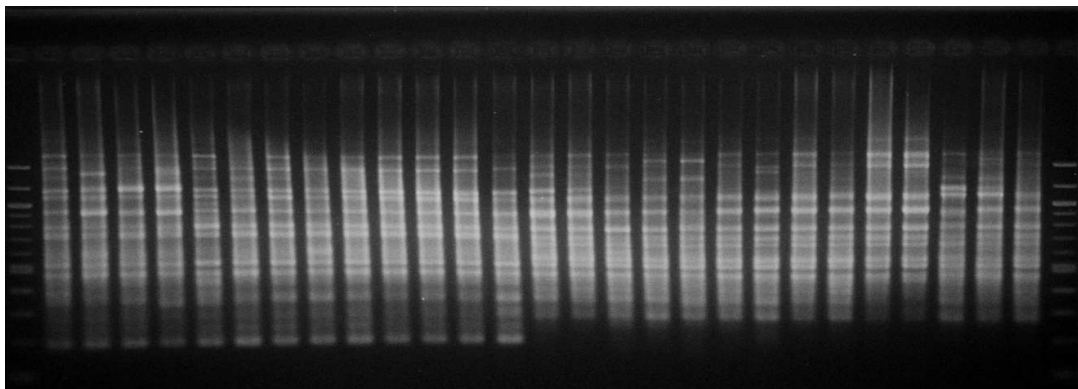




**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ**

**Μελέτη της ενδοποικιλιακής γενετικής
παραλλακτικότητας των Ελληνικών ποικιλιών ελιάς
'Καλαμών' και 'Κορωνέικη' με τη χρήση μοριακών
δεικτών**



**ΔΕΣΠΟΤΑΚΗ ΕΥΘΥΜΙΑ
ΑΘΗΝΑ 2010**

«Μελέτη της ενδοποικιλιακής γενετικής παραλλακτικότητας των Ελληνικών ποικιλιών ελιάς 'Καλαμών' και 'Κορωνέικη' με τη χρήση μοριακών δεικτών»

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Χατζηδημητρίου Μαριάννα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Βέμμος Σταύρος** Αναπληρωτής Καθηγητής

*Εργαστήριο Δενδροκομίας
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής*

- 2. Κατσιώτης Ανδρέας** Επίκουρος Καθηγητής

*Εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής*

- 3. Χατζηδημητρίου Μαριάννα** Επίκουρη Καθηγήτρια

*Εργαστήριο Δενδροκομίας
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής*

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης δε θα ήταν εφικτή χωρίς τη βοήθεια ορισμένων ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Μαριάννα Χατζηδημητρίου, που μου ανέθεσε την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη αλλά και για την καθοδήγησή της σε όλα τα στάδια του πειραματικού και του θεωρητικού τμήματος της μελέτης αυτής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την άριστη συνεργασία μας η οποία ξεκίνησε από την ανάθεση της πτυχιακής μου μελέτης πριν από πέντε περίπου χρόνια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Σταύρο Βέμμο, Αναπληρωτή καθηγητή και Διευθυντή του εργαστηρίου Δενδροκομίας και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ανδρέα Κατσιώτη για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους επάνω στην εργασία μου.

Επιπλέον, ευχαριστώ το Δρ Αθανάσιο Λίνο για τις συμβουλές και τις υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακή μου μελέτης, τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Γιώργο Μητσόπουλο και τους συναδέλφους Μαρία Πισσιούνη και Ιωάννη Αθανασιάδη για τη βοήθειά τους και την άριστη συνεργασία μας μέσα στο χώρο του εργαστηρίου καθώς και το συνάδελφο Μηνά Αρναούτη για την έμπρακτη βοήθειά του κατά το στάδιο της συγγραφής.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την υπομονή τους και την υποστήριξη που μου παρείχαν σε όλα μου τα βήματα καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Στο παρόν πείραμα μελετήθηκε η ενδοποικιλιακή γενετική παραλλακτικότητα δύο κύριων Ελληνικών ποικιλιών ελιάς, της ελαιοποιήσιμης ποικιλίας 'Κορωνέικη' και της επιτραπέζιας ποικιλίας 'Καλαμών', με τη χρήση δύο μοριακών δεικτών, RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) και ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Νεαρά, υγιή φύλλα των δύο ποικιλιών συλλέχθηκαν από επτά περιοχές της Ελλάδας και από την Κύπρο. Η απομόνωση του DNA έγινε σύμφωνα με την μέθοδο CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Στα πλαίσια της μοριακής ανάλυσης δοκιμάστηκαν συνολικά τριάντα δεκαμερείς RAPD εκκινητές και δέκα ISSR εκκινητές από τους οποίους επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τελικά δέκα RAPD και έξι ISSR εκκινητές. Ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR έγινε σε πηκτή αγαρόζης 2,5% w/v και ακολούθησε χρώση της πηκτής αγαρόζης σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό NTSYS pc 2.02i. Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη χρήση του συντελεστή Jaccard και δημιουργήθηκαν δενδρογράμματα με τις μεθόδους UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) και N.J. (Neigbor-Joining) ενώ ελέγχθηκε και η αξιοπιστία των δενδρογραμμάτων με το συντελεστή του Mantel. Οι δύο μέθοδοι, RAPD και ISSR, έδωσαν ικανοποιητικό αριθμό πολυμορφικών ζωνών για να καταστεί δυνατός ο γονοτυπικός διαχωρισμός των δειγμάτων. Διαχώρισαν πλήρως τις ποικιλίες μεταξύ τους καθώς και τα δείγματα εντός των ποικιλιών. Οι RAPD εκκινητές έδωσαν 188 ενισχυμένες ζώνες από τις οποίες οι 81 (43%) ήταν πολυμορφικές. Οι ISSR εκκινητές έδωσαν 104 ενισχυμένες ζώνες εκ των οποίων οι 72 (69%) ήταν πολυμορφικές. Ο συντελεστής ομοιότητας του Jaccard για τους RAPD εκκινητές κυμάνθηκε στην 'Κορωνέικη' από 0,89 έως 1,00 και στην 'Καλαμών' από 0,81 έως 0,99. Για τους ISSR εκκινητές κυμάνθηκε στην 'Κορωνέικη' από 0,71 έως 1,00 και στην 'Καλαμών' από 0,73 έως 1,00. Η ομαδοποίηση των δειγμάτων έγινε σε δύο ομάδες, ανάλογα, με την ποικιλία, 'Καλαμών' και 'Κορωνέικη', ενώ εντός της κάθε ποικιλίας τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την περιοχή συλλογής. Γενετικό υλικό που συλλέχθηκε από το Γ.Π.Α και τη Φθιώτιδα

βρέθηκε πολύ κοντά γενετικά ενώ στην ποικιλία 'Κορωνέικη' παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα της Κρήτης και της Καλαμάτας ήταν γενετικά κοντά.

Abstract

The olive tree (*Olea europaea L.*) is cultivated in the Mediterranean Basin since 4000 B.C. Its socioeconomic impact is very important for the countries in the area. Greece occupies the third place in the world rank of olive oil producers and the second place in the European Union as a table olive producer. 'Koroneiki' is an olive oil variety while 'Kalamon' is a table olive variety. Both of them are the most well known worldwide Greek olive varieties. In this study, healthy, young leaves of both varieties were collected from seven different regions in Greece and Cyprus in order to study the intra-varietal variability. DNA extraction was performed according to Doyle & Doyle protocol. Markers originating from two different molecular techniques, Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), were used for investigating the germplasm variability. In order to establish the genetic relationships among the clones of 'Kalamon' and 'Koroneiki', thirty RAPD primers were tested and ten were used while for ISSR ten primers were tested and six of them were used. PCR products were separated in 2,5% w/v agarose gel and digitally photographed under UV light. Genetic similarities for the RAPD and ISSR data were calculated using the *Jaccard* similarity coefficient. Phylogenetic trees were created using the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) and N.J. (Neighbour Joining) methods. The correlation among all genetic similarity matrices was checked using the *Mantel* test. The analysis was performed using the NTSYS pc 2.02i. Based on the results from both methods, but primarily from ISSR, intra-varietal variability was present in both varieties.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Καταγωγή Και Εξάπλωση Της Ελιάς.....	8
1.2. Σημασία Της Ελαιοκαλλιέργειας.....	10
1.3. Βοτανική Ταξινόμηση Και Περιγραφή Ποικιλιών Ελιάς Που Μελετήθηκαν Στην Παρούσα Εργασία.....	17
1.3.1. Βοτανική Ταξινόμηση Της Ελιάς.....	17
1.3.2. Περιγραφή Ποικιλιών Ελιάς Που Μελετήθηκαν Στην Παρούσα Εργασία... ..	17
1.3.2.1. ‘Κορωνέικη’ (<i>Olea europaea</i> var <i>microcarpa alba</i> ή <i>mastoides</i>).....	18
1.3.2.2. ‘Καλαμών’ (<i>Olea europaea</i> var <i>ceraticarpa</i>).....	19
1.4. Μέθοδοι Ταυτοποίησης Ποικιλιών.....	21
1.4.1. Μορφολογικοί Δείκτες.....	21
1.4.2. Καρυστυπικοί Δείκτες.....	21
1.4.3. Βιοχημικοί Δείκτες.....	21
1.4.4. Μοριακοί Δείκτες.....	22
1.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	24
1.6. Μοριακοί Δείκτες Που Χρησιμοποιήθηκαν Στο Παρόν Πείραμα.....	29
1.6.1. RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA):.....	29
1.6.2. ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats):.....	30
1.6.3. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα των μεθόδων RAPDs και ISSRs.....	31
1.7. Μελέτη Της Γενετικής Παραλλακτικότητας Στην Ελιά.....	33
1.8. Σκοπός Του Πειράματος.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	42
2.1. Φυτικό Υλικό.....	42
2.2. Εκκινητές.....	44
2.3. Συσκευές.....	45
2.4. Απομόνωση DNA.....	47
2.5. Καθαρισμός DNA.....	48
2.6. Ποσοτικός Προσδιορισμός Του DNA.....	49
2.7. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	49
2.8. Παρασκευή Πηκτής Αγαρόζης.....	50
2.9. Ηλεκτροφόρηση.....	51
2.10. Αριθμητική Ανάλυση Των Δεδομένων.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
3.1. Ενισχυμένες Ζώνες DNA.....	54
3.2. Ανάλυση Δεδομένων Με Το Συντελεστή Ομοιότητας Του <i>Jaccard</i>	60
3.3. Κατασκευή Δενδρογραμμάτων.....	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	81
4.1. Συζήτηση.....	81
4.2. Συμπεράσματα.....	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	91
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	106
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	113

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Καταγωγή Και Εξάπλωση Της Ελιάς

Η μακραίωνη ιστορία της ελιάς χάνεται στα βάθη του χρόνου. Το ελαιόδενδρο αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο της εξέλιξης των πολιτισμών της Μεσογείου και είναι βασικό στοιχείο της διατροφής, της καθημερινότητας και της οικονομίας, ακόμα και της θρησκείας, των λαών της περιοχής, σε σημείο που να θεωρείται ιερό. Στην ελληνική μυθολογία αναφέρεται ότι η θεά Αθηνά δώρισε την ελιά στον πρώτο βασιλιά της Αθήνας, τον Κέκροπα. Σύμφωνα λοιπόν με τους θρύλους και τις παραδόσεις των μεσογειακών λαών, η ελιά έλκει την καταγωγή της από τη λεκάνη της Μεσογείου και τα αρχαιολογικά ευρήματα έρχονται να στηρίξουν την άποψη αυτή.

Πολλοί βοτανικοί θεωρούν ως πιθανότερο τόπο προέλευσης της ελιάς τις μεσογειακές περιοχές, αν και διαφωνούν ως προς το ποιες είναι οι χώρες αυτές. Ο A. De Candolle (1880) υποστηρίζει ότι πατρίδα της ελιάς είναι μάλλον η περιοχή της Συρίας και της Μ. Ασίας διότι, σύμφωνα με παρατηρήσεις, οι πλαγιές των βουνών στη Β. Συρία, κοντά στα σύνορα με την Τουρκία, είναι σκεπασμένες με άγριες ελιές. Επιπλέον, η περιοχή της Συρίας/Παλαιστίνης/Ισραήλ θεωρείται τόπος καταγωγής της ελιάς καθώς εκεί παρατηρείται η μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα (Damania, 1995). Σύμφωνα με τον Camps (1974), ο οποίος βασίζεται σε αναλύσεις που έγιναν σε άνθρακα και γύρη προερχόμενη από Ιβηρο-Μαυριτανικές περιοχές, στη Β. Αφρική υπήρχαν αγριελιές από τη 12^η χιλιετηρίδα. Τέλος, ο Fischer (1904), αντίθετα από τις παραπάνω απόψεις, ισχυρίζεται ότι η ελιά ήλθε στην ανατολική Μεσόγειο, δια μέσου του Ιράν, από τη Β.Δ. Ινδία όπου το γένος *Olea* εκπροσωπείται από έναν αριθμό διαφορετικών ειδών. Πάντως, όπως επισημαίνουν και οι Rubio *et al.* (2002), η παρουσία

άγριων ελαιόδενδρων θεωρείται ο καλύτερος βιοδείκτης προσδιορισμού των περιοχών που καλύπτονται από τη Μεσογειακή χλωρίδα.

Όσον αφορά τον Ελλαδικό χώρο, οι αρχαιότερες ενδείξεις ύπαρξης της ελιάς προέρχονται από απολιθώματα φύλλων στις νήσους Θήρα (Σαντορίνη) και Νίσυρο. Σύμφωνα με τους Friedrich & Velitzelos (1986), τα απολιθώματα φύλλων χρονολογούνται στα 60.000 χρόνια πριν από σήμερα. Ο Π. Αναγνωστόπουλος (1951) υποστήριξε ότι, σύμφωνα με ευρήματα ανασκαφών, πατρίδα της ελιάς είναι η Κρήτη. Η άποψή του ενισχύεται από το γεγονός ότι το όνομα της ελιάς είναι ελληνικό. Κατά τον A.B. Damania (1995), η περιοχή του Αιγαίου θεωρείται δευτερογενής περιοχή καταγωγής της ελιάς.

Είναι σίγουρο ότι η ελιά συλλεγόταν και χρησιμοποιείτο προτού καλλιεργηθεί. Σύμφωνα με αρχαιολογικά ευρήματα, η παλαιότερη αναφορά καλλιέργειας της ελιάς στον πλανήτη είναι στην περιοχή Συρίας – Ισραήλ – Παλαιστίνης το 5800 π.Χ. (Zohary & Hopf, 1994; Remesal-Rodriguez, 1996). Το ίδιο κέντρο καταγωγής της καλλιέργειας της ελιάς εισηγούνται και οι Belaj *et al.* (2003a) ενώ σύμφωνα με τους Besnard and Bervillé (2000) πιθανότατα ξεκίνησε ταυτόχρονα στα ανατολικά και δυτικά της Μεσογειακής λεκάνης. Κατά τους Loucas & Krimbas (1983), τα παλαιότερα ευρήματα ανασκαφών που αφορούν την καλλιέργεια της ελιάς έχουν βρεθεί στην Κύπρο, την Παλαιστίνη, το Λίβανο και τη Συρία και χρονολογούνται πριν από 6.500 χρόνια περίπου.

Σύμφωνα με τις ανασκαφές, η ελιά καλλιεργείται και στην Ελλάδα από πολύ παλιά. Ο De Candolle (1880) πιστεύει ότι οι Έλληνες ανέπτυξαν την καλλιέργεια της ελιάς ανεξάρτητα από τους Σημίτες. Σύμφωνα με τον Κριμπά, η ελιά καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά στην Κρήτη μεταξύ 1500 και 2000 π.Χ. ενώ η αρχαιότερη ένδειξη σύνθλιψης της ελιάς για παραγωγή ελαιολάδου τοποθετείται στη Μέσο-Μινωική εποχή (Προ-Ανακτορική Εποχή), στην αρχαιολογική θέση Χαμαλεύρι (2160-2000 π.Χ.) (Σαρπάκη, 1999).

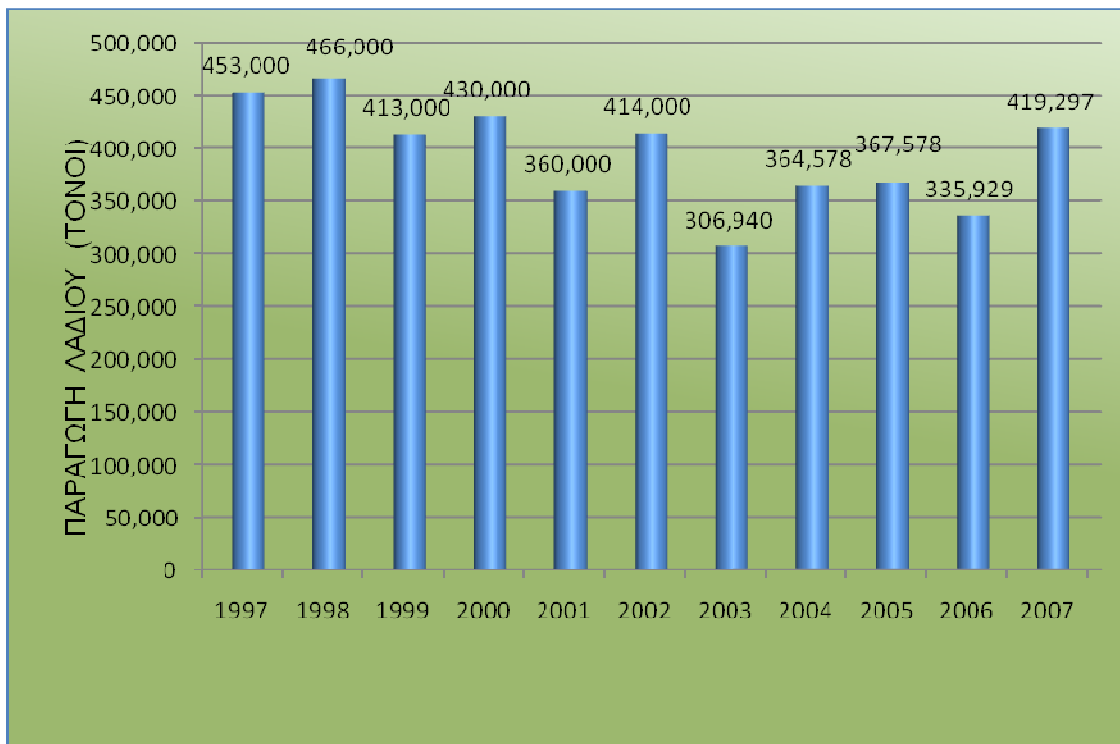
Παρ' όλο που στην αμερικανική ήπειρο υπάρχουν περιοχές με κλίμα παρόμοιο με το μεσογειακό, η ελιά δεν ήταν αυτοφυής στο Νέο Κόσμο. Μεταφέρθηκε όμως εκεί το 16^ο αιώνα από τους Ισπανούς αποίκους. Σήμερα η καλλιέργεια της ελιάς έχει επεκταθεί εκτός της Μεσογείου σε χώρες όπως οι

Η.Π.Α., οι χώρες της Νοτίου Αμερικής, η Ν. Αφρική, η Αυστραλία, η Κίνα και η Ιαπωνία.

1.2. Σημασία Της Ελαιοκαλλιέργειας

Το ελαιόδενδρο είναι ένα υποτροπικό είδος, τυπικό της λεκάνης της Μεσογείου όπου αποτελεί το πιο σημαντικό ελαιοπαραγωγικό φυτό. Γι' αυτό, η αξία της καλλιέργειάς του είναι ιδιαίτερα σημαντική. Σε όλη την υφήλιο υπάρχουν περίπου 800 εκατομμύρια ελαιόδενδρα. Από αυτά το 98% περίπου καλλιεργούνται στη λεκάνη της Μεσογείου λόγω των άριστων εδαφοκλιματικών συνθηκών που υπάρχουν εκεί για την ανάπτυξη της ελιάς (Ποντίκης, 2000). Έτσι, η παραγωγή ελαιολάδου επικεντρώνεται στη Μεσόγειο και κυρίως στις χώρες: Ισπανία, Ιταλία, Ελλάδα, Τυνησία, Συρία, Μαρόκο, Τουρκία και Πορτογαλία. Αυτές οι οκτώ χώρες καλύπτουν πάνω από το 90% της παγκόσμιας παραγωγής (ΙΟΟC, 2007/2008).

Το οικονομικό έτος 2007/08 η παγκόσμια παραγωγή ελαιολάδου έφτασε τους 2.713.000 t ενώ η παραγωγή επιτραπέζιων ελιών ανήλθε σε 2.151.500 t (ΙΟΟC). Η Ελλάδα είναι η τρίτη σημαντικότερη παραγωγός χώρα ελαιολάδου παγκοσμίως μετά την Ισπανία και την Ιταλία και η δεύτερη μεγαλύτερη παραγωγός χώρα επιτραπέζιων ελιών στην Ευρωπαϊκή Ένωση (95.000 t κατά το ελαιοκομικό έτος 2006/07) (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων). Συγκεκριμένα, το 2007/2008 παράχθηκε το 15,5% του συνόλου της ευρωπαϊκής παραγωγής ελαιολάδου (ΙΟΟC). Η διακύμανση της ελληνικής παραγωγής κατά τα έτη 1997-2007 φαίνεται στο *Γράφημα 1.1*. Το δένδρο της ελιάς καλλιεργείται σε όλα σχεδόν τα διαμερίσματα της χώρας (*Εικόνα 1.1, Εικόνα 1.2*) ενώ αποτελεί την πιο διαδεδομένη καλλιέργεια καθώς καταλαμβάνει το 21,2% του συνόλου της γεωργικής γης (ΕΣΥΕ, 2006). Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, οι καλλιεργούμενες εκτάσεις ακολουθούν τα τελευταία χρόνια φθίνουσα πορεία. Το ελαιοκομικό έτος 2004/05 στην Ελλάδα καλλιεργήθηκαν 1.015.410 εκτάρια (*Γράφημα 1.2*).



Γράφημα 1.1. Εξέλιξη παραγωγής ελαιολάδου στην Ελλάδα (σε χιλιάδες τόνους)
 Πηγή: http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/ladi.htm



Γράφημα 1.2. Εξέλιξη καλλιεργούμενης έκτασης ελαιοδένδρων στην Ελλάδα (σε εκτάρια)
 Πηγή: Ο.Π.Ε.Κ.Ε.Π.Ε. / (αρχείο Α.Υ.Μ.Ε.Ε.Ε.)



Εικόνα 1.1. Ο χάρτης απεικονίζει περιοχές Δημοτικών Διαμερισμάτων με χρωματισμό ανάλογα με το ποσοστό καλλιέργειας της **ελαιοποιήσιμης** ελιάς.

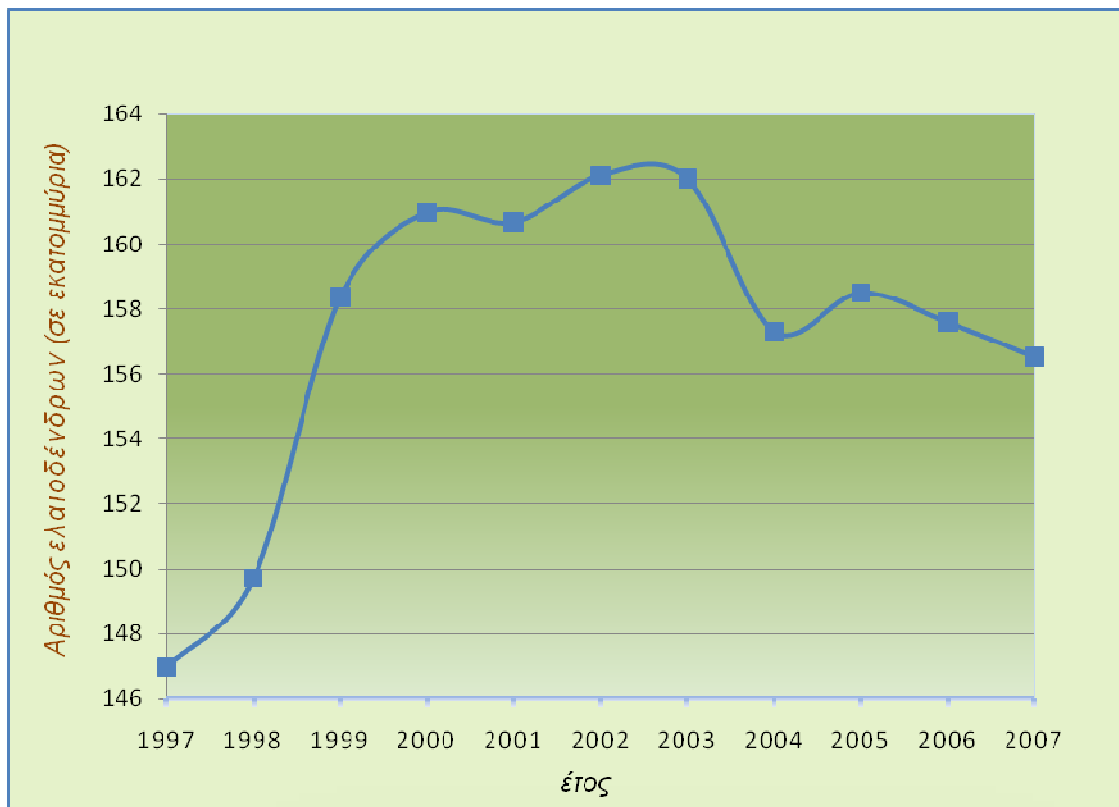
Πηγή: http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/Maps/Elies_oleop.htm



Εικόνα 1.2. Ο χάρτης απεικονίζει περιοχές Δημοτικών Διαμερισμάτων με χρωματισμό ανάλογα με το ποσοστό καλλιέργειας της **επιτραπέζιας** ελιάς.

Πηγή: http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/Maps/Elies_epitr.htm

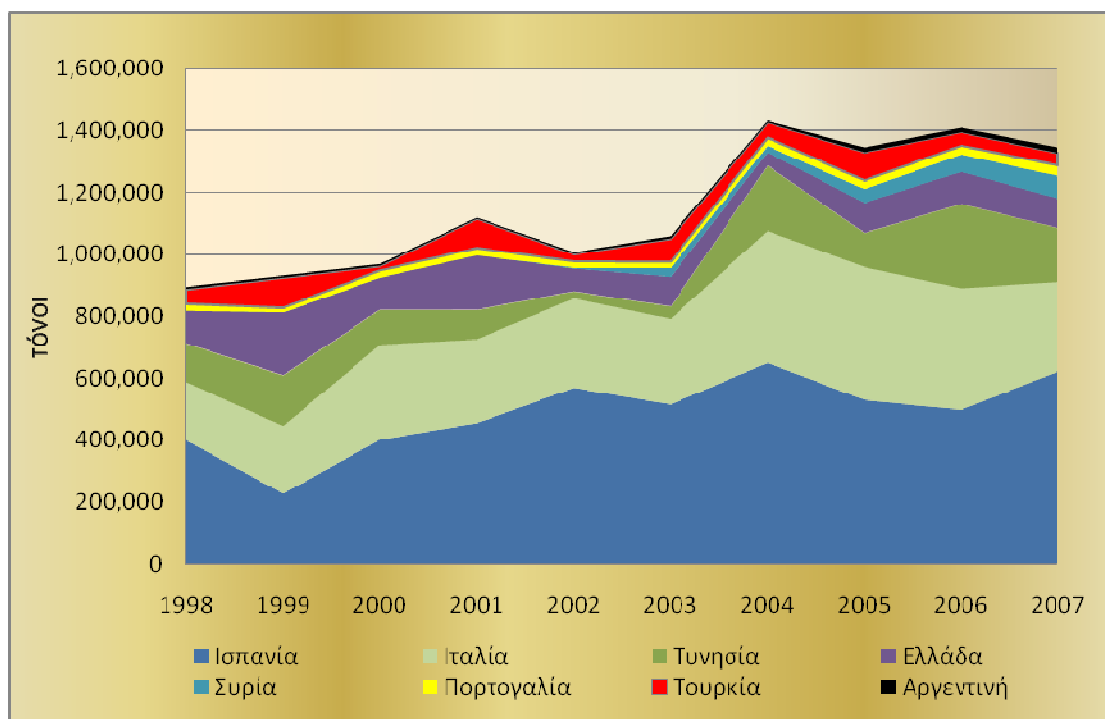
Φθίνουσα πορεία ακολουθεί τα τελευταία χρόνια και ο αριθμός των ελαιοδένδρων (Γράφημα 1.3). Το ελαιοκομικό έτος 2007 στην Ελλάδα καλλιεργήθηκαν 156.527.889 ελαιόδενδρα (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων).



Γράφημα 1.3. Εξέλιξη αριθμού παραγωγικών ελαιοδένδρων στην Ελλάδα ανά έτος (σε εκατομμύρια).

Πηγή: http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/ladi.htm

Το ελαιόλαδο είναι ένα προϊόν μεγάλης οικονομικής σημασίας, καθώς η ακαθάριστη αξία της παραγωγής του αποτελεί το 12,5% της ακαθάριστης φυτικής παραγωγής της χώρας και το 46,5% του ακαθαρίστου γεωργικού εισοδήματος (ΕΣΥΕ, 2006). Η Ελλάδα καταλαμβάνει την τέταρτη θέση σε εξαγωγές ελαιολάδου παγκοσμίως (Γράφημα 1.4). Επιπλέον, το ελαιόδενδρο αξιοποιεί εκτάσεις ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες και προστατεύει το έδαφος από διαβρώσεις.



Γράφημα 1.4. Εξέλιξη εξαγωγών ελαιολάδου σε παγκόσμιο επίπεδο.

Πηγή: <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>

Η ελαιοκαλλιέργεια έχει επιπλέον κοινωνικό ρόλο, καθώς αναπτύσσεται σε περιοχές ορεινές και ημιορεινές όπου δύσκολα μπορούν να επιβιώσουν άλλες καλλιέργειες λόγω των φτωχών εδαφών. Επομένως αποτελεί συχνά το κύριο εισόδημα για τους κατοίκους των περιοχών αυτών ενώ αποτελεί συμπληρωματικό εισόδημα κατά τους χειμερινούς μήνες για τους κατοίκους νησιών και γενικότερα παραθαλάσσιων περιοχών, που το καλοκαίρι στρέφονται στον τουρισμό. Περίπου 450.000 ελληνικές οικογένειες ασχολούνται με την καλλιέργεια του ελαιοδένδρου και την επεξεργασία του ελαιόκαρπου.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν σήμερα οι Έλληνες ελαιοπαραγωγοί είναι η διάθεση των προϊόντων τους εξαιτίας του ανταγωνισμού ομοειδών προϊόντων. Επιπλέον, το δυναμικό παραγωγής είναι περιορισμένο, όσον αφορά την ποσότητα, σε σχέση με άλλες χώρες, όπως π.χ. η Ισπανία, λόγω κυρίως της περιορισμένης γεωργικής έκτασης. Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων η παραγωγή ελαιοκομικών προϊόντων θα πρέπει να στραφεί στην κατεύθυνση προϊόντων υψηλής ποιότητας ενώ η ποσότητα θα πρέπει να

παραμείνει δευτερεύουσας σημασίας. Η βιολογική καλλιέργεια ελιάς αποτελεί την πλέον κατάλληλη μέθοδο παραγωγής προϊόντων ποιότητας και κερδίζει συνεχώς έδαφος στην Ελλάδα (Πίνακας 1.1).

Η υψηλή διατροφική αξία των ελαιοκομικών προϊόντων, οι ευεργετικές ιδιότητές τους στην υγεία καθώς και η ευχάριστη γεύση τους οδηγούν σε έντονα ανοδική τάση την κατανάλωση σε παγκόσμιο επίπεδο. Όλο και περισσότεροι μη Μεσογειακοί καταναλωτές εντάσσουν το ελαιόλαδο στη διατροφή τους, ειδικά στην Αμερική, τον Καναδά, την Ιαπωνία, την Κίνα αλλά και στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Ενδεικτικό της αναγνώρισης της αξίας του ελαιολάδου στην ανθρώπινη διατροφή είναι ότι ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA) δέχτηκε να αναφέρεται στη συσκευασία των προϊόντων που περιέχουν ελαιόλαδο η ευεργετική επίδρασή του στις καρδιαγγειακές παθήσεις. Έτσι, η παγκόσμια αγορά διευρύνεται, καθιστώντας την ελαιοκαλλιέργεια βασική πηγή εσόδων για τις χώρες της Μεσογείου.

Πίνακας 1.1. Εξέλιξη έκτασης βιολογικής καλλιέργειας ελιάς στην Ελλάδα.
 Πηγή: <http://www.minagric.gr/greek/3.6.4.html>

Καλλιεργούμενες εκτάσεις	Μεταβατικό στάδιο (στρ.)	Βιολογικό στάδιο (στρ.)	Σύνολο (στρ.)
Έτος 2007			
Ελιά-σύνολο	330.561,0	188.666,5	519.227,5
Ελιά-επιτραπέζια	92.266,9	44.452,8	136.719,7
Ελιά-ελαιοποιήσιμη	238.294,1	144.213,7	382.507,8
Έτος 2006			
Ελιά-σύνολο	392.700,5	207.289,5	599.990,0
Ελιά-επιτραπέζια	102.576,7	19.859,6	122.436,3
Ελιά-ελαιοποιήσιμη	290.123,8	187.430,0	477.553,8
Έτος 2005			
Ελιά-σύνολο	66.330,0	330.030,0	396.360,0
Έτος 2004			
Ελιά-σύνολο	113.370,0	144.740,0	258.110,0
Έτος 2003			
Ελιά-σύνολο	121.422,2	51.986,3	173.408,5
Έτος 2002			
Ελιά-σύνολο	47.017,3	98.929,3	145.946,6

1.3. Βοτανική Ταξινόμηση Και Περιγραφή Ποικιλιών Ελιάς Που Μελετήθηκαν Στην Παρούσα Εργασία

1.3.1. Βοτανική Ταξινόμηση Της Ελιάς

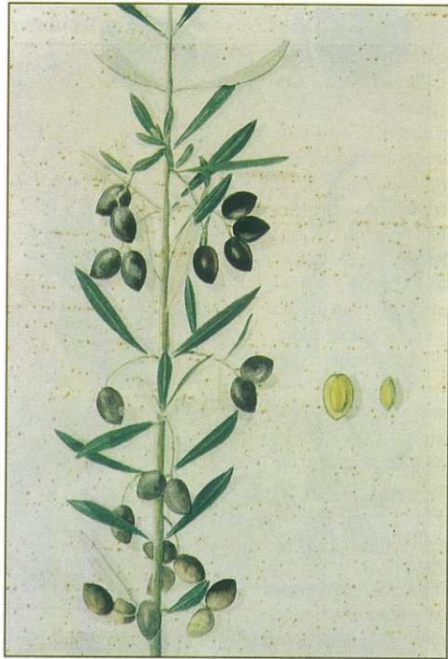
Η ελιά είναι Αγγειόσπερμο Δικότυλο φυτό που κατατάσσεται στην τάξη *Scrophulariales* και ανήκει στην οικογένεια *Oleaceae* (Ελαϊδες), η οποία περιλαμβάνει φυτά μεγάλης οικονομικής σημασίας των θερμών και εύκρατων περιοχών. Τα φυτά αυτά διαχωρίζονται σε 30 γένη με 600 περίπου είδη κοσμοπολίτικης εξαπλώσεως. Η οικογένεια διαθέτει διπλοειδείς ποικιλίες με $2x=46$ χρωμοσώματα. Αντιπροσωπευτικά γένη για την Ελλάδα είναι τα εξής: *Fraxinus*, *Olea*, *Phillyrea*, *Ligustrum*, *Syringa*, *Jasminum* και *Forsythia* (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999).

Στο γένος *Olea* και στην υποοικογένεια *Oleoideae* ανήκουν η αγριελιά (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) και η καλλιεργούμενη ελιά (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) (Green, 2002). Η καλλιεργούμενη ελιά είναι ένα αιθαλές δέντρο που παρενιαυτοφορεί και φέρει ερμαφρόδιτα άνθη που παρουσιάζουν αυτοασυμβίβαστο το οποίο οφείλεται κυρίως σε αρρενοστεριότητα. Το αυτοασυμβίβαστο καθορίζεται από κυτοπλασματική κληρονομικότητα και φαίνεται ότι διατηρείται μέσω της ποικιλιακής επιλογής (Besnard *et al.*, 2000).

1.3.2. Περιγραφή Ποικιλιών Ελιάς Που Μελετήθηκαν Στην Παρούσα Εργασία

Στην Ελλάδα καλλιεργούνται πολλές ποικιλίες ελιάς, που κάθε μία είναι γνωστή με διάφορες ονομασίες. Συγκεκριμένα υπάρχουν περίπου 60 ντόπιες ποικιλίες, ελαιοποίησης, βρώσης ή διπλής χρήσης, αλλά καλλιεργούνται και αρκετές ξένες (Θεριός I.N., 2005). Στο παρόν πείραμα μελετήθηκαν δύο Ελληνικές ποικιλίες ελιάς: οι 'Καλαμών' και 'Κορωνέικη'.

1.3.2.1. 'Κορωνέικη' (*Olea europaea* var *microcarpa alba* ή *mastoides*)

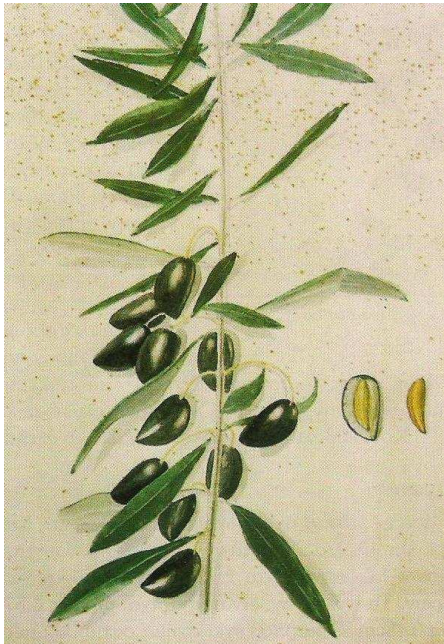


Καρποφόρος κλάδος ελιάς ποικιλίας 'Κορωνέικη' (κατά Εμ. Βάθη)

Η 'Κορωνέικη' είναι γνωστή και ως 'Ψιλολιά', 'Κρητικιά', 'Βάτσικη', 'Κορωνιά', 'Κορώνι', 'Κοράνι', 'Λαδολιά' και 'Λιανολιά'. Τα πολλά ονόματα της ποικιλίας οφείλονται στη μεγάλη εξάπλωσή της στη χώρα και το διαφορετικό μέγεθος που αποκτά ο καρπός ανάλογα με τις καλλιεργητικές περιποιήσεις και τις εδαφικές συνθήκες που επικρατούν ανά περιοχή. Καλλιεργείται κυρίως στην Πελοπόννησο, Αιτωλοακαρνανία, Κεφαλληνία, Ζάκυνθο, Σάμο, Κυκλάδες και Κρήτη. Αναπτύσσεται σε δένδρο ύψους 5-7m και η κόμη της έχει σχήμα ημισφαιρικό συμμετρικό ή κύπελλο. Τα φύλλα είναι βαθυπράσινα, μικρά, λογχοειδή, μήκους $5,47 \pm 0,52$ cm περίπου και πλάτους $1,03 \pm 0,12$ cm περίπου ενώ το μήκος του μίσχου είναι 0,2-0,6cm. Ανήκει στις μικρόκαρπες ποικιλίες. Ο καρπός είναι κυλινδροκωνικός με βάρος περίπου 1,3 gr και φέρει μικρή θηλή. Ο ποδίσκος είναι πολύ ισχυρός και η ομφαλική κοιλότητα πολύ μικρή. Ο πυρήνας έχει όμοιο σχήμα με τον καρπό και απολήγει σε οξεία ακίδα. Έχει μέσο βάρος 0,17 gr και φέρει επτά αβαθείς γλυφές. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα είναι 1,63-4,06/1 σε διάφορες παραλλαγές της 'Κορωνέικης'. Η ωρίμανση ξεκινά αρχές Οκτωβρίου και τελειώνει τέλη Δεκεμβρίου. Μεγάλο πλεονέκτημα της ποικιλίας είναι η σταθερή καρποφορία και οι ικανοποιητικές αποδόσεις που κυμαίνονται από 30 έως 150kg καρπού ανά δένδρο. Μειονεκτεί όμως, λόγω του μικρού μεγέθους του καρπού που δυσχεραίνει τη συλλογή. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι φτάνει το 27%. Χρησιμοποιείται αποκλειστικά ως ελαιοποιήσιμη και το παραγόμενο ελαιόλαδο ίσως είναι το εκλεκτότερο από όλες τις ποικιλίες με πολύ καλό άρωμα και γεύση. Το φρέσκο λάδι προκαλεί αίσθηση καψίματος στο λαιμό κατά τη βρώση ανεξάρτητα με την οξύτητα. Η καυστικότητα όμως αυτή εξαλείφεται με την πάροδο του χρόνου ενώ δε γίνεται

αισθητή στο φρέσκο λάδι όταν αναμιχθεί με καρπό άλλης ποικιλίας κατά την ελαιοποίηση. Τέλος, είναι ανθεκτική στις ξηροθερμικές συνθήκες και τους ανέμους ενώ είναι ευπαθής στο δάκο, τη βαμβακάδα και στο ρυγχίτη (Ποντίκης, 2000 και Θεριός, 2005).

1.3.2.2 'Καλαμών' (*Olea europaea var ceraticarpa*)



Καρποφόρος κλάδος ελιάς ποικιλίας 'Καλαμών' (κατά Εμ. Βάθη)

Αδρόκαρπη ποικιλία που φέρει και τις συνωνυμίες : 'Αετονύχι', 'Αετονυχολιά', 'Καλαματιανή', 'Κορακολιά', 'Ταγκελολιά', 'Χονδρολιά', 'Μπουράκλα' και 'Τσιγκέλι'. Καλλιεργείται στους νομούς Μεσσηνίας, Αιτωλοακαρνανίας, Φθιώτιδας, Λακωνίας ενώ πρόσφατα η καλλιέργειά της άρχισε να επεκτείνεται και στο Νομό Χαλκιδικής. Θεωρείται εκλεκτή επιτραπέζια ποικιλία. Είναι μεγάλης εμπορικής αξίας και οι κονσερβοποιημένοι, μαύροι καρποί εξάγονται στην Ε.Ε., τις Η.Π.Α. καθώς και τρίτες χώρες.

Οι τιμές για τους παραγωγούς, ιδιαίτερα για τα μεγάλα μεγέθη καρπού, είναι πολύ υψηλές.

Αναπτύσσεται σε δέντρο ύψους 7-10 μέτρων. Το δένδρο είναι ορθόκλαδο και τα φύλλα είναι πλατιά και σκληρά, με ισχυρό μίσχο μήκους 0,6-1cm, βαθυπράσινα, μήκους $8,48 \pm 1,10$ cm και πλάτους $1,64 \pm 0,24$ cm. Ο καρπός είναι επιμήκης και αιχμηρός, στενούμενος προς την κορυφή και με κύρτωση προς τη μια πλευρά, με μέσο βάρος 5,6 gr. Οι καρποί φέρονται 1-2 μαζί. Ο πυρήνας έχει σχήμα παρόμοιο με τον καρπό, μέσο βάρος 0,60 gr και φέρει εννιά έως δέκα αβαθείς γλυφές. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα είναι 8,3:1 και η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 17%. Ευδοκιμεί σε περιοχές υψηλών βροχοπτώσεων (600-800mm βροχομετρικού ύψους περίπου) και υψηλής ατμοσφαιρικής υγρασίας. Είναι μερικώς αυτόστειρη και ως επικονιαστής της συνιστάται η ποικιλία Manzanillo ή Gordales. Θεωρείται ποικιλία ανθεκτική στον

αδηλομύκητα *Verticillium dahliae* και στις προσβολές από δάκο ενώ είναι μέσης ανθεκτικότητας στο ψύχος. Οι καρποί της ωριμάζουν όψιμα, το Νοέμβριο, αν το φορτίο είναι μειωμένο ή αργά τον Δεκέμβριο, αν το φορτίο είναι βαρύ. Απαιτεί εδάφη μέσης σύστασης, με optimum pH=7. Το καλοκαίρι χρειάζεται τουλάχιστον 3 αρδεύσεις για να δώσει ικανοποιητικό μέγεθος καρπού. Η ποικιλία πολλαπλασιάζεται δύσκολα με φυλλοφόρα μοσχεύματα (Ποντίκης, 2000, Θεριός, 2005).

1.4. Μέθοδοι Ταυτοποίησης Ποικιλιών

Η ταξινόμηση και ο καθορισμός των φυλογενετικών σχέσεων στους φυτικούς οργανισμούς αντιμετωπίζουν συχνά προβλήματα τα οποία μπορούν να επιλυθούν με τη χρήση διαφόρων ειδών δεικτών, όπως οι μορφολογικοί δείκτες, οι καρυοτυπικοί δείκτες, οι βιοχημικοί δείκτες και οι μοριακοί δείκτες.

1.4.1. Μορφολογικοί Δείκτες

Οι μορφολογικοί δείκτες είναι πολυμορφικά, κληρονομήσιμα, μορφολογικά χαρακτηριστικά τα οποία χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ ειδών και ποικιλιών. Επιπλέον, αξιοποιούνται για εφαρμογές διαχείρισης γενετικού υλικού. Δεν απαιτούν ειδικό εξοπλισμό, αναλώσιμα ή εξειδικευμένο προσωπικό. Συνεπώς, η καταγραφή μόνο- ή ολίγο-γονιδιακών χαρακτηριστικών αποτελεί μια γρήγορη και οικονομική μέθοδο. Αντίθετα, η χρήση των μορφολογικών δεικτών για πολυγονιδιακά χαρακτηριστικά δεν είναι εξίσου αποτελεσματική εξαιτίας κυρίως του χαμηλού συντελεστή κληρονομικότητας (Patterson and Weatherup, 1984). Οι μορφολογικοί δείκτες έχουν εφαρμοστεί στην πλειονότητα των φυτών. Συγκεκριμένα, όσοι χρησιμοποιούνται επισήμως στην ταυτοποίηση ποικιλιών ονομάζονται περιγραφητές (descriptors).

1.4.2. Καρυοτυπικοί Δείκτες

Οι τύποι των καρυοτυπικών δεικτών είναι: ο χρωμοσωμικός αριθμός, τα χρωμοσωμικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, τα ειδικά πρωτόκολλα χρώσης του κυττάρου και ο *in situ* υβριδισμός. Οι καρυοτυπικές, κυτταρογενετικές παρατηρήσεις απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό ενώ τα προπαρασκευαστικά πρωτόκολλα είναι απλά και χαμηλού κόστους. Επιπλέον, η ερμηνεία των κυτταρομορφολογικών γνωρισμάτων απαιτεί ιδιαίτερη εμπειρία και γνώσεις (Bretting and Widrlechner, 1995).

1.4.3. Βιοχημικοί Δείκτες

Βιοχημικοί δείκτες ονομάζονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες και οι πρωτεΐνες.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οργανικές ενώσεις, προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού ανώτερων φυτών. Είναι δείκτες κληρονομήσιμοι και πολυμορφικοί, κυρίως σε ενδοειδικό και διειδικό επίπεδο.

Οι πρωτεϊνικοί δείκτες είναι πρωτεΐνες που εξυπηρετούν συγκεκριμένες εφαρμογές διαχείρισης του γενετικού υλικού. Οι πληροφορίες που παρέχουν αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα γονιδίων που κωδικοποιούν πολυπεπτίδια, τα οποία δεν είναι τυχαία διασκορπισμένα στο γονιδίωμα (Bretting and Widrlechner, 1995). Οι κυριότεροι από αυτούς είναι οι ορολογικές αναλύσεις, οι πρωτεΐνες αποθήκευσης και τα ισσένζυμα.

1.4.4. Μοριακοί Δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA, χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο, που παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των προς μελέτη ατόμων, η ανάδειξη των οποίων χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κληρονομικότητας χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών (Fanourakis *et al.*, 2004). Πλεονεκτούν, σε σχέση με τους φαινοτυπικούς δείκτες, διότι δεν επηρεάζονται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος ενώ είναι ανιχνεύσιμοι σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυτού. Επιπλέον, είναι απεριόριστοι σε αριθμό και εμφανίζουν υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού. Χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία δένδρων συγγένειας ή εξέλιξης διαφόρων ποικιλιών ή οικοτύπων. Το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους είναι ότι έχουν υψηλό κόστος και απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και εξοπλισμό.

Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Botstein *et al.*, 1980). Οι δείκτες RFLP κόβουν τα μόρια DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων. Τα θραύσματα DNA που προκύπτουν είναι ποικίλου μεγέθους. Ακολουθεί διαχωρισμός των θραυσμάτων σε πηκτή αгарόζης, αποτύπωση κατά Southern, υβριδισμός με κατάλληλο ανιχνευτή DNA και λήψη της οπτικής εικόνας με αυτοραδιογραφία με ραδιενεργό ισότοπο (Bebeli and Kaltsikes, 1993). Οι δείκτες RFLP χαρακτηρίζονται από επαναληψιμότητα και συγκυριαρχία στην κληρονομικότητά τους (Tanksley *et al.*, 1989). Τα

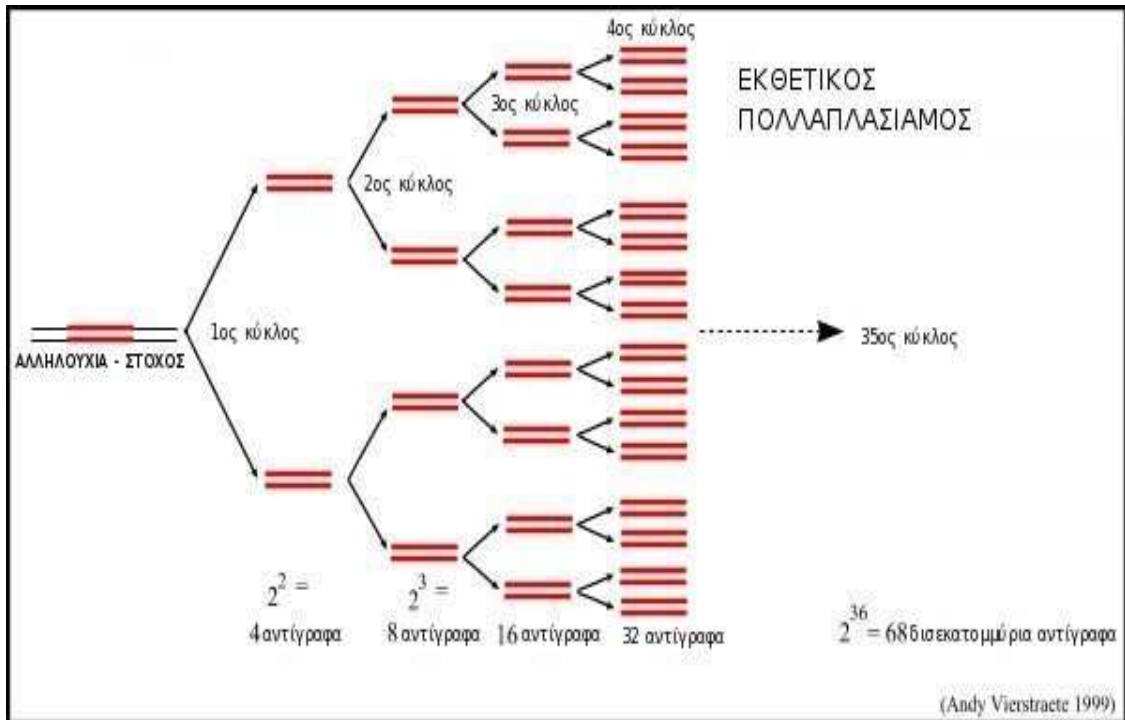
μειονεκτήματά τους είναι ότι απαιτούν χρονοβόρες διαδικασίες, μεγάλη ποσότητα DNA και υψηλό κόστος αναλύσεων ενώ η έκθεση των χρηστών σε ραδιενεργό ακτινοβολία έχει επιπτώσεις στην υγεία (Σκαράκης, 2005).

Μετά την ανακάλυψη της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) αναπτύχθηκαν νέες μέθοδοι μοριακών δεικτών που βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA. Το 1990, οι Williams *et al.* και Welsh and McClelland, περιέγραψαν μια νέα μέθοδο δημιουργίας μοριακών δεικτών με πολυμορφισμό, τα RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA). Στη συνέχεια, εμφανίστηκαν οι μοριακοί δείκτες δεύτερης γενιάς στους οποίους ανήκουν οι ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz *et al.*, 1994), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) (Vos *et al.*, 1995) και διάφοροι τροποποιημένοι τύποι τους. Ακολούθησαν οι μοριακοί δείκτες τρίτης γενιάς οι οποίοι περιλαμβάνουν τους IFLPs (Intron Fragment Length Polymorphisms) και SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) (Landegren *et al.*, 1998). Σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός μοριακών δεικτών, όπως π.χ. οι SSRs (Simple Sequence Repeat) (Jacob *et al.*, 1991), SCARs (Sequence Characterize Amplified Regions) (Yang and Korban, 1996), SPARs (Simple Primer Amplification Reaction) (Gupta *et al.*, 1994), MAS (Marker Assisted Selection) (Lande, 1991) και άλλοι, βρίσκεται στη διάθεση των ερευνητών.

1.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Το Δεκέμβριο του 1983 ο Δρ. Kary Mullis εμπνεύστηκε την τεχνική της PCR. Για το μεγάλο του αυτό επίτευγμα βραβεύτηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1993. Η PCR είναι μια σχετικά απλή και οικονομική μέθοδος με την οποία ένα τμήμα DNA μπορεί να αναπαραχθεί δισεκατομμύρια φορές *in vitro* με τη χρήση της DNA πολυμεράσης. Οι εφαρμογές της μεθόδου στις βιολογικές επιστήμες είναι άπειρες.

Η κινητική επανασύνδεση αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA, ιδιαίτερα στην αρχή, όπου η διάρκεια επανασύνδεσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση και την πολυπλοκότητα των συμβαλλομένων συμπληρωματικών αλυσίδων αποτελεί τη βάση της μεθόδου της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης. Με την PCR επιτυγχάνεται ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός τμήματος DNA, *in vitro*, το ονομαζόμενο DNA-στόχος, από ελάχιστη αρχική ποσότητα δείγματος κατά τη διάρκεια λίγων ωρών. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε κύκλους. Ο κάθε κύκλος έχει ως αποτέλεσμα εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου. Έτσι, ο DNA-στόχος, από αρχική ποσότητα δείγματος μη ανιχνεύσιμου με κλασικές τεχνικές υβριδισμού, ενισχύεται σε σημείο που να γίνει ευρέως ανιχνεύσιμος (Williams *et al.*, 1990) (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3. Εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου.

Πηγή: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

Σύμφωνα με τους Mullis *et al.* (1987), η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στη χρήση:

- DNA πολυμεράσης (*Taq* DNA Polymerase) η οποία έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Taq*). Είναι θερμοσταθερή διατηρώντας τη δραστηρότητά της σε θερμοκρασία 95°C για τουλάχιστον 40 λεπτά.
- Ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 15-30 βάσεων), τα ονομαζόμενα εκκινητικά μόρια (*primers*). Οι εκκινητές υποβοηθούν την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε κάθε κλώνο του αρχικού δίκλωνου DNA.
- Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (*dNTPs*).
- Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος $MgCl_2$.
- Ρυθμιστικού διαλύματος απαραίτητου για τη δράση της *Taq* πολυμεράσης.
- Μικρής ποσότητας DNA που έχει το ρόλο μορίου μήτρας.

Η διαδικασία της PCR αποτελείται από 3 κύρια βήματα τα οποία επαναλαμβάνονται για 30-40 κύκλους. Η ακολουθία αυτών των κύκλων λαμβάνει χώρα σε μια συσκευή η οποία θερμαίνει και ψύχει τους σωλήνες (tubes), μέσα στους οποίους βρίσκεται το μίγμα των αντιδραστηρίων, σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Τα 3 κύρια βήματα πιο αναλυτικά έχουν ως εξής:

1^ο βήμα – Αποδιάταξη στους 94°C:

Κατά την διάρκεια της αποδιάταξης το δίκλωνο μόριο του DNA θερμαίνεται στους 94°C με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο μονόκλωνων αλυσίδων. Συγκεκριμένα, η υψηλή θερμοκρασία σπάει τους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τις δύο αλυσίδες μεταξύ τους και έτσι διαχωρίζονται. Όλες οι ενζυματικές αντιδράσεις σταματούν. Η διάρκεια της αποδιάταξης είναι συνήθως 1-2 min.

2^ο βήμα – Υβριδισμός ή αναδιάταξη στους 54°C:

Οι ιοντικοί δεσμοί ανάμεσα στο μονόκλωνο DNA και την αλληλουχία του εκκινητή σπάνε και σχηματίζονται παροδικά. Οι πιο σταθεροί δεσμοί διαρκούν λίγο περισσότερο (στα σημεία όπου οι εκκινητές εφαρμόζουν ακριβώς) και στο μικρό αυτό τμήμα δίκλωνου DNA (εκκινητή και μονή αλυσίδα DNA-στόχου) η πολυμεράση μπορεί να προσκολληθεί και να ξεκινήσει τη συμπλήρωση της αλληλουχίας. Μόλις συμπληρωθούν μερικές βάσεις, ο ιοντικός δεσμός είναι τόσο ισχυρός ανάμεσα στο DNA-στόχο και τον εκκινητή ώστε δεν πρόκειται να ξανασπάσει.

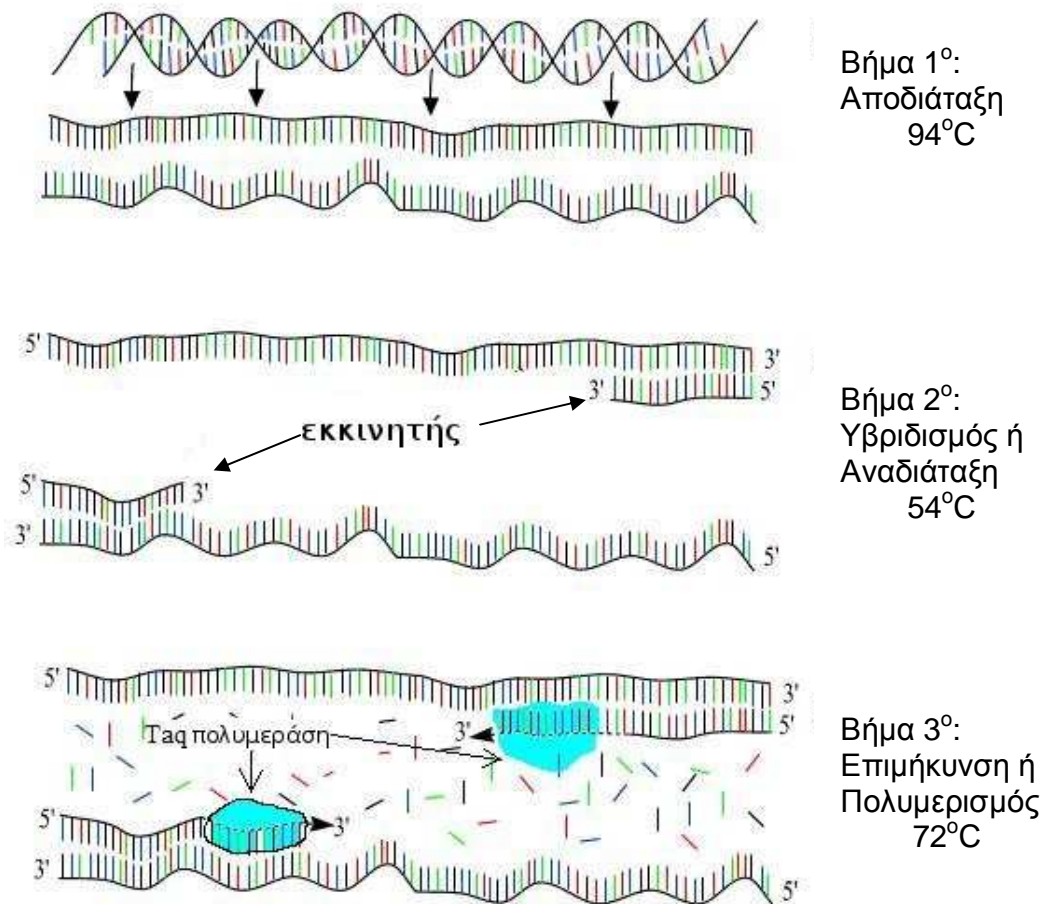
Ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'-άκρο της μιας αλυσίδας του στόχου και ο άλλος στο 3'-άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας του στόχου. Προσθέτοντας εκκινητή σε περίσσεια αποφεύγουμε την υβριδοποίηση του αρχικού DNA με τον εαυτό του.

3^ο βήμα – Επιμήκυνση ή πολυμερισμός στους 72°C:

Στους 72°C είναι η ιδανική θερμοκρασία για τη δράση της πολυμεράσης. Οι εκκινητές, στα σημεία όπου έχουν συμπληρωθεί μερικές βάσεις, συνδέονται ήδη με ένα ισχυρότερο ιοντικό δεσμό στη μονόκλωνη αλυσίδα του DNA ο οποίος υπερτερεί σε σχέση με τις δυνάμεις που προσπαθούν να σπάσουν αυτούς τους δεσμούς. Οι εκκινητές που δε βρίσκονται σε συμπληρωματική αλληλουχία αποκολλούνται εξ αιτίας της υψηλής θερμοκρασίας.

Η πολυμεράση επιμηκύνει και τους δύο εκκινητές προς το μέρος του στόχου διότι η κατεύθυνση της σύνθεσης του DNA ακολουθεί την πορεία από το 5' προς το 3'-άκρο. Η σύνθεση του DNA πραγματοποιείται και στις δύο αλυσίδες αλλά προεκτείνεται και πέρα από την αλληλουχία-στόχο (Εικόνα 1.4).

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ



Εικόνα 1.4. Τα στάδια της PCR: (1) Αποδιάταξη, (2) Υβριδισμός ή Αναδιάταξη και (3) Επιμήκυνση ή Πολυμερισμός.

Πηγή: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

1.6. Μοριακοί Δείκτες Που Χρησιμοποιήθηκαν Στο Παρόν Πείραμα

1.6.1. RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA):

Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά Τμήματα DNA

Την τελευταία εικοσαετία έχουν αναπτυχθεί μοριακοί δείκτες που βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Το 1990, οι Williams *et al.* και Welsh and McClelland, περιέγραψαν μια μέθοδο για τη δημιουργία μοριακών δεικτών με πολυμορφισμό, τα RAPDs. Τα RAPDs είναι τυχαία δεκαμερή ολιγονουκλεοτίδια τα οποία υβριδίζονται σε συμπληρωματικές θέσεις ως προς την αλληλουχία DNA του επιθυμητού σημείου έναρξης. Οι εκκινητές αυτοί, ως ολιγονουκλεοτίδια, είναι πολύ πιθανόν να βρουν αρκετές θέσεις υβριδισμού πάνω στην αλυσίδα του DNA. Ένα δίκλωνο μόριο DNA για να σχηματιστεί είναι απαραίτητη η ύπαρξη δύο εκκινητών, ένας για το 3' άκρο της κάθε αλυσίδας. Τα ενισχυμένα τμήματα ή τα αντιγραφόμενα τμήματα DNA δημιουργούνται στις περιοχές όπου υβριδίζει ο εκκινητής, με κατάλληλο προσανατολισμό, σε απόσταση περίπου 200-3000 βάσεων. Ένας εκκινητής RAPD έχει μια καθορισμένη αλληλουχία η οποία όμως είναι τυχαία. Έτσι, υπάρχει δυνητικά ένας απεριόριστος αριθμός εκκινητών RAPDs με συγκεκριμένες αλληλουχίες (Deragon and Landry, 1992). Ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και πολυμερισμού επαναλαμβάνεται έχοντας ως αποτέλεσμα τη λογαριθμική αύξηση της συγκέντρωσης αυτών των τμημάτων του γονιδιώματος.

Η τεχνική αυτή, ουσιαστικά, εντοπίζει μικρές ανεστραμμένες αλληλουχίες ενώ οι πολυμορφισμοί αντιστοιχούν στα πολλαπλασιασμένα τμήματα, τα οποία ποικίλλουν ως προς το μέγεθος ανάλογα με την απόσταση των δύο θέσεων υβριδισμού του εκκινητή. Οι πολυμορφισμοί οφείλονται σε σημειακές μεταλλάξεις που καταργούν ή δημιουργούν νέα θέση υβριδισμού του εκκινητή, σε ενθέσεις ή διαγραφές, που εισάγουν ή απαλοΐφουν αντίστοιχα θέσεις υβριδισμού, αλλά και σε ενθέσεις ή διαγραφές μεταξύ των θέσεων υβριδισμού που έχουν ως αποτέλεσμα μεταβολή του μεγέθους του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος (όταν μια ένθεση απομακρύνει σημαντικά τις θέσεις υβριδισμού) ή δημιουργία νέου σε

περίπτωση που μια διαγραφή μειώσει την απόσταση των θέσεων υβριδισμού (Williams *et al.*, 1990).

Τα προϊόντα της ενίσχυσης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόριση σε πηκτή αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Ακολουθεί χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο ή νιτρικό άργυρο, οπότε και γίνονται ορατά. Ο πολυμορφισμός μεταξύ ατόμων προσδιορίζεται με παρουσία ή απουσία μιας συγκεκριμένης ζώνης (Williams *et al.*, 1990). Η διαφορά στην ένταση φθορισμού συγκεκριμένης ζώνης (και άρα η διαφορετική ποσότητα πολλαπλασιασμένου τμήματος) δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο διαχωρισμό ετεροζυγωτών από ομοζυγωτούς γονοτύπους καθώς τέτοιες διαφορές συνήθως οφείλονται σε φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ των διαφόρων θέσεων υβριδισμού του εκκινητή (Hallden *et al.*, 1996) ή στον πολλαπλασιασμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του γονιδιώματος (Thormann *et al.*, 1994).

Οι δείκτες RAPD είναι κυρίαρχοι στην έκφραση της κληρονομικότητάς τους. Οι συνδυασμοί που περιέχουν κυρίαρχο αλληλόμορφο AA και Aa εκφράζονται με την παρουσία ενισχυμένης ζώνης DNA ενώ ο συνδυασμός aa με απουσία της (Clark and Lanigan, 1993; Staub *et al.*, 1996).

Στην ελιά οι RAPDs έχουν εφαρμοστεί στη διάκριση ποικιλιών (Cresti *et al.*, 1996; Khadari *et al.*, 2003), στη μελέτη ενδο- και διαπαικισιακής γενετικής παραλλακτικότητας (Wiesman *et al.*, 1998; Mekuria *et al.*, 1999; 2002; Roselli *et al.*, 2002; Belaj *et al.*, 2002; 2003b,c; Gemas *et al.*, 2004), στον καθορισμό γενετικών σχέσεων ανάμεσα σε ποικιλίες (Besnard *et al.*, 2001a; Belaj *et al.*, 2002; 2003b; Khadari *et al.*, 2003) και στη μελέτη της γενετικής διαφοροποίησης στο σύμπλεγμα της ελιάς (olive complex) (Besnard *et al.*, 2001b).

1.6.2. ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats):

Ενδο-επαναλαμβανόμενες Απλές Ακολουθίες

Με σκοπό να ξεπεραστούν ορισμένα από τα προβλήματα που σχετίζονται με τους RAPD εκκινητές, έχουν δημιουργηθεί νέες τεχνικές, όπως τα ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Η τεχνική των ISSR

βασίζεται στην ενίσχυση περιοχών (100-3000 bp) ανάμεσα σε κοντινούς μεταξύ τους μικροδορυφόρους προσανατολισμένους αντίθετα. Οι ISSR εκκινητές είναι προϊόντα της PCR τα οποία λαμβάνονται με εκκινητές βασιζόμενους σε επαναλήψεις δινουκλεοτιδίων, τρινουκλεοτιδίων, τετρανουκλεοτιδίων και πεντανουκλεοτιδίων. Συγκεκριμένα, η ενίσχυση ενός τμήματος DNA γίνεται από ένα μόνο εκκινητή, μήκους 16-18 βάσεων, ο οποίος αποτελείται από μία ακολουθία μικροδορυφόρων που προσφύεται στο 3' ή 5' άκρο δύο έως τεσσάρων αυθαίρετων νουκλεοτιδίων (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Η δυνατότητα ενίσχυσης τμημάτων του DNA από ISSR εκκινητές εξαρτάται από την ποικιλία και τη συχνότητα των μικροδορυφόρων, η ακολουθία των οποίων αλλάζει ανάλογα με τα είδη που μελετώνται (Depeiges *et al.*, 1995). Τα προϊόντα της ενίσχυσης, τα οποία ποικίλουν ως προς το μέγεθος, διαχωρίζονται σε πηκτή αγαρόζης.

Οι ISSRs έχουν εφαρμοστεί στη διάκριση ποικιλιών ελιάς (Hess *et al.*, 2000; Pasqualone *et al.*, 2001; Gemas *et al.*, 2004), στον καθορισμό φυλογενετικών σχέσεων στο σύμπλεγμα της *Olea europaea* (Hess *et al.*, 2000; Gemas *et al.*, 2004), στην αναγνώριση καρπών από διαφορετικές ποικιλίες (Pasqualone *et al.*, 2001) καθώς και στην αναγνώριση ελαιολάδου Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Martins-Lopes *et al.*, 2007).

1.6.3. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα των μεθόδων RAPDs και ISSRs

Η μέθοδος των RAPDs εκκινητών παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα:

Πλεονεκτήματα

- Είναι μια δυναμική, απλή και χαμηλού κόστους μοριακή τεχνική (Belaj *et al.*, 2001).
- Δεν εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως και οι υπόλοιποι δείκτες που βασίζονται στην τεχνολογία PCR ενώ επιπλέον παρουσιάζει υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού στην ελιά (Bogani *et al.*, 1994; Fabbri *et al.*, 1995; Cresti *et al.*, 1996; Wiesman *et al.*, 1998).

- Έχει υποστηριχθεί ότι πιθανότατα σχετίζεται με σημαντικούς λειτουργικά γενετικούς τόπους (Penner, 1996).
- Το DNA που μελετάται με αυτή την τεχνική απομονώνεται από μικρή ποσότητα φυτικού υλικού (Fritsch and Rieseberg, 1996).
- Δεν προαπαιτείται ιδιαίτερη γνώση του γονιδιώματος του προς μελέτη οργανισμού (Williams *et al.*, 1990; Welsh and McClelland, 1990).

Μειονεκτήματα

- Έχει χαμηλή επαναληψιμότητα (Schierwater and Ender, 1993; Jones *et al.*, 1997). Γι' αυτό το λόγο και η διαδικασία που ακολουθείται στο εργαστήριο θα πρέπει να είναι όσο γίνεται πιο ακριβής γιατί είναι ευαίσθητοι στις συνθήκες αντίδρασης.
- Οι αναλύσεις με RAPD γενικά απαιτούν καθαρό, υψηλού μοριακού βάρους DNA (Spooner *et al.*, 2005).
- Είναι κυρίαρχοι δείκτες.
- Παρουσιάζουν αποτελέσματα που διαφέρουν από εργαστήριο σε εργαστήριο (Martins-Lopes *et al.*, 2007).

Η μέθοδος των ISSR εκκινητών παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα:

Πλεονεκτήματα

- Ενισχύουν περιοχές που παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα σε περιοχές που δεν κωδικοποιούν (Esselman *et al.*, 1999).
- Παρουσιάζουν επαναληψιμότητα, χαμηλό κόστος και δε χρειάζεται να είναι γνωστές οι παράπλευρες αλληλουχίες στη δημιουργία εκκινητών ISSR.
- Δεν είναι απαραίτητη η χρονοβόρα και υψηλού κόστους κατασκευή γενομικής ή άλλου τύπου βιβλιοθήκης (Rakoczy-Trojanowska *et al.*, 2004).
- Δεν προαπαιτείται ιδιαίτερη γνώση του γονιδιώματος του προς μελέτη οργανισμού για το σχεδιασμό του εκκινητή.

- Και τέλος, παρουσιάζουν παρόμοια πλεονεκτήματα με τους RAPD εκκινητές (Kantety *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996; Fang and Roesse, 1997).

Παλαιότερες μελέτες στο σιτάρι (*Triticum aestivum*), σε οπωροφόρα δένδρα και στο κοινό φασόλι (*Phaseolus vulgare*) (Nagaoka and Ogihara, 1997; Korbing *et al.*, 2002; Galvan *et al.*, 2003) καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η ενίσχυση με ISSR εκκινητές αποδείχτηκε να είναι πιο λεπτομερής από την ενίσχυση με RAPDs στην αξιολόγηση της γενετικής διαφοροποίησης.

Μειονεκτήματα

- Οι δείκτες ISSR είναι κυρίαρχοι.
- Το κόστος της τεχνικής αυτής είναι υψηλότερο από εκείνο των RAPDs.
- Απαιτεί πιο εξειδικευμένες γνώσεις σε σχέση με τα RAPDs.
- Μια ζώνη δεν αποτελείται από το ίδιο τμήμα DNA.
- Τα προϊόντα δεν μπορούν να αντιστοιχηθούν με συγκεκριμένους πολυμορφικούς τόπους (loci).
- Ζώνες ίδιου μεγέθους μπορεί να μην είναι ομόλογες.

Η συνδυασμένη χρήση των δεικτών RAPD και ISSR επιτρέπει υψηλότερη κάλυψη του γονιδιώματος δεδομένου ότι τα RAPDs έχουν περιγραφεί ως πιθανότατα σχετιζόμενοι με σημαντικούς λειτουργικά γενετικούς τόπους (Penner, 1996) και οι ISSRs ενισχύουν περιοχές που παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα σε περιοχές που δεν κωδικοποιούν (Esselman *et al.*, 1999). Και οι δύο τεχνικές σαρώνουν όλο το γονιδίωμα (πολλοί γενετικοί τόποι) και είναι ικανές να διαχωρίσουν γονοτύπους κάτω από το επίπεδο του είδους, όπως ποικιλίες και κλώνους ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί σε όλων των ειδών τις μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας (Karp *et al.*, 1997).

1.7. Μελέτη Της Γενετικής Παραλλακτικότητας Στην Ελιά

Η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ και μέσα στους φυτικούς πληθυσμούς απορρέει από ένα συνδυασμό γενετικής απόστασης, μεγέθους πληθυσμού,

τρόπου σύζευξης (αυτογονιμοποίηση ή διασταύρωση), τρόπου διασποράς της γύρης και των σπόρων και του ρυθμού γονιδιακής ροής (Loveless and Hamrick, 1984). Το σύστημα σύζευξης των φυτών φαίνεται να παίζει κύριο ρόλο στη γενετική διαφοροποίηση προσδιορίζοντας το ποσοστό ανταλλάσσόμενων γονιδίων (Darmency, 1997). Είδη στα οποία επικρατεί η σταυρογονιμοποίηση αναφέρεται ότι παρουσιάζουν χαμηλότερη διαπληθυσμιακή και υψηλότερη ενδοπληθυσμιακή διαφοροποίηση στη γενετική ποικιλομορφία συγκρινόμενα με είδη όπου η αυτογονιμοποίηση κυριαρχεί (Maguire and Sedgley, 1997).

Η ελιά είναι ένα διπλοειδές είδος ($2n=46$), πρωταρχικώς αλλόγαμο, που παρουσιάζει υψηλό επίπεδο διασταυρώσεων. Ο κύριος τρόπος μεταφοράς γύρης είναι μέσω του ανέμου (Morettini and Pulselli, 1953) και σ' ένα μικρό ποσοστό μέσω των εντόμων (Lavee, 1996). Οι απόγονοι προέρχονται άμεσα από διασταυρώσεις ανάμεσα σε καλλιεργούμενες ποικιλίες, όπως επίσης και μεταξύ ποικιλιών και αγριελιών (Angiolillo *et al.*, 1999). Ο βαθμός των διασταυρώσεων ποικίλλει ανάλογα με τις ποικιλίες (Fontanazza and Baldoni, 1990) και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Lavee, 1996). Επισημαίνεται ότι η καλλιεργούμενη ελιά πολλαπλασιάζεται με μοσχεύματα ή εμβολιασμό ενώ η άγρια ελιά με σπέρματα (Green, 2002) τα οποία μεταφέρονται κυρίως με πουλιά (Herrera, 1995).

Η ελιά παρουσιάζει την πλουσιότερη γενετική παραλλακτικότητα ανάμεσα σε όλα τα καρποφόρα δένδρα με πάνω από 2.600 ποικιλίες να έχουν περιγραφεί (Rugini and Lavee, 1992), παρόλο που πολλές από αυτές μπορεί να είναι συνώνυμες, ομώνυμες (Barranco *et al.*, 2000), οικότυποι ή το αποτέλεσμα διασταυρώσεων μεταξύ γειτονικών ατόμων. Οι ποικιλίες αυτές παρουσιάζουν αξιοσημείωτη παραλλακτικότητα στην ελαιοπεριεκτικότητα, το μέγεθος καρπού, το σχήμα της κόμης και στην προσαρμογή στις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Bartolini *et al.*, 1998). Η μακροβιότητα του είδους και η χαμηλή πίεση βελτιωτικής επιλογής έχουν συνεισφέρει στη διατήρηση της παραλλακτικότητας ενώ η μειωμένη έκταση της γενετικής διάβρωσης μέσα στο γενετικό υλικό έχει επιτρέψει τη διατήρηση της ποικιλομορφίας (Rallo *et al.*, 2000).

Μερικές από τις ποικιλίες επεκτείνονται σε μεγάλες περιοχές καλλιέργειας, όμως, αν και η υπάρχουσα παραλλακτικότητα είναι πολύ υψηλή, αυτές οι ποικιλίες είναι κυρίως τοπικές και παλαιές, έχοντας μια περιορισμένη έκταση διάδοσης (Barranco and Rallo, 1985; Barranco, 1997). Η καταγωγή και η γεωγραφική εξάπλωση μιας τόσο υψηλής ποικιλομορφίας στην καλλιεργούμενη ελιά είναι ακόμη υπό διερεύνηση.

Σήμερα, υποστηρίζεται ότι οι ποικιλίες προέρχονται από αγενή πολλαπλασιασμό μεμονωμένων αγριελιών οι οποίες παρουσίασαν επιθυμητά χαρακτηριστικά ως προς το μέγεθος ή και την ελαιοπεριεκτικότητα του καρπού και οι οποίες επιλέχθηκαν εμπειρικά ενώ άλλοι ερευνητές πιστεύουν ότι οι περισσότερες σύγχρονες ποικιλίες προήλθαν από τη διασταύρωση αρχαίων ποικιλιών ή μέσω της διασταύρωσης με άγριες ελιές ακολουθούμενη από τοπική επιλογή (Angiolillo *et al.*, 1999; Besnard and Bervillé, 2000; Besnard *et al.*, 2001b). Οι ποικιλίες ελιάς διαμορφώθηκαν και διαδόθηκαν από τις μετακινήσεις των πληθυσμών στη λεκάνη της Μεσογείου, κυρίως από την Ανατολή στη Δύση, παρόλο που η επιλογή ήταν πολυκλωνική και περιείχε φυτικό υλικό προερχόμενο από τη Δύση, όπως φαίνεται από γενετικές μελέτες βασισμένες σε πολυμορφισμό αλλοενζύμων (Lumaret *et al.*, 1997), σε μελέτες βασισμένες σε RAPDs και μιτοχονδριακά RFLPs (Besnard and Bervillé, 2000; Claros *et al.*, 2000; Besnard *et al.*, 2001a,b; Bronzini de Caraffa *et al.*, 2002) όπως επίσης και ISSR δείκτες (Vargas and Kadereit 2001). Οι ποικιλίες που προέρχονται από αγριελιές μιας περιοχής αναμένεται να είναι γενετικά πολύ κοντά και απαιτείται η λεπτομερής μελέτη τους.

Οι παρούσες οικονομικές τάσεις στην κατεύθυνση της παγκόσμιας αγοράς και η αυξανόμενη ζήτηση ελαιολάδου αποκαλύπτουν μια σοβαρή ανάγκη για ανάπτυξη νέων ποικιλιών οι οποίες ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των νέων ανταγωνιστικών συστημάτων παραγωγής. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη ποικιλιών που δεν έχουν επικρατήσει ως κύριες παραγωγικές ποικιλίες και περιορίζονται μόνο στον τόπο καταγωγής τους καθώς επίσης και οι άγριοι πληθυσμοί διότι μπορεί να παρουσιάζουν αγρονομικά χαρακτηριστικά κατάλληλα

για τις σημερινές απαιτήσεις της αγοράς (Cantini *et al.*, 1999; Zohary and Hopf, 1994).

Στην Πορτογαλία για να αυξηθεί η παραγωγή και η ποιότητα ελαιολάδου οι Gemas *et al.* (2002) εισηγούνται την χρήση επιλεγμένων και πιστοποιημένων δένδρων από ποικιλίες περιοχών Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) στους νέους ελαιώνες. Η ανανέωση των σύγχρονων ελαιώνων θα πρέπει να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας πιστοποιημένα ελαιόδεντρα από επιλεγμένες ποικιλίες ελιάς. Λαμβάνοντας υπόψη την παρούσα κατάσταση στη βελτίωση της ελιάς, η ανάλυση της γενετικής παραλλακτικότητας είναι αναγκαία για την ορθή ταξινόμηση, διατήρηση και χρήση των γενετικών πηγών. Μέχρι σήμερα, η βελτίωση στην ελιά έχει περιοριστεί στην κλωνική ή ποικιλιακή επιλογή και στις εισαγόμενες μεταλλάξεις (Panelli *et al.*, 1990; Guerriero *et al.*, 1994; Rugini and Panelli, 1994; Tous *et al.*, 1998; Rossetto *et al.*, 1999). Η βελτίωση στην ελιά, όπως και σε άλλα είδη δένδρων, παρεμποδίζεται από τη μακρά περίοδο νεανικότητας (15 έτη), τις δυσκολίες στις καλλιεργητικές φροντίδες, όπως επίσης και από το επίπεδο της γενετικής πολυπλοκότητας σε ένα είδος με 46 χρωμοσώματα ($n=23$), καθώς και στην έλλειψη γενετικής γνώσης.

Η ταξινόμηση του γενετικού υλικού της ελιάς είναι πολύπλοκη όχι μόνο λόγω του πλούσιου γενετικού υποβάθρου αλλά από την απουσία αναφορών και από τη σύγχυση στα ονόματα των ποικιλιών με πολυάριθμες περιπτώσεις ομώνυμων και συνώνυμων (Tous *et al.*, 1990; Rugini and Lavee, 1992; Ouazzani *et al.*, 1995, 1996; Bartolini *et al.*, 1998). Επιπρόσθετα, πολλές από τις καλλιεργούμενες ποικιλίες ήταν κοινώς αποδεκτές ως 'ποικιλιακοί πληθυσμοί' όταν περιείχαν διάφορους κοντινούς αλλά ξεχωριστούς κλώνους όσο αφορά γενετικούς ή και μορφολογικούς χαρακτήρες (Ouazzani *et al.*, 1996).

Στην πόλη Cordoba της Ισπανίας έχει δημιουργηθεί η παγκόσμια τράπεζα γενετικού υλικού (World Germplasm Bank of Cordoba). Για το χαρακτηρισμό και τον προσδιορισμό των ποικιλιών ελιάς σ' αυτή τη συλλογή χρησιμοποιήθηκαν αρχικά μορφολογικά δεδομένα (Barranco and Rallo, 1984; Barranco *et al.*, 2000). Όμως, αυτή η προσέγγιση είναι αργή και υπόκειται σε περιβαλλοντικές επιρροές. Αντίστοιχα, μέσω συνεργασιών έχουν δημιουργηθεί επιτυχώς βάσεις δεδομένων

μοριακών δεικτών για 'true to type' αναγνώριση ποικιλιών και διάκριση σε καλλιέργειες όπως το σιτάρι (Röder *et al.*, 2002), η τομάτα (Bredemeijer *et al.*, 2002) και το αμπέλι (This *et al.*, 2004), παρέχοντας ένα σημαντικό εργαλείο για τους επιστήμονες, τους φυτωριούχους και τους βελτιωτές. Οι βάσεις δεδομένων που προκύπτουν από συνεργασίες έχουν ως κύρια δύναμη το γεγονός ότι παρέχουν πληροφορίες γενικώς εφαρμόσιμες που απορρέουν από την εναρμόνιση δεδομένων διαφορετικών εργαστηρίων.

Στην ελιά, όπως και σε πολλά άλλα είδη, οι μελέτες της γενετικής ποικιλομορφίας αντανakλούν σε κάποιο βαθμό την ιστορία της εξέλιξης των γενετικών δεικτών. Ένας μεγάλος αριθμός ποικιλιών, ο οποίος ανέρχεται σε μερικές εκατοντάδες, σε κάθε μια από τις κύριες ελαιοπαραγωγικές χώρες, έχουν διακριθεί με βάση μορφολογικά και φυσιολογικά γνωρίσματα (Ciferri, 1950; Turrill, 1951; Hauville, 1953; Zohary and Spiegel-Roy, 1975; Barranco *et al.*, 2000). Οι Cantini *et al.* (1999) χρησιμοποίησαν μορφολογικούς χαρακτήρες όπως το φύλλο, ο καρπός και ο τρόπος ανάπτυξης, για να αξιολογήσουν τη γενετική ποικιλομορφία ανάμεσα αλλά και μέσα στις διαφορετικές καταχωρήσεις γνωστών και άγνωστων ποικιλιών ελιάς. Όπως ανέφεραν παλαιότερα οι Gottlieb (1997) και Hamrick *et al.*, (1992) τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία συνήθως καθορίζονται από πολλά γονίδια και ποικίλουν ανάλογα με το χρόνο και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, δεν παρέχουν καμία άμεση πληροφορία για συγκεκριμένους γονότυπους. Με σκοπό να συμπληρωθούν και να ξεκαθαριστούν οι αρχικές μορφολογικές περιγραφές έγιναν μελέτες με τη χρήση διαφόρων γενετικών δεικτών. Αρχικά, ο γονοτυπικός προσδιορισμός ποικιλιών βασίστηκε στην ποικιλομορφία ισοενζύμων της γύρης (Loukas and Krimbas, 1983; Trujillo *et al.*, 1995; Ouazzani *et al.*, 1993; 1996) και στον πολυμορφισμό αλλοενζύμων στα φύλλα (Ouazzani *et al.*, 1993, 1995). Όμως, οι συγκεκριμένοι δείκτες παρουσίασαν περιορισμένη αποτελεσματικότητα στη διάκριση ποικιλιών κοντινής συγγένειας (Ouazzani *et al.*, 1993, 1995).

Η μορφολογική περιγραφή έχει πλέον αναβαθμιστεί με την είσοδο των μοριακών τεχνικών. Σήμερα, χρησιμοποιούνται ευρέως για επακριβή γενετική περιγραφή, εξακρίβωση της καταγωγής και για τη διευκρίνιση του τρόπου

διασποράς. Οι δείκτες AFLP, οι οποίοι αναπτύχθηκαν από τους Vos *et al.*, (1995), χρησιμοποιήθηκαν σε μελέτες γενετικών σχέσεων μεταξύ καλλιεργούμενων ελιών, αγριελιών και συγγενών ειδών (Angiolillo *et al.*, 1999; Baldoni *et al.*, 2000).

Οι βασιζόμενοι στην PCR μοριακοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μελέτες συστηματικής. Είναι περιβαλλοντικά ανεξάρτητοι και αποτελεσματικοί στο προσδιορισμό ποικιλιών ελιάς καθώς και στην ανίχνευση συνωνύμων και ομωνύμων (Fabbri *et al.*, 1995; Besnard *et al.*, 2001a; Bronzini de Caraffa *et al.*, 2002). Ανάμεσα σ' αυτές τις τεχνικές, η ανάλυση με RAPDs αποδείχθηκε μια δυναμική, σχετικά απλή και οικονομική τεχνική για την ανάλυση του γενετικού υλικού των ποικιλιών (Weisman *et al.*, 1998; Mekuria *et al.*, 1999; Gemas *et al.*, 2000; Besnard *et al.*, 2001a; Belaj *et al.*, 2001, 2002; Khadari *et al.*, 2003; Hagidimitriou *et al.*, 2005) και σε συνδυασμό με την ανάλυση μοριακής παραλλακτικότητας (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) έχει χρησιμοποιηθεί στη μελέτη γενετικής πληθυσμών σε πολλά φυτά (Maguire and Sedgley, 1997; Gillies *et al.*, 1997). Παρά την καλή ικανότητα διάκρισης ποικιλιών, οι δείκτες RAPD συχνά απέτυχαν να διαχωρίσουν κοντινούς συγγενικά κλώνους (όπως π.χ. μέσα στην ίδια ποικιλία) οι οποίοι είχαν προηγουμένως προσδιορισθεί με μορφολογικούς ή άλλους γενετικούς δείκτες (Khadari *et al.*, 2001).

Επιπρόσθετα, οι ISSRs, οι οποίοι αρχικά χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη φυλογενετικών σχέσεων μέσα στο σύμπλεγμα της *Olea europaea* (Hess *et al.*, 2000; Vargas and Kadereit, 2001), επέτρεψαν τη διάκριση ορισμένων ποικιλιών από την Ιταλία (Pasqualone *et al.*, 2001) και την αξιολόγηση της κλωνικής γενετικής ποικιλομορφίας που διέπει την πορτογαλική ποικιλία 'Galega Vulgar' η οποία καλλιεργείται ευρέως σ' αυτή τη χώρα (Gemas *et al.*, 2002). Οι ISSRs, μόνοι ή σε συνδυασμό με άλλα συστήματα δεικτών έχουν εφαρμοσθεί και στην ανάλυση κλωνικής ποικιλομορφίας και γενετικής παραλλακτικότητας σε ποικιλίες ελιάς (Fabbri *et al.*, 1995; Mekuria *et al.*, 1999; Gemas *et al.*, 2004; Martins-Lopes *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2008). Παλαιότερες μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι δείκτες ISSR είναι αποτελεσματικοί στην εκτίμηση φυλογενετικών σχέσεων στο σύμπλεγμα της *Olea europaea* (Hess *et al.*, 2000;

Gemas *et al.*, 2004) και στην αναγνώριση καρπών και φύλλων (Pasqualone *et al.*, 2001). Οι ISSR δείκτες έχουν δημιουργηθεί με σκοπό την κατανόηση των γενετικών σχέσεων στην ελιά, τον προσδιορισμό ποικιλιών και τα προγράμματα βελτίωσης (Sefc *et al.*, 2000; Rallo *et al.*, 2000).

Πρόσφατα, οι γενετικές μελέτες με χρήση μικροδορυφόρων έχουν αυξηθεί κατακόρυφα διότι είναι αλληλουχίες υψηλού πολυμορφισμού και διατηρούμενης ετεροζυγωτίας αλληλουχίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συγκυρίαρχοι δείκτες (Rallo *et al.*, 2000; Sefc *et al.*, 2000; Cipriani *et al.*, 2002; Zane *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2006). Οι δείκτες SSRs εξελίσσονται σε δείκτες μελέτης της ποικιλομορφίας στην ελιά (Rallo *et al.*, 2000; Sefc *et al.*, 2000; Cipriani *et al.*, 2002) καθώς είναι μεταφερόμενοι, υψηλού πολυμορφισμού, πολυαλληλικοί, βασιζόμενοι στην τεχνολογία PCR, συνεπικρατείς δείκτες και σχετικά απλοί στην εφαρμογή (Rafalski *et al.*, 1996). Τέτοια χαρακτηριστικά δικαιολογούν τη μεγάλη αρχική προσπάθεια που απαιτείται για τη δημιουργία των SSR δεικτών καθώς είναι απαραίτητες σχετικές πληροφορίες με την αλληλουχία (Morgante *et al.*, 1998).

Τέλος, πρόσφατα στην ελιά έχουν εφαρμοσθεί επιτυχώς οι δείκτες SCARs (Busconi *et al.*, 2006) και SNPs (Reale *et al.*, 2006).

Οι Ελληνικές ποικιλίες ελιάς που έχουν καταγραφεί ξεπερνούν τις 40 (αν εξαιρέσουμε τις κλωνικές επιλογές) και έχουν εξελιχθεί μέσα στους αιώνες έτσι ώστε να ταιριάζουν στις τοπικές συνθήκες. Ο μεγάλος αυτός αριθμός ποικιλιών αποδεικνύει και το γενετικό πλούτο της περιοχής. Όσον αφορά την Ελληνική επιστημονική κοινότητα, έχουν γίνει αξιόλογες προσπάθειες διάκρισης των Ελληνικών ποικιλιών με βάση, αρχικά, τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Αναγνωστόπουλος, 1939; Pontikis, 2000) και στη συνέχεια, με βιοχημικούς δείκτες/ισοένζυμα (Pontikis *et al.*, 1980). Η προσπάθεια διαχωρισμού των ποικιλιών με βιοχημικούς δείκτες/ισοένζυμα (Pontikis *et al.*, 1980) ήταν απαλλαγμένη από τα μειονεκτήματα των μορφολογικών χαρακτήρων αλλά παρουσίαζε άλλα προβλήματα όπως την ανάγκη χρήσης πολύ μεγάλου αριθμού ισοενζύμων κ.ά.

Όσον αφορά τους μοριακούς δείκτες, οι εργασίες που ασχολούνται με τη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας της ελιάς στον Ελλαδικό χώρο είναι περιορισμένες. Οι Hagidimitriou *et al.* (2005) μελετώντας 26 Ελληνικές και οκτώ ξένες ποικιλίες μελέτησαν τη γενετική σχέση ανάμεσά τους επιλέγοντας AFLP και RAPD εκκινητές. Οι Α. Λίνος και Μ. Χατζηδημητρίου (2007), χρησιμοποίησαν τη μέθοδο των RAPD εκκινητών στην ταυτοποίηση και μελέτη της παραλλακτικότητας μητρικών φυτών ελιάς σε φυτώρια και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε κρίνεται επαρκής για την ταυτοποίηση των μητρικών φυτών, τη μελέτη της ενδοποικιλιακής ομοιομορφίας και την ξεκάθαρη διαφοροποίηση των ποικιλιών.

Η επιλογή της καταλληλότερης τεχνικής που ταιριάζει σε κάθε ερευνητική εργασία δεν είναι εύκολη και εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων που περιλαμβάνουν το σκοπό της έρευνας, τη βιολογία των ειδών και τις διαθέσιμες πηγές. Η καλύτερη κατανόηση της αποτελεσματικότητας των διαφόρων μοριακών δεικτών αποτελεί προτεραιότητα για το χαρακτηρισμό και την ταξινόμηση του γενετικού υλικού της ελιάς ενώ είναι προαπαιτούμενη για πιο αποτελεσματικά προγράμματα βελτίωσης.

1.8. Σκοπός Του Πειράματος

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είχε ως στόχο την ανίχνευση ενδοποικιλιακών διαφορών στις Ελληνικές ποικιλίες ελιάς 'Καλαμών' και 'Κορωνέικη' εφαρμόζοντας δύο διαφορετικές μοριακές μεθόδους, εκείνες των δεικτών RAPDs και ISSRs. Επιπλέον, έγινε σύγκριση των δύο μεθόδων ως προς το βαθμό της διαχωριστικής τους ικανότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Φυτικό Υλικό

Το φυτικό υλικό από το οποίο απομονώθηκε το DNA συλλέχθηκε από πέντε περιοχές της Ελλάδας και μια περιοχή της Κύπρου (*Εικόνα 2.1*). Συλλέχθηκαν συνολικά είκοσι επτά (27) δείγματα εκ των οποίων δεκατρία (13) ανήκαν στην ποικιλία 'Κορωνέικη' και δεκατέσσερα (14) στην ποικιλία 'Καλαμών', όπως φαίνεται στον *Πίνακα 2.1*. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τρία τυχαία σημεία της κόμης του δένδρου με μεγάλη προσοχή ώστε να αποτελούνται από την πιο νεαρή και υγιή βλάστηση. Αμέσως μετά τη συλλογή, τα νεαρά φύλλα τοποθετήθηκαν σε αλουμινόχαρτο και στη συνέχεια σε φορητό ψυγείο. Τέλος, μεταφέρθηκαν το συντομότερο δυνατό στο εργαστήριο Δενδροκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών όπου καταψύχθηκαν στους -20°C.



Εικόνα 2.1. Μητρική φυτεία Κυβερνητικής Έπαυλης Αχέλειας - Κρατική Συλλογή Κύπρου

Πίνακας 2.1. Περιοχές συλλογής, αριθμός δένδρων ανά περιοχή και ημερομηνία συλλογής των δειγμάτων του πειράματος

Περιοχή	Ποικιλία	Αριθμός δένδρων/δείγμα	Ημερομηνία συλλογής
Κύπρος (Κυβερνητική Έπαυλη Αχέλειας) Κρατική Συλλογή	‘Κορωνέικη’	1	30/04/2009
Κύπρος (Κυβερνητική Έπαυλη Αχέλειας) Κρατική Συλλογή	‘Καλαμών’	3	30/04/2009
Λιανοκλάδι Φθιώτιδας	‘Κορωνέικη’	2	28/04/2009
Λιανοκλάδι Φθιώτιδας	‘Καλαμών’	1	28/04/2009
Καλαμάτα (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.)	‘Κορωνέικη’	2	30/04/2009
Καλαμάτα (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.)	‘Καλαμών’	3	30/04/2009
Κρήτη (Ινστιτούτο Ελιάς και Υποτροπικών Φυτών Χανίων) Κρατική Συλλογή	‘Κορωνέικη’	4	11/05/2009
Κρήτη (Ινστιτούτο Ελιάς και Υποτροπικών Φυτών Χανίων) Κρατική Συλλογή	‘Καλαμών’	2	11/05/2009
Πόρος	‘Κορωνέικη’	3	16/05/2009
Πόρος	‘Καλαμών’	2	16/05/2009
Γ.Π.Α.	‘Κορωνέικη’	1	18/05/2009
Γ.Π.Α.	‘Καλαμών’	3	18/05/2009

2.2. Εκκινητές

Στα πλαίσια της μοριακής ανάλυσης δοκιμάστηκαν συνολικά τριάντα δεκαμερείς εκκινητές RAPDs και δέκα δεκαμερείς εκκινητές ISSRs από τους οποίους επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τελικά δέκα εκκινητές RAPDs και έξι εκκινητές ISSRs. Τα ονόματα και οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα και η αλληλουχία των βάσεων κάθε εκκινητή

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' → 3'
RAPD	
RI - 4	ATACACCAGC
RAPD - 1	TCCGCAACCA
OPAH - 17	CAGTGGGGAG
OPB - 11	GTAGACCCGT
RAPD - 13	CACCACCACC
OPG - 5	CTGAGACGGA
OPA - 9	GGGTAACGCC
RI - 5	TTGCGTCATG
RAPD - 3	GTAGACCCGT
OPB - 1	GTTTCGCTCC
ISSR	
UBC - 842	(GA) ₈ G
UBC - 826	(AC) ₈ C
UBC - 856	(GGAGA) ₃
UBC - 844	(CT) ₈ RC
UBC - 825	(AC) ₈ T
UBC - 818	(CA) ₈ G

2.3. ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Φυγόκεντρος (Heraeus instruments Labofuge 400)
- Απαγωγός εστία
- Μικροφυγόκεντρος (Hermle Z160M) (Εικ. 2.2)
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή στροβιλίσματος (Vortex)
- pH meter (Jen Way 3310)
- Ζυγαριά ακριβείας (Kern 410)
- Ζυγαριά ακριβείας (Kern 470)
- Θερμικός αναδευτήρας (Snijders Hotplate 34532 Stirrer)
- Συσκευή PCR (Sensoquest, LabCycler Standard) (Εικ. 2.3)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Clever Multisub Maxi) (Εικ. 2.4)
- Τροφοδοτικό ρεύματος (Consort E865) (Εικ. 2.5)
- Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UVP) (Εικ. 2.6)
- Κάλυμμα (Hood) (Εικ. 2.7)
- Φωτογραφική μηχανή (Canon A630) (Εικ. 2.8)
- Φασματοφωτόμετρο (Unicam Helios γ) (Εικ. 2.9)



Εικόνα 2.2 Μικροφυγόκεντρος



Εικόνα 2.3 Συσκευή PCR



Εικόνα 2.4 Συσκευή ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 2.5 Τροφοδοτικό ρεύματος



Εικόνα 2.6 Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας



Εικόνα 2.7 Κάλυμμα (Hood)



Εικόνα 2.8 Φωτογραφική μηχανή



Εικόνα 2.9 Φασματοφωτόμετρο

2.4. Απομόνωση DNA

Οι φυτικοί ιστοί περιέχουν, εκτός από το DNA, διάφορες προσμίξεις (RNA, χρωστικές, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες κ.ά.), οι οποίες πρέπει να απομακρυνθούν ώστε να απομονωθεί καθαρό DNA, κατάλληλο για τις αντιδράσεις PCR. Στο παρόν πείραμα η απομόνωση έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο CTAB (Doyle & Doyle, 1987), τροποποιημένη σε ορισμένα σημεία ώστε να δώσει την επιθυμητή ποσότητα και καθαρότητα DNA.

Το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού έδωσε τιμές ενδεικτικές της καθαρότητας και της συγκέντρωσης του DNA. Ο λόγος της απορρόφησης A_{260}/A_{280} κυμάνθηκε μεταξύ 1,18 και 1,79.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

- Τοποθετείται η αιθανόλη στους -20°C .
- Ενεργοποιείται το υδατόλουτρο στους 65°C .
- Τα διαλύματα CTAB 2% και 5% τοποθετούνται στους 65°C .
- Τα νεαρά φύλλα (3-5 gr νεαρού ιστού ελιάς) τοποθετούνται στο γουδί, προστίθεται ποσότητα υγρού αζώτου και ομογενοποιούνται.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε falkon των 50ml.
- Προστίθενται 10ml διαλύματος 2% CTAB extraction buffer και το δείγμα ανακινείται μέχρι να ομογενοποιηθεί.
- Το δείγμα τοποθετείται για επώαση 60 λεπτά στους 65°C στο υδατόλουτρο και αναδεύεται περιοδικά (περίπου κάθε 10 λεπτά).
- Ακολούθως προστίθεται CIAA (chloroform iso amyl alcohol) 24:1 (24 chloroform : 1 iso amyl alcohol) ίσου όγκου με το CTAB 2% που προσθέσαμε αρχικά στο falkon. Το δείγμα αναδεύεται πολύ αργά για να ομογενοποιηθεί.
- Φυγοκέντριση για 6 λεπτά στις 3000 rpm.
- Λήψη της επάνω φάσης και μεταφορά της σε νέο falkon 50ml.
- Στα νέα falkons προστίθενται CTAB 5% ίσο με το 1/5 του όγκου που λήφθηκε και CIAA ίσο με το σύνολο των 2 προηγούμενων.
- Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση.

- Φυγοκέντριση για 6 λεπτά στις 3.000 rpm.
- Λήψη της άνω φάσης και μεταφορά της σε νέα falkon 50ml.
- Στα falkons προστίθενται 2 όγκοι διαλύματος 95% ethanol (παγωμένη) για κατακρήμνιση.
- Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση. Δημιουργείται ένα ελαφρύ ίζημα.
- Το ίζημα συλλέγεται και μεταφέρεται σε erendorfs.
- Στα erendorfs προστίθενται 500 μl TE.
- Τα erendorfs τοποθετούνται στην κατάψυξη στους -20°C.

2.5. Καθαρισμός DNA

- Ενεργοποιείται το υδατόλουτρο στους 37°C.
- Στα δείγματα προστίθενται 7-8 μl RNAase (συγκέντρωση 10 mg/ml).
- Τα δείγματα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο για 1 ώρα.
- Αφού βγουν τα δείγματα από το υδατόλουτρο, προστίθενται 500 μl (ίση ποσότητα με το TE που προστέθηκε) φαινόλης.
- Τα δείγματα ανακινούνται ελαφριά μέχρι να γίνουν γαλακτώδη.
- Φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 5 λεπτά στις 14.000 rpm.
- Λήψη της άνω φάσης και μεταφορά σε νέα erendorfs.
- Επανάληψη του καθαρισμού με φαινόλη για δεύτερη φορά.
- Μεταφορά της άνω φάσης σε νέα erendorfs.
- Προστίθενται 250 μl φαινόλης και 250 μl CIAA.
- Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 14.000 rpm.
- Λήψη της άνω φάσης και μεταφορά σε νέα erendorfs.
- Προστίθεται 1 όγκος CIAA (ίσος όγκος με την άνω φάση που έχει ληφθεί).
- Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 14.000 rpm.
- Λήψη της άνω φάσης και μεταφορά σε νέα erendorfs.
- Προστίθεται το 1/10 του υπάρχοντος στα erendorfs όγκου Sodium Acetate και περίπου δύομιση φορές όγκος παγωμένης αιθανόλης (absolute).
- Τα δείγματα μεταφέρονται στους -20°C για περίπου 30 λεπτά.
- Φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στις 14.000 rpm.

- Απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης και διατήρηση του στερεού υπολείμματος.
- Προσθήκη 200 μl TE και αναμονή μέχρι να διαλυθεί το στερεό υπόλειμμα.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στους -20°C.

2.6. Ποσοτικός Προσδιορισμός Του DNA

Η φασματοφωτομετρική μέθοδος, η μέτρηση δηλαδή της απορρόφησης του υπεριώδους φωτός από τις βάσεις των πυρινηκών οξέων, χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους - ορατού Unicam Helios γ. Ο λόγος της απορρόφησης του οργάνου A_{260}/A_{280} έδωσε τιμές ενδεικτικές της καθαρότητας του DNA ενώ η απορρόφηση στα 260nm έδωσε τη συγκέντρωση. Οι αραιώσεις στα δείγματα, τελικής συγκέντρωσης 25ng/μl, έγιναν βασιζόμενες στις μετρήσεις του φασματοφωτόμετρου ώστε να χρησιμοποιηθούν στις αντιδράσεις της PCR.

2.7. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για τα RAPDs, κάθε αντίδραση PCR περιείχε 25ng DNA, 1 X PCR ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), 300 μM MgCl₂, 270 μM dNTPs, 1 μM εκκινητή και 3,3 U *Taq* πολυμεράση. Ο όγκος της αντίδρασης συμπληρώθηκε με δις απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό (ddH₂O) έως τον τελικό όγκο των 30μl.

Ο πολλαπλασιασμός του DNA έγινε σε θερμοκυκλικό μηχάνημα PCR με τις εξής συνθήκες: αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 2 min ακολουθούμενη από 30 κύκλους της αντίδρασης οι οποίοι χωρίζονται σε τρία επιμέρους στάδια, θέρμανση στους 94°C για 45 sec, πτώση της θερμοκρασίας στους 38°C για 1 min ώστε να υβριδίσει ο εκκινητής και τέλος άνοδος στους 72°C για 2 min όπου πραγματοποιείται η επιμήκυνση του εκκινητή για τη σύνθεση των νέων κλώνων. Μετά την ολοκλήρωση των απαιτούμενων κύκλων, η θερμοκρασία παρέμεινε στους 72°C για 7 min ώστε να πραγματοποιηθεί η τελική επιμήκυνση των νέων

κλώνων. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα παραγόμενα προϊόντα διατηρήθηκαν στους 10°C.

Για τα ISSRs, κάθε αντίδραση PCR περιείχε 25ng DNA, 1 X PCR ρυθμιστικό διάλυμα, 300 μM MgCl₂, 270 μM dNTPs, 1 μM εκκινητή και 3,3 U *Taq* πολυμεράση. Ο όγκος της αντίδρασης συμπληρώθηκε με δις απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό (ddH₂O) έως τον τελικό όγκο των 30μl.

Ο πολλαπλασιασμός του DNA έγινε σε θερμοκυκλικό μηχάνημα PCR με τις εξής συνθήκες: αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 5 min ακολουθούμενη από 40 κύκλους της αντίδρασης οι οποίοι χωρίζονται σε τρία επιμέρους στάδια, θέρμανση στους 94°C για 30 sec, πτώση της θερμοκρασίας στους 52°C για 45 sec ώστε να υβριδίσει ο εκκινητής και τέλος άνοδος στους 72°C για 2 min όπου πραγματοποιείται η επιμήκυνση του εκκινητή για τη σύνθεση των νέων κλώνων. Μετά την ολοκλήρωση των απαιτούμενων κύκλων, η θερμοκρασία παρέμεινε στους 72°C για 7 min ώστε να πραγματοποιηθεί η τελική επιμήκυνση των νέων κλώνων. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα παραγόμενα προϊόντα διατηρήθηκαν στους 12°C.

2.8. Παρασκευή Πηκτής Αγαρόζης

Για τα RAPDs χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αγαρόζης 2,5%. Σε κωνική φιάλη προστέθηκαν 2,5gr αγαρόζης σε 100ml ρυθμιστικού διαλύματος 1 X TAE. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε στο φούρνο μικροκυμάτων όπου το περιεχόμενο της, ενώ βράζει, ανακινείται ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως. Μετά τη διάλυση, το διάλυμα αφέθηκε να κρυώσει μέχρι να γίνει ανεκτό στο ανθρώπινο χέρι και στη συνέχεια τοποθετήθηκε μέσα στη λεκάνη της ηλεκτροφόρησης, όπου επίσης τοποθετήθηκε και το ειδικό κτενάκι για το σχηματισμό των 'πηγαδιών'. Το διάλυμα αφέθηκε να πήξει και τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου αφαιρέθηκε το κτενάκι, στη θέση του οποίου δημιουργούνται τα 'πηγάδια', μέσα στα οποία θα προστεθεί το μίγμα ης PCR αντίδρασης.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για την παρασκευή διαλύματος αγαρόζης 2,5% όπου διαχωρίστηκαν τα προϊόντα της PCR για τους ISSRs εκκινητές.

2.9. Ηλεκτροφόρηση

Ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR έγινε σε πηκτή αγαρόζης 2,5%, για τους RAPD και ISSR εκκινητές, βυθισμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE. Σε κάθε 'πηγάδι' της πηκτής φορτώθηκε δείγμα όγκου 18μl. Για την ανάλυση των δειγμάτων στην πηκτή εφαρμόστηκε ρεύμα τάσης 70 Volt για 3 ώρες.

Το διαχωρισμό των προϊόντων ακολούθησε χρώση της πηκτής αγαρόζης σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και στη συνέχεια φωτογράφιση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας με τη φωτογραφική μηχανή Canon A630. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε βασιζόμενη σ' αυτές τις φωτογραφίες.

Για κάθε εκκινητή κατασκευάστηκε μήτρα στην οποία εντοπίστηκαν τα ενισχυμένα τμήματα του DNA, η παρουσία ή απουσία των οποίων δηλώνονταν με το συμβολισμό 1 ή 0 αντίστοιχα.

2.10. Αριθμητική Ανάλυση Των Δεδομένων

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου NTSYS pc 2.2i (Rohlf, 1998). Η συγγένεια μεταξύ των δειγμάτων προσδιορίστηκε με βάση τον συντελεστή ομοιότητας του *Jaccard*, όπως αυτός ορίζεται και περιγράφεται από τους Sneath and Sokal (1973). Ο συντελεστής αυτός χρησιμοποιείται ευρέως για κυρίαρχους δείκτες, όπως είναι και οι δείκτες RAPD και ISSR που εφαρμόστηκαν στο πείραμα, και δίνεται από τον τύπο:

$$J_{ij} = a / (n - d)$$

Έτσι, συγκρίνοντας δύο διαφορετικά δείγματα, τα a και d εκφράζουν ταυτόχρονη παρουσία (a) ή απουσία (d) των δύο ενισχυμένων ζωνών DNA. Αντίστοιχα, υπάρχουν άλλες δύο περιπτώσεις όπου μπορεί να υπάρχει παρουσία μιας ενισχυμένης ζώνης στο ένα δείγμα και απουσία της στο άλλο. Εκεί έχουμε τις περιπτώσεις c και b . Το άθροισμα των $a+b+c+d$ συμβολίζεται με το γράμμα n .

Σχηματικά αυτό παρουσιάζεται στο σχέδιο που ακολουθεί όπου υπάρχουν όλες οι δυνατές περιπτώσεις (a , b , c , d) για δύο ενισχυμένες ζώνες DNA σε δύο δείγματα i και j .

		j	
		+	-
i	+	a	b
	-	c	d

Με βάση το συντελεστή ομοιότητας του *Jaccard* κατασκευάζεται μια μήτρα ομοιότητας (πίνακας των γενετικών αποστάσεων) από την οποία αντλούνται τα στοιχεία για την ανάλυση συστάδων (cluster analysis) με τις μεθόδους UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means), N.J. (Neigbor – joining method, Saitou and Nei, 1987) και την Ανάλυση των Κυρίων Συντεταγμένων (PCOORDA) (Principal Coordinate Analysis, Sneath and Sokal, 1973).

Σύμφωνα με τους Saitou and Nei (1987), η μέθοδος UPGMA χρησιμοποιείται κυρίως σε μελέτες μοριακών δεικτών, όπου η ομαδοποίηση ξεκινά από τα πιο κοντινά δείγματα και συνεχίζει στα υπόλοιπα ενώ η μέθοδος N.J. δίνει πιο αντιπροσωπευτικό δενδρόγραμμα ως προς την πραγματική ομαδοποίηση των δειγμάτων.

Η Ανάλυση των Κυρίων Συντεταγμένων (PCOORDA) είναι μια μέθοδος πολυμεταβλητής ανάλυσης δεδομένων (Multivariate Data Analysis). Μέσω της μεθόδου αυτής απεικονίζεται η σχέση μεταξύ δειγμάτων σ' ένα ή περισσότερους άξονες (Beer *et al.*, 1993). Κάθε άξονας περιγράφει μέρος του ποσοστού της παραλλακτικότητας. Όσο λιγότερο διαφέρουν τα δεδομένα, δηλαδή όσο πιο συγγενικό είναι το υλικό, τόσο μεγαλύτερο ποσοστό της παραλλακτικότητας περιγράφει ο κάθε άξονας. Οπότε, με μικρό αριθμό αξόνων δύναται να προσδιοριστεί μεγάλο ποσοστό της παραλλακτικότητας. Με κάθε επιπλέον άξονα που προστίθεται, αυξάνεται το ποσοστό της παραλλακτικότητας που

περιγράφεται, δηλαδή, δίνεται μια νέα πληροφορία για το υλικό, οπότε, αυτό προσδιορίζεται πληρέστερα (Wickens, 1995; Morrison, 1990).

Για τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής του Mantel (1967). Ο συντελεστής αρχικά χρησιμοποιήθηκε για συγκρίσεις δεδομένων από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές αλλά ο Sokal (1979) έδειξε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για βιολογικά δεδομένα.

Ο συντελεστής του Mantel δίνεται από τον τύπο:

$$Z = \sum_{i < j}^n X_{ij} Y_{ij}$$

Όπου X_{ij} και Y_{ij} είναι τα δεδομένα δύο μη διαγώνιων μητρών X και Y . Κατά τη διαδικασία σύγκρισης, κάθε δεδομένο της μήτρας X συγκρίνεται με το αντίστοιχο της μήτρας Y . Όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής, τόσο περισσότερο μοιάζουν οι δύο μήτρες.

Στο παρόν πείραμα, ο συντελεστής του Mantel χρησιμοποιήθηκε για δύο είδη συγκρίσεων:

- i. Στη σύγκριση των δύο τεχνικών (RAPD και ISSR) μεταξύ τους και
- ii. Με τη χρήση των συν-φαινομενολογικών συντελεστών εξετάστηκε πόσο αντιπροσωπευτική ήταν η γραφική απεικόνιση των δεδομένων της μήτρας. Οι συν-φαινομενολογικοί (cophenetic) συντελεστές (Rohlf and Sokal, 1981) δημιουργούν μια συμμετρική μήτρα η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιείται για τις συγκρίσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ενισχυμένες Ζώνες DNA

Με βάση τις μετρήσεις που έδωσε το φασματοφωτόμετρο, οι συγκεντρώσεις του DNA στα είκοσι επτά δείγματα κυμάνθηκαν από 60 ng/μl έως 2.300 ng/μl ενώ οι λόγοι καθαρότητας κυμάνθηκαν από 1,182 έως 1,790. Στον *Πίνακα 3.1.* παρουσιάζονται οι μετρήσεις σύμφωνα με το φασματοφωτόμετρο.

Οι απομονώσεις του DNA από τα δείγματα έδωσαν επαρκή ποσότητα για τις αντιδράσεις της PCR. Μετά από δοκιμαστικές αντιδράσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA, 25ng, 50ng και 75ng, η ποσότητα των 25ng κρίθηκε ότι δίνει τα πιο ικανοποιητικά προϊόντα κατά τις αντιδράσεις PCR.

Ο σαφέστερος διαχωρισμός των προϊόντων της PCR επετεύχθη, κατόπιν πολλών δοκιμαστικών συνδυασμών της πυκνότητας στην πηκτική αγαρόζης και της ταχύτητας της ηλεκτροφόρησης, όταν η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε πηκτική αγαρόζης 2,5% με τάση 70 Volts για τρεις ώρες.

Πίνακας 3.1. Απορρόφηση DNA για τα 27 δείγματα του πειράματος

A/A	Δείγματα	260nm	280nm	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Ποσότητα DNA ng/μl
1	Κορ. Κρήτη-1	0,027	0,018	1,518	270
2	Κορ. Κρήτη-2	0,023	0,016	1,437	230
3	Κορ. Κρήτη-3	0,013	0,011	1,182	130
4	Κορ. Κρήτη-4	0,031	0,019	1,622	310
5	Κορ. Καλαμάτα-1	0,013	0,008	1,625	130
6	Κορ. Καλαμάτα-2	0,006	0,004	1,500	60
7	Κορ. Πόρος-G	0,031	0,012	1,631	190
8	Κορ. Πόρος Ιστοκ.	0,012	0,007	1,714	120
9	Κορ. Πόρος AGRO	0,025	0,015	1,666	250
10	Κορ. Φθιώτιδα-1	0,042	0,024	1,725	420
11	Κορ. Φθιώτιδα-2	0,047	0,028	1,682	470
12	Κορ. ΓΠΑ	0,040	0,023	1,770	400
13	Κορ. Κύπρος	0,023	0,015	1,533	230
14	Καλ. Κρήτη-1	0,052	0,030	1,710	520
15	Καλ. Κρήτη-2	0,045	0,028	1,587	450
16	Καλ. Καλαμάτα-1	0,027	0,016	1,687	270
17	Καλ. Καλαμάτα-2	0,035	0,022	1,590	350
18	Καλ. Καλαμάτα-3	0,013	0,008	1,625	130
19	Καλ. Πόρος-νάνα	0,024	0,015	1,600	240
20	Καλ. Πόρος-κοινή	0,036	0,021	1,714	360
21	Καλ. Φθιώτιδα	0,110	0,066	1,670	1100
22	Καλ. ΓΠΑ-1	0,036	0,023	1,580	360
23	Καλ. ΓΠΑ-2	0,230	0,141	1,635	2300
24	Καλ. ΓΠΑ-3	0,207	0,116	1,790	2070
25	Καλ. Κύπρος-1	0,029	0,018	1,611	290
26	Καλ. Κύπρος-2	0,024	0,015	1,600	240
27	Καλ. Κύπρος-3	0,058	0,034	1,705	580

Από τους συνολικά τριάντα εκκινητές RAPD και δέκα εκκινητές ISSR που δοκιμάστηκαν, επιλέχθηκαν τελικά δέκα εκκινητές RAPD και έξι εκκινητές ISSR καθώς έδωσαν ευκρινή αριθμό ενισχυμένων ζωνών και ικανοποιητικό πολυμορφισμό. Οι αλληλουχίες των δεκαέξι εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, όπως και τα αποτελέσματά τους, φαίνονται στον *Πίνακα 3.2*.

Σύμφωνα με τον *Πίνακα 3.2* ο συνολικός αριθμός των ενισχυμένων ζωνών DNA που έδωσαν οι RAPD εκκινητές ήταν 188 από τις οποίες οι 81 ήταν πολυμορφικές. Άρα, το ποσοστό πολυμορφισμού για αυτή την τεχνική ανήλθε στο 43%. Ο αριθμός των ενισχυμένων ζωνών που αντιστοιχεί σε κάθε εκκινητή κυμάνθηκε από 16 έως 21 ενώ οι αντίστοιχοι αριθμοί για τις πολυμορφικές ζώνες ήταν από 3 έως 12. Σε κάθε εκκινητή αντιστοίχησαν, κατά μέσο όρο, 18,8 ενισχυμένες ζώνες DNA εκ των οποίων 8,1 πολυμορφικές.

Ο OPAH-17 έδωσε τις περισσότερες ενισχυμένες ζώνες DNA, 21 ζώνες, ενώ ο εκκινητής που έδωσε τις λιγότερες ζώνες ήταν ο RAPD-3, ο οποίος έδωσε 16 ζώνες. Το μεγαλύτερο ποσοστό πολυμορφισμού παρουσίασε ο εκκινητής RI-5, με ποσοστό 67%, ενώ αντίθετα, το μικρότερο ποσοστό παρουσίασε ο RI-4 με 16%.

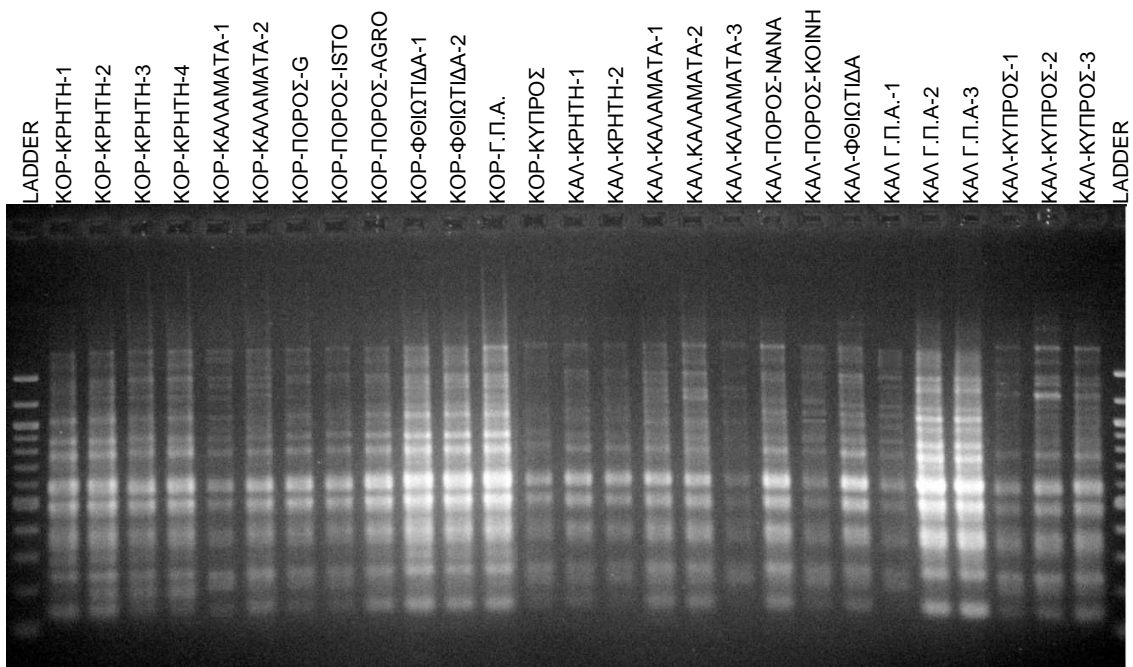
Αντίστοιχα, για τους ISSR εκκινητές, ο συνολικός αριθμός ενισχυμένων ζωνών DNA ήταν 104 εκ των οποίων οι 72 ήταν πολυμορφικές. Άρα, το ποσοστό πολυμορφισμού για αυτή την τεχνική ανήλθε στο 69%. Ο αριθμός των ενισχυμένων ζωνών που αντιστοιχεί σε κάθε εκκινητή κυμάνθηκε από 10 έως 21 ενώ οι αντίστοιχοι αριθμοί για τις πολυμορφικές ζώνες ήταν από 9 έως 18. Σε κάθε εκκινητή αντιστοίχησαν, κατά μέσο όρο, 17,3 ενισχυμένες ζώνες DNA εκ των οποίων 12 πολυμορφικές.

Το μεγαλύτερο αριθμό ενισχυμένων ζωνών έδωσαν οι εκκινητές UBC-842, UBC-826 και UBC-856 με 21 ζώνες ο καθένας. Αντίθετα, ο εκκινητής UBC-818 έδωσε 10 ζώνες, που ήταν και οι λιγότερες. Το μεγαλύτερο ποσοστό πολυμορφισμού παρουσίασε ο εκκινητής UBC-825, καθώς ανήλθε στο 100%. Ο εκκινητής UBC-826 έδωσε το μικρότερο ποσοστό πολυμορφισμού το οποίο αντιστοιχούσε στο 43% των ενισχυμένων ζωνών.

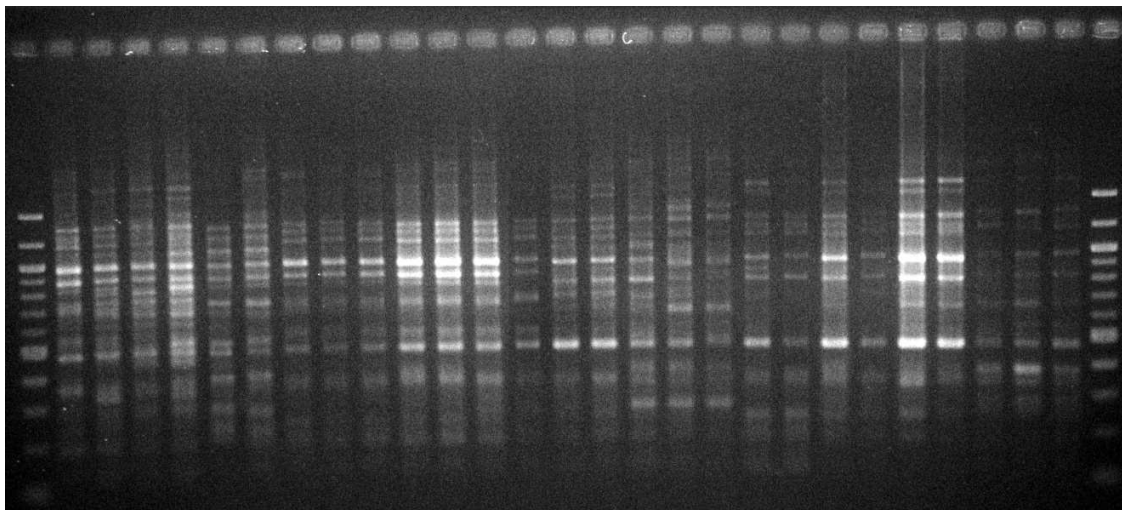
Πίνακας 3.2. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, η αλληλουχία των βάσεων κάθε εκκινητή και ο αριθμός των ενισχυμένων και πολυμορφικών ζωνών DNA για κάθε εκκινητή

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' → 3'	Αριθμός ενισχυμένων ζωνών	Αριθμός πολυμορφικών ζωνών	Ποσοστό πολυμορφισμού %
RAPD				
RI - 4	ATACACCAGC	19	3	16
RAPD - 1	TCCGCAACCA	18	11	61
ΟΡΑΗ - 17	CAGTGGGGAG	21	6	29
ΟΡΒ - 11	GTAGACCCGT	19	7	37
RAPD - 13	CACCACCACC	20	7	35
ΟΡΓ - 5	CTGAGACGGA	18	10	56
ΟΡΑ - 9	GGGTAACGCC	19	10	53
RI - 5	TTGCGTCATG	18	12	67
RAPD - 3	GTAGACCCGT	16	6	38
ΟΡΒ - 1	GTTTCGCTCC	20	9	45
Σύνολο:		188	81	43
ISSR				
UBC - 842	(GA) ₈ G	21	13	62
UBC - 826	(AC) ₈ C	21	9	43
UBC - 856	(GGAGA) ₃	21	11	52
UBC - 844	(CT) ₈ RC	19	18	95
UBC - 825	(AC) ₈ T	12	12	100
UBC - 818	(CA) ₈ G	10	9	90
Σύνολο:		104	72	69

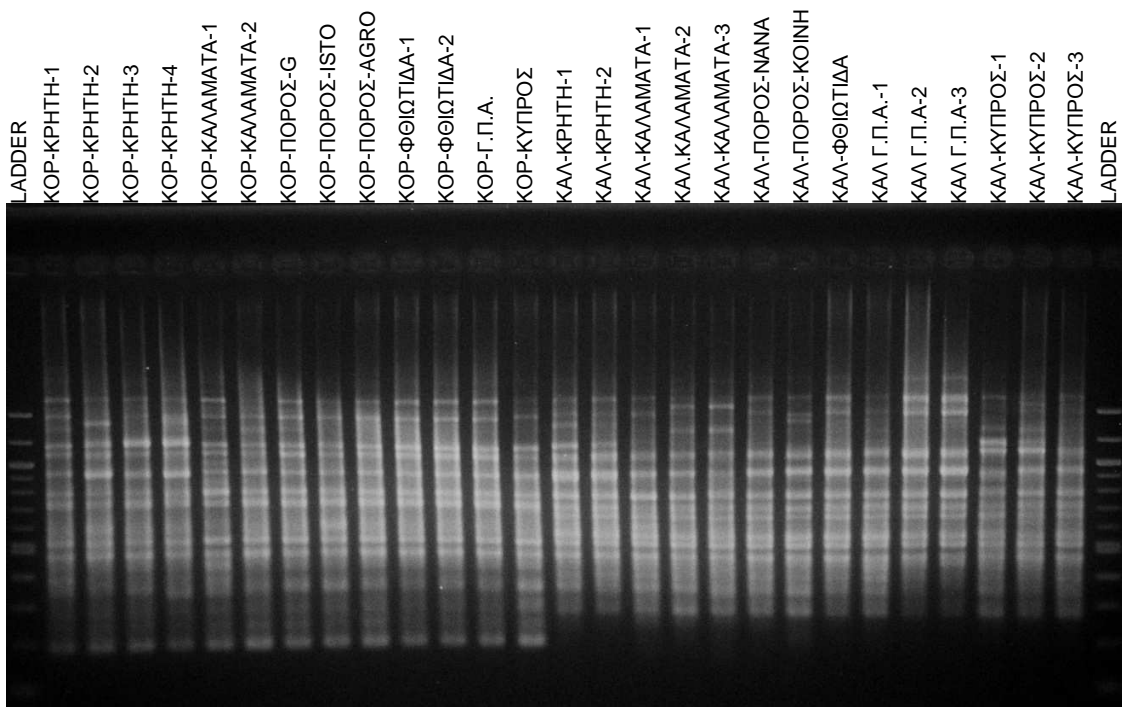
Στις *Εικόνες 3.1., 3.2., 3.3, 3.4.* φαίνονται τα αποτελέσματα των ΟΡΑΗ-17, RI-5, UBC-856 και UBC-826 εκκινητών αντίστοιχα. Στις εικόνες αναγράφονται τα ονόματα των δειγμάτων και τα πρότυπα μεγέθη των θραυσμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.



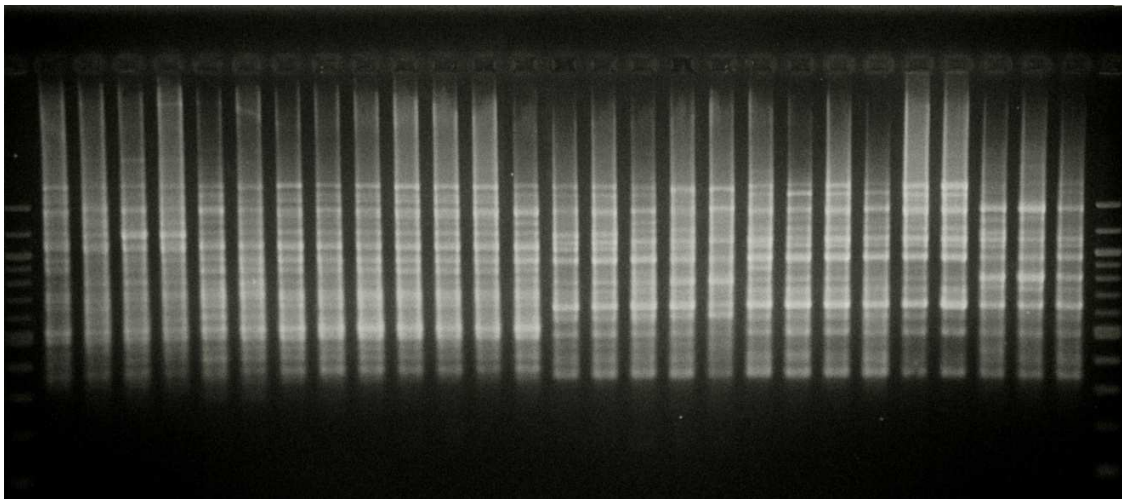
Εικόνα 3.1. Πηκτή αгарόζης των 27 δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή ORAH-17



Εικόνα 3.2. Πηκτή αгарόζης των 27 δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή RI-5



Εικόνα 3.3. Πηκτή αгарόζης των 27 δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή UBC-856



Εικόνα 3.4. Πηκτή αгарόζης των 27 δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή UBC-826

3.2. Ανάλυση Δεδομένων Με Το Συντελεστή Ομοιότητας Του Jaccard

Το πρώτο βήμα στην ανάλυση των δεδομένων είναι ο υπολογισμός του συντελεστή ομοιότητας του *Jaccard* για τα δείγματα ενώ στη συνέχεια ακολούθησε η ομαδοποίησή τους με βάση το συντελεστή ομοιότητας. Η ομαδοποίηση έγινε με τις μεθόδους UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means) και N.J. (Neighbor-joining).

Η ανάλυση των δεδομένων είχε ως αποτέλεσμα την κατασκευή μιας μήτρας ομοιότητας βασισμένη στο συντελεστή ομοιότητας του *Jaccard* (Sneath and Sokal, 1973) με $n=188$ για τους RAPD εκκινήτες και $n=104$ για τους ISSR (Πίνακας.3.2). Ο συντελεστής ομοιότητας μπορεί να λαμβάνει τιμές μεταξύ 0 και 1. Όσο πλησιέστερα βρίσκεται ο συντελεστής στην τιμή 1 τόσο τα δείγματα μοιάζουν γενετικά. Στην περίπτωση που ο συντελεστής πλησιάζει στην τιμή 0, αυξάνεται η γενετική διαφοροποίηση των δειγμάτων. Στην περίπτωση που η τιμή του συντελεστή ομοιότητας ισούται με 1, τότε τα δείγματα ταυτίζονται.

Η χρήση των συν-φαινομενολογικών συντελεστών και στη συνέχεια του συντελεστή του *Mantel* έδωσαν μια ένδειξη για το πόσο αντιπροσωπευτικό είναι το δενδρόγραμμα που προκύπτει με τη μέθοδο UPGMA σε σχέση με τα δεδομένα.

Η επεξεργασία της μήτρας ομοιότητας του *Jaccard* έδωσε επίσης και την Ανάλυση των Κύριων Συντεταγμένων (PCORDA). Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου παρουσιάζονται σε απεικόνιση δύο συντεταγμένων (2D).

Οι συντελεστές ομοιότητας των δειγμάτων, ως αποτέλεσμα της στατιστικής επεξεργασίας, παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.3, 3.4, 3.5.

Πίνακας 3.3. Ο συντελεστής ομοιότητας των δειγμάτων όπως προέκυψε με τη χρήση του συντελεστή του *Jaccard* για τα RAPD.
 Με C1, C2, ...C27 συμβολίζονται τα 27 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με τη σειρά που απεικονίζονται στον Πίνακα 3.1

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27
KOR-KRHHTH-1	1																										
KOR-KRHHTH-2	0,97	1																									
KOR-KRHHTH-3	0,95	0,98	1																								
KOR-KRHHTH-4	0,95	0,98	1,00	1																							
KOR-KALAMATA-1	0,94	0,93	0,93	0,93	1																						
KOR-KALAMATA-2	0,95	0,94	0,95	0,95	1,00	1																					
KOR-POROD-G	0,92	0,90	0,90	0,90	0,91	0,92	1																				
KOR-POROS-ISTO	0,92	0,90	0,89	0,89	0,90	0,91	0,97	1																			
KOR-POROS-AGRO	0,93	0,91	0,90	0,90	0,92	0,92	0,99	0,97	1																		
KOR-FTHIOTIDA-1	0,95	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,97	0,95	0,97	1																	
KOR-FTHIOTIDA-2	0,96	0,94	0,93	0,93	0,94	0,94	0,96	0,95	0,97	0,99	1																
KOR-GPA	0,95	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,94	0,95	0,97	0,98	1															
KOR-KYPROS	0,92	0,89	0,89	0,89	0,90	0,90	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	1														
KAL-KRHHTH-1	0,76	0,76	0,75	0,75	0,79	0,77	0,74	0,73	0,75	0,75	0,74	0,76	0,77	1													
KAL-KRHHTH-2	0,75	0,75	0,75	0,75	0,79	0,76	0,74	0,73	0,74	0,74	0,74	0,75	0,78	0,99	1												
KAL-KALAMATA-1	0,74	0,74	0,74	0,74	0,82	0,78	0,72	0,70	0,72	0,73	0,73	0,74	0,75	0,87	0,88	1											
KAL-KALAMATA-2	0,75	0,75	0,75	0,75	0,83	0,79	0,73	0,71	0,73	0,74	0,74	0,75	0,76	0,86	0,87	0,99	1										
KAL-KALAMATA-3	0,76	0,76	0,75	0,75	0,83	0,80	0,73	0,72	0,74	0,75	0,74	0,76	0,76	0,87	0,88	0,98	0,98	1									
KAL-POROS-NANA	0,71	0,71	0,70	0,70	0,74	0,71	0,76	0,73	0,75	0,75	0,74	0,75	0,75	0,86	0,87	0,83	0,82	0,82	1								
KAL-POROS-KOINH	0,73	0,72	0,72	0,72	0,76	0,73	0,77	0,75	0,78	0,77	0,76	0,77	0,77	0,89	0,89	0,84	0,83	0,83	0,96	1							
KAL-FTHIOTIDA	0,74	0,72	0,72	0,72	0,77	0,74	0,76	0,74	0,76	0,75	0,75	0,76	0,76	0,89	0,90	0,86	0,86	0,86	0,89	0,93	1						
KAL-GPA-1	0,73	0,71	0,71	0,71	0,77	0,74	0,73	0,71	0,73	0,73	0,73	0,75	0,76	0,89	0,90	0,84	0,83	0,83	0,86	0,87	0,92	1					
KAL-GPA-2	0,72	0,72	0,72	0,72	0,77	0,73	0,72	0,71	0,73	0,73	0,72	0,74	0,75	0,90	0,90	0,83	0,82	0,83	0,86	0,88	0,92	0,99	1				
KAL-GPA-3	0,71	0,71	0,71	0,71	0,77	0,72	0,72	0,70	0,73	0,73	0,72	0,73	0,74	0,88	0,89	0,82	0,81	0,82	0,86	0,87	0,92	0,98	0,99	1			
KAL-KYPROS-1	0,74	0,72	0,72	0,72	0,78	0,73	0,73	0,72	0,73	0,73	0,73	0,74	0,77	0,84	0,85	0,84	0,84	0,83	0,81	0,82	0,85	0,86	0,86	0,86	1		
KAL-KYPROS-2	0,75	0,73	0,72	0,72	0,78	0,74	0,74	0,72	0,74	0,74	0,73	0,75	0,77	0,85	0,85	0,84	0,84	0,84	0,82	0,82	0,86	0,87	0,86	0,86	0,99	1	
KAL-KYPROS-3	0,74	0,72	0,72	0,72	0,78	0,73	0,73	0,72	0,73	0,73	0,73	0,74	0,78	0,85	0,86	0,84	0,84	0,83	0,82	0,82	0,85	0,88	0,87	0,87	0,99	0,99	1

Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζεται η γενετική ομοιότητα των δειγμάτων σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έδωσαν οι εκκινητές RAPDs. Ο συντελεστής ομοιότητας του *Jaccard* κυμάνθηκε από 0,70 μέχρι 1,00.

Παρατηρείται ότι:

- Η μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των δειγμάτων:
 - 'Κορωνέικη-Κρήτη-4' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-3' (1,00),
 - 'Κορωνέικη-Καλαμάτα-2' και 'Κορωνέικη-Καλαμάτα-1' (1,00),
 - 'Κορωνέικη-Πόρος-AGRO' και 'Κορωνέικη-Πόρος-G' (0,99),
 - 'Κορωνέικη-Φθιώτιδα-1' και 'Κορωνέικη-Φθιώτιδα-2' (0,99),
 - 'Καλαμών-Κρήτη-1' και 'Καλαμών-Κρήτη-2' (0,99),
 - 'Καλαμών-Καλαμάτα-1' και 'Καλαμών-Καλαμάτα-2' (0,99),
 - 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-1' και 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-2' (0,99),
 - 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-2' και 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-3' (0,99),
 - 'Καλαμών-Κύπρος-2' και 'Καλαμών-Κύπρος-1' (0,99),
 - 'Καλαμών-Κύπρος-3' και 'Καλαμών-Κύπρος-1' (0,99) και τέλος,
 - 'Καλαμών-Κύπρος-3' και 'Καλαμών-Κύπρος-2' (0,99).

δείχνοντας ότι, σχεδόν, ταυτίζονται.

- Η μικρότερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των δειγμάτων:
 - 'Καλαμών-Καλαμάτα-1' και 'Κορωνέικη-Πόρος-ISTO' (0,70),
 - 'Καλαμών-Πόρος-Νάνα' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-3' (0,70),
 - 'Καλαμών-Πόρος-Νάνα' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-4' (0,70) και τέλος,
 - 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-3' και 'Κορωνέικη-Πόρος-ISTO' (0,70).

Μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας ποικιλίας η γενετική συγγένεια κυμάνθηκε ως εξής:

- Από τα δείγματα της ποικιλίας 'Κορωνέικη' μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των:
 - Κορωνέικη-Κρήτη-4' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-3' (1,00),
 - 'Κορωνέικη-Καλαμάτα-2' και 'Κορωνέικη-Καλαμάτα-1' (1,00),
- Αντίστοιχα, η μικρότερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των:
- 'Κορωνέικη-Πόρος-ISTO' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-3' (0,89),
 - 'Κορωνέικη-Πόρος-ISTO' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-4' (0,89),

- 'Κορωνέικη-Κύπρος' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-2' (0,89),
 - 'Κορωνέικη-Κύπρος' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-3' (0,89),
 - 'Κορωνέικη-Κύπρος' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-4' (0,89).
 - Όσον αφορά τα δείγματα της ποικιλίας 'Καλαμών' μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των:
 - 'Καλαμών-Κρήτη-1' και 'Καλαμών-Κρήτη-2' (0,99),
 - 'Καλαμών-Καλαμάτα-1' και 'Καλαμών-Καλαμάτα-2' (0,99),
 - 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-1' και 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-2' (0,99),
 - 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-2' και 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-3' (0,99),
 - 'Καλαμών-Κύπρος-2' και 'Καλαμών-Κύπρος-1' (0,99),
 - 'Καλαμών-Κύπρος-3' και 'Καλαμών-Κύπρος-1' (0,99) και τέλος,
 - 'Καλαμών-Κύπρος-3' και 'Καλαμών-Κύπρος-2' (0,99).
- Αντίστοιχα, η μικρότερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των:
- 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-3' και 'Καλαμών-Καλαμάτα-2' (0,81),
 - 'Καλαμών-Κύπρος-1' και 'Καλαμών-Πόρος-Νάνα' (0,81).

Πίνακας 3.4. Ο συντελεστής ομοιότητας των δειγμάτων όπως προέκυψε με τη χρήση του συντελεστή του *Jaccard* για τα ISSR.
 Με C1, C2, ...C27 συμβολίζονται τα 27 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με τη σειρά που απεικονίζονται στον Πίνακα 3.1

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27
KOR-KRHTH-1	1																										
KOR-KRHTH-2	0,97	1																									
KOR-KRHTH-3	0,97	0,97	1																								
KOR-KRHTH-4	0,99	0,99	0,96	1																							
KOR-KALAMATA-1	0,75	0,73	0,73	0,74	1																						
KOR-KALAMATA-2	0,77	0,75	0,75	0,76	0,95	1																					
KOR-POROD-G	0,80	0,78	0,78	0,79	0,88	0,88	1																				
KOR-POROS-ISTO	0,78	0,78	0,81	0,77	0,82	0,82	0,90	1																			
KOR-POROS-AGRO	0,86	0,86	0,86	0,84	0,80	0,80	0,88	0,92	1																		
KOR-FTHIOTIDA-1	0,85	0,85	0,85	0,84	0,84	0,86	0,87	0,86	0,93	1																	
KOR-FTHIOTIDA-2	0,85	0,85	0,85	0,84	0,84	0,86	0,87	0,86	0,93	1,00	1																
KOR-GPA	0,84	0,84	0,84	0,83	0,85	0,90	0,86	0,82	0,90	0,96	0,96	1															
KOR-KYPROS	0,72	0,72	0,74	0,71	0,80	0,82	0,80	0,81	0,79	0,81	0,81	0,84	1														
KAL-KRHTH-1	0,52	0,53	0,53	0,53	0,50	0,53	0,53	0,53	0,50	0,52	0,52	0,54	0,56	1													
KAL-KRHTH-2	0,53	0,54	0,54	0,54	0,51	0,54	0,54	0,54	0,51	0,53	0,53	0,55	0,57	0,99	1												
KAL-KALAMATA-1	0,54	0,52	0,54	0,53	0,54	0,57	0,57	0,52	0,49	0,53	0,53	0,56	0,56	0,84	0,86	1											
KAL-KALAMATA-2	0,53	0,52	0,53	0,53	0,55	0,58	0,58	0,53	0,50	0,54	0,54	0,57	0,57	0,83	0,84	0,99	1										
KAL-KALAMATA-3	0,53	0,51	0,53	0,52	0,56	0,59	0,57	0,52	0,49	0,53	0,53	0,56	0,58	0,82	0,83	0,97	0,99	1									
KAL-POROS-NANA	0,58	0,60	0,60	0,59	0,56	0,59	0,59	0,61	0,58	0,58	0,58	0,60	0,60	0,81	0,83	0,73	0,75	0,74	1								
KAL-POROS-KOINH	0,57	0,58	0,58	0,58	0,55	0,58	0,60	0,62	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,82	0,84	0,83	0,85	0,84	0,85	0,89	1						
KAL-FTHIOTIDA	0,57	0,57	0,58	0,56	0,55	0,58	0,60	0,62	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,82	0,84	0,83	0,85	0,84	0,85	0,89	1						
KAL-GPA-1	0,56	0,56	0,57	0,55	0,54	0,57	0,57	0,59	0,57	0,60	0,60	0,59	0,60	0,86	0,88	0,82	0,83	0,82	0,84	0,88	0,90	1					
KAL-GPA-2	0,56	0,56	0,57	0,55	0,54	0,57	0,59	0,61	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,85	0,86	0,81	0,82	0,81	0,85	0,89	0,91	0,96	1				
KAL-GPA-3	0,56	0,56	0,57	0,55	0,54	0,57	0,59	0,61	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,85	0,86	0,81	0,82	0,81	0,85	0,89	0,91	0,96	1,00	1			
KAL-KYPROS-1	0,63	0,61	0,62	0,62	0,61	0,63	0,58	0,54	0,55	0,56	0,56	0,60	0,63	0,82	0,83	0,87	0,85	0,87	0,76	0,77	0,77	0,78	0,78	0,78	1		
KAL-KYPROS-2	0,57	0,55	0,57	0,56	0,57	0,60	0,55	0,55	0,51	0,53	0,53	0,56	0,60	0,82	0,83	0,85	0,84	0,85	0,78	0,79	0,79	0,82	0,81	0,81	0,94	1	
KAL-KYPROS-3	0,56	0,54	0,56	0,55	0,57	0,61	0,57	0,54	0,51	0,53	0,53	0,56	0,60	0,88	0,89	0,88	0,87	0,89	0,77	0,80	0,80	0,86	0,84	0,84	0,92	0,93	1

Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζεται η γενετική ομοιότητα των δειγμάτων σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έδωσαν οι εκκινήτες ISSR. Ο συντελεστής ομοιότητας του *Jaccard* κυμάνθηκε από 0,49 μέχρι 1,00.

Παρατηρείται ότι:

- Η μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των δειγμάτων:
 - 'Κορωνέικη-Φθιώτιδα-1' και 'Κορωνέικη-Φθιώτιδα-2' (1,00), καθώς και
 - 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-3' και 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-2' (1,00).
- Η μικρότερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των δειγμάτων:
 - 'Καλαμών-Καλαμάτα-1' και 'Κορωνέικη-Πόρος-AGRO' (0,49), καθώς και
 - 'Καλαμών-Καλαμάτα-3' και 'Κορωνέικη-Πόρος-AGRO' (0,49).

Μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας ποικιλίας η γενετική συγγένεια κυμάνθηκε ως εξής:

- Από τα δείγματα της ποικιλίας 'Κορωνέικη' μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των:
 - 'Κορωνέικη-Φθιώτιδα-1' και 'Κορωνέικη-Φθιώτιδα-2' (1,00),
 - 'Κορωνέικη-Κρήτη-1' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-4' (0,99), καθώς και
 - 'Κορωνέικη-Κρήτη-2' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-4' (0,99).

Αντίστοιχα, η μικρότερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των:

- 'Κορωνέικη-Κύπρος' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-4' (0,71),
 - 'Κορωνέικη-Κύπρος' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-1' (0,72)
 - 'Κορωνέικη-Κύπρος' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-2' (0,72).
 - Όσον αφορά τα δείγματα της ποικιλίας 'Καλαμών' μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των:
 - 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-3' και 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-2' (1,00),
 - 'Καλαμών-Κρήτη-2' και 'Καλαμών-Κρήτη-1' (0,99),
 - 'Καλαμών-Καλαμάτα-2' και 'Καλαμών-Καλαμάτα -1' (0,99), καθώς και
 - 'Καλαμών-Καλαμάτα-2' και 'Καλαμών-Καλαμάτα -3' (0,99).
- Αντίστοιχα, η μικρότερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των:
- 'Καλαμών-Πόρος-Νάνα' και 'Καλαμών-Καλαμάτα-1' (0,73).

Πίνακας 3.5. Ο συντελεστής ομοιότητας των δειγμάτων όπως προέκυψε με τη χρήση του συντελεστή του *Jaccard* για το συνδυασμό RAPD και ISSR. Με C1, C2, ...C27 συμβολίζονται τα 27 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με τη σειρά που απεικονίζονται στον Πίνακα 3.1

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27
KOR-KRHTH-1	1																										
KOR-KRHTH-2	0,97	1																									
KOR-KRHTH-3	0,96	0,98	1																								
KOR-KRHTH-4	0,96	0,98	0,99	1																							
KOR-KALAMATA-1	0,87	0,85	0,86	0,86	1																						
KOR-KALAMATA-2	0,89	0,88	0,88	0,88	0,98	1																					
KOR-POROD-G	0,88	0,86	0,86	0,86	0,90	0,90	1																				
KOR-POROS-ISTO	0,88	0,86	0,86	0,85	0,87	0,88	0,95	1																			
KOR-POROS-AGRO	0,90	0,89	0,89	0,88	0,87	0,88	0,96	0,96	1																		
KOR-FTHIOTIDA-1	0,92	0,90	0,90	0,90	0,90	0,91	0,94	0,92	0,96	1																	
KOR-FTHIOTIDA-2	0,92	0,91	0,91	0,90	0,90	0,91	0,93	0,92	0,96	1,00	1																
KOR-GPA	0,91	0,90	0,90	0,90	0,90	0,92	0,92	0,90	0,93	0,97	0,97	1															
KOR-KYPROS	0,85	0,83	0,84	0,83	0,86	0,88	0,88	0,89	0,88	0,89	0,88	0,90	1														
KAL-KRHTH-1	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,69	0,67	0,67	0,66	0,67	0,67	0,68	0,70	1													
KAL-KRHTH-2	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,69	0,67	0,67	0,66	0,67	0,67	0,68	0,71	0,99	1												
KAL-KALAMATA-1	0,67	0,66	0,67	0,67	0,70	0,71	0,66	0,64	0,64	0,66	0,66	0,68	0,68	0,86	0,87	1											
KAL-KALAMATA-2	0,68	0,67	0,67	0,67	0,72	0,72	0,68	0,65	0,65	0,67	0,67	0,69	0,69	0,85	0,86	0,99	1										
KAL-KALAMATA-3	0,68	0,67	0,68	0,67	0,72	0,73	0,68	0,65	0,65	0,67	0,67	0,69	0,70	0,85	0,86	0,98	0,98	1									
KAL-POROS-NANA	0,66	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,70	0,69	0,69	0,69	0,69	0,70	0,70	0,84	0,85	0,80	0,80	0,79	1								
KAL-POROS-KOINH	0,67	0,67	0,67	0,67	0,68	0,67	0,70	0,70	0,70	0,70	0,69	0,70	0,70	0,87	0,87	0,82	0,81	0,81	0,96	1							
KAL-FTHIOTIDA	0,68	0,67	0,68	0,67	0,69	0,68	0,70	0,70	0,70	0,70	0,69	0,70	0,70	0,87	0,88	0,85	0,86	0,85	0,88	0,92	1						
KAL-GPA-1	0,67	0,66	0,67	0,66	0,68	0,68	0,67	0,67	0,68	0,69	0,68	0,69	0,70	0,88	0,89	0,83	0,83	0,83	0,85	0,87	0,92	1					
KAL-GPA-2	0,67	0,67	0,67	0,66	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,69	0,70	0,88	0,89	0,82	0,82	0,82	0,86	0,88	0,92	0,98	1				
KAL-GPA-3	0,66	0,66	0,66	0,66	0,68	0,67	0,68	0,67	0,68	0,68	0,68	0,68	0,69	0,87	0,88	0,82	0,81	0,81	0,86	0,88	0,92	0,97	0,99	1			
KAL-KYPROS-1	0,71	0,69	0,69	0,69	0,72	0,70	0,68	0,66	0,67	0,68	0,67	0,70	0,72	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,80	0,80	0,83	0,84	0,83	0,83	1		
KAL-KYPROS-2	0,69	0,67	0,67	0,67	0,70	0,69	0,67	0,66	0,65	0,66	0,66	0,68	0,71	0,84	0,85	0,84	0,84	0,84	0,80	0,81	0,83	0,85	0,85	0,84	0,98	1	
KAL-KYPROS-3	0,68	0,66	0,66	0,66	0,70	0,69	0,68	0,66	0,65	0,66	0,66	0,68	0,71	0,86	0,87	0,85	0,85	0,85	0,80	0,81	0,83	0,87	0,86	0,86	0,97	0,97	1

Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζεται η γενετική ομοιότητα των δειγμάτων σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έδωσε ο συνδυασμός RAPD & ISSR εκκινητών. Ο συντελεστής ομοιότητας του *Jaccard* κυμάνθηκε από 0,64 μέχρι 1,00.

Παρατηρείται ότι:

- Η μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των δειγμάτων:
 - 'Κορωνέικη-Φθιώτιδα-1' και 'Κορωνέικη-Φθιώτιδα-2' (1,00).
- Η μικρότερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των δειγμάτων:
 - 'Καλαμών-Καλαμάτα-1' και 'Κορωνέικη-Πόρος-ISTO' (0,64) και
 - 'Καλαμών-Καλαμάτα-1' και 'Κορωνέικη-Πόρος-AGRO' (0,64)

Μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας ποικιλίας η γενετική συγγένεια κυμάνθηκε ως εξής:

- Από τα δείγματα της ποικιλίας 'Κορωνέικη' μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των:
 - 'Κορωνέικη-Φθιώτιδα-1' και 'Κορωνέικη-Φθιώτιδα-2' (1,00) και
 - 'Κορωνέικη-Κρήτη-3' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-4' (0,99).

Αντίστοιχα, η μικρότερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των:

- 'Κορωνέικη-Κύπρος' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-2' (0,83) και
- 'Κορωνέικη-Κύπρος' και 'Κορωνέικη-Κρήτη-4' (0,83)
- Όσον αφορά τα δείγματα της ποικιλίας 'Καλαμών' μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των:
 - 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-3' και 'Καλαμών-Γ.Π.Α.-2' (0,99),
 - 'Καλαμών-Κρήτη-2' και 'Καλαμών-Κρήτη-1' (0,99), καθώς και
 - 'Καλαμών-Καλαμάτα-2' και 'Καλαμών-Καλαμάτα-1' (0,99).

Αντίστοιχα, η μικρότερη γενετική ομοιότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των:

- 'Καλαμών-Πόρος-Νάνα' και 'Καλαμών-Καλαμάτα-1' (0,80),
- 'Καλαμών-Πόρος-Νάνα' και 'Καλαμών-Καλαμάτα-2' (0,80),
- 'Καλαμών-Πόρος-Νάνα' και 'Καλαμών-Κύπρος-1' (0,80),
- 'Καλαμών-Πόρος-Κοινή' και 'Καλαμών-Κύπρος-1' (0,80),
- 'Καλαμών-Πόρος-Νάνα' και 'Καλαμών-Κύπρος-2' (0,80), καθώς και
- 'Καλαμών-Πόρος-Νάνα' και 'Καλαμών-Κύπρος-3' (0,80).

3.3. Κατασκευή Δενδρογραμμάτων

Για την παρούσα ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι μήτρες ομοιότητας οι οποίες προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων με το συντελεστή ομοιότητας *Jaccard*. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό NTSYS pc 2.02i. Οι *Πίνακες 3.3, 3.4, 3.5* με τις γενετικές αποστάσεις αναλύθηκαν με τις μεθόδους UPGMA, N.J. και την Ανάλυση των Κύριων Συντεταγμένων (PCORDA), από τις οποίες προέκυψαν τα δενδρογράμματα των *Εικόνων 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13*.

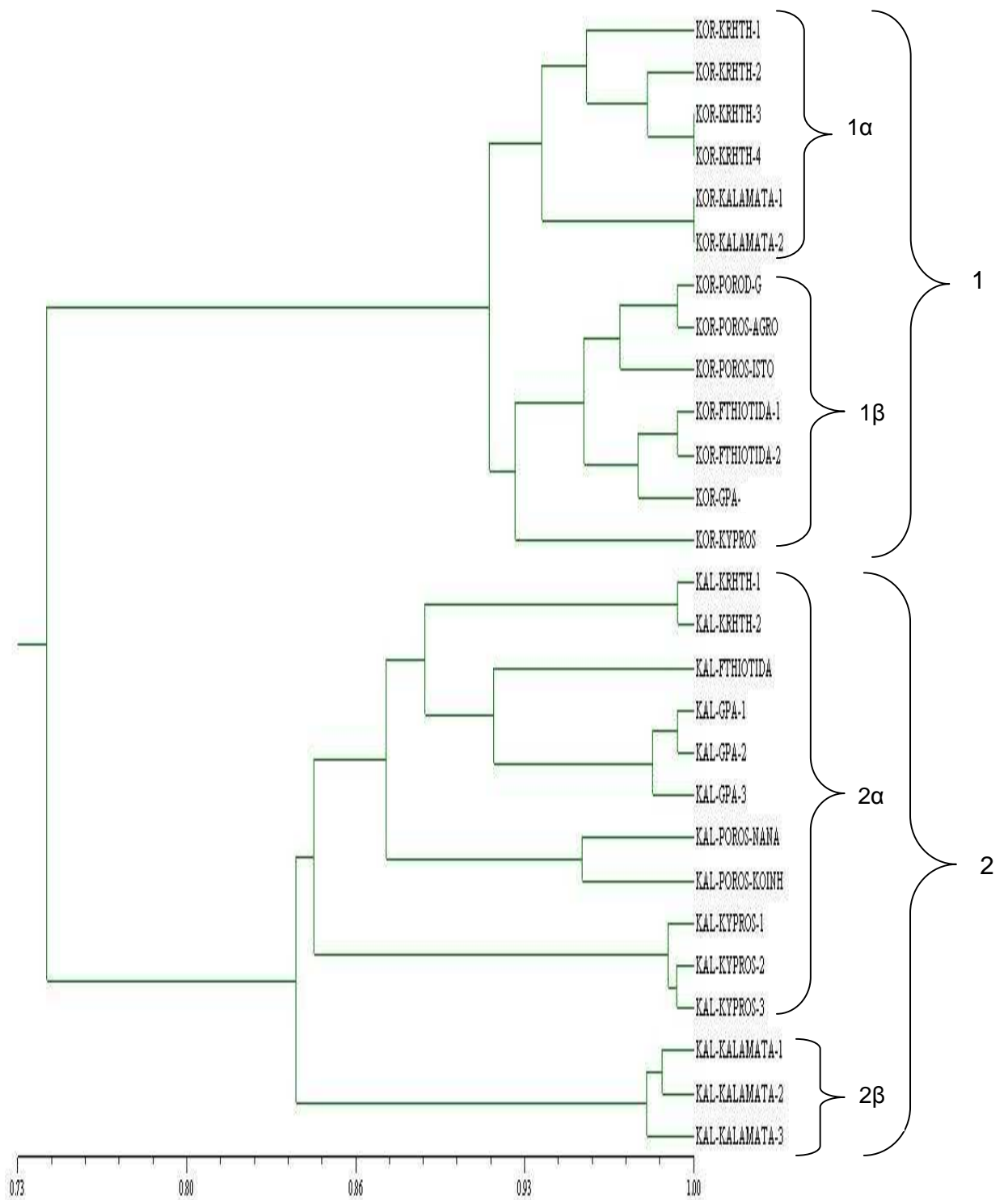
Τα δενδρογράμματα (*Εικόνα 3.5, 3.7 και 3.9*) που προέκυψαν με τη μέθοδο UPGMA αναπαριστούν δένδρα με ρίζα ενώ τα δενδρογράμματα (*Εικόνα 3.6, 3.8 και 3.10*) που προέκυψαν με τη μέθοδο N.J. αναπαριστούν δένδρα χωρίς ρίζα. Η ρίζα σ' ένα δένδρο δείχνει τον κοινό πρόγονο των ειδών που περιλαμβάνει ενώ συγχρόνως δηλώνεται η εξελικτική κατεύθυνση και τα εξελικτικά μονοπάτια μέσω των οποίων ένα ή περισσότερα είδη προήλθαν από κάποιο άλλο. Στα δενδρογράμματα (*Εικόνα 3.6, 3.8 και 3.10*) παρουσιάζονται μόνο οι πιθανές εξελικτικές σχέσεις συγγένειας των ειδών αφού πρόκειται για δένδρα χωρίς ρίζα.

Στα δένδρογράμματα RAPD – UPGMA (Εικόνα 3.5) και RAPD – N.J. (Εικόνα 3.6) παρατηρείται ότι:

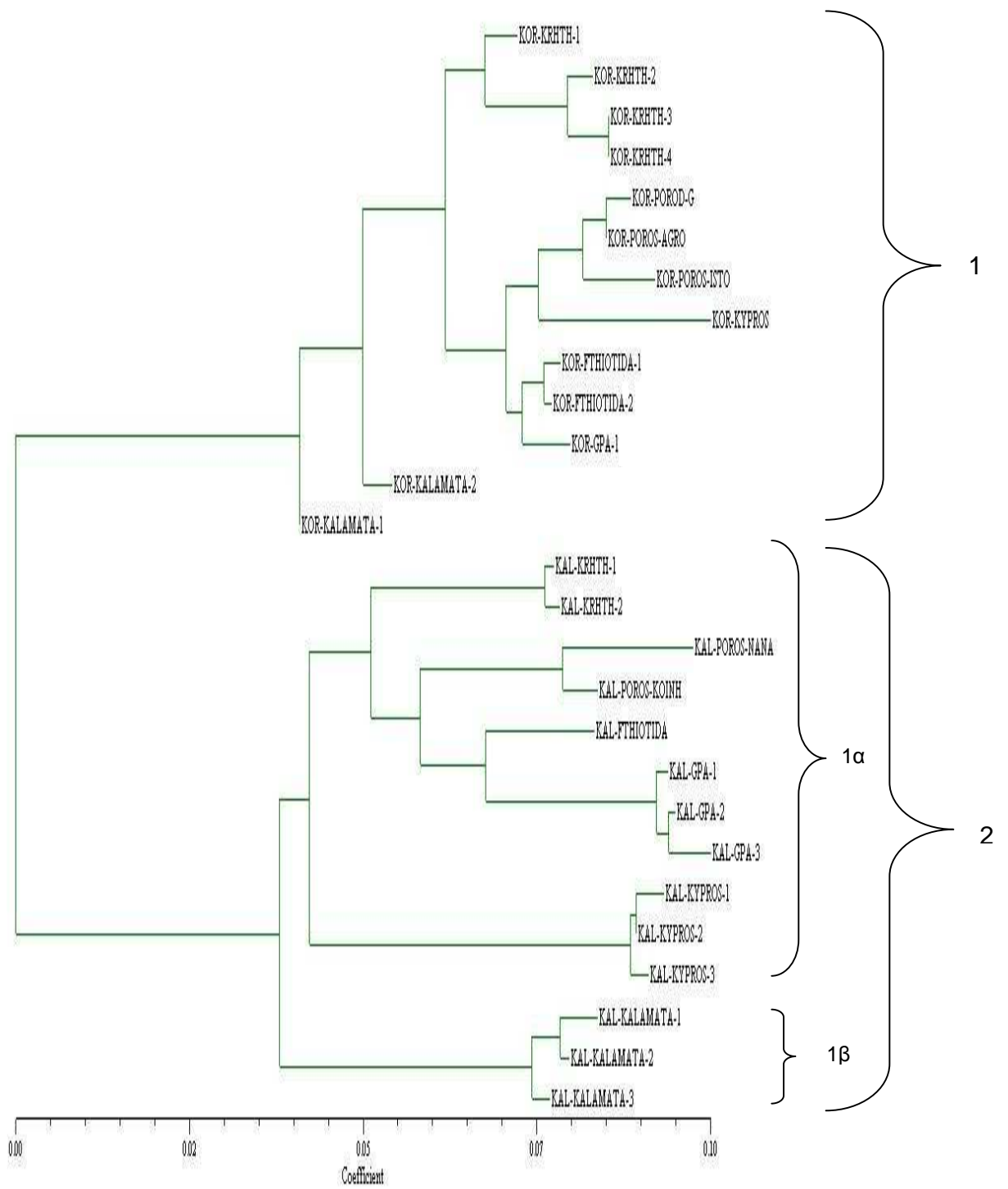
Στο δένδρογράμμα RAPD – UPGMA (Εικόνα 3.5) παρουσιάζεται διαχωρισμός των δειγμάτων σε 2 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα εντάσσονται όλα τα δείγματα που ανήκουν στην ποικιλία ‘Κορωνέικη’ ενώ στη δεύτερη ομάδα ανήκουν όλα τα δείγματα της ποικιλίας ‘Καλαμών’. Η πρώτη ομάδα διαχωρίζεται σε δύο υποομάδες στην πρώτη εκ των οποίων βρίσκονται τα δείγματα της Κρήτης και της Καλαμάτας, τα οποία επίσης ομαδοποιούνται ανά περιοχή μεταξύ τους. Στη δεύτερη υποομάδα ανήκουν τα δείγματα που συλλέχθηκαν στις περιοχές του Πόρου, της Φθιώτιδας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και της Κύπρου. Το δείγμα από την Κύπρο συνδέεται εξωτερικά με την υποομάδα 1β. Στη δεύτερη ομάδα παρατηρείται διάκριση σε δύο υποομάδες. Στην πρώτη υποομάδα ανήκουν τα δείγματα που προέρχονται από την Κρήτη, τη Φθιώτιδα, το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, τον Πόρο και την Κύπρο, τα οποία ομαδοποιούνται μεταξύ τους ανά περιοχή, ενώ στη δεύτερη υποομάδα ανήκουν τα δείγματα της Καλαμάτας.

Στο δένδρογράμμα RAPD – N.J. (Εικόνα 3.6) τα δείγματα διαχωρίζονται σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται τα δείγματα της ποικιλίας ‘Κορωνέικη’ ενώ στη δεύτερη τα δείγματα που ανήκουν στην ποικιλία ‘Καλαμών’.

Ο συντελεστής του *Mantel* για τα δένδρογράμματα RAPD – UPGMA και RAPD – N.J. έδωσε συντελεστή συσχέτισης $r = 0,97$ και $r = 0,98$ αντίστοιχα.



Εικόνα 3.5. Δενδρόγραμμα RAPD με τη μέθοδο UPGMA



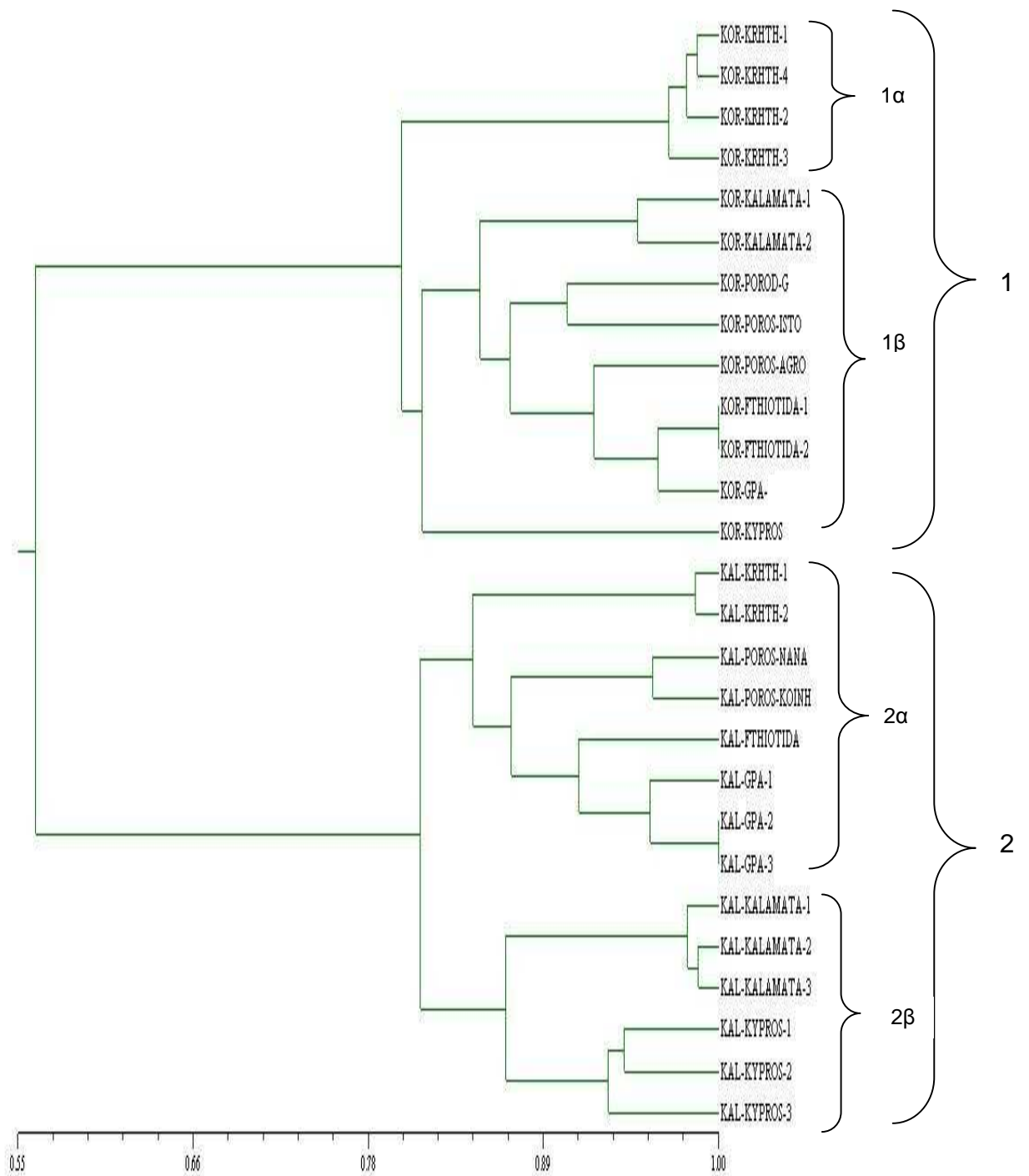
Εικόνα 3.6. Δενδρόγραμμα RAPD με τη μέθοδο N.J.

Στα δενδρογράμματα ISSR – UPGMA (Εικόνα 3.7) και ISSR – N.J. (Εικόνα 3.8) παρατηρείται ότι:

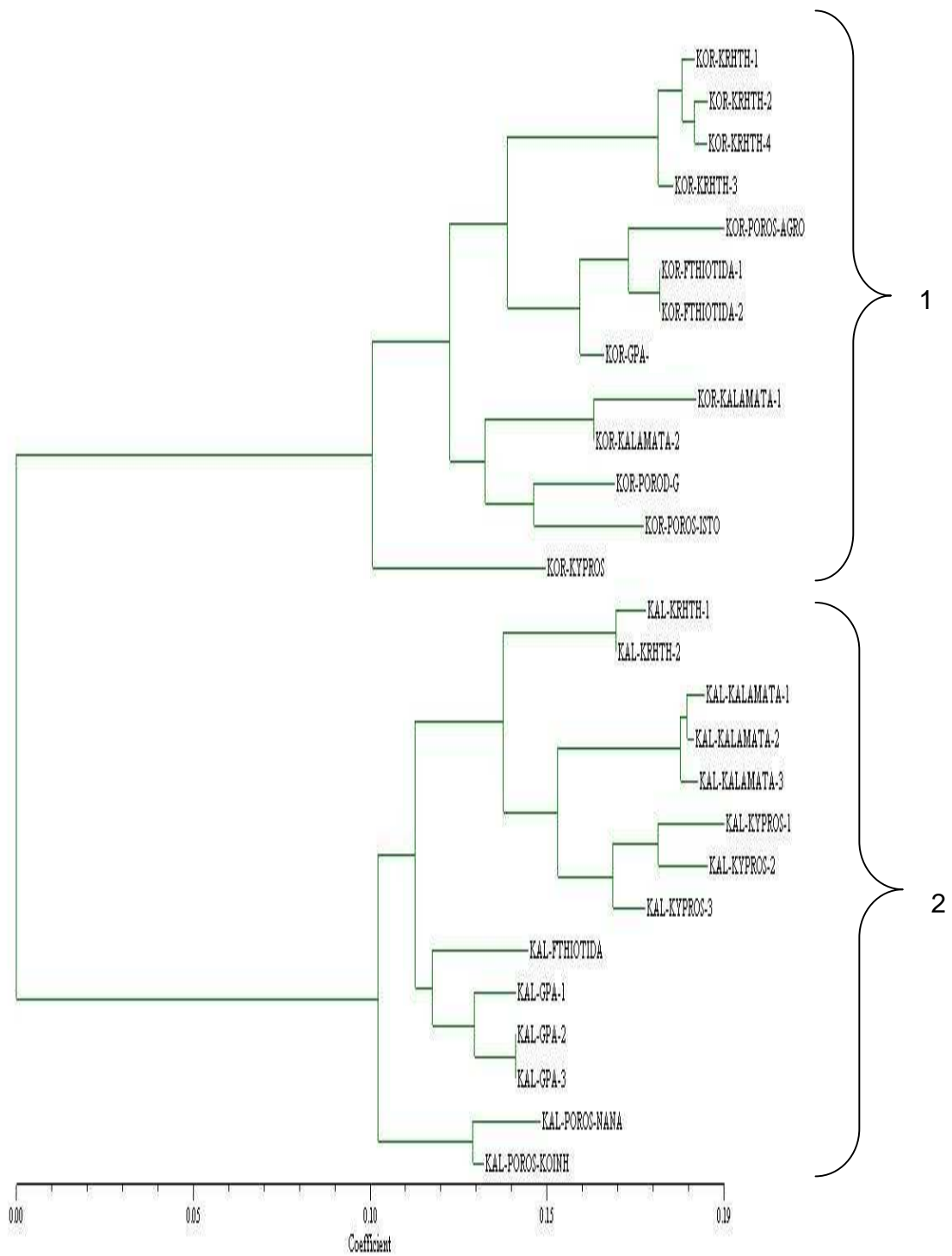
Στο δενδρογράμμα ISSR – UPGMA (Εικόνα 3.7) παρουσιάζεται διαχωρισμός των δειγμάτων σε 2 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα εντάσσονται όλα τα δείγματα που ανήκουν στην ποικιλία ‘Κορωνέικη’ ενώ στη δεύτερη ομάδα ανήκουν όλα τα δείγματα της ποικιλίας ‘Καλαμών’. Η πρώτη ομάδα διαχωρίζεται σε δύο υποομάδες στην πρώτη εκ των οποίων βρίσκονται τα δείγματα της Κρήτης. Στη δεύτερη υποομάδα ανήκουν τα δείγματα που συλλέχθηκαν στις περιοχές Καλαμάτας, Πόρου, Φθιώτιδας, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και τέλος, το δείγμα της Κύπρου, το οποίο συνδέεται εξωτερικά με την υποομάδα 1β. Στη δεύτερη ομάδα παρατηρείται, επίσης, διάκριση σε δύο υποομάδες. Στην πρώτη υποομάδα ανήκουν τα δείγματα που προέρχονται από την Κρήτη, τον Πόρο, τη Φθιώτιδα και το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών ενώ στη δεύτερη υποομάδα ανήκουν τα δείγματα της Καλαμάτας και της Κύπρου. Σε όλο το δενδρογράμμα τα δείγματα ομαδοποιούνται μεταξύ τους ανά περιοχή.

Στο δενδρογράμμα ISSR – N.J. (Εικόνα 3.8) τα δείγματα διαχωρίζονται σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται τα δείγματα της ποικιλίας ‘Κορωνέικη’ ενώ στη δεύτερη τα δείγματα που ανήκουν στην ποικιλία ‘Καλαμών’.

Ο συντελεστής του *Mantel* για τα δενδρογράμματα ISSR – UPGMA και ISSR – N.J. έδωσε συντελεστή συσχέτισης $r = 0,97$ και $r = 0,98$ αντίστοιχα.



Εικόνα 3.7. Δενδρόγραμμα ISSR με τη μέθοδο UPGMA



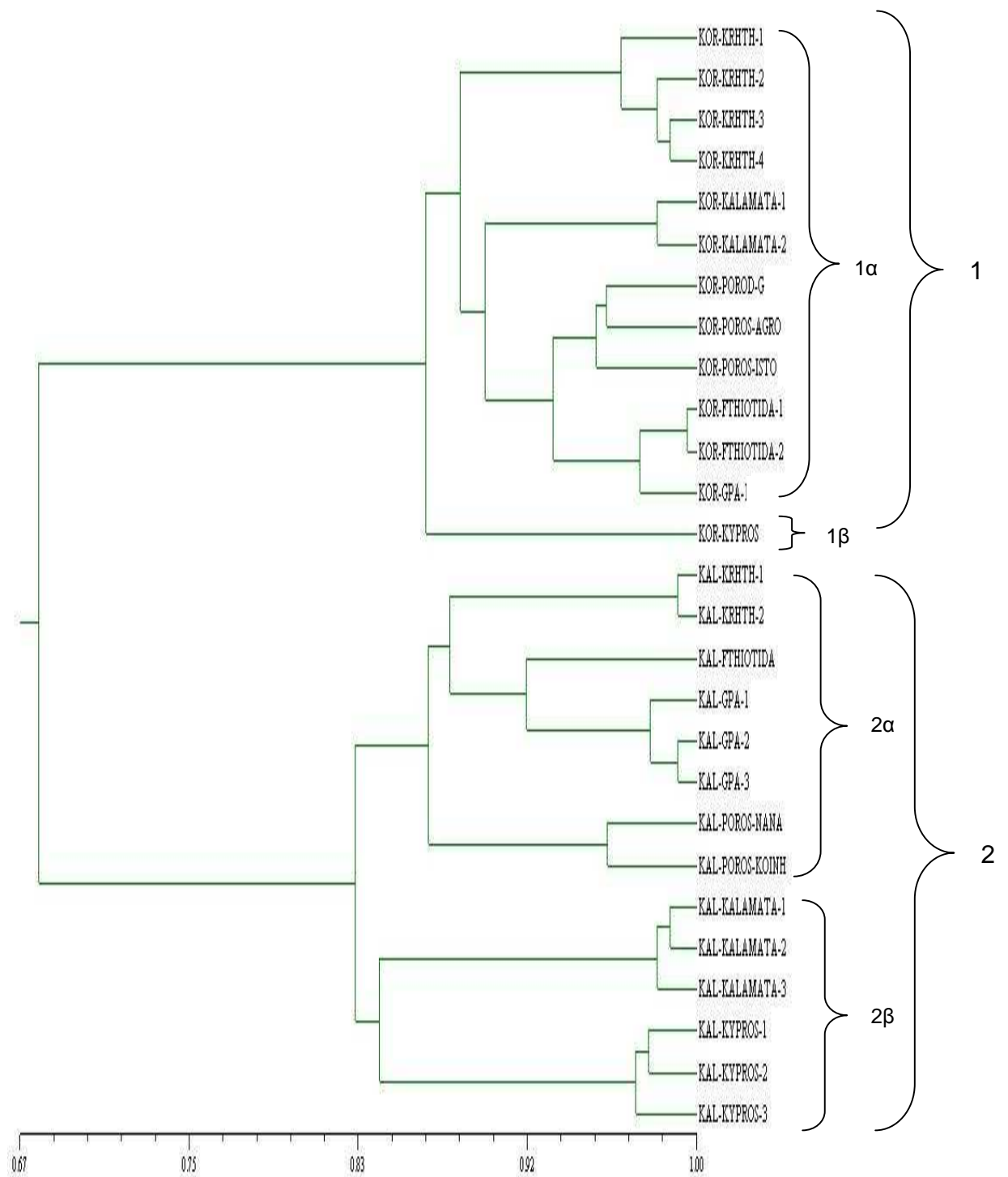
Εικόνα 3.8. Δενδρόγραμμα ISSR με τη μέθοδο N.J.

Στα δενδρογράμματα RAPD & ISSR – UPGMA (Εικόνα 3.9) και RAPD & ISSR – N.J. (Εικόνα 3.10) παρατηρείται ότι:

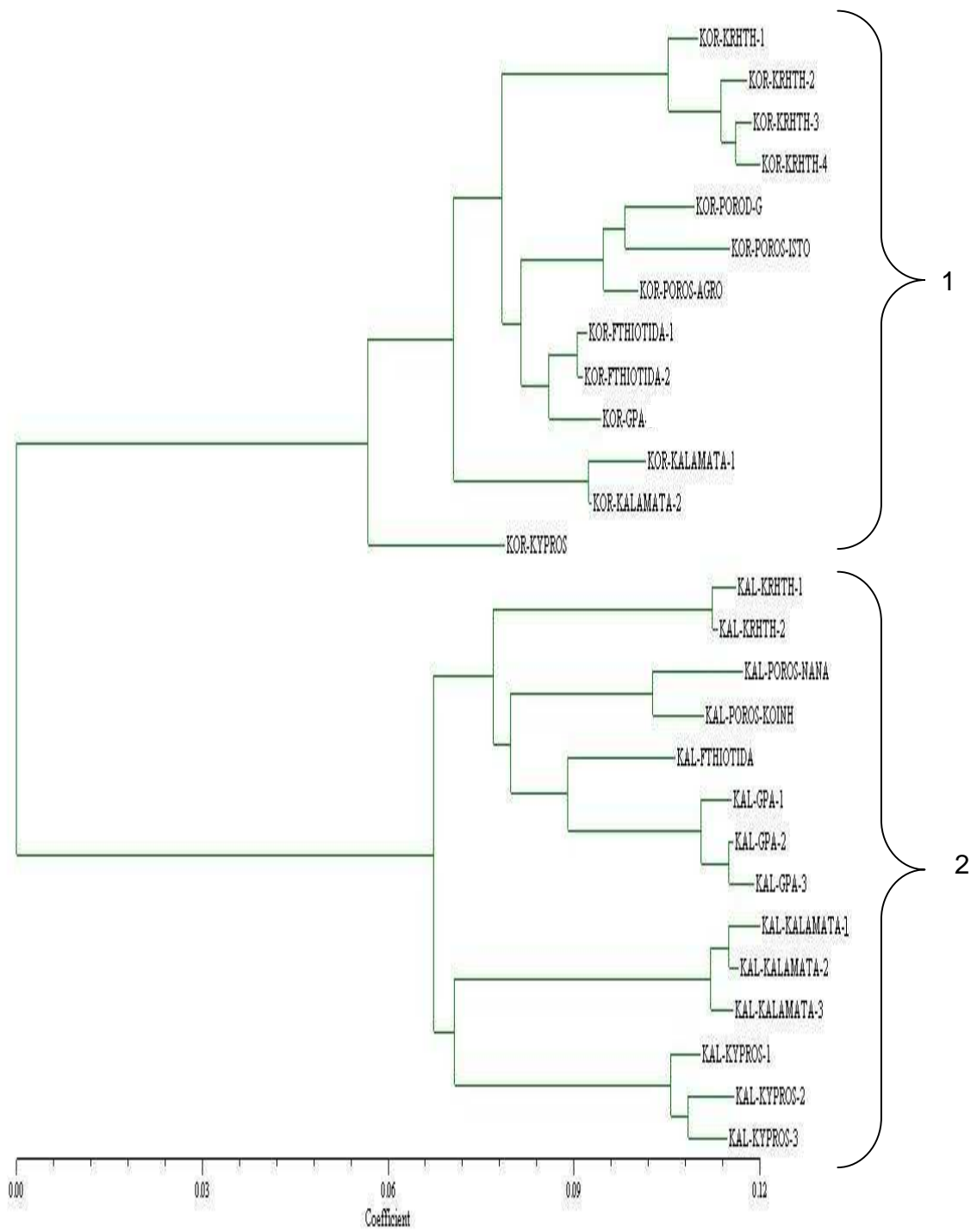
Στο δενδρογράμματα RAPD & ISSR – UPGMA (Εικόνα 3.9) τα δείγματα διαχωρίζονται σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα εντάσσονται όλα τα δείγματα που ανήκουν στην ποικιλία 'Κορωνέικη' ενώ στη δεύτερη ομάδα ανήκουν όλα τα δείγματα της ποικιλίας 'Καλαμών'. Στην ομάδα της ποικιλίας 'Κορωνέικη', όλα τα δείγματα είναι ομαδοποιημένα ανά περιοχή συλλογής, εκτός από το δείγμα της Κύπρου, το οποίο συνδέεται με την ομάδα των υπολοίπων με ξεχωριστό κλάδο. Στην ομάδα της ποικιλίας 'Καλαμών', τα δείγματα διαχωρίζονται σε δύο υποομάδες. Στην πρώτη ανήκουν τα δείγματα των περιοχών Κρήτης, Φθιώτιδας, Γ.Π.Α. και Πόρου ομαδοποιημένα ανά περιοχή συλλογής. Η δεύτερη υποομάδα διαχωρίζεται σε δύο κλάδους. Στον πρώτο ανήκουν τα δείγματα που συλλέχθηκαν στην Καλαμάτα και στο δεύτερο τα δείγματα που συλλέχθηκαν στην Κύπρο.

Στο δενδρογράμματα RAPD & ISSR – N.J. (Εικόνα 3.10) τα δείγματα διαχωρίζονται σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται τα δείγματα της ποικιλίας 'Κορωνέικη' ενώ στη δεύτερη τα δείγματα που ανήκουν στην ποικιλία 'Καλαμών'.

Ο συντελεστής του *Mantel* για τα δενδρογράμματα RAPD & ISSR – UPGMA και RAPD & ISSR – N.J. έδωσε συντελεστή συσχέτισης $r = 0,99$ και $r = 0,98$ αντίστοιχα.

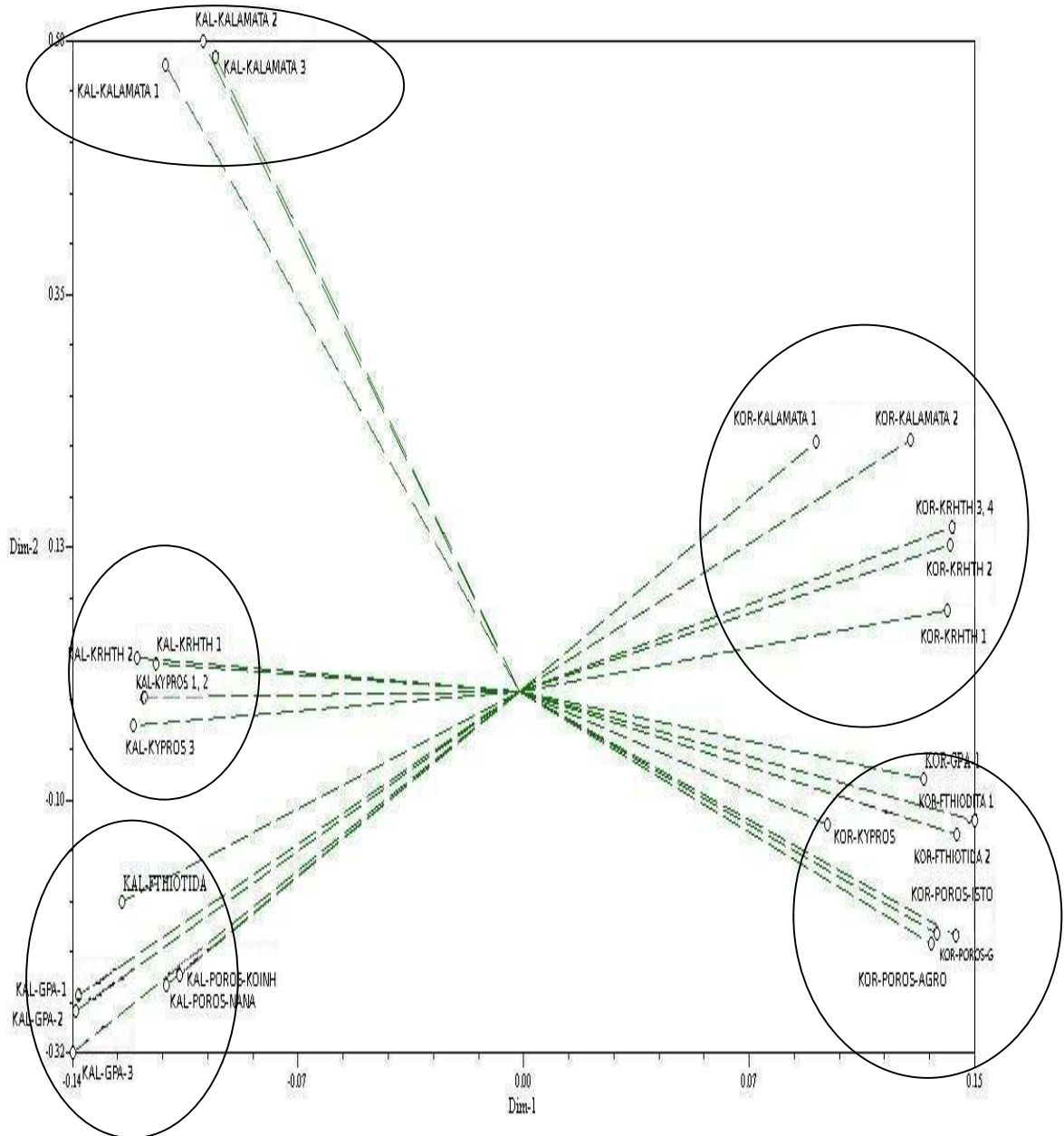


Εικόνα 3.9. Δενδρόγραμμα συνδυασμού RAPD-ISSR με τη μέθοδο UPGMA

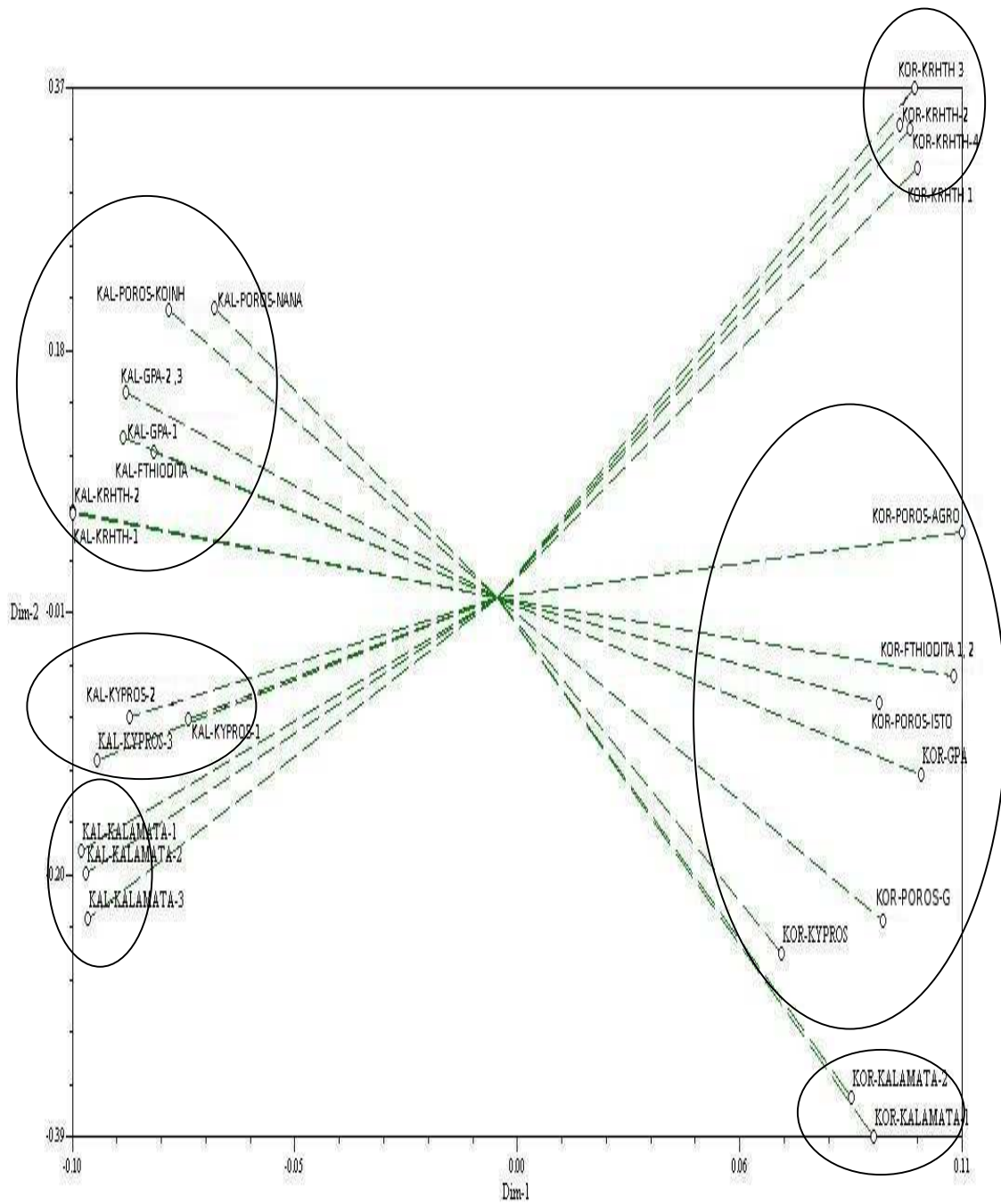


Εικόνα 3.10. Δενδρόγραμμα συνδυασμού RAPD-ISSR με τη μέθοδο N.J.

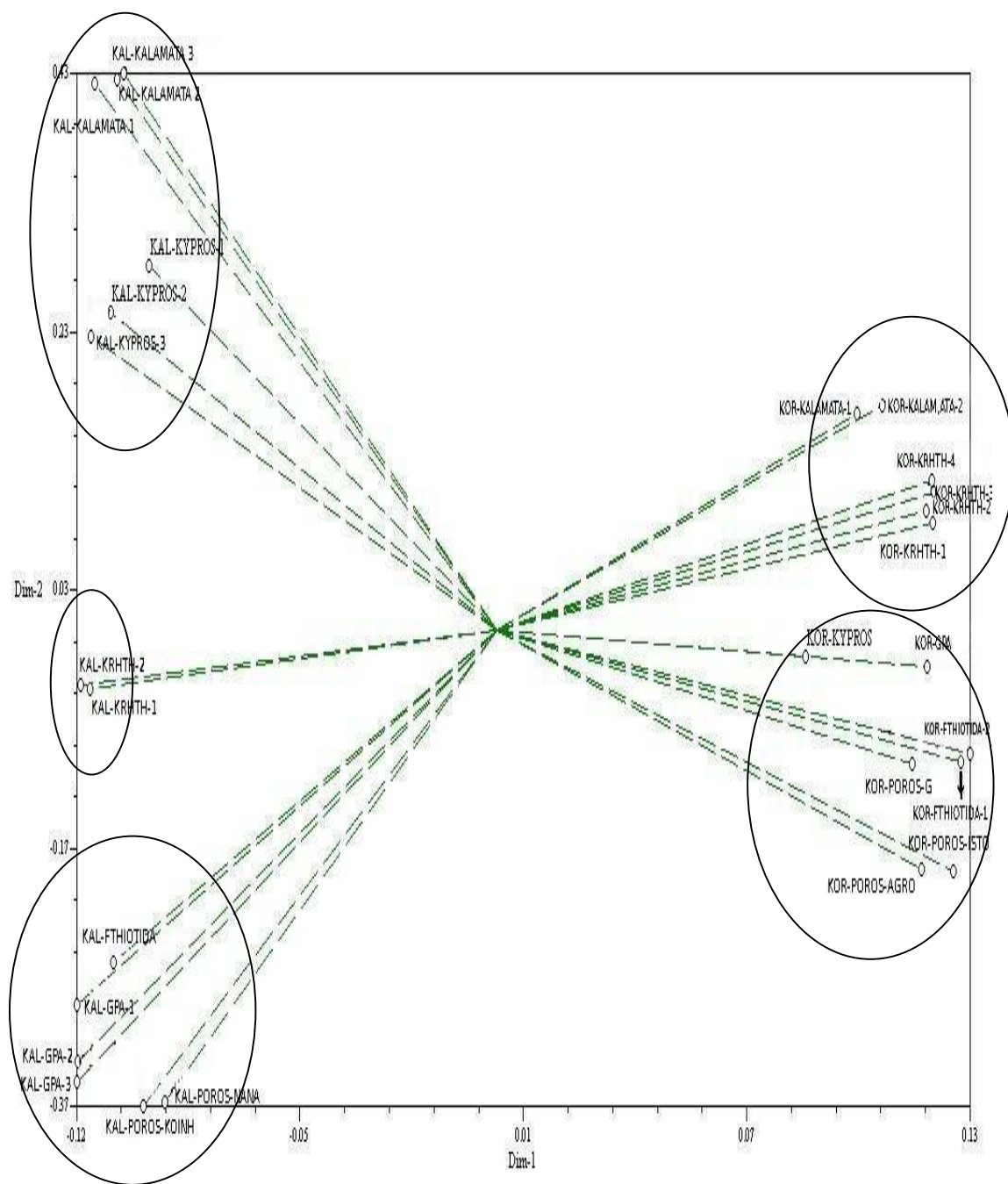
Η Ανάλυση των δύο πρώτων Κύριων Συντεταγμένων παρουσιάζεται στις *Εικόνες 3.11, 3.12, 3.13*. Τα διαγράμματα των δύο διαστάσεων της PCOORDA επιβεβαιώνουν τα δένδρογράμματα των UPGMA και N.J. (*Εικόνες 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10*) χωρίζοντας τα δείγματα σε ομάδες και υποομάδες με την ίδια ακριβώς σύνθεση που είχαν και στα δένδρογράμματα.



Εικόνα 3.11. Απεικόνιση των γενετικών σχέσεων σε 2 άξονες (PCOORDA) για τα RAPD



Εικόνα 3.12. Απεικόνιση των γενετικών σχέσεων σε 2 άξονες (PCOORDA) για τα ISSR



Εικόνα 3.13. Απεικόνιση των γενετικών σχέσεων σε 2 άξονες (PCOORDA) για το συνδυασμό RAPD – ISSR

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Συζήτηση

Οι μοριακοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μελέτη των γενετικών σχέσεων ανάμεσα στις ποικιλίες ελιάς (Bronzini de Caraffa *et al.*, 2002; Belaj *et al.*, 2003a,b; Gemas *et al.*, 2004; Hagidimitriou *et al.*, 2005). Όμως, οι μελέτες που αφορούν ενδοποικιλιακή παραλλακτικότητα είναι πολύ περιορισμένες.

Σε ενδοποικιλιακό επίπεδο ένα ποσοστό παραλλακτικότητας είναι αναμενόμενο καθώς η ελιά αποτελεί μια δενδρώδη, πολυετή καλλιέργεια όπου είναι πιθανές οι σωματικές μεταλλάξεις αλλά και οι σταυρογονιμοποιήσεις, όπως φάνηκε και από αναλύσεις ισοενζύμων (Hamrick, 1989). Σε περιπτώσεις μεγάλου εύρους παραλλακτικότητας υπάρχει επιπλέον η πιθανότητα να οφείλεται σε ομώνυμα, τα οποία αποτελούν ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα στην επιλογή δενδρυλλίων για την εγκατάσταση ελαιώνων και την παραγωγή ελαιοκομικών προϊόντων Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης. Η ενδοποικιλιακή ποικιλομορφία μπορεί να είναι αποτέλεσμα δύο αντίθετων τάσεων, της χαμηλής γενετικής διάβρωσης εξαιτίας της μακροβιότητας των ελαιοδένδρων τα οποία αναγεννώνται αγενώς και επιβιώνουν χωρίς να καλλιεργούνται και της μειωμένης γενετικής ετερογένειας ως αποτέλεσμα του κατά παράδοση αγενούς πολλαπλασιασμού. Η γενετική βάση της καλλιεργούμενης ελιάς μπορεί να εμπλουτίζεται με περιστασιακές τυχαίες διασταυρώσεις μεταξύ καλλιεργούμενων κλώνων και άγριων μορφών (Zohary and Hopf, 1994). Η γονιδιακή ετερογένεια μέσα στις ποικιλίες αμφισβητεί το βασιζόμενο αποκλειστικά στα μορφολογικά χαρακτηριστικά διαχωρισμό των ποικιλιών. Ο γενετικός έλεγχος μπορεί να αποκαλύψει μια πιο καθαρή εικόνα του συμπλέγματος της βιολογικής διαφοροποίησης των πληθυσμών. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και πολλές μελέτες γενετικής διαφοροποίησης

ποικιλιών με τη χρήση μοριακών δεικτών (Rotondi *et al.*, 2003; Hagidimitriou *et al.*, 2005).

Στο παρόν πείραμα μελετήθηκε η γενετική παραλλακτικότητα δύο εμπορικών Ελληνικών ποικιλιών, της 'Καλαμών' και της 'Κορωνέικης'. Η 'Κορωνέικη' απαντάται στην Ελλάδα με πολλά ονόματα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μεγάλη εξάπλωση της καλλιέργειάς της στη χώρα και το διαφορετικό μέγεθος που αποκτά ο καρπός ανάλογα με τις καλλιεργητικές περιποιήσεις και τις εδαφοκλιματικές συνθήκες που επικρατούν ανά περιοχή. Όσον αφορά την 'Καλαμών', λόγω έλλειψης φορέα πιστοποίησης των ποικιλιών, υπάρχουν δένδρα που φέρουν αυτή την ονομασία αλλά δεν ανήκουν στην ποικιλία.

Στην παρούσα εργασία, με σκοπό τον προσδιορισμό του επιπέδου της ενδοποικιλιακής παραλλακτικότητας σ' ένα σύνολο 27 δειγμάτων που ανήκουν στις δύο ελληνικές ποικιλίες ελιάς, 'Καλαμών' και 'Κορωνέικη', εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι μοριακών δεικτών, οι RAPD και ISSRs. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν οι δύο αυτοί εκκινητές, παρά το γεγονός ότι είναι και οι δύο κυρίαρχοι με αποτέλεσμα ν' αναμένεται σύμπτωση σε υψηλό βαθμό, είναι ότι στοχεύουν διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος παρέχοντας ευρύτερη κάλυψη σε μια ολοκληρωμένη ανάλυση. Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν διαχώρισαν πλήρως τις ποικιλίες μεταξύ τους καθώς και τα δείγματα εντός των ποικιλιών. Οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν από τους δεκαέξι εκκινητές (Πίνακας 3.2) ήταν αρκετοί για να διαχωρίσουν τα 27 δείγματα του πειράματος.

Από τους τριάντα RAPD και δέκα ISSR εκκινητές που δοκιμάστηκαν επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τελικά δέκα RAPD και έξι ISSR εκκινητές. Ο συνολικός αριθμός των ενισχυμένων ζωνών DNA που έδωσαν οι RAPD εκκινητές ήταν 188 από τις οποίες οι 81 (43%) ήταν πολυμορφικές. Αντίστοιχα, για τους ISSR εκκινητές, ο συνολικός αριθμός ενισχυμένων ζωνών DNA ήταν 104 εκ των οποίων οι 72 (69%) ήταν πολυμορφικές. Παρά το γεγονός ότι τα 27 δείγματα του πειράματος ανήκαν σε δύο μόλις ποικιλίες, οι δύο μέθοδοι έδωσαν ικανοποιητικό αριθμό πολυμορφικών ζωνών για να καταστεί δυνατός ο γονοτυπικός διαχωρισμός.

Οι Gemas *et al.* (2000) μελετώντας τις φυλογενετικές σχέσεις αλλά και την ενδοποικιλιακή παραλλακτικότητα των τριών ελαιοποιήσιμων Πορτογαλικών ποικιλιών, 'Galega Vulgar', 'Cordovil de Sepra' και 'Verdeal Alentejana', χρησιμοποίησαν 20 RAPD εκκινητές για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα στις τρεις ποικιλίες και 7 RAPD εκκινητές κατά την ανάλυση της ενδοποικιλιακής παραλλακτικότητας. Οι 20 RAPD εκκινητές έδωσαν ένα σύνολο 102 ενισχυμένων ζωνών, από τις οποίες 57 πολυμορφικές για ένα σύνολο τριών δειγμάτων αντιπροσωπευτικών των τριών ποικιλιών. Αντίστοιχα, κατά την ενδοποικιλιακή μελέτη οι 7 εκκινητές, από το σύνολο των ζωνών που παρήχθησαν έδωσαν 156 πολυμορφικές. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι η τεχνική των RAPD εκκινητών αποτελεί ένα χρήσιμο όργανο για την ανάλυση του γενετικού υλικού των τριών ποικιλιών. Επιπλέον, επισημαίνουν ότι η μέθοδος των RAPD είναι ικανή να ανιχνεύσει τις διαποικιλιακές σχέσεις χρησιμοποιώντας ένα πολύ περιορισμένο αριθμό δειγμάτων καθώς επίσης και ν' αναλύει την ενδοποικιλιακή διαφοροποίηση. Τέλος, τέτοιου είδους εργασίες αποτελούν βιβλιοθήκες αναφοράς για τις μελετώμενες ποικιλίες και μπορούν ν' αξιοποιηθούν στην πιστοποίηση ποικιλιών.

Οι Ozkaya *et al.* (2006) χρησιμοποίησαν 10 RAPD εκκινητές σε μια συγκριτική μελέτη όπου εξετάστηκε η ομοιότητα δέκα δειγμάτων που καλλιεργούνται σε μια περιοχή και θεωρούνται ότι ανήκουν στην Τουρκική ποικιλία 'Derik Halhali' με ένα επίσημο δείγμα της ποικιλίας. Από τις 86 ενισχυμένες ζώνες που παρήχθησαν οι 32 ήταν πολυμορφικές. Οι 10 εκκινητές διαχώρισαν όλα τα δείγματα. Η μοριακή ανάλυση έδειξε αξιοσημείωτη παραλλακτικότητα ανάμεσα στο επίσημο δείγμα και τα δείγματα της περιοχής. Η μέθοδος αυτή αποδεικνύεται αποτελεσματική στην οργάνωση του γενετικού υλικού για τη διατήρηση των γενετικών πηγών και στην πιστοποίηση του.

Οι Gemas *et al.* (2004) μελέτησαν την ενδοποικιλιακή παραλλακτικότητα σε 77 δείγματα από διαφορετικές περιοχές της Πορτογαλικής ποικιλίας 'Galega' χρησιμοποιώντας 3 RAPD και 5 ISSR εκκινητές. Οι 616 ζώνες, από τις οποίες οι 93 ήταν πολυμορφικές, διαχώρισαν όλα τα δείγματα και σύμφωνα με το UPGMA δένδrogramma ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την οικολογική προσαρμογή.

Στην παρούσα εργασία ο συντελεστής ομοιότητας του Jaccard, ο οποίος βρίσκει εφαρμογή σε κυρίαρχους μοριακούς δείκτες, για τους RAPD εκκινητές κυμάνθηκε από 0,70 μέχρι 0,83 ανάμεσα στα δείγματα των δύο ποικιλιών ενώ ενδοποικιλιακά περιορίστηκε μεταξύ 0,89 έως 1,00 για την ποικιλία 'Κορωνέικη' και 0,81 έως 0,99 για την 'Καλαμών'. Το ίδιο δείχνει και η διακύμανση του συντελεστή ομοιότητας του Jaccard για τους ISSR εκκινητές, οι οποίοι κατά κανόνα παράγουν μεγαλύτερο αριθμό ενισχυμένων αλλά και πολυμορφικών ζωνών από τα RAPD, αν και το εύρος του είναι πολύ μεγαλύτερο. Ο συντελεστής ομοιότητας ανάμεσα στις δύο ποικιλίες κυμάνθηκε από 0,49 έως 0,63. Ενδοποικιλιακά, στην ποικιλία 'Κορωνέικη' κυμάνθηκε από 0,72 έως 1,00 και στην ποικιλία 'Καλαμών' από 0,73 έως 1,00. Όσον αφορά το συνδυασμό των δύο μεθόδων, ανάμεσα στις δύο ποικιλίες ο συντελεστής κυμάνθηκε από 0,64 έως 0,73 ενώ ενδοποικιλιακά μεταξύ 0,83 έως 1,00 για την ποικιλία 'Κορωνέικη' και 0,80 έως 0,99 για την 'Καλαμών'. Η 'Καλαμών', πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης διασποράς και διάδοσής της, παρουσίασε μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα απ' ό τι η 'Κορωνέικη'.

Κατά την ενδοποικιλιακή μελέτη 120 κλώνων της Πορτογαλικής ποικιλίας 'Cobrançosa' (Martins-Lopes *et al.*, 2009) με 10 RAPD και 10 ISSR εκκινητές οι οποίοι έδωσαν 50% και 55% πολυμορφισμού αντίστοιχα διαχωρίστηκαν όλοι οι κλώνοι. Ο συντελεστής του Jaccard κυμάνθηκε μεταξύ 0,69 - 0,99, 0,41 - 0,99 και 0,51 - 0,98 για τα RAPD, τα ISSRs και το συνδυασμό τους αντίστοιχα.

Κατά τη μελέτη 12 δειγμάτων της ίδιας περιοχής, τα οποία μορφολογικά ανήκουν στις τρεις Ιταλικές ποικιλίες 'Leccino', 'Moraiolo' και 'Mignolo', με τη χρήση 6 AFLP δεικτών παρήχθησαν 274 ζώνες, εκ των οποίων 164 πολυμορφικές. Σύμφωνα με το συντελεστή του Jaccard οι γενετικές αποστάσεις μέσα στις ποικιλίες κυμάνθηκαν από 0,69 έως 0,85, 0,84 έως 0,97 και 0,72 έως 1,00 για τις 'Mignolo', 'Moraiolo' και 'Leccino' αντίστοιχα. Από το δενδρόγραμμα UPGMA φάνηκε ότι διαχωρίστηκαν όχι μόνο οι ποικιλίες μεταξύ τους αλλά και τα δείγματα. Τα δείγματα της κάθε ποικιλίας ομαδοποιήθηκαν μεταξύ τους και η γενετική ομοιότητα μέσα στις ποικιλίες ήταν εμφανής όπως και η μεταξύ τους

ετερογένεια. Τα παραπάνω αποτελέσματα της εργασίας των Sensi *et al.* (2003) συμφωνούν μ' αυτά του παρόντος πειράματος.

Οι Λίνος και Χατζηδημητρίου (2007) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο των RAPD εκκινητών στην ταυτοποίηση και μελέτη της παραλλακτικότητας μητρικών φυτών ελιάς σε φυτώρια και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε κρίνεται επαρκής για την ταυτοποίηση των μητρικών φυτών, τη μελέτη της ενδοποικιλιακής ομοιομορφίας και την ξεκάθαρη διαφοροποίηση των ποικιλιών. Συγκεκριμένα, ο συντελεστής ομοιότητας του *Jaccard* εντός των ποικιλιών ήταν μεγαλύτερος από 0,95.

Οι Τουλουμενίδου κ.ά. (2005) μελέτησαν δείγματα της ποικιλίας 'Καλαμών' και συνωνύμων ποικιλιών από περιοχές της Ελλάδας και τη γενετική τους ποικιλομορφία με RAPD και ISSR εκκινητές. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι εντός της ποικιλίας 'Καλαμών' υπάρχει χαμηλή γενετική ποικιλομορφία καθώς ο συντελεστής του *Jaccard* κυμάνθηκε από 0,90 έως 1,00.

Ο αριθμός των δειγμάτων σε μελέτες του γονιδιώματος κάτω από το επίπεδο της ποικιλίας μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα (Martins-Lopes *et al.*, 2009). Έτσι, σε μελέτες όπου ο αριθμός των δειγμάτων είναι υψηλός, όπως π.χ. 120 στη μελέτη των Martins-Lopes *et al.* (2009), 77 στη μελέτη των Gemas *et al.* (2004), 20 κατά μέσο όρο για τις ποικιλίες των Gemas *et al.* (2000) και 10 στην εργασία των Ozkaya *et al.* (2006) ήταν δυνατό ν' ανιχνευθεί γενετική παραλλακτικότητα. Αντίθετα, σε εργασίες όπου ο αριθμός των δειγμάτων κυμαίνεται από 1 έως 5, τα αποτελέσματα δεν ήταν πάντα επιτυχή και αξιόπιστα. Για παράδειγμα οι Cordeiro *et al.* (2008) δεν μπόρεσαν ν' ανιχνεύσουν την ενδοποικιλιακή παραλλακτικότητα στην ποικιλία 'Galega' όπως αυτή ανιχνεύθηκε από τους Gemas *et al.* (2004), πιθανόν διότι τα δείγματα ήταν μόλις 3. Στο παρόν πείραμα ο αριθμός των δειγμάτων ήταν 13 για την ποικιλία 'Κορωνέικη' και 14 για την ποικιλία 'Καλαμών' ενώ η δειγματοληψία κάλυπτε τις κύριες περιοχές καλλιέργειας των δύο ποικιλιών στην Ελλάδα και την Κύπρο.

Συγκρίνοντας και τα 6 δενδρογράμματα (*Εικόνα 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 και 3.10*) φαίνεται ότι η ομαδοποίηση των δειγμάτων ήταν παρόμοια. Συγκριτικά με τα UPGMA, τα N.J. δενδρογράμματα ομαδοποιούν τα δείγματα σε μεγαλύτερες

ομάδες. Γενικότερα παρατηρούμε ότι η ομαδοποίηση ακολουθεί γεωγραφική κατανομή. Όλα τα δείγματα ομαδοποιούνται ανά περιοχή συλλογής. Η γεωγραφική ομαδοποίηση των ποικιλιών παρατηρείται ανάμεσα σε ποικιλίες διαφορετικών χωρών όπως επισημαίνουν οι Besnard *et al.* (2001a) και Belaj *et al.* (2002) για τη Μεσογειακή λεκάνη όπως επίσης και μέσα σε μια χώρα, όπως αναφέρουν οι Claros *et al.* (2000) για τις Ισπανικές ποικιλίες, οι Carriero *et al.* (2002) για Ιταλικές ποικιλίες και οι Gemas *et al.* (2004) για Πορτογαλικές ποικιλίες αλλά ακόμη και μέσα σε μια περιοχή όπως παρατήρησαν οι Sanz-Cortés *et al.* (2001) για μια περιοχή της Ισπανίας. Ενδοποικιλιακά, το ίδιο επισημαίνουν και οι Ozkaya *et al.* (2006) και Martins-Lopes *et al.* (2009) σε πειράματα όπου, όπως και στο παρόν πείραμα, οι κλώνοι μιας ποικιλίας ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με την περιοχή συλλογής τους. Το φαινόμενο αυτό είναι πιθανότατα αποτέλεσμα ανθρώπινης παρέμβασης και κοινής προέλευσης κλώνων ανά περιοχή.

Στα δενδρογράμματα RAPD – UPGMA (Εικόνα 3.5) και RAPD – N.J. (Εικόνα 3.6) παρουσιάζεται διαχωρισμός των δειγμάτων σε 2 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται τα δείγματα της ποικιλίας ‘Κορωνέικη’ ενώ στη δεύτερη τα δείγματα που ανήκουν στην ποικιλία ‘Καλαμών’. Σε κάθε ομάδα τα δείγματα χωρίζονται σε δύο υποομάδες. Στην ‘Κορωνέικη’, η πρώτη υποομάδα περιλαμβάνει τα δείγματα από τις περιοχές Κρήτης και Καλαμάτας ενώ η δεύτερη τα δείγματα από Πόρο, Φθιώτιδα, Γ.Π.Α. και Κύπρο. Όσον αφορά την ‘Κορωνέικη’ η ομαδοποίηση διαφοροποιείται ανάμεσα στους δυο τύπους δενδρογραμμάτων.

Στα δενδρογράμματα ISSR – UPGMA (Εικόνα 3.7) και ISSR – N.J. (Εικόνα 3.8) παρουσιάζεται διαχωρισμός των δειγμάτων σε 2 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα εντάσσονται όλα τα δείγματα που ανήκουν στην ποικιλία ‘Κορωνέικη’ ενώ στη δεύτερη ομάδα ανήκουν όλα τα δείγματα της ποικιλίας ‘Καλαμών’. Όσον αφορά το δενδρόγραμμα ISSR – UPGMA για την ‘Κορωνέικη’ η πρώτη ομάδα διαχωρίζεται σε δύο υποομάδες στην πρώτη εκ των οποίων βρίσκονται τα δείγματα της Κρήτης. Στη δεύτερη υποομάδα ανήκουν όλα τα άλλα δείγματα ενώ παρατηρείται ότι το δείγμα της Κύπρου ανήκει σε ξεχωριστό κλάδο

από τα υπόλοιπα δείγματα της υποομάδας. Αντίστοιχα, στο δένδρογραμμα ISSR – N.J. το δείγμα της Κύπρου διαφοροποιείται με ξεχωριστό κλάδο από όλα τα υπόλοιπα. Όσον αφορά το δένδρογραμμα ISSR – UPGMA για την ‘Καλαμών’, στην πρώτη υποομάδα ανήκουν τα δείγματα που προέρχονται από την Κρήτη, τον Πόρο, τη Φθιώτιδα και το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών ενώ στη δεύτερη υποομάδα ανήκουν τα δείγματα της Καλαμάτας και της Κύπρου. Η ομαδοποίηση διαφέρει στο δένδρογραμμα ISSR – N.J. όπου τα δείγματα του Πόρου ομαδοποιούνται ξεχωριστά από τα υπόλοιπα.

Τα δένδρογράμματα UPGMA και N.J. (Εικόνα 3.9 και 3.10) για το συνδυασμό των δύο μοριακών μεθόδων ακολουθούν την ίδια ακριβώς ομαδοποίηση παρουσιάζοντας διαχωρισμό των δειγμάτων σε 2 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται τα δείγματα της ποικιλίας ‘Κορωνέικη’ ενώ στη δεύτερη τα δείγματα που ανήκουν στην ποικιλία ‘Καλαμών’. Σε κάθε ομάδα τα δείγματα χωρίζονται σε δύο υποομάδες. Για την ‘Κορωνέικη’, το δείγμα της Κύπρου διαχωρίζεται από όλα τα υπόλοιπα. Για την ‘Καλαμών’, τα δείγματα της Καλαμάτας και της Κύπρου ομαδοποιούνται μαζί και ξεχωριστά από όλα τα υπόλοιπα δείγματα.

Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει γενικά η τάση τα δείγματα από τις περιοχές του Γ.Π.Α. και της Φθιώτιδας, και για τις δύο ποικιλίες, να ομαδοποιούνται. Άρα, το γενετικό υλικό αυτών των περιοχών είναι ίδιο. Ίσως προήλθε από τη μία ή την άλλη περιοχή. Επίσης, στην ποικιλία ‘Κορωνέικη’ οι περιοχές της Κρήτης και της Καλαμάτας φαίνονται να είναι πιο κοντά γενετικά.

Οι Gemas *et al.* (2002) μελέτησαν την ενδοποικιλιακή παραλλακτικότητα σε 77 δείγματα της Πορτογαλικής ποικιλίας ‘Galega Vulgar’ από 5 διαφορετικές περιοχές. Χρησιμοποιήθηκαν 3 εκκινητές RAPD και 5 ISSRs οι οποίοι έδωσαν 62 και 105 πολυμορφικές ζώνες αντίστοιχα και διαχώρισαν όλα τα δείγματα της συλλογής. Στο δένδρογραμμα UPGMA τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε κλάδους σύμφωνα με την περιοχή συλλογής. Ο διαχωρισμός αυτός πιθανόν να οφείλεται όχι μόνο στην περιβαλλοντική προσαρμογή αλλά επιπλέον στην ανθρώπινη επέμβαση μέσω επιλογής καθώς και στις τεχνικές πολλαπλασιασμού. Επιπρόσθετα, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι τα δείγματα που παρουσίασαν τη

μεγαλύτερη απόσταση στο δένδρογράμμα, καθώς και τη μεγαλύτερη διασπορά στο σύστημα τριών αξόνων, πιθανότατα προέρχονται από τον τόπο καταγωγής της ποικιλίας. Κάτι τέτοιο ίσως ισχύει για τα δείγματα της ποικιλίας 'Καλαμών' από την περιοχή της Καλαμάτας, της παρούσας εργασίας, καθώς φαίνεται να διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα της ίδιας ποικιλίας.

Με τη χρήση των συν-φαινομενολογικών (cophenetic) συντελεστών και με τη διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί εφαρμόστηκε το test του *Mantel* για να ελεγχθεί το κατά πόσο αντιπροσωπευτική είναι η γραφική απεικόνιση (UPGMA και N.J.) των δεδομένων της μήτρας ομοιότητας του *Jaccard* των 27 δειγμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η συσχέτιση μεταξύ μήτρας και δένδρογράμματος ήταν ίδια για τα RAPD – UPGMA και ISSR – UPGMA ($r = 0,97$) καθώς επίσης και για τα RAPD – N.J. και ISSR – N.J. ($r = 0,98$) δένδρογράμματα. Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης παραμένει πολύ υψηλή και για τα δένδρογράμματα RAPD&ISSR – UPGMA ($r = 0,99$) καθώς επίσης και για τα RAPD & ISSR – N.J. ($r = 0,98$) αποδεικνύοντας ότι η απεικόνιση των δεδομένων της μήτρας από τα δένδρογράμματα ήταν πολύ πιστή. Η γενετική ομοιογένεια των δειγμάτων πιθανόν να ευνοεί την καλύτερη απεικόνιση των δεδομένων της μήτρας από τα δένδρογράμματα. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι σε εργασίες μελέτης της παραλλακτικότητας ανάμεσα σε ποικιλίες ο συντελεστής r κυμαίνεται σε πολύ πιο χαμηλά επίπεδα. Έτσι σε τέτοιες εργασίες ο r έλαβε τιμές όπως 0,76 (Belaj *et al.*, 2003b), 0,68 (Belaj *et al.*, 2003a) και 0,73 (Hagidimitriou *et al.*, 2005). Αντίθετα, σε ενδοποικιλιακές μελέτες ο συντελεστής πήρε τιμές $r = 0,98$ (Τουλουμενίδου κ.ά., 2005).

Τέλος, τα διαγράμματα των δύο διαστάσεων της PCORDA (Εικόνες 3.11, 3.12, 3.13) επιβεβαιώνουν τα δένδρογράμματα των UPGMA και N.J. (Εικόνες 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10) χωρίζοντας τα δείγματα σε ομάδες και υποομάδες με την ίδια ακριβώς σύνθεση που είχαν και στα δένδρογράμματα.

4.2. Συμπεράσματα

Κατά τη μελέτη της ενδοποικιλιακής παραλλακτικότητας δύο κύριων Ελληνικών ποικιλιών, της ελαιοποιήσιμης ποικιλίας 'Κορωνέικη' και της επιτραπέζιας ποικιλίας 'Καλαμών', η χρήση των μοριακών μεθόδων RAPD και ISSR κρίθηκε αποτελεσματική.

Ο λόγος που εφαρμόστηκαν δύο μοριακές τεχνικές είναι η αύξηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Οι μοριακοί δείκτες RAPD και ISSR έδωσαν ικανοποιητικό αριθμό ενισχυμένων ζωνών καθώς επίσης και ικανοποιητικό ποσοστό πολυμορφικών ζωνών. Ειδικότερα για τους ISSR, ο αριθμός των ενισχυμένων και πολυμορφικών ζωνών ήταν υψηλότερος από εκείνον για τους RAPD, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαχωριστική τους ικανότητα.

Στην παρούσα εργασία ο συντελεστής ομοιότητας του *Jaccard*, όσον αφορά το συνδυασμό των δύο μεθόδων, παρουσίασε διακύμανση από 0,64 έως 0,73 ανάμεσα στα δείγματα των δύο ποικιλιών ενώ ενδοποικιλιακά περιορίστηκε μεταξύ 0,83 έως 1,00 για την ποικιλία 'Κορωνέικη' και 0,80 έως 0,99 για την ποικιλία 'Καλαμών'. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι δύο ποικιλίες διαχωρίζονται ξεκάθαρα. Επιπλέον, η 'Καλαμών', πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης διασποράς και διάδοσής της, παρουσίασε μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα απ' ό,τι η 'Κορωνέικη'.

Οι δύο μέθοδοι έδωσαν παρόμοια ομαδοποίηση των δειγμάτων στα δένδρογράμματα UPGMA και N.J. Το κάθε δένδρογράμμα διαχωρίστηκε σε δύο ομάδες η κάθε μία από τις οποίες περιείχε τα δείγματα μιας ποικιλίας. Επιπλέον, εντός της κάθε ποικιλίας τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την περιοχή συλλογής. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει γενικά η τάση τα δείγματα από τις περιοχές του Γ.Π.Α. και της Φθιώτιδας, και για τις δύο ποικιλίες, να ομαδοποιούνται. Άρα, το γενετικό υλικό αυτών των περιοχών είναι ίδιο. Ίσως προήλθε από τη μία ή την άλλη περιοχή. Επίσης, στην ποικιλία 'Κορωνέικη' οι περιοχές της Κρήτης και της Καλαμάτας φαίνονται να είναι πιο κοντά γενετικά.

Όπως προέκυψε από το συντελεστή συσχέτισης *Mantel*, όλα τα δένδρογράμματα των δύο μεθόδων UPGMA και N.J. αποτέλεσαν πιστή γραφική απεικόνιση των δεδομένων της μήτρας ομοιότητας του *Jaccard*.

Συγκρίνοντας το εύρος της ενδοποικιλιακής παραλλακτικότητας των δύο Ελληνικών ποικιλιών με αποτελέσματα αντίστοιχων μελετών της διεθνούς βιβλιογραφίας παρατηρείται ότι οι Ελληνικές ποικιλίες παρουσιάζουν μικρότερη γενετική παραλλακτικότητα γεγονός που δείχνει την ομοιογένεια των ποικιλιών και το ότι δεν υφίσταται το πρόβλημα των συνώνυμων.

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε κρίνεται επαρκής για την ταυτοποίηση δενδρολλίων κατά την εγκατάσταση ελαιώνων ενώ ταυτόχρονα είναι γρήγορη, αξιόπιστη και σχετικά οικονομική. Επιπλέον, μπορεί να βρει εφαρμογές σε βελτιωτικά προγράμματα και γενικότερα στη διαχείριση και διατήρηση γενετικού υλικού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

- Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L., 1999.** Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 98: 411–421.
- Baldoni L., Pellegrini M, Mencuccini M, Angiolillo A, Mulas M., 2000.** Genetic relationships among cultivated and wild olives revealed by AFLP markers. *Acta Horticulturae* 521: 275–284.
- Barranco D., 1997.** Variedades y patrones. In: Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L (eds.). *El cultivo del olivo* 2nd edn. Mundi-Prensa, Madrid, pp 81–87.
- Barranco D., Cimato A., Fiorino P., Rallo L., Touzani A., Castaneda C., Serafin F., Trujillo I., 2000.** World catalogue of olive varieties. International Olive Oil Concl, Madrid, 360 pp.
- Barranco D., Rallo L., 1985.** Las variedades de olivo cultivadas en España. *Olivae* 9: 16–20.
- Barranco, D. & L. Rallo, 1984.** Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. M.º de Agricultura, Junta de Andalucía, Madrid, Spain.
- Bartolini G., Prevost G., Messeri C., Carignani G., 2005.** Olive germplasm: cultivars and world-wide collections. Web site FAO: <http://www.apps3.fao.org/wiews/olive/olive.jsp>
- Bartolini, G., Prevost, G., Messeri, C., Carignani, C., Menini, U.G.:** Olive Germplasm. Cultivars and World-wide Collections - FAO, Rome 1998.
- Bebeli, P.J. and Kaltsikes P.J., 1993.** New developments in varietal identification. In: *Seed Science and Technology*, Ed.: A.J.G. van Gastel, M.A. Pagnotta and E. Porceddu. ICCARDA, pp: 161-172.
- Beer S.C., J. Goffreda, T.D. Phillips, J.P. Murphy and M.E. Sorrells, 1993.** Assessment of genetic variation in *Avena sterilis* using morphological traits isozymes and RFLPs. *Crop Science* 33: 1386-1393.
- Belaj A., Caballero J.M., Barranco D., Rallo L., Trujillo I., 2003c.** Genetic characterization and identification of new accessions from Syria in an olive germplasm bank by means of RAPD markers. *Euphytica* 134: 261-268.

- Belaj A., Satovic Z., Ciprian G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L. and Trujillo I. 2003a.** Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and their effectiveness in establishing genetic relationship in olive. *Theor. Appl. Genet.* 107: 736–744.
- Belaj, A., I. Trujillo, R. de la Rosa, L. Rallo & M.J. Giménez, 2001.** Polymorphism and discriminating capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J Amer Soc Hort Sci* 126: 64–71.
- Belaj, A., Satovic, Z., Ismaili, H., Panajoti, D., Rallo, L., Trujillo, I., 2003b.** RAPD genetic diversity of Albanian olive germplasm and its relationships with other Mediterranean countries. *Euphytica* 130: 387–395.
- Belaj, A., Z. Satovic, L. Rallo & I. Trujillo, 2002.** Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theor Appl Genet* 105: 638–644.
- Besnard G., Baradat P. and Berville A., 2001b.** Genetic relationship in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 102: 251–258.
- Besnard G., Baradat P., Chevalier D., Tagmonount A. And Berville A., 2001c.** Genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea* L.) revealed by RAPDs and RFLPs in the rRNA genes. *Genet. Resour. Crop Evol.* 48: 165–182.
- Besnard, G., B. Khadari, P. Villemur & A. Berville, 2000.** Cytoplasmic male sterility in the olive (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 100: 1018–1024.
- Besnard, G., Bervillé, A., 2000.** Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. *subsp europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *CR. Acad. Sci. Paris série III* 323: 173–181.
- Besnard, G., Breton, C., Baradat, P., Khadari, B., Bervillé, A., 2001a.** Cultivar identification in olive based on RAPD markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126: 668–675.
- Bogani, P., Cavalieri, D., Petrucelli, R., Polsinelli, L., Roselli, G., 1994.** Identification of olive tree cultivars by using random amplified polymorphic DNA. *Acta Hort.* 356: 98–101.
- Botstein, D., K. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis, 1980.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314–331.
- Bredemeijer, G.M.M., Cooke, R.J., Ganal, M.W., Peeters, R., Isaac, P., Noordijk, Y., Rendell, S., Jackson, J., Röder, M.S., Wendehake, K., Dijcks,**

- M., Amelaine, M., Wickaert, V., Bertrand, L., Vosman, B., 2002.** Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 105: 1019–1026.
- Bretting P.K. and Widrechner M.P., 1995.** Genetic markers and plant genetic resource management. In: *Plant Breeding Reviews*, Ed: Jules Janink John Wiley & Sons. Inc, 13, pp: 11-86.
- Bronzini de Caraffa, V., Giannettini, J., Gambotti, C., Maury, J., 2002.** Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. *Euphytica* 123: 263–271.
- Busconi, M., Sebastiani, L., Fogher, C., 2006.** Development of SCAR markers for germplasm characterisation in olive tree (*Olea europaea* L.). *Mol. Breeding* 17: 59–68.
- Camps, G., 1974.** Les civilisations préhistoriques d' Afrique du Nord et du Sahara. Paris, *Doin*, pp 51 et 90.
- Cantini, C., A. Cimato & G. Sani, 1999.** Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. *Euphytica* 109: 173–181.
- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., Giorio, G., 2002.** Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104: 301–307.
- Ciferri R., 1950.** Dated ipotesi sull'origine e l'evoluzione dell'olivo. *Olearia* 1: 114–122.
- Cipriani G., Marrazzo M.T., Marconi R., Cimato A., Testolin R., 2002.** Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 104: 223–228.
- Clark A.G. and Lanigan C.M.S., 1993.** Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Mol. Biol. Evol.* 10(5): 1096-1111.
- Claros, M.G., Crespillo, R., Aguilar, M.L., Canovas, F.M., 2000.** DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive-tree (*Olea europaea* L.). *Euphytica* 116: 131–142.
- Cordeiro A.I., J.F. Sanchez-Sevilla, M.C. Alvarez-Tinaut and M.C. Gomez-Jimenez, 2008.** Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* by RAPD markers. *Biol. Plantarum* 52 (4): 642-647.
- Cresti, M., Linskens, H.F., Mulcahy, D.L., Bush, S., Distillio, V., Xu, M.Y., Vignani, R., Cimato, A., 1996.** Preliminary communication about the

- identification of DNA in leaves and oil of *Olea europaea*. *Adv. Hort. Sci.* 10: 105–107.
- Damania A. B., 1995.** Olive, the plant of peace, reigns throughout Mediterranean. *Diversity* 11: 131-132.
- Darmency, H., 1997.** Gene flow between crops and weeds: risk for new herbicide resistance weeds? In: De Prado, R., Jorrín, J., García-Torres, L., Weed and Crop Resistance to Herbicides. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 239–248.
- De Candolle, G., 1880.** Sur l'origin des especes cultivées. Paris.
- Depeiges, A., C. Goubely, A. Lenoir, S. Cocherel, and G. Picard, M. Raynal, F. Grellet, M. Delseny, 1995.** Identification of the most represented motifs in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci. *Theor. Appl. Genet.* 91:160-168.
- Deragon, J.M. and Landry, B.S., 1992.** RAPD and other PCR-based analyses of plant genomes using DNA extracted from small leaf discs. *PCR Methods Appl.* 1:175-180.
- Díaz R., De la Rosa R., Martín A., Rallo P., 2006.** Development, characterization and inheritance of new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. *Tree Genet Genomes* 2: 165–175.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle., 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Esselman E.J., Jianqiang L., Crawford D.J., Winduss J.L. and Wolfe A.D., 1999.** Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae). comparative results for al- lozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol. Ecol.* 8: 443– 451.
- Excoffier L., Smouse P., Quattro J., 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Fabri, A., Hormaza, J.I., Polito, V.S., 1995.** Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) Cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120 (3), 538–542.
- Fang D.Q. and Roese M.L., 1997.** Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 408–417.

- Fanourakis N., H. Pavlikaki and C.P. Navarro, 2004.** Genetic relationships of different Greek landraces of cucumber. *Euphytica Plant breeding* 136: 143-147.
- Fisher, T., 1904.** Der oelbaum. Pettermans Mittelungen, Ergänzungscheft Nt 147:4-60.
- Fontanazza, G., Baldoni, L., 1990.** Proposed programme for genetic improvement of the olive. *Olivae* 34, 32–40.
- Friedrich W.L. and E. Velitzelos., 1986.** Bemerkungen zur sptquartaren flora von Santorin (Griechenland). *Cour. Forsch. Inst. Senckenberg*, 86: 387-395. Frankfurt am Main.
- Fritsch P. and Rieseberg L.H., 1996.** The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Smith T.B. and Wayne R.K. (eds.), in *Conservation*. Oxford University Press, London, pp. 54–73.
- Galvan M.Z., Borner B., Balatti P.A. and Branchard M., 2003.** Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Euphytica* 132: 297–301.
- Gemas V.J.V., Almadanim M.C., Tenreiro R., Martins A. and Fevereiro P., 2004.** Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea L. subsp. europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 51: 501–511.
- Gemas V.J.V., Rijo-Johansen M.J. and Fevereiro P., 2002.** Intravariability of the Portuguese olive Cultivar Galega Vulgar expressed by RAPD, ISSR and SPAR. *Acta Hort.* 586: 175–178.
- Gemas V.J.V., Rijo-Johansen M.J., Tenreiro R. and Fevereiro P., 2000.** Inter- and intra-varietal analysis of three *Olea europaea L.* cultivars using the RAPD technique. *J. Hort.Sc. & Biotech.* 75 (3): 312-319.
- Gillies, A.C.M., Cornelius, J.P., Newton, A.C., Navarro, C., Herná'ndez, M., Wilson, J., 1997.** Genetic variation in Costa Rica populations of the tropical timber species *Cedrela odorata L.*, assessed using RAPDs. *J. Mol. Ecol.* 6, 1133–1145.
- Gomes S., Martins-Lopes P., Lima-Brito J., Meirinhos J., Lopes J., Martins A., Guedes-Pinto H., 2008.** Evidence of clonal variation in olive 'Verdeal-Transmontana' cultivar using RAPD, ISSR and SSR markers. *J Hortic Sci Biotechnol* 83(4): 395–400.

- Gottlieb L.D., 1977.** Electrophoretic evidence and plant systematic. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 64: 161–180.
- Green P.S., 2002.** A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bulletin* 57: 91–140.
- Gregoriou, C., 1996.** Assessment of variation of landraces of olive tree in Cyprus. *Euphytica*, 87: 173-176.
- Guerrero R., Loreti F., Bartolini S., Vitogliano C., Giorgelli F., 1994.** Clonal selection and self compatibility in the olive cultivar 'Leccino'. Technical Meeting of Working Groups 1 and 4, Córdoba, Spain, 14–16 Dec
- Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J. and Owen, J.L., 1994.** Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet* 89: 998-1006.
- Hagidimitriou, M., A. Katsiotis, G. Menexes, C. Pontikis and M. Loukas, 2005.** Genetic diversity of major Greek olive cultivars using molecular (AFLP and RAPDs) markers and morphological traits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 130(2): 211-217.
- Halldén, C., Hansen, M., Nilsson, N.-O., Hjerdin, A. and Säll, T. 1996.** Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1185-1192.
- Hamrick, J.L., 1989.** Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In: Soltis, D.E., Soltis, P.S. (Eds.), *Isozymes in Plant Biology*. Chapman & Hall, London, pp. 87–105.
- Hamrick J.L., Godt M.J.W. and Sherman-Broyles S.L., 1992.** Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95–124.
- Hauville A., 1953.** La répartition des variétés d'olivier en Algérie et ses conséquences pratiques. *Bull Soc des Agricult. d'Algérie* 580: 1–8.
- Herrera C., 1995.** Plant–vertebrate seed dispersal systems in the Mediterranean: ecological, evolutionary, and historical determinants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 26: 705–727.
- Hess J., Kadereit J.W. and Vargas P., 2000.** The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). *Mol. Ecol.* 9: 857–867.
- Jacob, H. J., Lindpaintner, K., Lincoln, S. E., Kusumi, K., Bunker, R. K., Mao, Yi-Pei, Ganten, D. Dzau, V. J. and Lander, E. S., 1991.** Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. *Cell* 67: 213-224.

- Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vázquez & A. Karp, 1997.** Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol Breeding* 3: 381–390.
- Kantety R.V., Zeng X.P., Bennetzen J.L. and Zehr B.E., 1995.** Assessment of genetic diversity in Dent and Popcorn (*Zea mays L.*) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol. Breed.* 1: 365–373.
- Karp A., Kresovich S., Bhat K.V., Ayad W.G. and Hodgkin T., 1997.** Molecular tools in plant genetic resources: a guide to the technologies. IPGRI *Technical Bulletin Number 2*.
- Khadari B., Breton C., Moutier N., Roger P.J., Besnard G., Berville A. and Dosba F., 2003.** The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theor. Appl. Genet.* 106: 521–529.
- Khadari B., Moutier N. and Dosba F., 2001.** Approche moléculaire de caractérisation des variétés françaises d'olivier: construction d'une base de données de géotypes de référence. *Olivae* 87: 29–32.
- Korbin M., Kuras A. and Urawicz E., 2002.** Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR PCR. *Cell Mol. Biol. Lett.* 7(2B): 785–794.
- Lande, R., 1991.** Marker-assisted selection in relation to traditional methods of plant breeding. In *Plant breeding in the 1990s*. Edited by H. Stalker and J. Murphy. CAB International, Wallingford, U.K. pp. 437–451.
- Landegren U., Nilsson M., Kwok P.-Y., 1998.** Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res.* 8:769–776.
- Lavee, S., 1996.** Biology and physiology of the olive. In: *World Olive Encyclopedia*. International Olive Oil Council, Spain, pp. 61–110.
- Loukas, M. & C.B. Krimbas, 1983.** History of olive cultivars based on their genetic distances. *J Hort Sci* 58: 121–127.
- Loveless, M.D., Hamrick, J.L., 1984.** Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15, 65–95.
- Lumaret, R., Amame, M., Ouzzani, N., Baldoni, L., Debain, C., 2000.** Chloroplast DNA variation in the cultivated and wild taxa of the genus *Olea L.* - *Theor. appl. Genet.* 101: 547_553.

- Maguire, T.L., Sedgley, M., 1997.** Genetic diversity in *Banksia* and *Dryandra* (Proteaceae) with emphasis on *Banksia cuneata*, a rare and endangered species. *Heredity* 79, 396–401.
- Martins-Lopes, P., Lima-Brito, J., Gomes, S., Meirinhos, J., Santos, L. and Guedes-Pinto, H., 2007.** RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 117-128.
- Martins-Lopes, P., S. Gomes, J. Lima-Brito, J. Lopes, H. Guedes-Pinto, 2009.** Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. 'Cobrançosa' by molecular markers. *Sc. Hort.* 123: 82–89.
- Mekuria G., Collins G. and Sedgley M., 2002.** Genetic diversity within an isolated olive (*Olea europaea* L.) population in relation to feral spread. *Sci. Hort.* 94: 91–105.
- Mekuria G.T., Collins G.G. and Sedgley M., 1999.** Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. *J. Hort. Sci. Biotech.* 74: 309–314.
- Morettini, A., Pulselli, A., 1953. In: Lavee, S., 1996.** Biology and physiology of the olive. In: World Olive Encyclopaedia. International Olive Oil Council, Spain, pp. 61–110.
- Morgante M., Pfeiffer A., Jurman I., Paglia G., Olivieri A.M., 1998.** Isolation of microsatellite markers in plants. In: Karp A., Isaac P.G., Ingram D.S. (eds) Molecular tools for screening biodiversity. Plants and animals. Chapman and Hall, London, pp 75–134
- Morrison D.F., 1990.** Multivariate Statistical Methods. 3th ed. *McGraw-Hill*, Inc. pp. 312-351.
- Mullis K.B., Erlich H.A., Arnheim N., Horn G.T., Saiki R.K., and Scharf S.J., 1987.** Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. U.S. Patent #4,683,195.
- Nagaoka T. and Ogihara Y., 1997.** Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 597–602.
- Ouazzani N., Lumaret R. and Villemur P., 1995.** Apport du polymorphisme alloenzymatique à l'identification variétale de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Agronomie* 15: 31–37.
- Ouazzani N., Lumaret R. and Villemur P., 1996.** Genetic variation in the olive tree (*Olea europaea* L.) cultivated in Morocco. *Euphytica* 91: 9–20.

- Ouazzani N., Lumaret R., Villemur P. and Di Giusto F., 1993.** Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive tree (*Olea europaea* L.). *J. Heredity* 84: 34–42.
- Ozkaya, M.T., E. Cakir, Z. Gokbayrak, H. Ercan, N. Taskin, 2006.** Morphological and molecular characterization of ‘Derik Halhali’ olive (*Olea europaea* L.) accessions grown in Derik–Mardin province of Turkey *Sc. Hort.* 108: 205–209.
- Panelli G., Famiani F., Rugini E., Bignani D., Natali S., 1990.** Preliminary characterization of olive somatic mutants from gamma irradiated ‘Frantoio’ and ‘Leccino’ plantlets. *Acta Hort* 286: 77–80.
- Pasqualone A., Caponio F. and Blanco A. 2001.** Inter-simple sequence repeat DNA markers for identification of drupes from different *Olea europaea* L. cultivars. *Eur. Food Res. Technol.* 213: 240–243.
- Patterson H.D. and Weatherup S.T.C., 1984.** Statistical criteria for distinctness between varieties of herbage crops. *J. agric. Sci., Camb.*, 102: 59-68.
- Penner G.A. 1996.** RAPD analysis of plant genomes. In: Jauhar P.P. (ed.), *Methods of genome analysis in plants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 251–268.
- Pontikis, C. 2000.** Subtropical and tropical fruits: Olive (in Greek). *Stamoulis Publ.*, Athens, Greece.
- Pontikis, C., M. Loukas and G. Kousounis. 1980.** The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars. *J.Hort. Sci.* 54: 333-343.
- Prevost, A. and M. J. Wilkinson. 1999.** A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet.* 98: 107-112.
- Rafalski J.A., Vogel J.M., Morgante M., Powell W., Andre C., Tingey S.V., 1996.** Generating and using DNA markers in plants. In: Birren B, Lai E (eds) *Nonmammalian genomic analysis. A practical guide*. Academic Press, San Diego, pp 75–134.
- Rakoczy–Trojanowska M. and Bolibok H., 2004.** Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9: 221–238.
- Rallo P., Dorado G., Martin A., 2000.** Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 101: 984–989. doi:10.1007/s001220051571

- Reale S., Doveri S., Díaz A., Angiolillo A., Lucentini L., Pilla F., Martin A., Donini P., Lee D., 2006.** SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Genome* 49: 1193–1205.
- Remesal-Rodríguez, J., 1996.** Economía oleícola: En la antigüedad, p. 47–58. In: Consejo Oleícola Internacional (Ed.), 'Enciclopedia Mundial del Olivo, Plaza & Janes Editores S.A., Barcelona, Spain.
- Röder, M.S., Wendehake, K., Korzun, V., Bredemeijer, G., Laborie, D., Bertrand, L., Isaac, P., Rendell, S., Jackson, J., Cooke, R.J., Vosman, B., Ganal, M.W., 2002.** Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties. *Theor. Appl. Genet.* 106: 67–73.
- Rohlf F.J. and R.R. Sokal, 1981.** Comparing numerical taxonomic studies. *Systematic Zool.* 30: 459-490.
- Rohlf, M., 1998.** NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.02i. Department of Ecology and Evolution. State University of New York, Setauket, NY.
- Roselli G., Petruccelli L., Polsinelli L. and Cavalieri D. 2002.** Variability in five Tuscan olive cultivars (*Olea europaea* L.). *J. Genet. Breed.* 56: 51–60.
- Rossetto M., McLauchlan A., Harriss F.C.L., Henry R.J., Baverstock P.R., Lee L.S., Maguire T.L., Edwards K.J., 1999.** Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae). *Theor Appl Genet* 98: 1091 – 1098.
- Rotondi, A., Magli, M., Ricciolini, C., Baldolini, L., 2003.** Morphological and molecular analysis for the characterization of a group of Italian olive cultivars. *Euphytica* 132 (2): 129–137.
- Rubio de Casas R., Balaguer L., Manrique E., Pérez-Corona M.E., Vargas P., 2002.** On the historical presence of the wild olive *Olea europaea* L. var. *sylvestris* (Miller) Leh. in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. *Anales de Jardín Botánico* 59: 342–344.
- Rugini E. and Lavee S., 1992.** In: Hammerschlag F.A. and Litz R.E. (eds.), Olive in Biotechnology of Perennial Fruit Crops. Cambridge University Press, 371–382.
- Rugini F., Panelli G., 1994.** In vivo and in vitro selection of polyploidy mutants in olive cultivars 'Frantoio' and 'Leccino'. XXIV Int Horti Congr, Kyoto, Japan, 21–22 August, Abstract- 274.
- Saitou, N. & M. Nei, 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing filogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.

- Sanz-Cortés F., Badenes M.L., Paz S., Iñiguez A., Llácer G., 2001.** Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. *J Am Soc Hort Sci* 126: 7–12.
- Schierwater B. and Ender A., 1993.** Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Res* 21: 4647-4648.
- Sefc K.M., Lopes M.S., Mendonca D., Rodrigues dos Santos M., Laimer da Câmara Machado M., da Câmara Machado A., 2000.** Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology* 9: 1171–1173.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973.** Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Sokal, R. R. 1979.** Testing statistical significance of geographic variation patterns. *Syst. Zool.* 28: 227-231.
- Spooner D., Treuren R., Vicente M.C., 2005.** Molecular markers for GenBank management. *IPGRI Technical Bulletin* 10: 136.
- Staub, J.E., Serquen F.C., Gupta M., 1996.** Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience* 31: 729–741.
- Tanksley S.D., Young N.D., Paterson A.H. and Bonierbale M.W., 1989.** RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology* 7: 257-264.
- Terzopoulos P.J., Kolano B., Bebeli P.J., Kaltsikes P.J. and Metzidakis, 2005.** Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. *Sci. Hort.* 105: 45–51.
- This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G.S., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibanez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhaes R., Meredith C.P., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E., 2004.** Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1448–1458.
- Thormann, C., M. Ferreira, L. Camargo, J. Tivang and T. Osborn, 1994.** Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor. Applied Genet.*, 88: 973-980.
- Tous J., Romero A. and Barranco D., 1990.** Olive cultivars in Catalonia (Spain). *Acta Hort.* 286: 129–132.

- Tous J., Romero A., Plana J., Aranburu J., 1998.** Selección clonal de la variedad de olivo 'Arbequina'. Presentación del clon IRTA- 1–18. *Phytoma* 102: 15–28.
- Trujillo I., Rallo L. and Arus P., 1995.** Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120: 318–324.
- Turrill W.B. 1951.** Wild and cultivated olives. *Kew Bull.* 3: 439–442.
- Vargas P. and Kadereit J.W., 2001.** Molecular fingerprinting evidence (ISSR) for a wild status of *Olea europaea* L. (Oleaceae) in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. *Flora* 196: 142–152.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995.** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407–4414.
- Welsh J., McClelland M., 1990.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213–7218.
- Wickens T.D., 1995.** The Geometry of Multivariate Statistics. *Lawrence Erlbaum Associates, Inc.* pp. 127-143.
- Wiesman Z., Avidan N., Lavee S. and Quebedeaux B., 1998.** Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the West bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123: 837–841.
- Williams J.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V., 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531–6535.
- Yang H. and Korban S.S., 1996.** Screening apples for OPD20/600 using sequence-specific primers. *Theor. Appl. Genet.* 92: 263–266.
- Yang W.P., Oliveira A.C., Godwin I., Schertz K. and Bennetzen J.L., 1996.** Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Sci.* 36: 1669–1676.
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T., 2002.** Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* 11:1–16.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994.** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-178.
- Zohary D. and Spiegel-Roy P., 1975.** Beginning of fruits growing in the Old World. *Science* 187: 319–327.

Zohary D., Hopf M., 1994. Domestication of Plants in the Old World, second edition. Clarendon Press, Oxford.

Ελληνική βιβλιογραφία

Αναγνωστόπουλος, Π. 1939. Αι ποικιλίαι και η οικολογία της ελληνικής ελαίας. Εκδόσεις Λαμπρόπουλος. Αθήνα.

Θεριός Ι.Ν, 2005. Ελαιοκομία, *Εκδ. Γαρταγάνη*, Θεσσαλονίκη 2005.

Λίνος, Α. και Μ. Χατζηδημητρίου, 2007. Μελέτη της παραλλακτικότητας των μητρικών φυτών ελιάς σε φυτώρια της περιοχής Ξυλοκάστρου. 23^ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, Χανιά, 23-26 Οκτωβρίου. Πρακτικά συνεδρίου, Τόμος 13, τεύχος Α, σελ. 247.

Ο.Π.Ε.Κ.Ε.Π.Ε. / (αρχείο Α.Υ.Μ.Ε.Ε.Ε.)

Ποντίκης Κ.Α, 2000. Ελαιοκομία. *Εκδ. Σταμούλης*, Αθήνα 1994.

Σαρπάκη, Α.,1999. Η αρχαιοβοτανική μελέτη της οικίας 'Τζάμπakas' στο Ρέθυμνο Κρήτης, στο Μινωιτών και Μυκηναίων Γεύσεις, Τζεδάκις, Γ. & Martlew Η. (επιμ.). εκδ. Καπόν, pp. 40-41. Αθήνα.

Σκαράκης Γ. Ν., 2005. Κλασσική και μοριακή βελτίωση φυτών. Σημειώσεις στα πλαίσια μεταπτυχιακών σπουδών.

Στεφανάκη-Νικηφοράκη Μ., 1999. Συστηματική Βοτανική, *Εκδ. Σταμούλης*, Αθήνα.

Τουλουμενίδου Τ., Α. Κατσιώτης, Μ. Χατζηδημητρίου και Π. Καλτσίκης, 2005. Γενετική ποικιλομορφία της ποικιλίας 'Καλαμών' (*Olea Europaea*). 22^ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, Πάτρα, 19-21 Οκτωβρίου. Περιλήψεις ανακοινώσεων σελ. 253.

Διαδίκτυο

1. <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>
2. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
3. <http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/LabelClaims/QualifiedHealthClaims/ucm073992.htm>
4. <http://www.internationaloliveoil.org/>
5. <http://www.minagric.gr/greek/3.6.4.html>
6. http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/elia_ep.htm

7. http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/ladi.htm
8. http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/Maps/Elies_eleop.htm
9. http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/Maps/Elies_epitr.htm
10. <http://www.statistics.gr/portal/page/portal/ESYE>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

	KOR-KRHTH-1	KOR-KRHTH-2	KOR-KRHTH-3	KOR-KRHTH-4	KOR-KALAMATA-1	KOR-KALAMATA-2	KOR-POROS-G	KOR-POROS-ISTO	KOR-POROS-AGRO	KOR-FTHIOTIDA-1	KOR-FTHIOTIDA-2	KOR-GPA	KOR-KYPROS	KAL-KRHTH-1	KAL-KRHTH-2	KAL-KALAMATA-1	KAL-KALAMATA-2	KAL-KALAMATA-3	KAL-POROS-NANA	KAL-POROS-KOINH	KAL-FTHIOTIDA	KAL-GPA-1	KAL-GPA-2	KAL-GPA-3	KAL-KYPROS-1	KAL-KYPROS-2	KAL-KYPROS-3	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RI-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	1	1	1	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RAPD-1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

UBC-818

1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Καυστικό Νάτριο NaOH 4M (Pellets)

Για τη δημιουργία διαλύματος NaOH 4M τελικού όγκου 100 ml προστέθηκαν 16 gr NaOH (Pellets) σε αποσταγμένο νερό και το διάλυμα αναδεύτηκε στο μαγνητικό αναδευτήρα. Όταν διαλύθηκαν εντελώς τα Pellets συμπληρώθηκε αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

Υδροχλωρικό οξύ HCL 1M

Για τη δημιουργία διαλύματος HCL 1M τελικού όγκου 100 ml προστέθηκαν 10 ml πυκνό HCL 10M (37%) σε 90 ml αποσταγμένο νερό και το διάλυμα αναδεύτηκε στο μαγνητικό αναδευτήρα.

Tris HCL 1M (pH 7.5)

Για τη δημιουργία διαλύματος Tris HCL 1M τελικού όγκου 100 ml προστέθηκαν 12,11 gr TRIS METHYLAMINE ή TRIS BASE σε περίπου 80 ml αποσταγμένου νερού και περίπου 4 ml πυκνό HCL. Το διάλυμα αναδεύτηκε στο μαγνητικό αναδευτήρα και με τη βοήθεια του ηλεκτρόδιου του pHμέτρου το pH έφτασε στο 7,5 (+/- 0,1-0,2) με τη χρήση είτε πυκνού HCL είτε του λιγότερο πυκνού διαλύματος HCL 1M.

EDTA 0.5M (pH 8) (Ethylene Diaminate Traacetic Acid)

Για τη δημιουργία διαλύματος EDTA 0,5M τελικού όγκου 100 ml προστέθηκαν 18,61 gr EDTA σε περίπου 75 ml αποσταγμένο νερό και περίπου 1,7 – 2 gr NaOH (pellets). Το διάλυμα αναδεύτηκε στο μαγνητικό αναδευτήρα και βάζοντας μέσα στο διάλυμα το ηλεκτρόδιο του pHμέτρου το pH φτάνει στο 8 χρησιμοποιώντας pellets NaOH επιπρόσθετα της αρχικής ποσότητας των 1,7-2 gr.

TAE 50X (Trizma Base)

Για τη δημιουργία διαλύματος TAE τελικού όγκου 500 ml προστέθηκαν 121 gr TAE (Trizma base) σε περίπου 200 ml αποσταγμένο νερό. Το διάλυμα αναδεύτηκε στο μαγνητικό αναδευτήρα και αφού διαλύθηκε προστέθηκαν 50 ml EDTA. Εν συνεχεία προστέθηκαν 28,55 ml Glacial Acetic Acid. Αφού το διάλυμα αναδευτεί καλά και με τη βοήθεια ογκομετρικού σωλήνα προστέθηκε αποσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 500 ml. Τέλος, αναδεύτηκε ξανά το διάλυμα.

TAE 1X

Τόσο για την παρασκευή του Gel αгарόζης όσο και για την παρασκευή του buffer που χρησιμοποιείται ηλεκτροφόρηση απαιτείται διάλυμα TAE 1X. Για την παρασκευή 1 lt διαλύματος TAE 1X προστέθηκαν 20 ml διαλύματος TAE 50X σε 880 ml αποσταγμένο νερό.

Na – Acetate (Ammonium Acetate)

Για τη δημιουργία διαλύματος Ammonium Acetate τελικού όγκου 100 ml προστέθηκαν 40,8 gr Ammonium Acetate σε αποσταγμένο νερό. Το διάλυμα αναδεύεται στο μαγνητικό αναδευτήρα. Όταν διαλυθεί προστίθεται αποσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 100 ml.

CTAB 2% & 5%

Για τη δημιουργία του CTAB πρέπει όλα τα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν να είναι αποστειρωμένα. Χρόνος αποστείρωσης περίπου 45 λεπτά.

Αποστειρώνονται τα διαλύματα:

- EDTA 0,5 M
- Tris HCl
- NaOH 4 M
- HCl 1 M
- TAE 50x
- Περίπου 700 ml αποσταγμένο νερό

- Όλα τα μπουκαλάκια που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή και αποθήκευση του CTAB

Προσοχή: Το CTAB για να διαλυθεί πρέπει να φτάσει σε θερμοκρασία 65 °C

(+/-1) υπό ανάδευση

CTAB 2%

CTAB 2% περιέχει	Stock Solutions	Για τελικό όγκο 100 ml	Για τελικό όγκο 350 ml	Για τελικό όγκο 700 ml
2% CTAB σκόνη		2 gr CTAB	7 gr CTAB	14 gr CTAB
100 mM Tris	1M Tris	10 ml Tris	35 ml Tris	70 ml Tris
20 mM EDTA	0,5M EDTA	4 ml EDTA	14 ml EDTA	28 ml EDTA
1,4 M NaCl	5M NaCl	28 ml NaCl ή 8,18 gr *	98 ml NaCl ή 28,63 gr σκόνη	196 ml NaCl ή 57,27 gr σκόνη
1% PVP Σκόνη		1 gr PVP	3,5 gr PVP	7 gr PVP

CTAB 5%

CTAB 5% περιέχει	Stock Solutions	Για τελικό όγκο 100 ml	Για τελικό όγκο 200 ml	
5% CTAB σκόνη		5 gr CTAB	10 gr CTAB	
0,35 M NaCl	5M NaCl	7 ml NaCl	14 ml NaCl	

Σύμφωνα με τους παραπάνω πίνακες όλα τα υλικά προστίθενται στον αναδευτήρα προσπαθώντας να διατηρηθεί σταθερή η θερμοκρασία στους 65 °C (+/-1). Τα διαλύματα δημιουργούν αφρό. Κατά την μεταφορά των διαλυμάτων πρέπει να μεταφέρεται όλος ο αφρός.

TE

Για τη δημιουργία διαλύματος TE τελικού όγκου 100 ml προστίθενται 0,2 ml EDTA και 0,5 ml διάλυμα Tris σε αποσταγμένο νερό. Το διάλυμα αναδεύεται στο

μαγνητικό αναδευτήρα. Όταν διαλυθεί προστίθεται αποσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 100 ml.

CIAA

Για τη δημιουργία διαλύματος CIAA τελικού όγκου 250 ml προστίθενται 10 ml ισοαμλικής Αλκοόλης (προστατεύει το DNA) και 240 ml χλωροφόρμιο (αναλογία 24:1). Το χλωροφόρμιο απομακρύνει τις διάφορες ανεπιθύμητες ουσίες.