό το βήμα γίνεται καθίζηση πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών).
- v. Φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 5 λεπτά.
- vi. Λήψη του υπερκευμένου και τοποθέτηση του σε tube των 2 ml με λιλά φίλτρο. Φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 2 λεπτά. Το φίλτρο βγαίνει και απορρίπτεται ενώ το υγρό που είναι στο tube τοποθετείται σε νέο tube.
- vii. Προσθήκη 1,5*(όγκο του υγρού που είναι στο tube) Buffer AP3/E, δηλαδή αν στο tube έχω 500 μl υγρού τότε προσθέτω 750 μl Buffer AP3/E.
- viii. Ανάμιξη με pipetting.
- ix. Λήψη 650 μl από το μίγμα και τοποθέτηση του σε λευκά tube με φίλτρο (το DNA συγκρατείται στο φίλτρο).

- x. Φυγοκέντρηση στις 8.000 στροφές για 1 λεπτό και προσθήκη του υπόλοιπου μίγματος (από το βήμα 7).
- xi. Ξανά φυγοκέντρηση στις 8.000 στροφές για 1 λεπτό.
- xii. Τοποθέτηση του φίλτρου σε νέο tube και προστίθενται 500 μl Buffer AW.
- xiii. Επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
- xiv. Φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 2 λεπτά.
- xv. Τοποθέτηση του φίλτρου σε νέο tube των 2 ml. Προσθήκη 2*100 μl Buffer AE.
- xvi. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- xvii. Φυγοκέντρηση στις 8.000 στροφές για 2 λεπτά.

2.2.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Η ποσοτικοποίηση του DNA έγινε σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους / ορατού (nanodrop), με απορρόφηση στα 260 nm. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των δειγμάτων έγινε με απορρόφηση στα 280 nm, ώστε να εκτιμηθεί το επίπεδο παρουσίας πρωτεϊνών στα δείγματα από τον λόγο 260 / 280 nm.

Με βάση τα αποτελέσματα από το φασματοφωτόμετρο, όσον αφορά την ποσότητα του DNA, έγιναν αραιώσεις των δειγμάτων με απεσταγμένο νερό μέχρι να έχουν όλα τελικό όγκο 24 ng / μL.

2.2.3 Μοριακή ανάλυση με δείκτες SSR

Για το σκοπό της εργασίας, επιλέχθηκαν 6 ζεύγη δεικτών SSR (primers), εκ των οποίων οι 3 στόχευαν σε περιοχές του γενόματος που σχετίζονταν με τους αναστολείς θρέψης τρυψίνης και οι υπόλοιποι 3 σε περιοχές που σχετίζονταν με την πρωτεΐνη (Πίνακας 2.1). Ο υβριδισμός των δεικτών SSR και η ενίσχυση των τμημάτων του DNA προς μελέτη, έγινε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Πριν από την εφαρμογή της μεθόδου PCR έγινε αραιώση των δεικτών SSR με τον εξής τρόπο: η ποσότητα των nanomoles του κάθε δείκτη πολλαπλασιάστηκε με το 10 και το νούμερο που προέκυπτε ήταν η ποσότητα του υπερκάθαρου νερού που θα προσθέτονταν για να γίνει ίση η συγκέντρωση όλων των δεικτών. Έπειτα έγινε

ακόμη μία αραίωση με υπερκάρθαρο νερό ώστε η τελική συγκέντρωση των δεικτών να είναι 10%.

Πίνακας 2.1 Δείκτες SSR οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές για την ενίσχυση του DNA.

ssr markers	αλληλουχία forward	αλληλουχία reverse
Satt228	TCATAACGTAAGAGATGGTAAAAC	CATTATAAGAAAACGTGCTAAAGAG
Satt409	CCTTAGACCATGAATGTCTCGAAGATA	CTTAAGGACACGTGGAAGATGACTAC
Satt429	GCGACCATCATCTAATCACAATCTACTA	TCCCCATCATTTATCGAAAATAATAATT
Satt496	GCGATCCCTTTATGTTGGTATTACATT	GCGGCACACAAGTAGTTGTGAAACTAA
Satt239	GCGCCAAAAAATGAATCACAAT	GCGAACACAATCAACATCCTTGAAC
Satt700	GCGGGGGTTAAGAGGAGGAAAAATA	GCGCACTTTGCAAATGAGAGAT

Οι συνθήκες της PCR, για κάθε εκκινητή, επιλέχθηκαν με βάση τις βιβλιογραφικές αναφορές και η θερμοκρασία συγκόλλησης του εκκινητή (T_m) υπολογίστηκε με την μαθηματική εξίσωση:

$$T_m(^{\circ}C) = 64,9 + 41 \cdot (yG + zC - 16,4) / (wA + xT + yG + zC)$$

Όπου w,x,y και z είναι ο συνολικός αριθμός των νουκλεοτιδίων Κυτοσίνης (C), Γουανίνης (G), Αδενίνης (A) και Θυμίνης (T). Από το T_m μπορούμε να υπολογίσουμε και την θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (T_a) από τον τύπο:

$$T_a(^{\circ}C) = T_m(^{\circ}C) - 5(^{\circ}C)$$

Οι συνθήκες των θερμοκρασιακών κύκλων που ακολουθήθηκαν για την ενίσχυση του DNA είναι οι ακόλουθες: Μετά από μια πεντάλεπτη αποδιάταξη στους 95° C, ακολουθούν 30 κύκλοι: αποδιάταξης (denaturation) στους 95° C για 30 sec, υβριδισμού (annealing) στους 56° C για τον Satt228, 52° C για τον Satt409, 46° C για τον Satt429, 51° C για τον Satt496, 48° C για τον Satt239 και 52° C για τον Satt700,

για 2 min και επιμήκυνσης (extention) στους 72° C για 1 min. Τέλος ακολουθεί η τελική επιμήκυνση στους 72° C για 10 min.

Η αντίδραση της PCR έγινε σε συνολικό όγκο 15 μ l και αποτελούταν από 3 μ l (10x) PCR buffer, 1 μ l MgCl₂ 25mM, 0,5 μ l dNTPs (10 mM από κάθε νουκλεοτίδιο: dATP, dCTP, dGTP και dTTP), 1 μ l από κάθε primer (forward-reverse), 0,25 μ l Taq DNA πολυμεράση και 1 μ l DNA. Ο υπόλοιπος όγκος μέχρι τα 15 μ l συμπληρώθηκε με υπερκάθαρο νερό. Στον Πίνακα 2.2 δίνονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR.

Πίνακας 2.2 Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για τελικό όγκο PCR 15 μ l.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Συγκέντρωση (μl)</i>
10X PCR Buffer	3
25 mM MgCl ₂	1
dNTPs	0,5
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
Taq DNA πολυμεράση	0,25
DNA	1
H ₂ O	7,25
Σύνολο	15



Εικόνα 2.6 Μηχάνημα eppendorf για PCR.

2.2.4 Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων - πήκτωμα αγαρόζης

Για να γίνουν ορατά τα αποτελέσματα των προϊόντων της PCR για κάθε SSR δείκτη, έγινε ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή (gel) αγαρόζης 3% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο.

Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν:

- 130 ml TBE 1% (Tris-HCl, Acetic Acid και EDTA, pH 8).
- 3,9 g στερεής αγαρόζης, και
- 3 μl Βρωμιούχου Αιθιδίου 1%

Σε κωνική φιάλη των 250 ml προστέθηκε η στερεή αγαρόζη και το διάλυμα TBE. Ακολούθησε θέρμανση τους, στους 100 °C σε hot plate, με ανακίνηση ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έως ότου το διάλυμα να γίνει διαυγές. Μετά την διάλυση της αγαρόζης στο TBE, προστέθηκαν 4 μl Βρωμιούχου Αιθιδίου και μετά από σύντομη ανακίνηση το διάλυμα ρίχθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο, στο οποίο είχε τοποθετηθεί ειδική “χτένα” για τη δημιουργία θέσεων στις οποίες θα φορτώνονταν τα προϊόντα της PCR. Αφού το πήκτωμα στερεοποιήθηκε, αφαιρέθηκε η χτένα και το

gel τοποθετήθηκε μέσα στην λεκάνη ηλεκτροφόρησης (SCIE-PLAS) και προστέθηκε διάλυμα TBE 1X μέχρι να καλυφθεί το gel.

Από τα δείγματα του DNA φορτώθηκαν 7 μl από προϊόντα της PCR σε κάθε “πηγαδάκι” θέση. Στη συνέχεια διοχετεύθηκε τάση, 80 Volt, στην συσκευή ηλεκτροφόρησης μέσω του τροφοδοτικού (CONSORT E143) για 2 ώρες . Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) για την λήψη φωτογραφίας και την καταγραφή των πολυμορφισμών στα δείγματα.

2.3 Στατιστική ανάλυση

Στα μορφολογικά χαρακτηριστικά κατά UPOV, έγινε Ανάλυση Κύριων Συνιστώσων (PCA) με τη χρήση του προγράμματος XLSTAT 2016, με σκοπό να ελεγχθεί κατά πόσο οι ποικιλίες έμοιαζαν ή διέφεραν μεταξύ τους, ως προς την μορφολογία τους .

Επιπλέον από τις μετρήσεις που αφορούσαν το τελικό ύψος των φυτών, το ύψος του πρώτου λοβού, τον αριθμό των λοβών ανά ποικιλία και την απόδοση σε σπόρο, έγιναν ιστογράμματα με την βοήθεια του Excell, ώστε να γίνει πιο εύκολα η σύγκριση και η αξιολόγηση των ποικιλιών. Όσον αφορά τις μετρήσεις της απόδοσης σε σπόρο, έγινε ανάλυση της παραλλακτικότητας μεταξύ των ποικιλιών με one-way ANOVA με την χρήση του προγράμματος SPSS Statistics 17.0.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων από την οπτικοποίηση των τζελ αгарόζης, με σκοπό την διεξαγωγή δένδρογραμμάτων γενετικών αποστάσεων, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο pnclust στο περιβάλλον R και ο αλγόριθμος UPGMA υπολογίζοντας μέσω bootstrapping τις «προσεγγιστικά αμερόληπτες τιμές p».

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Καταγραφή μορφολογικών χαρακτηριστικών κατά UPOV

Σχετικά με τις μορφολογικές παρατηρήσεις που λήφθηκαν (Πίνακας 3.1) και οι δέκα ποικιλίες παρουσίασαν κόκκινο χρωματισμό (ανθοκυανίνη) στην υποκοτύλη, με διαφορετική ένταση ωστόσο σε κάθε ποικιλία. Ο τύπος ανάπτυξης των φυτών ποικίλλει, σε διακλαδιζόμενο, ημι-διακλαδιζόμενο και μη διακλαδιζόμενο, καθώς επίσης και ο τρόπος ανάπτυξης των φυτών σε ορθόκλαδος προς ημιορθόκλαδος, ημιορθόκλαδος και ημιορθόκλαδος προς οριζόντιος. Το χρώμα των τριχών του κύριου στελέχους στις περισσότερες ποικιλίες ήταν γκρι και στις υπόλοιπες καστανοκίτρινο. Όσον αφορά το σχήμα των πλευρικών φύλλων, ήταν κυρίως μυτερά και ωοειδή ενώ το μέγεθός τους διέφερε. Το χρώμα του άνθους ήταν μωβ σε όλες τις ποικιλίες. Ο σπόρος κατά των πλείστων είχε μέτριο μέγεθος, ενώ το χρώμα και το σχήμα του διέφεραν στις περισσότερες ποικιλίες.

Από το σύνολο των μορφολογικών χαρακτηριστικών μετά από Ανάλυση Κύριων συνιστωσών (Principal Components Analysis – PCA), προέκυψε ότι οι ποικιλίες Atlantic και Mercury είχαν ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά στις περισσότερες παρατηρήσεις, ενώ υπήρχε ομοιότητα και μεταξύ των ποικιλιών Kondor και Zora (Εικόνα 3.2).



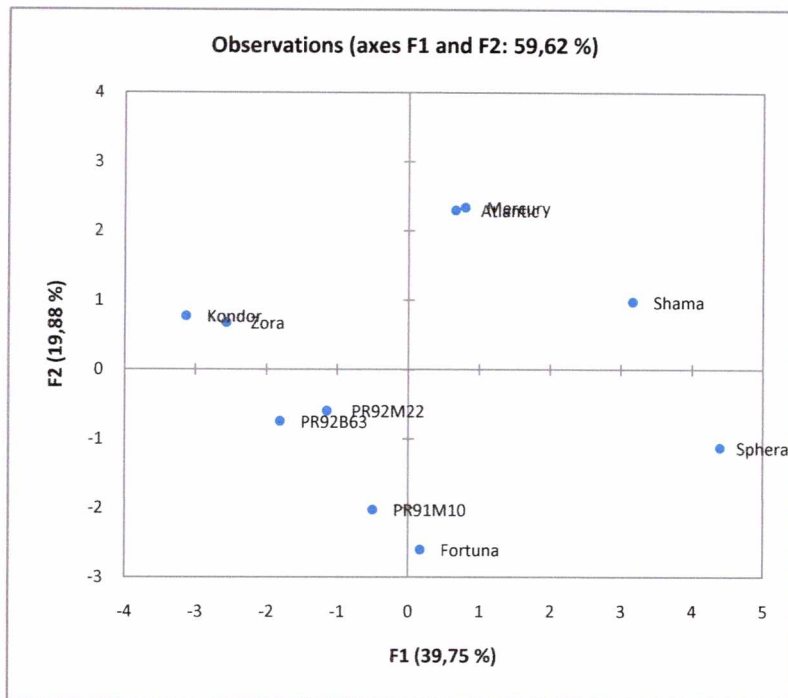
Εικόνα 3.1 Καλλιέργεια της ποικιλίας PR91M10.

Πίνακας 3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά κατά UPOV για κάθε ποικιλία του πειράματος.

Ποικιλία	Fortuna (1)	Zora (2)	PR92B63 (3)	PR91M10 (4)	Sphera (5)	Shama (6)	Atlantic (7)	Kondor (8)	PR92M22 (9)	Mercury (10)
Υποκοτύλη: εμφάνιση κόκκινου χρώματος - ανθοκυανίνη (1*)	Παρουσία 9	Παρουσία 9	Παρουσία 9	Παρουσία 9	Παρουσία 9	Παρουσία 9	Παρουσία 9	Παρουσία 9	Παρουσία 9	Παρουσία 9
Υποκοτύλη: ένταση ανθοκυανίνης (2*)	Μέτρια 5	Ασθενής 3	Ασθενής 3	Ασθενής 3	Πολύ ασθενής 1	Ασθενής 3	Ασθενής 3	Ισχυρή 7	Μέτρια 5	Ασθενής 3
Τύπος ανάπτυξης φυτού (3*)	Μη διακλαδιζόμενος 4	Διακλαδιζόμενος 1	Διακλαδιζόμενος 1	Ημι-διακλαδιζόμενος 2	Μη διακλαδιζόμενος 4	Ημι-διακλαδιζόμενος 2	Διακλαδιζόμενος 1	Διακλαδιζόμενος 1	Μη διακλαδιζόμενος 4	Ημι-διακλαδιζόμενος 2
Τρόπος ανάπτυξης φυτού (4*)	Ορθόκλαδος προς ημι-ορθόκλαδος 2	Ημι-ορθόκλαδος προς οριζόντιος 4	Ημι-ορθόκλαδος 3	Ορθόκλαδος προς ημι-ορθόκλαδος 2	Ορθόκλαδος προς ημι-ορθόκλαδος 2	Ημι-ορθόκλαδος 3	Ορθόκλαδος προς ημι-ορθόκλαδος 2	Ημι-ορθόκλαδος προς οριζόντιος 4	Ημι-ορθόκλαδος 3	Ορθόκλαδος προς ημι-ορθόκλαδος 2
Χρώμα τριχών κύριου στελέχους (5*)	Γκρί 1	Γκρί 1	Γκρί 1	Γκρί 1	Καστανό-κίτρινο 2	Καστανό-κίτρινο 2	Καστανό-κίτρινο 2	Γκρί 1	Γκρί 1	Καστανό-κίτρινο 2

Ποικιλία	Fortuna (1)	Zora (2)	PR92B63 (3)	PR91M10 (4)	Sphera (5)	Shama (6)	Atlantic (7)	Kondor (8)	PR92M22 (9)	Mercury (10)
Ύψος φυτού (6*)	Ψηλό 7	Χαμηλό προς μέτριο 4	Μέτριο προς ψηλό 6	Μέτριο προς ψηλό 6	Ψηλό 7	Μέτριο 5	Μέτριο 5	Χαμηλό προς μέτριο 4	Μέτριο 5	Μέτριο 5
Σχήμα πλευρικών φύλλων (8*)	Μυτερά & ωοειδή 3	Μυτερά & ωοειδή 3	Μυτερά & ωοειδή 3	Μυτερά & ωοειδή 3	Στρογγυλά & ωοειδή 4	Στρογγυλά & ωοειδή 4	Μυτερά & ωοειδή 3	Μυτερά & ωοειδή 3	Μυτερά & ωοειδή 3	Μυτερά & ωοειδή 3
Μέγεθος πλευρικών φύλλων (9*)	Μικρό 3	Μικρό προς μέτριο 4	Μικρό προς μέτριο 4	Μέτριο 5	Μεγάλο 7	Μεγάλο 7	Μέτριο 5	Μέτριο 5	Μεγάλο 7	Μεγάλο 7
Ένταση πράσινου χρώματος στα φύλλα (10*)	Μέτριο 5	Σκούρο 7	Σκούρο 7	Σκούρο 7	Μέτριο 5	Μέτριο 5	Μέτριο 5	Σκούρο 7	Σκούρο 7	Σκούρο 7
Χρώμα άνθους (11*)	Μώβ 2	Μώβ 2	Μώβ 2	Μώβ 2	Μώβ 2	Μώβ 2	Μώβ 2	Μώβ 2	Μώβ 2	Μώβ 2
Λοβός – ένταση καφέ χρώματος (12*)	Μέτριο 5	Σκούρο 7	Σκούρο 7	Ανοιχτό 3	Μέτριο 5	Μέτριο 5	Μέτριο 5	Σκούρο 7	Σκούρο 7	Μέτριο 5

Ποικιλία	Fortuna (1)	Zora (2)	PR92B63 (3)	PR91M10 (4)	Sphera (5)	Shama (6)	Atlantic (7)	Kondor (8)	PR92M22 (9)	Mercury (10)
Μέγεθος σπόρου (13*)	Μέτριο 5	Μέτριο 5	Μέτριο 5	Μέτριο 5	Μεγάλο 7	Μεγάλο 7	Μικρό 3	Μέτριο 5	Μέτριο 5	Μέτριο 5
Σχήμα σπόρου (14*)	Σφαιρικό & πεπλατυσμένο 2	Σφαιρικό & πεπλατυσμένο 2	Σφαιρικό 1	Σφαιρικό 1	Σφαιρικό & πεπλατυσμένο 2	Επιμήκες 3	Σφαιρικό & πεπλατυσμένο 2	Σφαιρικό & πεπλατυσμένο 2	Σφαιρικό 1	Επιμήκες 3
Σπόρος: χρώμα περιβλήματος (15*)	Κίτρινο 1	Κίτρινο-πράσινο 2	Κίτρινο-πράσινο 2	Κίτρινο 1	Κίτρινο 1	Κίτρινο 1	Καστανό ανοιχτό 4	Κίτρινο-πράσινο 2	Κίτρινο-πράσινο 2	Καστανό ανοιχτό 4
Σπόρος: χρώμα ουλής σπόρου (17*)	Καστανό ανοιχτό 3	Κίτρινο 2	Καστανό ανοιχτό 3	Κίτρινο 2	Μάυρο 6	Μάυρο 6	Μάυρο 6	Κίτρινο 2	Καστανό σκούρο 4	Καστανό σκούρο 4



Εικόνα 3.2 Ανάλυση Κύριων Συνιστώσων (PCA) με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά κατά UPOV, για τις δέκα ποικιλίες.



Εικόνα 3.3 Καλλιέργεια της ποικιλίας PR92B63.

3.2 Καταγραφή χαρακτηριστικών που συνδέονται με την απόδοση σε σπόρο

Η φυτρωτική ικανότητα του σπόρου συνδέεται άμεσα με την τελική απόδοση της καλλιέργειας και γι αυτό μετρήθηκε το ποσοστό των σπόρων που φύτρωσαν στο χωράφι.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα, όπου ο αριθμός 1 αντιστοιχεί σε άριστη φυτρωτικότητα (κανένα κενό), ο αριθμός 3 σε πολύ καλή φυτρωτικότητα (περίπου 10% κενά), ο αριθμός 5 σε καλή φυτρωτικότητα (περίπου 25% κενά) και ο αριθμός 7 σε μέτρια φυτρωτικότητα (περίπου 50% κενά).

Πίνακας 3.2 Εκτίμηση φυτρωτικής ικανότητας των δέκα ποικιλιών σόγιας.

Ποικιλία	1 ^η Επανάληψη	2 ^η Επανάληψη	3 ^η Επανάληψη
Fortuna	3	5	3
Zora	3	3	3
PR92B63	3	3	5
PR91M10	7	1	3
Sphera	5	5	3
Shama	3	3	5
Atlantic	7	1	3
Kondor	7	5	3
PR92M22	3	3	1
Mercury	1	3	7

Οι ποικιλίες Fortuna, Zora, PR92B63, Shama και PR92M22 είχαν υψηλό ποσοστό φυτρωτικότητας και σχετικά σταθερό σε όλες τις επαναλήψεις. Αντίθετα οι υπόλοιπες ποικιλίες εμφάνισαν προβλήματα όσον αφορά την φυτρωτική τους ικανότητα. Συγκεκριμένα οι ποικιλίες PR91M10, Atlantic και Mercury είχαν έντονες διακυμάνσεις μεταξύ των επαναλήψεων, δηλαδή η φυτρωτικότητα τους δεν ήταν σταθερή και επηρεάζεται πολύ από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες. Η ποικιλία Sphera είχε σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, όμως το 25% των σπόρων της δεν έδωσαν φυτά και η ποικιλία Kondor είχε προβλήματα στο ποσοστό και στην σταθερότητα της φυτρωτικότητας.



Εικόνα 3.4 Καλλιέργεια της ποικιλίας Mercury.

Ύψος φυτών πριν την συγκομιδή

Όπως προαναφέρθηκε, για την μέτρηση του ύψους επιλέχθηκαν τυχαία 30 φυτά από κάθε ποικιλία (10 για κάθε επανάληψη) και η λήψη των μετρήσεων έγινε λίγες ημέρες πριν την συγκομιδή.

Από τον πίνακα 3.3, προκύπτει ότι η ποικιλία Sphera ήταν με διαφορά η ψηλότερη από τις ποικιλίες με μέσο όρο ύψους 1,08 m, όμως εξαιτίας αυτού πλάγιαζε. Το ύψος των ποικιλιών Fortuna, PR92B63, Kondor και Mercury

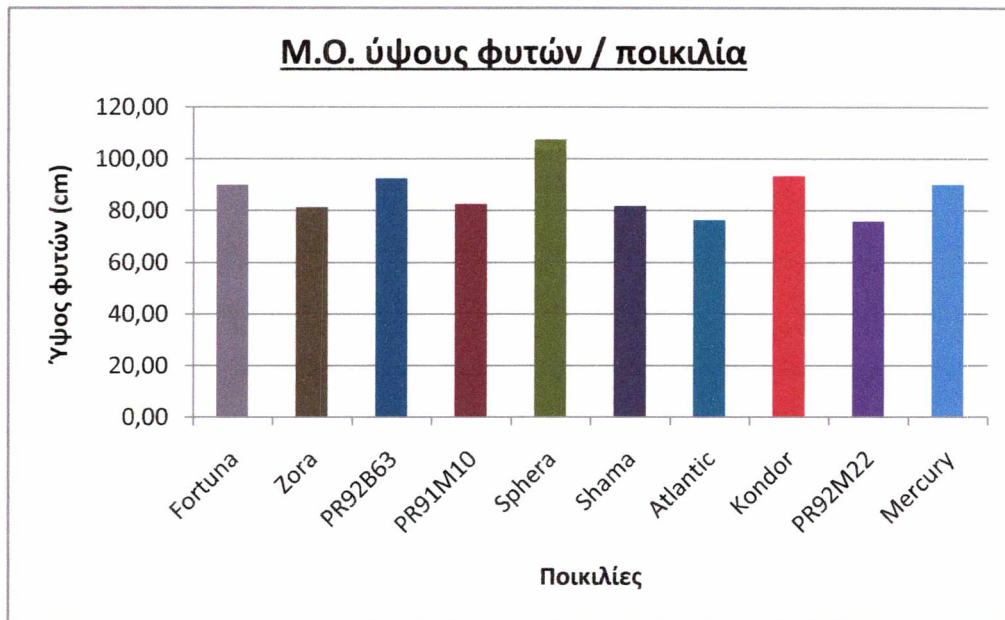
κυμαίνονταν από 0,9 m έως 0,93 m και ακολουθούσαν οι ποικιλίες Zora, PR91M10, Shama, Atlantic και PR92M22 με μέσο όρο ύψους 0,76-0,83 m.

Οι ποικιλίες Sphera, Fortuna, PR92B63, Kondor και Mercury θεωρούνται ψηλές. Ενώ οι ποικιλίες Zora, PR91M10, Shama, Atlantic και PR92M22 έχουν μέσο ύψος σύμφωνα με την βιβλιογραφία της εισαγωγής, διότι το μέσο ύψος των φυτών σόγιας είναι 0,3 - 0,9 m.

Πίνακας 3.3 Μέσοι όροι ύψους φυτών σε cm για κάθε ποικιλία.

Ποικιλία	Ύψος φυτών (cm)			Μ.Ο.
	1 ^η Επανάληψη	2 ^η Επανάληψη	3 ^η Επανάληψη	
Fortuna	92,50	92,50	85,00	90,00
Zora	76,38	85,00	82,50	81,29
PR92B63	87,50	92,50	97,50	92,50
PR91M10	81,38	83,75	82,50	82,54
Sphera	110,00	112,50	100,00	107,50
Shama	76,50	86,25	82,50	81,75
Atlantic	77,60	73,75	77,50	76,28
Kondor	91,25	93,75	95,00	93,33
PR92M22	71,25	76,25	80,00	75,83
Mercury	88,88	92,50	88,75	90,04

Σύμφωνα με τον Whigham (1983), οι ποικιλίες που έχουν διακλαδιζόμενο τύπο ανάπτυξης τείνουν να έχουν πιο χαμηλό ύψος από τις ποικιλίες με μη διακλαδιζόμενο τύπο ανάπτυξης. Στις ποικιλίες που μελετήσαμε, η παραπάνω σχέση μεταξύ του τύπου ανάπτυξης και του ύψους ίσχυε για τις περισσότερες ποικιλίες. Εξαιρέση αποτέλεσαν οι kondor και PR92B63 που είχαν ψηλά φυτά παρόλο που ήταν διακλαδιζόμενος ο τύπος αναπτυξής τους και η ποικιλία PR92M22 που είχε χαμηλό ύψος παρόλο που ήταν μη διακλαδιζόμενη.



Σχήμα 3.1 Μέσο ύψος φυτών κάθε ποικιλίας.

Ύψος 1^{ου} λοβού

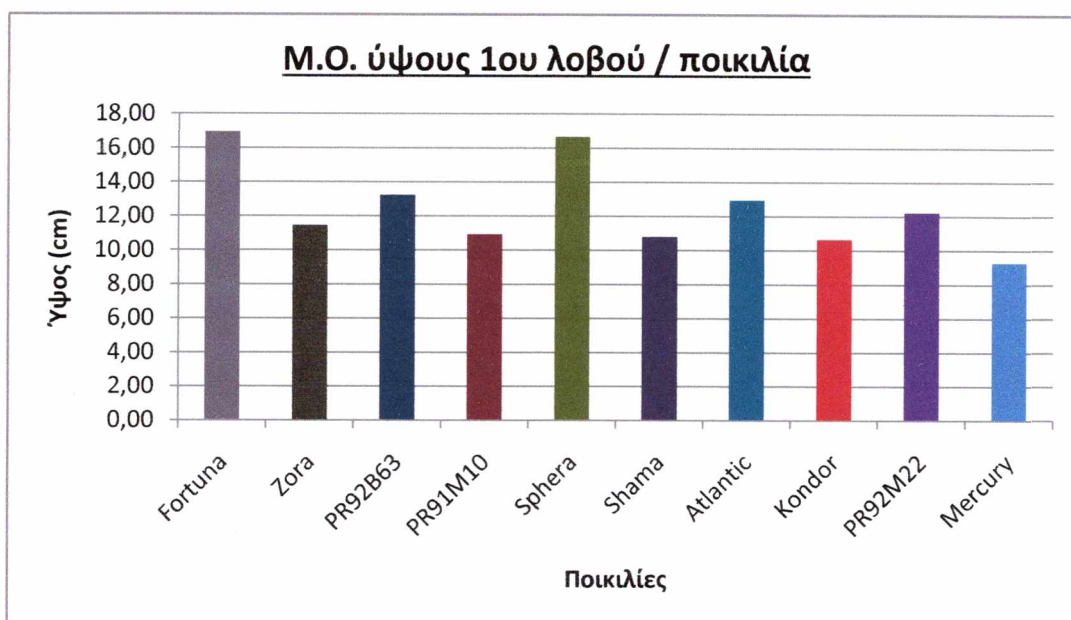
Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η απόσταση του πρώτου λοβού των φυτών από το έδαφος επηρεάζει σημαντικά την τελική απόδοση, διότι οι λοβοί που είναι πολύ χαμηλά δεν συγκομίζονται από την θεριζοαλωνιστική.

Οι μέσοι όροι του ύψους των πρώτων λοβών της κάθε ποικιλίας διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ($F=4,833$ και $p<0,05$). Μεγαλύτερη απόσταση από το έδαφος παρουσιάζεται στα φυτά των ποικιλιών Fortuna και Sphera και μικρότερη στις PR91M10, Shama, Kondor και Mercury (Πίνακας 3.4).

Πίνακας 3.4 Ύψος πρώτου λοβού από το έδαφος σε cm.

Ύψος 1ου λοβού/φυτό (cm)					
Ποικιλίες	Επαναλήψεις			Μ.Ο.	STDEV
	1 ^η Επανάληψη	2 ^η Επανάληψη	3 ^η Επανάληψη		
Fortuna	19,4	17,2	14,25	16,95	2,6
Zora	13,4	11,1	9,85	11,45	1,8
PR92B63	8,8	15,6	15,3	13,2	3,8
PR91M10	9,15	9,75	13,9	10,9	2,6
Sphera	16,3	17,3	16,4	16,7	0,5
Shama	11,25	9,75	11,4	10,8	0,9
Atlantic	13,85	13,05	11,95	12,95	0,9
Kondor	9,55	11,8	11,1	10,8	1,1
PR92M22	11,3	12,4	13	12,2	0,9
Mercury	7,8	10,7	9,4	9,3	1,4
				* F=4,833	
				p=0,002	

Η ποικιλία Sphera εκτός του ότι εμφανίζει τον πρώτο λοβό σε αρκετή απόσταση από το έδαφος (16,7 cm) είναι και σταθερή σε όλες τις επαναλήψεις, καθώς η τυπική απόκλιση από το μέσο όρο είναι 0,5. Για την ποικιλία με το μεγαλύτερο ύψος 1^{ου} λοβού, την Fortuna (16,95 cm), συμβαίνει το αντίθετο όσον αφορά την σταθερότητα των μετρήσεων στις επαναλήψεις διότι η τυπική απόκλιση από τον μέσο όρο είναι 2,6. Μεγάλες τυπικές αποκλίσεις στις τιμές τους εμφανίζουν και οι Zora, PR92B63, PR91M10. Στην ποικιλία Mercury παρατηρείται το μικρότερο ύψος του 1^{ου} λοβού (9,3 cm) από το έδαφος με τυπική απόκλιση 1,4.



Σχήμα 3.2 Μέσοι όροι ύψους πρώτου λοβού από το έδαφος για κάθε ποικιλία

Αριθμός λοβών/φυτό και απόδοση σε σπόρο

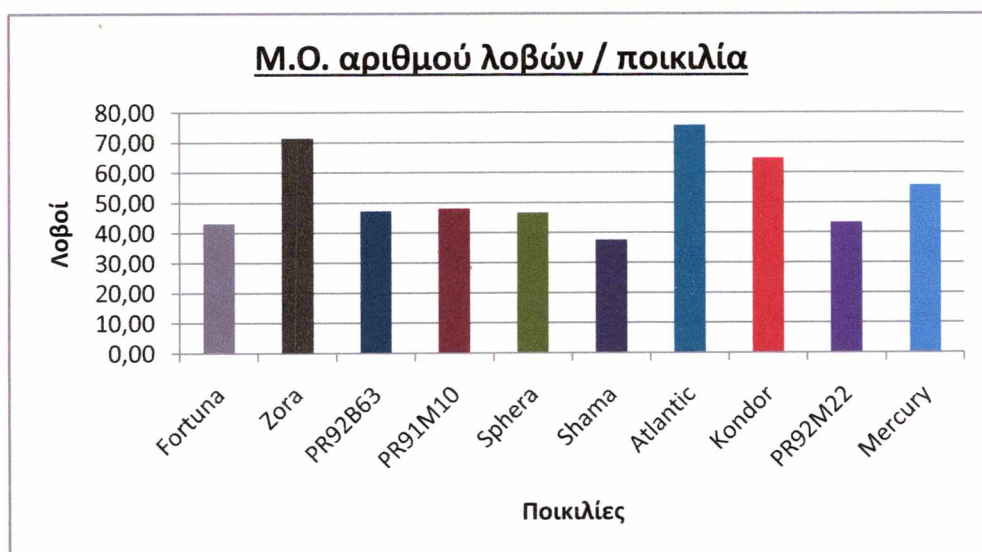
Από τις πιο σημαντικές παρατηρήσεις είναι η καταγραφή των λοβών/φυτό για κάθε ποικιλία, γιατί συνδέεται άρρηκτα με την τελική παραγωγή της σόγιας σε σπόρο, το οποίο είναι και το ζητούμενο από αυτή την καλλιέργεια.

Σύμφωνα με τον πίνακα 3.5, προκύπτει ότι οι μέσοι όροι των αριθμών των λοβών/φυτό σε κάθε ποικιλία διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($F > 1$ και $p < 0,05$). Περισσότερους λοβούς ανά φυτό κατά μέσο όρο, εμφανίζουν οι ποικιλίες Atlantic (75,4), Zora (71,5), Kondor (64,8) και Mercury (55,8). Στις υπόλοιπες ο μέσος όρος των λοβών ανά φυτό είναι 37,6 – 48,1. Τους λιγότερους λοβούς ανά φυτό έχει η ποικιλία Shama.

Οι ποικιλίες Atlantic, Zora και Kondor, σύμφωνα με τις παρατηρήσεις κατά UPOV είχαν διακλαδιζόμενο τύπο ανάπτυξης και σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Whigham, 1983) ήταν αναμενόμενο να έχουν πολλούς λοβούς/φυτό. Παρόλο που και η ποικιλία PR92B63 είχε διακλαδιζόμενο τύπο ανάπτυξης, οι λοβοί της ανά φυτό ήταν κατά 40% λιγότεροι συγκριτικά με τις Atlantic, Zora και Kondor.

Πίνακας 3.5 Αριθμός των λοβών ανά φυτό για κάθε ποικιλία.

Αριθμός λοβών/φυτό					
Ποικιλίες	Επαναλήψεις			Μ.Ο.	STDEV
	1 ^η Επαν.	2 ^η Επαν.	3 ^η Επαν.		
Fortuna	38,7	40,7	50	43,1	6
Zora	77,9	71,6	64,9	71,5	6,5
PR92B63	53,8	42,7	45,1	47,2	5,8
PR91M10	48,5	53	42,8	48,1	5,1
Sphera	50,6	54,5	34,8	46,6	10,4
Shama	33,9	39,9	38,9	37,6	3,2
Atlantic	65,3	93	68	75,4	15,3
Kondor	78	59,2	57,1	64,8	11,5
PR92M22	44,3	50,7	35,2	43,4	7,8
Mercury	54	55	58,4	55,8	2,3
				* F=7,323	
				p=0,000	



Σχήμα 3.3 Μέσοι όροι λοβών ανά φυτό για κάθε ποικιλία.

Η συγκομιδή των ποικιλιών Fortuna, Zora και Mercury έγινε στις 15/10. Ενώ των υπόλοιπων μια εβδομάδα μετά. Οι ποικιλίες PR92B63, PR91M10, Sphera, Shama, Atlantic, Kondor και PR92M22 συγκομίστηκαν στις 24/10 διότι παρατηρήθηκε το φαινόμενο stay green, δηλαδή της διατήρησης του πράσινου φυλλώματος ενώ ο λοβός είχε ξεραθεί.

Η μέτρηση της απόδοσης σε σπόρο έγινε για κάθε πειραματικό τεμάχιο και έπειτα υπολογίστηκε η απόδοση ανά στρεμματική έκταση.

Η απόδοση σε σπόρο της ποικιλίας Fortuna ήταν μεταξύ 274,3-361,1 Kg/στρ με μέσο όρο 312,1 Kg/στρ. Η Zora είχε κατά μέσο όρο 351,5 Kg/στρ απόδοση σε σπόρο, η PR92B63 είχε 340,7 Kg/στρ, η PR91M10 είχε 338 Kg/στρ, η Sphera είχε 393,6 Kg/στρ, η Shama 278,7 Kg/στρ, η Atlantic 213,1 Kg/στρ, η Kondor 316,8 Kg/στρ, η PR92M22 είχε 390,8 Kg/στρ και η Mercury είχε 294,2 Kg/στρ απόδοση σε σπόρο.

Αποτελέσματα απόδοσης σε σπόρο (kg/στρ)										
Επανά- ληψη	Ποικιλίες									
	Fortuna	Zora	PR92B63	PR91M10	Sphera	Shama	Atlantic	Kondor	PR92M22	Mercury
Rep 1	300,8	345,1	319,5	288,7	445,3	288,3	223,1	315	401,8	294,9
Rep 2	361,1	351	399,1	378,7	477,5	293,6	182,5	348,7	457,6	309,2
Rep 3	274,3	358,5	303,6	346,7	258,1	254,3	233,8	286,6	313	278,6
M.O.	312,1	351,5	340,7	338,0	393,6	278,7	213,1	316,8	390,8	294,2

Εικόνα 3.5 Μέσοι όροι απόδοσης σε σπόρο (kg/στρ) για κάθε ποικιλία.

Πίνακας 3.6 Φαίνεται η significant των μέσων όρων των ποικιλιών, η οποία δείχνει αν υπάρχουν και μεταξύ ποιόν τιμών στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

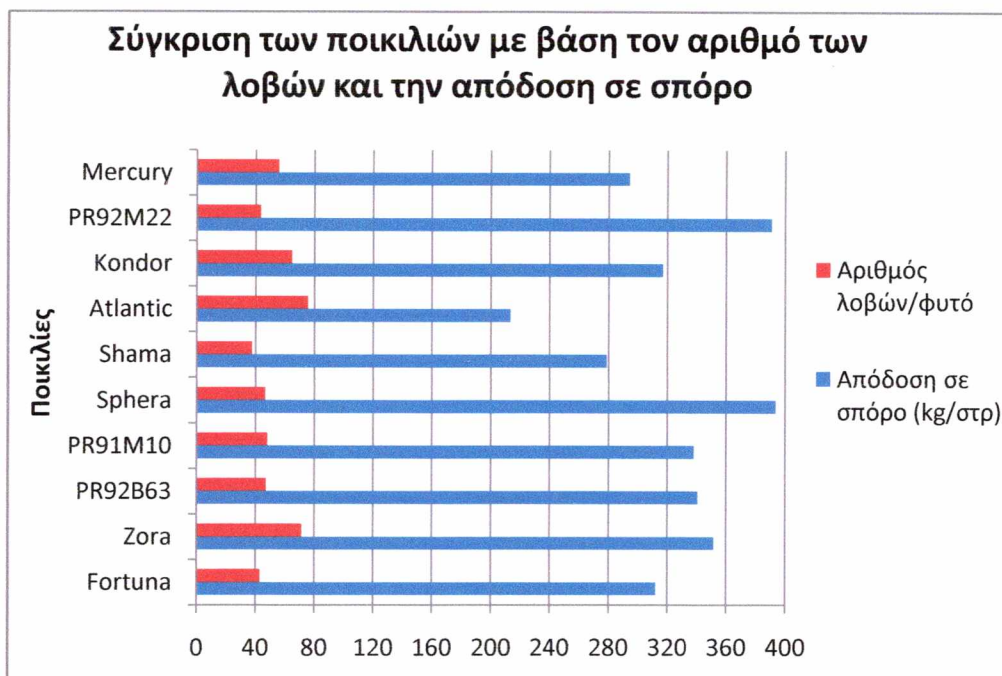
Sig.	<i>Fortuna</i>	<i>Zora</i>	<i>PR92B63</i>	<i>PR91M10</i>	<i>Sphera</i>	<i>Shama</i>	<i>Atlantic</i>	<i>Kondor</i>	<i>PR92M22</i>	<i>Mercury</i>
<i>Fortuna</i>		,994	1,000	1,000	,686	,998	,446	1,000	,724	1,000
<i>Zora</i>	,994		1,000	1,000	,991	,798	,102	,998	,995	,938
<i>PR92B63</i>	1,000	1,000		1,000	,961	,906	,161	1,000	,972	,983
<i>PR91M10</i>	1,000	1,000	1,000		,948	,926	,180	1,000	,962	,988
<i>Sphera</i>	,686	,991	,961	,948		,263	,014	,748	1,000	,440
<i>Shama</i>	,998	,798	,906	,926	,263		,875	,996	,291	1,000
<i>Atlantic</i>	,446	,102	,161	,180	,014	,875		,386	,016	,692
<i>Kondor</i>	1,000	,998	1,000	1,000	,748	,996	,386		,784	1,000
<i>PR92M22</i>	,724	,995	,972	,962	1,000	,291	,016	,784		,477
<i>Mercury</i>	1,000	,938	,983	,988	,440	1,000	,692	1,000	,477	

Αν και οι αποδόσεις μεταξύ των ποικιλιών παρουσιάζουν διαφορές, δεν είναι στατιστικώς σημαντικές για τις περισσότερες ποικιλίες, διότι όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.6, η significant >0,05. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μ.ο. των αποδόσεων παρουσιάζονται μεταξύ των ποικιλιών Atlantic – Sphera (sig=0,014) και Atlantic - PR92M22 (sig=0,016).

Τις υψηλότερες αποδόσεις τις είχαν οι ποικιλίες Sphera και PR92M22 και τις χαμηλότερες οι ποικιλίες Atlantic και Shama. Παρόλα αυτά το εύρος των αποδόσεων ήταν 213,1 – 393,6 kg/στρ, από το οποίο συμπεραίνουμε ότι και οι δέκα ποικιλίες είχαν σχετικά καλή απόδοση στην επίσπορη καλλιέργεια, εφόσον η παγκόσμια μέση απόδοση της σόγιας ως κύρια καλλιέργεια είναι 217 kg/στρ.

Παρατηρώντας το σχήμα 3.4, φαίνεται ότι η ποικιλία Atlantic παρόλο που είχε τους περισσότερους λοβούς ανά φυτό έχει την χαμηλότερη απόδοση σε σπόρο. Αυτό συμβαίνει διότι η φυτρωτικότητα της δεν ήταν σταθερή για όλες τις επαναλήψεις. Πιο συγκεκριμένα στην πρώτη επανάληψη το 50% των σπόρων της δεν βλάστησαν οπότε υπήρχαν λιγότερα φυτά για συγκομιδή ανά m². Η ποικιλία PR92M22 παρόλο που είχε τους λιγότερους λοβούς/φυτό μετά από τις Shama και

Fortuna, είχε την δεύτερη υψηλότερη απόδοση σε σπόρο. Αυτό οφείλεται κυρίως στην άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα της σε όλες τις επαναλήψεις.



Σχήμα 3.4 Σύγκριση των ποικιλιών με βάση τον αριθμό των λοβών ανά φυτό και της απόδοσης τους σε σπόρο.



Εικόνα 3.6 Σύγκριση ποικιλιών PR91M10, PR92B63 και Mercury.

3.3 Αποτελέσματα διασταυρώσεων

Πίνακας 3.7 Αριθμός διασταυρώσεων μεταξύ των ποικιλιών

Ποικιλίες	Αριθμός διασταυρώσεων
Kondor x PR92B63	15
Shama x Atlantic	15
Atlantic x Shama	11
Sphera x PR92M22	5
Atlantic x PR91M10	10
PR92B63 x Kondor	15
PR92M22 x Sphera	13
PR91M10 x Atlantic	10
Fortuna x Mercury	10
Mercury x Fortuna	5
Fortuna x Zora	7
PR92B63 x Sphera	10
PR92B63 x Shama	10
Sphera x PR92B63	5
Shama x PR92B63	5
PR92M22 x Mercury	5
Mercury x PR92M22	5
PR91M10 x Shama	10
Sphera x PR92M22	5
Shama x PR91M10	5
Mercury x Kondor	5
Sphera x PR91M10	5
Σύνολο	186

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν. Το ποσοστό των επιτυχημένων διασταυρώσεων ήταν 3,8% και συγκεκριμένα πέτυχαν οι παρακάτω:

- Kondor x PR92B63 (2),
- Fortuna x Zora,
- Shama x PR92B63,
- Shama x Atlantic (2),
- PR91M10 x Shama.

Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι η σόγια είναι αυτογονιμοποιούμενο φυτό και με σταυρογονιμοποίηση αναπαράγεται σε ποσοστό 1%. Οπότε το ποσοστό των διασταυρώσεων που πέτυχαν είναι εν μέρει ικανοποιητικό. Από οικονομικής άποψης όμως δεν είναι ικανοποιητικό καθώς σαν διαδικασία, η διασταύρωση των ποικιλιών με σκοπό την παραγωγή υβριδίων, είναι χρονοβόρα, απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και χρειάζεται μεγάλη χρονική ακρίβεια.

Παράγοντες οι οποίοι έδρασαν αρνητικά στην επιτυχία των διασταυρώσεων ήταν η υψηλή θερμοκρασία, το σύντομο χρονικό διάστημα που το στίγμα ήταν επιδεικτικό στην γύρη (24 - 48 ώρες), το γεγονός ότι ο συγχρονισμός της άνθισης μεταξύ των ποικιλιών δεν ήταν τέλειος και ότι το προσωπικό δεν ήταν εξειδικευμένο.

3.4 Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης

Ποσοτικοποίηση DNA

Τα δείγματα των ποικιλιών σόγιας μετά από την απομόνωση του DNA τους τοποθετήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους/ορατού (nanodrop) για να προσδιοριστεί η ποσότητα και η ποιότητα του .

Στην εικόνα 3.7 φαίνεται η ποσότητα του DNA στα δείγματα σε ng/μl και η καθαρότητα των δειγμάτων (απουσία πρωτεϊνών) από τους λόγους 260/280 και 260/230. Η συγκέντρωση του DNA ήταν υψηλή σε όλα τα δείγματα. Όσον αφορά

την καθαρότητα τους ήταν απαλλαγμένα από πρωτεΐνες αφού οι τιμές των λόγων 260/280 και 260/230 ήταν κοντά στο δύο.

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
1	Default	4/3/2014	1:54 PM	290.43	5.809	2.830	2.05	2.15
2	Default	4/3/2014	1:56 PM	447.20	8.944	4.322	2.07	2.27
3	Default	4/3/2014	2:00 PM	692.80	13.856	6.447	2.15	2.30
4	Default	4/3/2014	2:01 PM	166.53	3.331	1.567	2.13	2.11
5	Default	4/3/2014	2:02 PM	737.12	14.742	6.847	2.15	2.28
6	Default	4/3/2014	2:02 PM	465.67	9.313	4.556	2.04	2.22
7	Default	4/3/2014	2:03 PM	517.58	10.352	5.003	2.07	2.25
8	Default	4/3/2014	2:04 PM	535.15	10.703	5.228	2.05	2.12
9	Default	4/3/2014	2:04 PM	666.26	13.325	6.200	2.15	2.24
10	Default	4/3/2014	2:05 PM	182.58	3.652	1.802	2.03	1.94

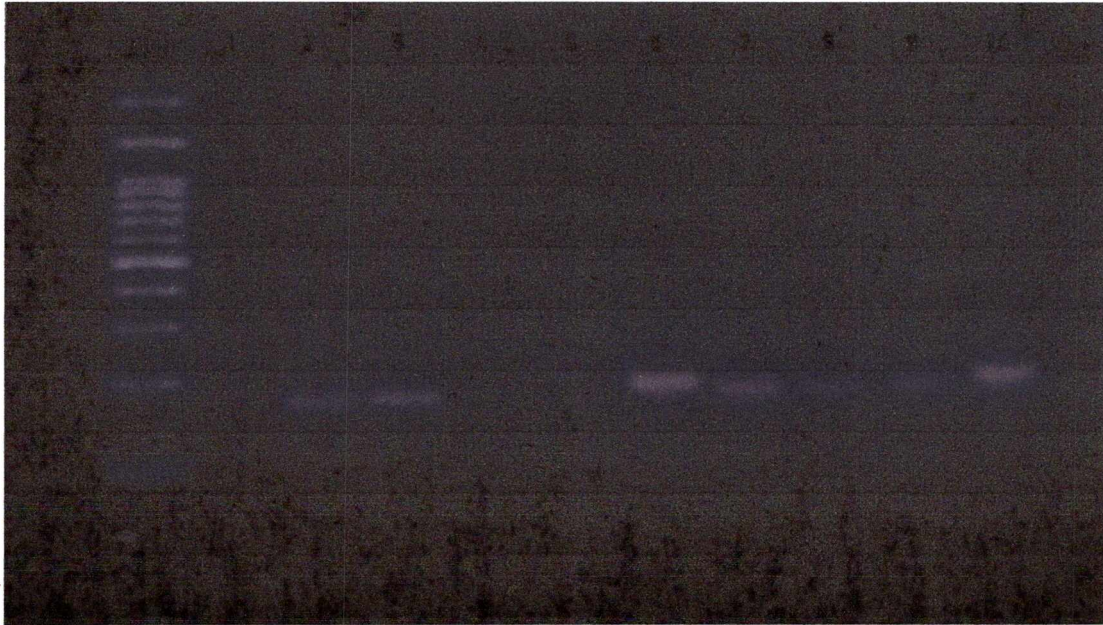
Εικόνα 3.7 Ποσοτικοποίηση DNA σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους/ορατού (nanodrop).

Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων των μοριακών δεικτών SSR's

Αφού έγινε ο υβριδισμός των δεικτών SSR και ο πολλαπλασιασμός της περιοχής του DNA που θέλαμε να μελετήσουμε, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή (gel) αγαρόζης 3% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο. Τα αποτελέσματα από τις ηλεκτροφορήσεις φαίνονται για τον κάθε δείκτη στις παρακάτω εικόνες. Ο ladder που χρησιμοποιήθηκε σαν αναφορά ήταν των 100bp. Όπου οι αριθμοί 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 είναι τα δείγματα των ποικιλιών Fortuna, Zora, PR92B63, PR91M10, Sphera, Shama, Atlantic, Kondor, PR92M22, Mercury αντίστοιχα.

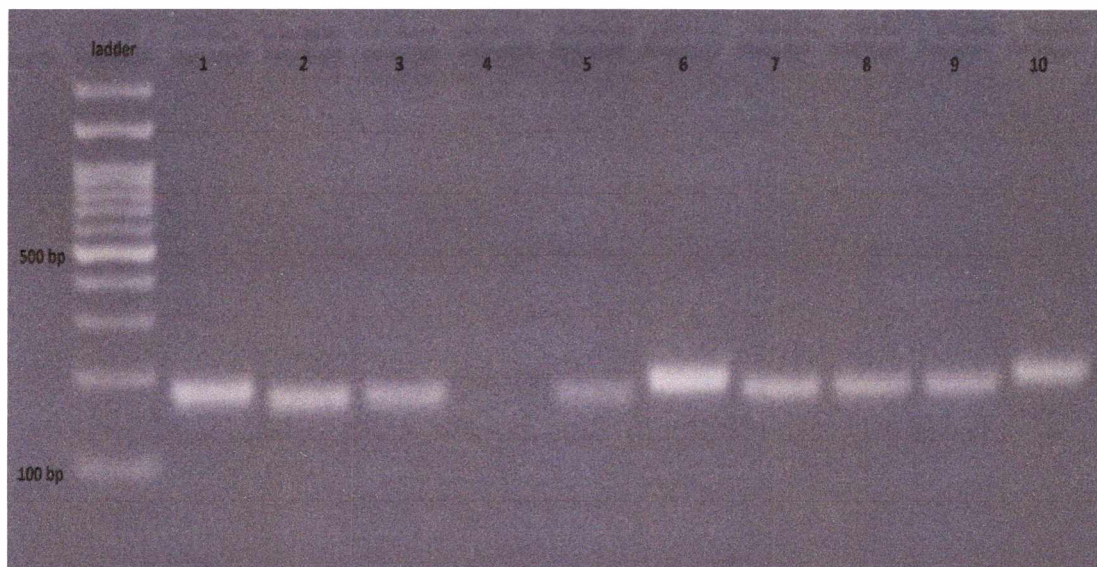
Στην εικόνα 3.8, διακρίνονται οι μπάντες των δειγμάτων DNA για τον δείκτη Satt 228, ο οποίος σχετίζεται με τους αναστολείς θρέψης τρυψίνης. Μεταξύ των δειγμάτων υπάρχει παραλλακτικότητα, καθώς στις ποικιλίες Fortuna, PR91M10 και Sphera δεν υπάρχει μπάντα ενώ οι υπόλοιπες εμφανίζουν μπάντα αλλά σε

διαφορετικό αριθμό ζευγών βάσεων. Γενικά σε όσα δείγματα εμφανίζεται μπάντα είναι γύρω στα 200 bp, όπου και αναμενόταν σύμφωνα με την βιβλιογραφία.



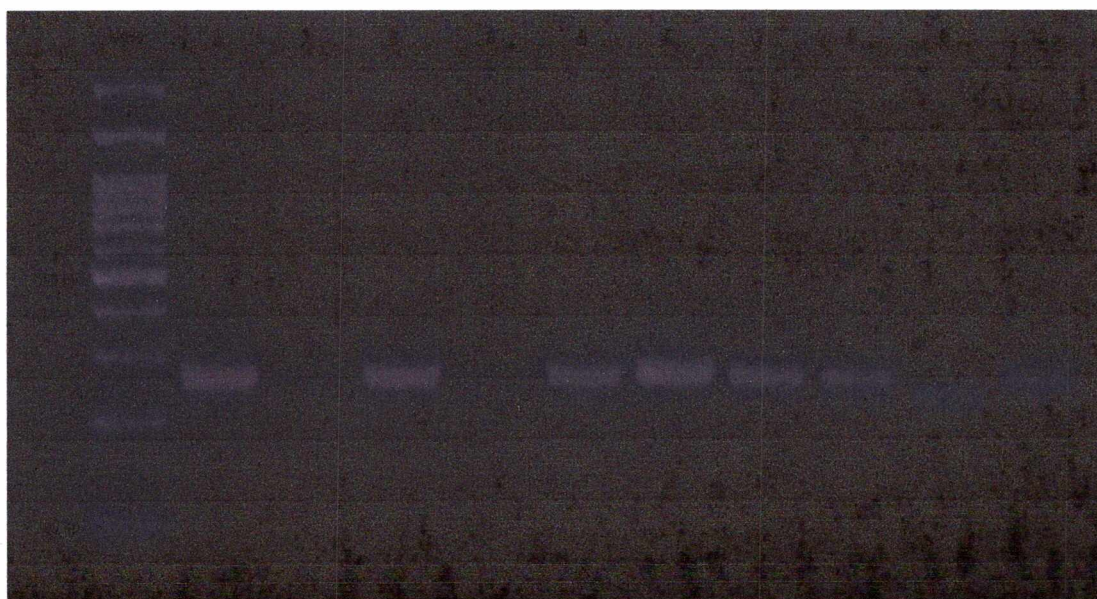
Εικόνα 3.8 Τζελ αγαρόζης για τον δείκτη Satt 228.

Ο δείκτης Satt 409 σχετίζεται επίσης με το γονίδιο Ti, το οποίο συνδέεται με τους αναστολείς θρέψης της τρυψίνης. Σε όλα τα δείγματα, εκτός από την ποικιλία PR91M10, εμφανίζεται μπάντα γύρω στα 200 ζεύγη. Παραλλακτικότητα μεταξύ των ποικιλιών εμφανίζεται και με αυτόν το δείκτη.



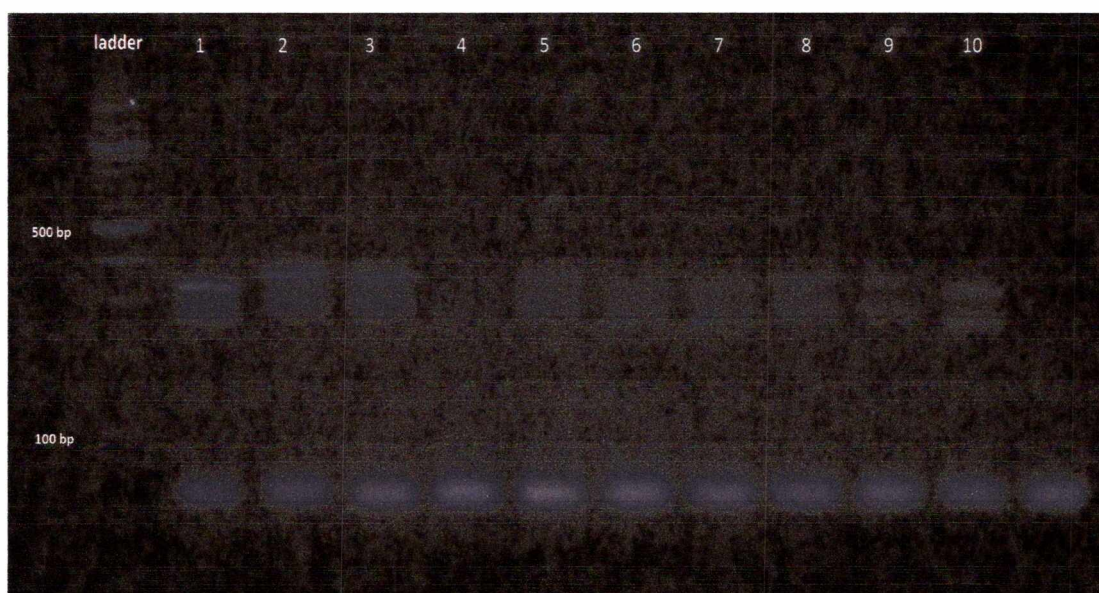
Εικόνα 3.9 Τζελ αγαρόζης για τον δείκτη Satt 409.

Ο τρίτος και τελευταίος δείκτης που χρησιμοποιήθηκε και συνδέεται με το γονίδιο Ti είναι ο Satt 429 (Εικόνα 3.10). Ο συγκεκριμένος δείκτης έδειξε έντονη παραλλακτικότητα μεταξύ των δειγμάτων. Οι ποικιλίες Zora και PR91M10 δεν εμφάνισαν μπάντα. Τα δείγματα των Fortuna, PR92B63, Sphera, Shama, Atlantic, Kondor και Mercury εμφανίζουν μπάντα στα 280 bp περίπου. Τέλος το δείγμα της ποικιλίας PR92M22 εμφανίζει απλή μπάντα στα 230 bp περίπου.



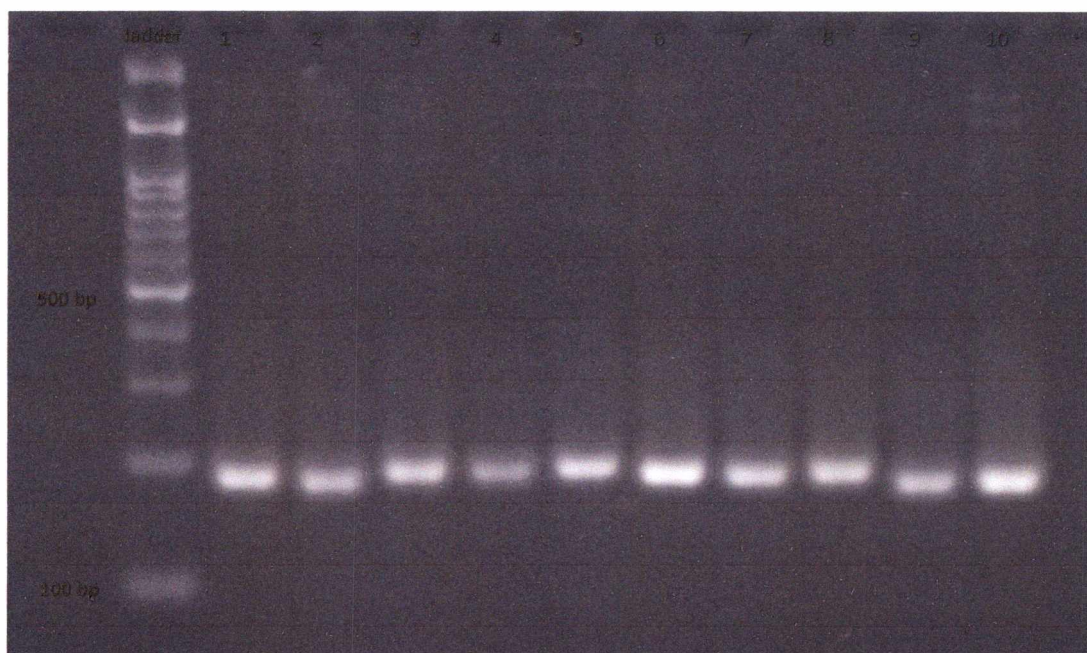
Εικόνα 3.10 Τζελ αγαρόζης για τον δείκτη Satt 429.

Στην εικόνα 3.11 φαίνονται οι μπάντες του DNA για τον δείκτη Satt 496, ο οποίος συνδέεται με τα γονίδια της πρωτεΐνης. Ο συγκεκριμένος δείκτης είναι πολυμορφικός καθώς τα δείγματα παρουσιάζουν διπλές μπάντες. Η ποικιλία PR91M10 για ακόμη μια φορά δεν εμφανίζει μπάντα. Οι μπάντες στα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζονται μεταξύ 280-370 bp. Προς το τέλος του τζελ, κάτω από τον ladder και στο δείγμα blank (μετά από το δείγμα 10) εμφανίζονται μπάντες με χαμηλό μοριακό βάρος το οποίο σημαίνει ότι είχαμε επιμόλυνση των δειγμάτων ή/και των δεικτών SSR.



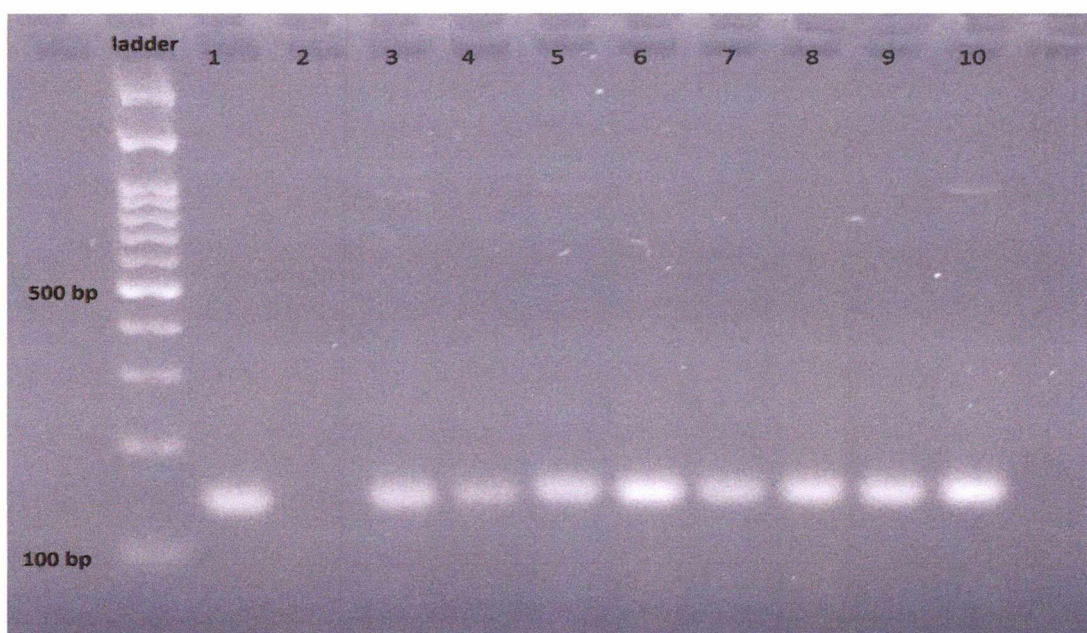
Εικόνα 3.11 Τζελ αγαρόζης για τον δείκτη Satt 496.

Η εικόνα 3.12 δείχνει τις μπάντες των δειγμάτων για τον μοριακό δείκτη Satt 239, ο οποίος συνδέεται και αυτός με γονίδια της πρωτεΐνης. Όλα τα δείγματα εμφανίζουν μπάντες μεταξύ 180-200 bp. Ακόμη φαίνεται ότι υπάρχει παραλλακτικότητα μεταξύ των δειγμάτων γιατί τα περισσότερα εμφανίζουν μπάντα σε διαφορετικά bp.



Εικόνα 3.12 Τζελ αγαρόζης για τον δείκτη Satt 239.

Τέλος, ο δείκτης Satt 700, ο οποίος συνδέεται επίσης με γονίδια πρωτεΐνης εμφανίζει μάλιστα στις 150 bp περίπου (Εικόνα 3.13). Στην ποικιλία zora δεν εμφανίζεται μάλιστα, οπότε υπάρχει διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες.



Εικόνα 3.13 Τζελ αγαρόζης για τον δείκτη Satt 700.

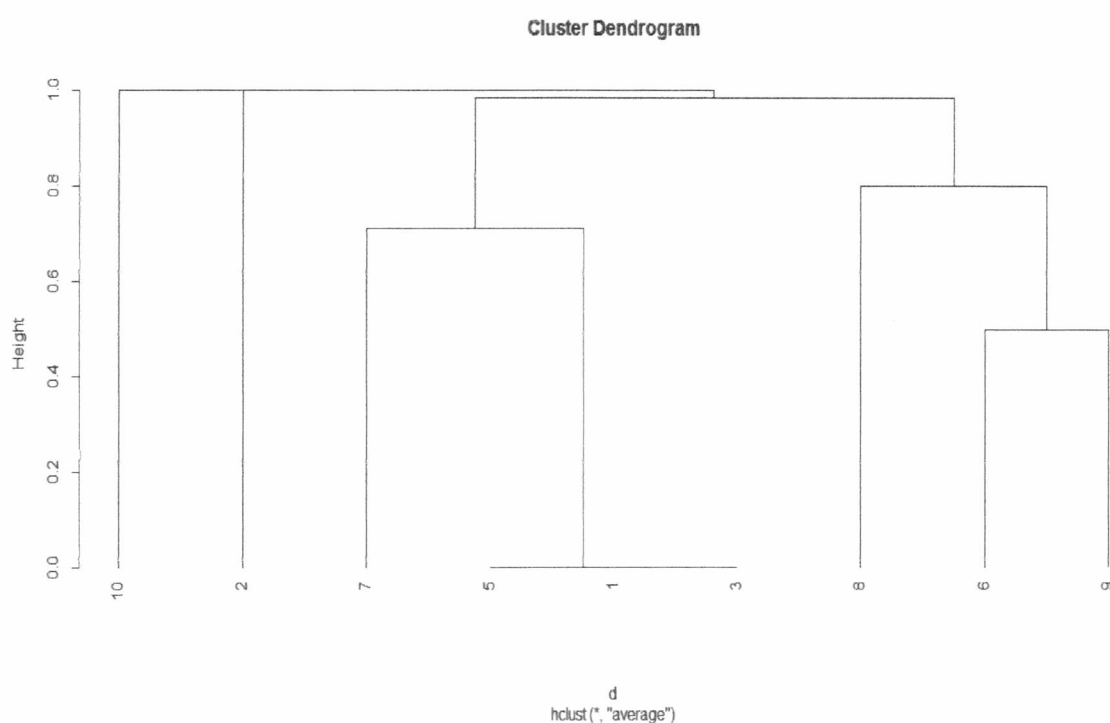
Πίνακας 3.8 Κωδικοποίηση των αποτελεσμάτων από τα τζελ για τους SSR δείκτες που σχετίζονται με το Ti locus.

	228	228a	228b	228c	228d	409	409a	409b	409c	409d	429	429a	429b	429c	429d
Fortuna	99	99	99	99	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Zora	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	99	99	99	99	99
PR92B63	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Sphera	99	99	99	99	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Shama	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Atlantic	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Kondor	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
PR92M22	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Mercury	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

Πίνακας 3.9 Κωδικοποίηση των αποτελεσμάτων από τα τζελ για τους SSR δείκτες που σχετίζονται με γονίδια της πρωτεΐνης.

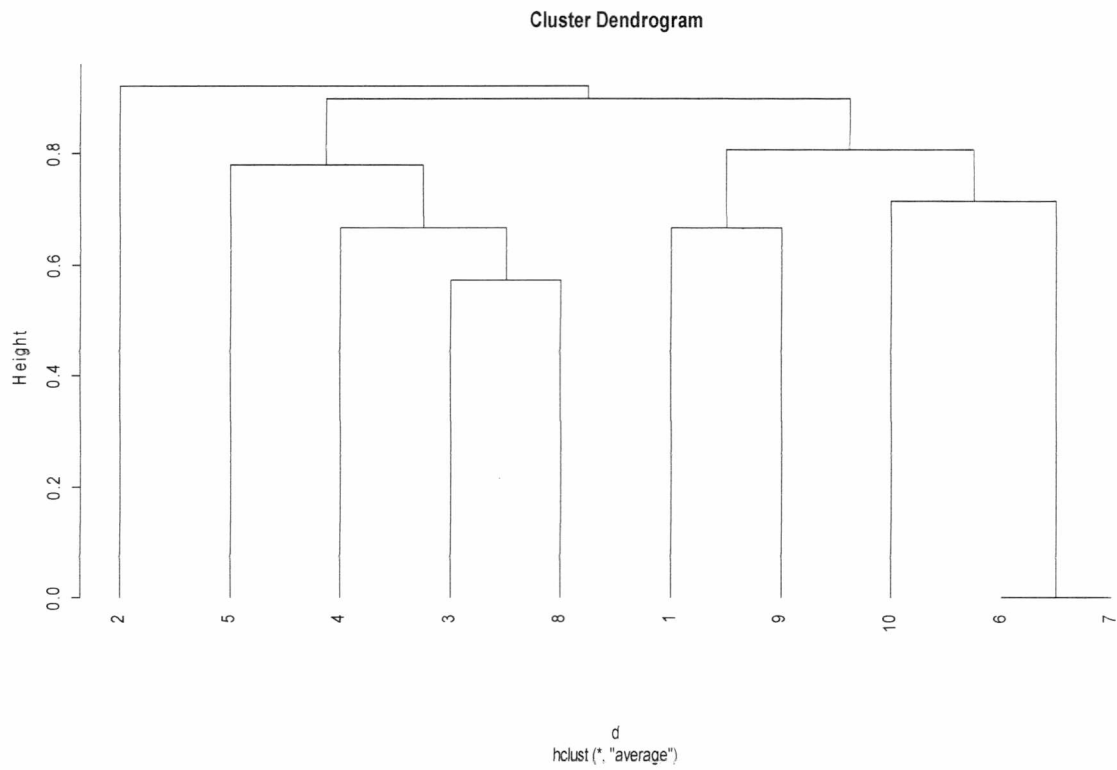
	239	239a	239b	239c	239d	496	496a	496b	496c	496d	496e	496f	496g	700	700a	700b	700c
Fortuna	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Zora	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	99	99	99	99
PR92B63	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
PR91M10	0	0	1	0	0	99	99	99	99	99	99	99	99	0	0	1	0
Sphera	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
Shama	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
Atlantic	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
Kondor	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
PR92M22	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Mercury	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0

Η γενετική απόσταση μεταξύ των ποικιλιών υπολογίστηκε ως ο λόγος του αριθμού των αλληλομόρφων (ζωνών) που είναι παρόντες μόνο σε μία εκ των ποικιλιών προς τον αριθμό των αλληλομόρφων που είναι παρόντες τουλάχιστον σε μία. Στους πίνακες 3.8 και 3.9 φαίνεται η μήτρα των δεδομένων που καταχωρήθηκαν στο πρόγραμμα για την δημιουργία των δενδρογραμμάτων. Επιπλέον για την ανάλυση και την εξαγωγή των δενδρογραμμάτων δεν συμπεριλήφθηκε η ποικιλία PR91M10, καθώς δεν παρουσίασε μπάντα σε κανέναν από τους δείκτες που συνδέονται με το Ti locus (Πίνακας 3.8) .



Εικόνα 3.14 Δενδρόγραμμα γενετικών αποστάσεων με βάση μοριακούς δείκτες SSR που συνδέονται με το Ti locus.

Από το δενδρόγραμμα της εικόνας 3.14 προκύπτει ότι όλες οι ποικιλίες είναι γενετικά κοντά εκτός από την ποικιλία Mercury (10), η οποία διαφέρει κατά πολύ από τις υπόλοιπες. Ενώ από το δενδρόγραμμα της εικόνας 3.15 προκύπτει ότι όλες οι ποικιλίες είναι γενετικά πολύ κοντά και οι ποικιλίες Shama (6) και Atlantic (7) ταυτίζονται.



Εικόνα 3.15 Δενδρόγραμμα γενετικών αποστάσεων με βάση μοριακούς δείκτες SSR που συνδέονται με την πρωτεΐνη.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα εργασία προέκυψε ότι η ποικιλία Fortuna είχε άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, είναι ψηλή ποικιλία και η απόσταση του πρώτου λοβού στα φυτά της από το έδαφος είναι μεγάλη. Η ποικιλία Zora, είχε άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, είναι μέτριου ύψους και ο πρώτος λοβός εμφανίζεται σε αρκετή απόσταση από το έδαφος. Η ποικιλία PR92B63 είχε άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, είναι ψηλή ποικιλία και η απόσταση του πρώτου λοβού από το έδαφος είναι μέτρια. Η ποικιλία PR91M10 δεν είχε σταθερή φυτρωτικότητα και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες. Έχει μέτριο ύψος και η απόσταση του πρώτου λοβού από το έδαφος είναι μικρή, το οποίο οδηγεί σε απώλειες κατά την συγκομιδή καθώς οι λοβοί που είναι πολύ κοντά στο έδαφος δεν συγκομίζονται. Η ποικιλία Sphera είχε σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, όμως το 25% των σπόρων της δεν φύτευαν. Είναι πολύ ψηλή ποικιλία, η ψηλότερη σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες του πειράματος και λόγω αυτού τα φυτά της πλαγιάζουν. Επίσης εμφανίζει τον πρώτο λοβό σε μεγάλη απόσταση από το έδαφος. Η ποικιλία Shama είχε άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, είναι μέτριου ύψους και η απόσταση του πρώτου λοβού στα φυτά της από το έδαφος είναι μικρή. Η ποικιλία Atlantic δεν είχε σταθερή φυτρωτικότητα και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες. Ακόμη, ο πρώτος λοβός στα φυτά της εμφανίζεται σε αρκετή απόσταση από το έδαφος. Η Kondor παρουσίασε προβλήματα τόσο στο ποσοστό όσο και στην σταθερότητα της φυτρωτικότητας. Είναι ψηλή ποικιλία και εμφανίζει τον πρώτο λοβό σε μικρή απόσταση από το έδαφος. Η ποικιλία PR92M22 είχε άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα σε όλες τις επαναλήψεις, είναι μέτριου ύψους και ο πρώτος λοβός εμφανίζεται σε αρκετή απόσταση από το έδαφος. Τέλος, η Mercury δεν είχε σταθερή φυτρωτικότητα και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, είναι ψηλή ποικιλία και εμφανίζει τον πρώτο λοβό σε μικρή απόσταση από το έδαφος, το οποίο οδηγεί σε απώλειες κατά την συγκομιδή.

Τους περισσότερους λοβούς ανά φυτό εμφάνισαν οι ποικιλίες Atlantic (75,4), Zora (71,5), Kondor (64,8) και Mercury (55,8). Στις υπόλοιπες ο μέσος όρος των λοβών ανά φυτό είναι 37,6 – 48,1 ενώ η ποικιλία Shama είχε τους λιγότερους.

Τις υψηλότερες αποδόσεις σε σπόρο είχαν οι ποικιλίες Sphera και PR92M22 και τις χαμηλότερες οι ποικιλίες Atlantic και Shama. Παρόλα αυτά το εύρος των αποδόσεων ήταν 213,1 – 393,6 kg/στρ, από το οποίο συμπεραίνουμε ότι και οι δέκα ποικιλίες είχαν σχετικά καλή απόδοση στην επίσπορη καλλιέργεια, εφόσον η παγκόσμια μέση απόδοση της σόγιας ως κύρια καλλιέργεια είναι 217 kg/στρ. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μ.ο. των αποδόσεων παρουσιάζονται μεταξύ των ποικιλιών Atlantic – Sphera (sig=0,014) και Atlantic - PR92M22 (sig=0,016). Η ποικιλία Atlantic παρόλο που είχε τους περισσότερους λοβούς ανά φυτό είχε την χαμηλότερη απόδοση σε σπόρο. Αυτό οφείλεται στο ότι η φυτρωτικότητα της δεν ήταν σταθερή για όλες τις επαναλήψεις. Η ποικιλία PR92M22 παρόλο που είχε τους λιγότερους λοβούς/φυτό, μετά από τις Shama και Fortuna, είχε την δεύτερη υψηλότερη απόδοση σε σπόρο. Το οποίο οφείλεται κυρίως στην άριστη και σταθερή φυτρωτικότητα της σε όλες τις επαναλήψεις.

Επίσης, από τις διασταυρώσεις που έγιναν για να ελεγχθεί το συνολικό ποσοστό επιτυχίας και η συνδυαστικότητα μεταξύ των ποικιλιών πέτυχαν οι εξής συνδυασμοί: Kondor x PR92B63 (2), Fortuna x Zora, Shama x PR92B63, Shama x Atlantic (2) και PR91M10 x Shama. Το ποσοστό των επιτυχημένων διασταυρώσεων ήταν 3,8%.

Όσον αφορά τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των ποικιλιών προκύπτει, με βάση το δενδρόγραμμα των γενετικών αποστάσεων για τους SSR δείκτες που συνδέονται με το T1 locus, ότι όλες οι ποικιλίες είναι γενετικά κοντά εκτός από την ποικιλία Mercury. Ενώ από το δενδρόγραμμα των γενετικών αποστάσεων για τους SSR δείκτες που συνδέονται με γονίδια πρωτεΐνης, προκύπτει ότι όλες οι ποικιλίες είναι γενετικά πολύ κοντά και οι ποικιλίες Shama και Atlantic ταυτίζονται.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική:

1. Παπακώστα-Τασοπούλου Δ., 2005. Ψυχανθή: Καρποδοτικά – Χορτοδοτικά. Ειδική Γεωργία Ι (Τεύχος Β'). Εκδ. Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη, pp 211-238.
2. Τόλης Δ.Ι. και Πάνος Ν.Ε., 1989. Ιστορικό και Σημερινή Παγκόσμια Κατάσταση. Από Τόλης Ι. Η Σόγια. pp 1-8.

Ξενόγλωσση:

1. Acquaah G., 2007. Principles of Plant Genetics and Breeding. Blackwell Publishing, pp 519-528.
2. Bernard R.L. and Weiss M.G., 1973. Qualitative Genetics. Soybeans, Production and Uses. In: B.E. Caldwell (Ed.), Agronomy Series, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp 117-154.
3. Beversdorf D.W., 1993. Traditional Crop Breeding Practices: An Historical Review to Serve as a Baseline for assessing the role of modern biotechnology. OECD, Paris, pp 16-25.
4. Board J.E. and Tan Q., 1995. Assimilatory capacity effects on soybean yield components and pod formation. Crop Science 35: 846–851.
5. Brachfeld A. and Choate M., 2007. Eat your food! Gastronomical Glory from Garden to Gut. Coastalfields, Colorado, USA. pp 275.
6. Carlson J.B. and Lersten N.R., 1987. Reproductive Morphology. In: Wilcox J.R. (Ed.) Soybeans: Improvement, Production, and Uses. Agronomy 16:95-134.
7. Cartier J.L. and Hartwig E.E., 1963. The management of Soybeans. In: A.G. Norman (Ed.) The Soybean: Genetic, Breeding, Physiology, Nutrition Management, pp. 161-226.

8. Caviness C.E., 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Science* 6:211.
9. Egli D.B. and Crafts-Brandner S.J., 1996. Soybean. In: Zamski E. and Schaffer A.A. (Eds.) *Photoassimilate distribution in plant and crops: Source-sink relationship*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 595-623.
10. Egli D.B. and Leggett J.E., 1973. Dry matter accumulation patterns in determinate and indeterminate soybeans. *Crop Science* 13:220-222.
11. Fehr W.R. and Caviness C.E., 1977. Stages of soybean development. Iowa State Univ. Agric. Exp. Stn. Spec. Rep. pp. 80.
12. Fehr W.R., Caviness C.E., Burmood D.T. and Pennington J.S., 1971. Stage development description for soybean *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science* 11:929-931.
13. Gordon W.B., 2008. Maximizing Irrigated Soybean Yields in the Great Plains. *Better Crops*, 92(2):6-7.
14. Hicks D.R., 1978. Growth and development. In: Norman A.G. (Ed.) *Soybean Physiology, Agronomy and Utilization*. New York Academic Press, pp. 17-44.
15. Hou A., Chen P., Alloatti J., Mozzoni L., Zhang B. and Shi A., 2009. Genetic variability of seed sugar content in worldwide soybean germplasm collections. *Crop Science* 49:903-912.
16. Hymowitz T. and Newell A.C., 1981. Taxonomy of the genus *Glycine* domestication and uses of soybeans. *Economic Botany* 35(3):272-288.
17. Hymowitz T. and Newell C.A., 1980. Taxonomy, speciation, domestication, dissemination, germplasm resources, and variation in the genus *Glycine*. In: Summerfield R.J. and Bunting A.H. (Ed.) *Advances in legume science*. Royal Botanic Garden, England, pp. 251-264.
18. Iowa State University, 2013. Historical Soybean Yields by County. *Ag Decision Maker*. File A1-13, pp. 1-8.

19. Kim M.S., Park M.J., Jeong W.H., Nam K.C. and Chung J.I., 2006. SSR marker tightly linked to the *Ti* locus in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Euphytica* 152: 361-366.
20. Liener I.E., 1981. Factors affecting the nutritional quality of soya products. *J Am Oil Chem Soc* 58:406–415.
21. Magness J.R., Markle G.M. and Compton C.C., 1971. Food and feed crops of the United States. Interregional Research Project IR-4. IR Bul 1, (Bul.828 New Jersey Agricultural Experiment Station).
22. Masuda T. and Goldsmith P.D., 2009. World Soybean Production: Area Harvested, Yield, and Long-Term Projections. *International Food and Agribusiness Management Review* 12(4):143-162.
23. Mayaki W.C., Teare I.D. and Stone L.R., 1976. Top and Root Growth of Irrigated and Nonirrigated Soybeans. *Crop Science* 16(1):92-94.
24. Orf J.H., 1989. “Breeding soybeans lacking antinutritional factors”. In: Pascale A.J. (Ed.). *World Soybean Research Conference IV*, Buenos Aires, pp. 1091-1100.
25. Rennie B.D. and Tanner J.W., 1989. Mapping a Second Fatty Acid Locus to Soybean Linkage Group 17. *Crop Science* 29(4): 1081-1083.
26. Schmutz J., Cannon S.B., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W., Hyten D.L., Song Q., Thelen J.J., Cheng J., Xu D., Hellsten U., May G.D., Yu Y., Sakurai T., Umezawa T., Bhattacharyya M.K., Sandhu D., Valliyodan B., Lindquist E., Peto M., Grant D., Shu S., Goodstein D., Barry K., Futrell-Griggs M., Abernathy B., Du J., Tian Z., Zhu L., Gill N., Joshi T., Libault M., Sethuraman A., Zhang X., Shinozaki K., Nguyen H.T., Wing R.A., Cregan P., Specht J., Grimwood J., Rokhsar D., Stacey G., Shoemaker R.C. and Jackson S.A., 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463:178-183.
27. Tantasawat P., Trongchuen J., Prajongjai T., Jenweerawat S. and Chaowiset W., 2011. SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic

relationship and variety identification in Thailand. Australian Journal of Crop Science 5(3):283-290.

28. Whigham D.K., 1983. Soybean. In: International Rice Research Institute (Ed.) Potential productivity of field crops under different environments. IRR, Los Banos, Philippines. pp. 205-225.

29. Wilson J.C., 1989. "The commercial utilization of soybeans, soymilk and soymilk derivatives". In: Pascale A.J. (Ed.) World Soybean Research Conference IV, Buenos Aires, pp. 1750-1761.

Ηλεκτρονική:

1. http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=26716
2. <http://eol.org/pages/641527/overview>
3. <http://olympus.gr/media/158205/ekthesi.pdf>



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000134381