

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Σπαντίδος Χ. Τάσος –Νεκτάριος

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάλυση της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS) του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA) και του χλωροπλαστικού DNA (psbA-trnH) σε ποικιλίες συκιάς του *Ficus carica*.



ΑΘΗΝΑ 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

Αγρο-Βιοτεχνολογία Φυτών και Μικροοργανισμών Γεωργικής Σημασίας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάλυση της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS) του
πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA) και του
χλωροπλαστικού DNA (psbA-trnH) σε ποικιλίες συκιάς του
Ficus carica.

Σπαντίδος Χ. Τάσος –Νεκτάριος

ΑΘΗΝΑ 2016

Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάλυση της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS) του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA) και του χλωροπλαστικού DNA (psbA-trnH) σε ποικιλίες συκιάς του *Ficus carica*.

Σπαντίδος Χ. Τάσος –Νεκτάριος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής (Επιβλέπων)
2. Δημήτριος Μπουράνης, Καθηγητής (Μέλος)
3. Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Καθηγητής (Μέλος)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Αγρο-Βιοτεχνολογία Φυτών και Μικροοργανισμών Γεωργικής Σημασίας» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κατινάκη πρωτίστως, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στον πρόσωπο μου, δίνοντας μου την ευκαιρία να αποτελέσω μέλος του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας. Η συνεχής καθοδήγησή του και οι πολύτιμες συμβουλές του συνέβαλαν καταλυτικά στην υλοποίηση της εργασίας. Η ουσιαστική, διαρκής, επικοινωνιακή και ευχάριστη συνεργασία μας, καθώς και το κριτικό πνεύμα του κατάφεραν να αλλάξουν το δικό μου τρόπο σκέψης.

Θερμές ευχαριστίες στα μέλη της Εξεταστικής και Συμβουλευτικής Επιτροπής καθηγητές Μπουράνη Δημήτριο και Καραμπουρνιώτη Γεώργιο, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή Επιτροπή και την ανάγνωση της μεταπτυχιακής διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Διδάκτορα κ. Βεζύρη Έλενα για την καθοδήγηση, τις γνώσεις και τις συμβουλές της στην πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους, την Λέκτορα κ. Μαρία Δήμου και την Διδάκτορα κ. Βενιεράκη Αναστασία για την πολύτιμη βοήθεια τους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή φοιτήτρια και φίλη μου Δούκα Δήμητρα καθώς και το υπόλοιπο επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και την βοήθεια τους.

Τέλος ευχαριστώ τα άτομα που είναι κοντά μου και κυρίως την οικογένειά μου που με στηρίζαν και με στηρίζουν οικονομικά, ψυχικά και που είναι κοντά μου σε όποια απόφαση και αν πάρω στη ζωή μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
SUMMARY	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Γενικά για τα ριβοσώματα	10
1.2 Το πυρηνικό ριβοσωμικό DNA	10
1.3 Μεταγραφή του 45S rDNA και επεξεργασία του πρόδρομου rRNA	12
1.4 ITS1 και ITS2 δευτεροταγείς δομές.....	13
1.5 Εναρμονισμένη εξέλιξη.....	15
1.6 Το ITS1 και ITS2 ως γραμμωτός κώδικας DNA	18
1.7 Το psbA- trnH ως γραμμωτός κώδικας.....	21
1.8 Η συκιά	21
1.9 Βοτανική ταξινόμηση και μορφολογία.....	22
1.10 Πολλαπλασιασμός.....	23
1.11 Ποικιλίες συκιάς.....	23
1.11.1 Κύμησ	23
1.11.2 Μίσιον (Mission).....	24
1.11.3 Βασιλική μαύρη.....	25
1.11.4 Ντοτάτο (Dottato).....	25
1.12 Κλίμα και έδαφος.....	26
1.13 Τύποι και τρόποι καρποφορίας της συκιάς.....	26
1.14 Επικοινωνία και γονιμοποίηση.....	27
1.15 Εχθροί και ασθένειες.....	28
2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	29
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30

3.1 Φυτικό υλικό	29
3.2 Απομόνωση ολικού DNA από το φυτικό ιστό.....	30
3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	32
3.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	32
3.3.2 Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR).....	34
3.3.3 Ενίσχυση τμήματος της περιοχής ITS	34
3.3.4 Ενίσχυση τμήματος της περιοχής trnH-psbA.....	35
3.4 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.	37
3.5 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης	38
3.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων	39
3.7 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα	40
3.7.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα.....	40
3.7.2. Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation)	41
3.8 Μετασχηματισμός ικανών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμίδιο	42
3.8.1. Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> σε υγρό η στερεό υπόστρωμα	42
3.8.2. Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells).....	42
3.8.3. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμίδιο	43
3.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E. coli</i>	44
3.9.1. Μέθοδος βρασμού (Boiling Preparation), (Holmes & Quigley, 1981)	44
3.9.2 . Μέθοδος απομόνωσης με στήλη (QIA prep)	45
3.10. Σύγκριση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση	47
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
4.1 Χαρακτηριστικά της περιοχής ITS	48
4.2. Ενδο-γονιδιωματικός πολυμορφισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των περιοχών ITS1 και ITS2 στις ποικιλίες <i>F.carica</i>	51
4.3. Πολυμορφισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στις περιοχές ITS1, ITS2 και 5.8S	

στις διάφορες ποικιλίες <i>F.carica</i>	51
4.4 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των αλληλουχιών ITS1, ITS2 και 5.8S.....	58
4.4.1 Συντηρημένες αλληλουχίες της περιοχής ITS1 και της ITS2	58
4.4.2 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 και της ITS2	60
4.4.3 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των αλληλουχιών 5.8S	64
4.5 Χαρακτηριστικά της psbA-trnH περιοχής.	65
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	68
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄	83
ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....	83
ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ	84
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄	85
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ.....	85

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή, προσδιορίστηκαν και αναλύθηκαν οι ακολουθίες της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS) του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA και της διαγονιδιακής περιοχής *psbA-trnH* του χλωροπλαστικού DNA από 20 ελληνικές ποικιλίες *F. carica*. Η περιοχή ITS καθώς και η περιοχή *psbA-trnH* ενισχύθηκαν με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας καθολικούς εκκινητές και στην συνέχεια τα προϊόντα της αντίδρασης PCR κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχίστηκαν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρξε σημαντική απόκλιση στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των περιοχών ITS2 και ITS1 μεταξύ των ποικιλιών καθώς και εντός της ποικιλίας. Η ανάλυση της πρωτοταγούς και δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2 έδειξε ότι αυτοί οι πολυμορφισμοί της τάξης του ενός ή δυο νουκλεοτιδίων δεν επηρέασαν σημαντικά τη δευτεροταγή δομή του ITS2. Ωστόσο, η παρουσία μιας έλλειψης σε ορισμένα ITS2 επηρέασε σημαντικά την έλικα IV. Οι πολυμορφισμοί της τάξης του ενός νουκλεοτιδίου μεταξύ των ποικιλιών δεν επηρέασαν την δευτεροταγή δομή του ITS1. Επίσης, προσδιορίστηκε και αναλύθηκε η αλληλουχία της περιοχής *psbA-trnH* αρκετών ποικιλιών *F. carica*. Τα δεδομένα έδειξαν ότι η ανάλυση της περιοχής ITS1, ITS2 και *psbA-trnH* επιτρέπει την διάκριση των ποικιλιών.

Λέξεις-κλειδιά: ποικιλίες, *Ficus carica*, ITS, *psbA-trnH*, γραμμωτός κώδικας DNA

SUMMARY

In our study the ITS and psbA-trnH sequences from 20 Greek *F. carica* cultivars were analyzed. The ITS (ITS1, 5.8S και ITS2) region of the nuclear genome and the psbA-trnH from the chloroplast was amplified from these samples using universal primers and reaction conditions. The resulting PCR products were cloned and subsequently sequenced. There was significant nucleotide sequences divergence between the intra-individual and intra-cultivar ITS2 and ITS1 regions. Analyses of sequence and secondary structure of ITS2 region demonstrated that these divergences in nucleotide sequences, did not significantly affected the secondary structure of ITS2 region. The presence of the indel affected significantly Helix IV. The single nucleotide polymorphisms found among the cultivars did not affected the secondary structure of ITS1. The psbA-trnH region of several *F. carica* cultivars was also analyzed. The data demonstrated that ITS1, ITS2 and psbA-trnH improves significantly cultivars discrimination.

Keywords: cultivars, *Ficus carica*, ITS, psbA-trnH, Barcoding DNA

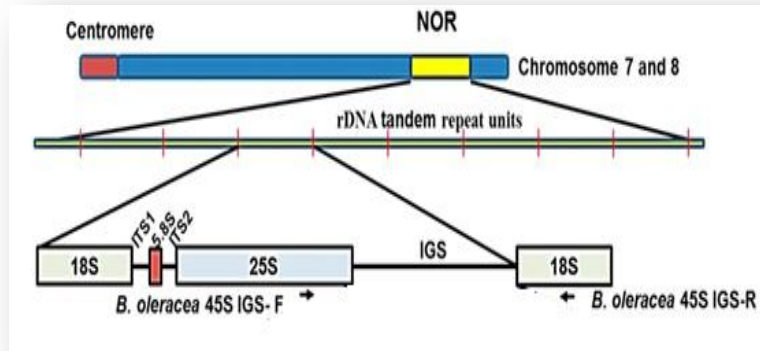
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά για τα ριβοσώματα

Τα ριβοσώματα είναι μικρά κυτταρικά οργανίδια. Ο κύριος ρόλος τους είναι η σύνθεση πρωτεϊνών. Τα ριβοσώματα είναι περίπου 20nm σε διάμετρο και αποτελούνται από 65% ριβοσωμικό RNA (rRNAs) και 35% ριβοσωμικές πρωτεΐνες που είναι γνωστές σαν ριβονουκλεοπρωτεΐνες. Τα ριβοσώματα αποτελούνται από δύο διακριτές υπομονάδες διαφορετικού μεγέθους, τη μικρή (SSU) και τη μεγάλη (LSU), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους. Το ριβόσωμα των ευκαρυωτικών κυττάρων χαρακτηρίζεται ως 80S ριβόσωμα και οι υπομονάδες του ως 40S και 60S, μικρή και μεγάλη, αντίστοιχα. Στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα αποτελείται από ένα μόριο 18S rRNA και 30 περίπου ριβοσωμικές πρωτεΐνες, ενώ η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα αποτελείται από τρία μόρια rRNA, τα 25-28S rRNA, 5S rRNA και 5,8S rRNA και 40 περίπου ριβοσωμικές πρωτεΐνες (Poczai and Hyvönen, 2010).

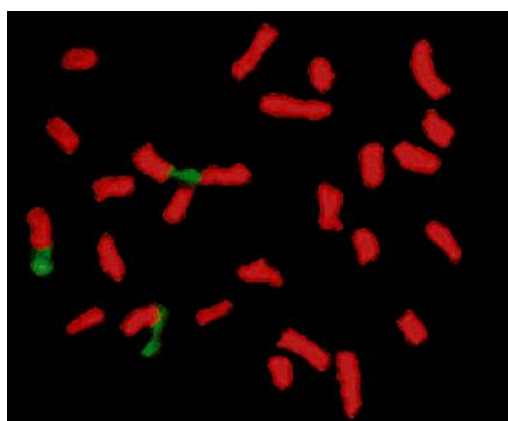
1.2. Το πυρηνικό ριβοσωμικό DNA

Το πυρηνικό γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών φιλοξενεί δεκάδες ή και χιλιάδες αντίγραφα ριβοσωμικού DNA (rDNA). Το ριβοσωμικό DNA μεταγράφεται σε ένα μεγάλο πρόδρομο μόριο RNA (το 45S pre-rRNA), από το οποίο στη συνέχεια αποκόπτονται τα 25-28S, 18S και 5,8S rRNA. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που βρίσκονται μεταξύ του 18S rRNA και του 5.8S γονιδίου αναφέρονται ως ενδομεταγραφόμενη περιοχή 1 (Internal Transcribed Spacer 1, ITS1) του πυρηνικού ριβοσωμικού (nr) DNA, ενώ οι αλληλουχίες DNA που βρίσκονται μεταξύ των 5.8S και 25-28S rRNA γονιδίων αναφέρονται ως ενδομεταγραφόμενη περιοχή 2 (Internal Transcribed Spacer 2, ITS2) του πυρηνικού ριβοσωμικού (nr) DNA. Τα αντίγραφα rDNA οργανώνονται ως διαδοχικές επαναλήψεις σε διάταξη κεφαλή-ουρά σε μία ή περισσότερες θέσεις στο γονιδίωμα. Κάθε αντίγραφο rDNA διαχωρίζεται από το γειτονικό του στη συστοιχία με μία αλληλουχία νουκλεοτιδίων η οποία αναφέρεται ως διαγονιδιακή περιοχή (Integenic Spacer, IGS) (Poczai and Hyvönen, 2010; Lafontaine, 2015) (Εικόνα 1.1).



Εικόνα1.1. Σχηματική παρουσίαση της θέσης των 45S rDNA στα χρωμοσώματα 7 και 8 της *B. oleracea* και της οργάνωσης του 45S rDNA.

Στο DNA των χρωμοσωμάτων απαντώνται δέσμες διαδοχικά επαναλαμβανόμενων ριβοσωμικών γονιδίων, (rDNA γονιδίων), τα οποία μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση I. Οι περιοχές αυτές των χρωμοσωμάτων ονομάζονται οργανωτές πυρηνίσκου, (Nucleolar Organiser Regions, NOR), και αποτελούν τη βάση της δομικής οργάνωσης του πυρηνίσκου. Ο αριθμός των NOR στα φυτά ποικίλει ανάλογα με το είδος του φυτού. Για παράδειγμα το *F. carica* έχει 26 χρωμοσώματα ($2n = 26$), στα 2 ή 3 από αυτά εντοπίζονται τα 45S rDNA που βρίσκονται σε διαδοχικές επαναλήψεις στις περιοχές NOR (Falistocco, 2009) (Εικόνα 1.2).

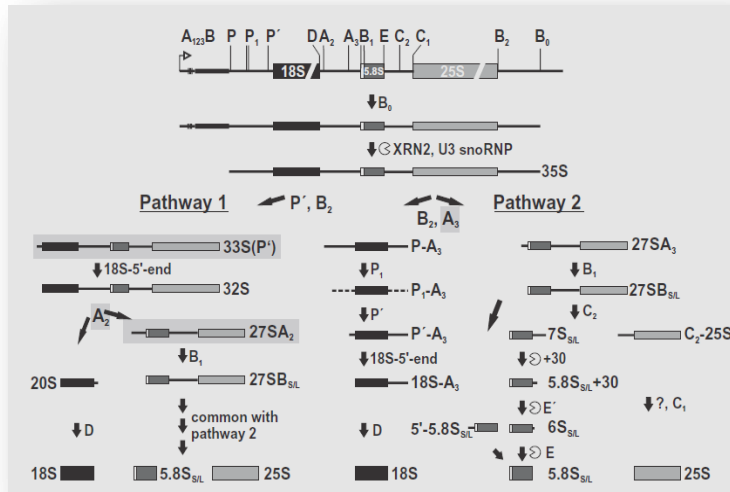


Εικόνα1.2. Προσδιορισμός της θέσης του 45S rDNA στα χρωμοσώματα του *F. carica*. Τα χρωμοσώματα βάφτηκαν με DAPI, και το 45S rDNA ανιχνεύθηκε μέσω *in situ* υβριδισμού (κίτρινο-πράσινο).

1.3. Μεταγραφή του 45SrDNA και επεξεργασία του πρόδρομου rRNA

Η RNA πολυμεράση I (Pol I) εστιάζεται αποκλειστικά στη μεταγραφή του rDNA. Η μεταγραφή ξεκινά από τον υποκινητή που εντοπίζεται στη περιοχή IGS (Εικόνα 1.1). Στην *A. thaliana* οι αλληλουχίες που εκτείνονται από τη θέση -55 ανωφερικά σε + 6 κατωφερικά από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (+1) είναι επαρκείς για την έναρξη της μεταγραφής. Από τη μεταγραφή τους προκύπτει αρχικά ένα μεγάλο πρόδρομο pre-rRNA, το 45S, το οποίο έχει μήκος περίπου 8-12kb και περιέχει αλληλουχίες για τα δομικά rRNAs (5.8S, 18S και 25-28S rRNAs), το ITS1 και ITS2, καθώς και τις εξωτερικές μεταγραφόμενες περιοχές (5'-ETS και 3'-ETS).

Τα πρόδρομα μετάγραφα, κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, συνδέονται με ριβοσωμικές πρωτεΐνες (Ribosomal Proteins, RPs) και με μια ομάδα μικρών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (snoRNPs) και έτσι σχηματίζονται μεγάλα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια τα οποία μπορεί να γίνουν ορατά με μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ITS1, ITS2 και ETS απομακρύνονται μέσω της δράσης ενδοριβονουκλεασών, οι οποίες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες θέσεις εκτομής και 5' ή και 3' εξωριβονουκλεασών και τελικά προκύπτουν τα ώριμα ριβοσωμικά RNA. Στα φυτά φαίνεται να υπάρχουν δυο εναλλακτικά μονοπάτια επεξεργασίας του pre-rRNA (Εικόνα 1.3). Τα δυο αυτά εναλλακτικά μονοπάτια επεξεργασίας του pre-rRNA μπορεί να χρησιμεύσουν για να διασφαλιστεί η βιογένεση των λειτουργικών ριβοσωμάτων ενώ θα μπορούσαν να ρυθμίζονται διαφορετικά σε κατάσταση στρες ή σε διαφορετικούς ιστούς (Henras *et al.*, 2015; Lafontaine, 2015).

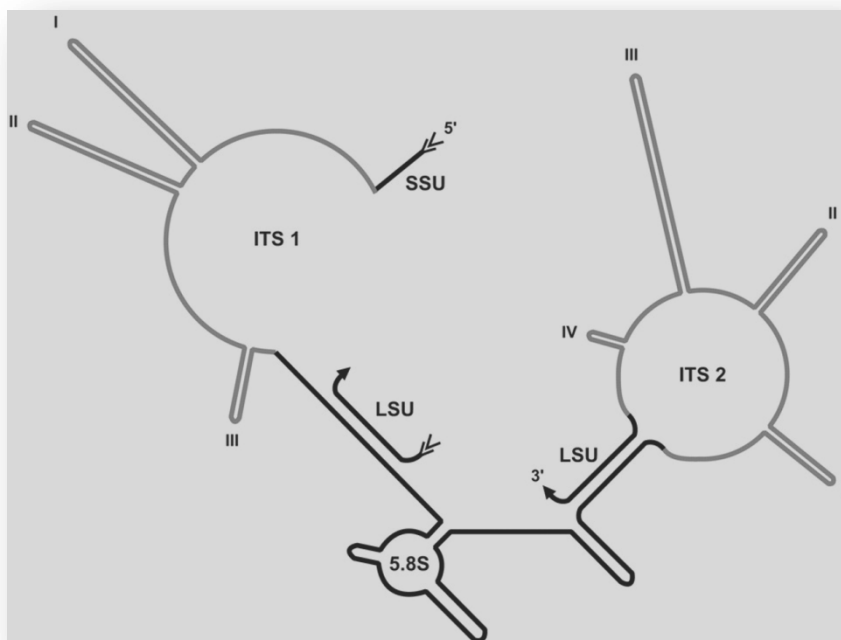


Εικόνα 1.3. Η *A.thaliana* διαθέτει δυο εναλλακτικά μονοπάτια επεξεργασίας του pre-rRNA. Αρχικά το κύριο μετάγραφο απελευθερώνεται από τη θέση εκτομής B₀ μέσω της δράσης της πρωτεΐνης atRTL2. Στη συνέχεια, είτε απομακρύνονται οι 3'ETS και 5'ETS-μεταγραφόμενες περιοχές μέσω της δράσης της εξωνουκλεάσης atXRN2 και παράγεται ένα μετάγραφο μεγέθους 35S (Μονοπάτι 1) είτε μέσω της δράσης μιας ενδονουκλεάσης στη θέση εκτομής A₃ πραγματοποιείται ο διαχωρισμός του μεταγράφου σε δυο τμήματα (Μονοπάτι 2). Στην συνέχεια τα δυο μονοπάτια παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες. Τελικά παράγονται τα ώριμα ριβοσωμικά RNAs τα οποία μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα. Κατά την ωρίμανση του pre-rRNA έχουν επίσης παρατηρηθεί χημικές τροποποιήσεις (π.χ. μεθυλίωση της βάσης ή της ριβόζης) των πρώιμων μεταγράφων.

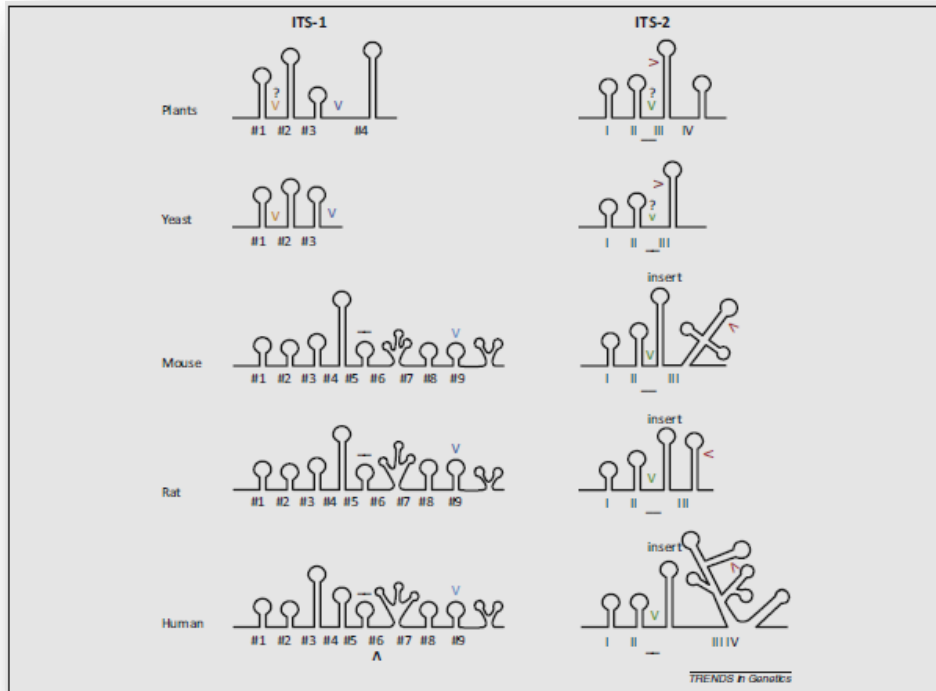
1.4. ITS1 και ITS2 δευτεροταγείς δομές

Η τάση του μονόκλωνου RNA είναι να αναδιπλώνεται σε έλικες οποτεδήποτε είναι συμβατές με την πρωτοταγή αλληλουχία. Η δημιουργία πολλαπλών ελίκων εμφανίζεται και στις δύο αλληλουχίες ITS, φέρνοντας τα 5' και 3' άκρα σε στενή εγγύτητα (Εικόνα 1.4). Οι δευτεροταγείς δομές του μεταγραφόμενου RNA των ITS1 και ITS2 RNA μεταγράφων εξετάστηκαν σε άλγη, πρωτόζωα, μύκητες, φυτά και θηλαστικά. Οι σχηματικές αναπαραστάσεις των δομών των ITS1 και ITS2 φαίνονται στην εικόνα 1.5. Στους ασπόνδυλους ευκαρυώτες, η κοινή δευτεροταγής δομή του ITS1 είναι τρεις έλικες, I, II και III (μερικές φορές λιγότερες ή μερικές φορές περισσότερες), που ακολουθείται από μια ασύζευκτη περιοχή πλούσια σε κυτοσίνη και αδενίνη (CA) και μια μικρού μήκους τέταρτη έλικα IV. Μια μονόκλωνη αλληλουχία πλούσια σε αδενίνη στο 5' άκρο του 5.8S είναι κοινή για όλους τους οργανισμούς. Όπως φαίνεται στη ζύμη (Εικόνα 1.5), η τέταρτη έλικα συχνά λείπει. Η περιοχή ITS1 των σπονδυλωτών δεν έχει αναγνωρίσιμη ομοιότητα με την ITS1 που

έχει βρεθεί είτε στα φυτά ή μύκητες, είτε στα ασπόνδυλα και πρώτιστα. Στα θηλαστικά το ITS1 έχει εννέα έλικες, κάποιες από αυτές είναι διακλαδισμένες, ενώ δεν υπάρχει καμιά ασύζευκτη περιοχή πλούσια σε CA. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ITS1 που διαθέτουν μόνο τα πτηνά και τα θηλαστικά, είναι η σχεδόν ταυτόσημη (με μία μόνο διαφορά νουκλεοτιδίου) 15-bp ακολουθία στο 3' άκρο της μικρής έλικας V. Η πιο κοινή μορφή του ITS2 έχει παρομοίως τέσσερις έλικες. Οι έλικες I και II, που ακολουθούνται από μια συντηρημένη μονόκλωνη περιοχή πλούσια σε πουρίνες (Εικόνα 1.5), μια σχετικά μεγάλου μήκους και μερικές φορές διακλαδισμένη έλικα III και τέλος μια μικρή έλικα IV, που είναι ως επί το πλείστον μεταβλητή. Το κύριο γνώρισμα που διευκολύνει την αναγνώριση των δομικών χαρακτηριστικών του ITS2 είναι ότι στην έλικα II υπάρχει μια διόγκωση ή αλλιώς «φουσαλίδα» (bulge) πυριμιδίνη-πυριμιδίνης κοντά στη βάση της και ενώνει την έλικα III, κοντά στο 5' άκρο της (Coleman, 2015).



Εικόνα 1.4. Η οργάνωση των RNAs με το διαχωρισμό των εσωτερικών μεσοδιαστημάτων μεταγραφόμενης αλληλουχίας ITS1 και ITS2. Μια γενική δευτεροταγής δομή των ITS1 και ITS2.



Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση της εσωτερικής μεταγραφόμενης περιοχής ITS1 και ITS2 και δευτεροταγείς δομές των φυτών, ζυμομυκήτων και τριών σπονδυλωτών.

1.5. Εναρμονισμένη εξέλιξη

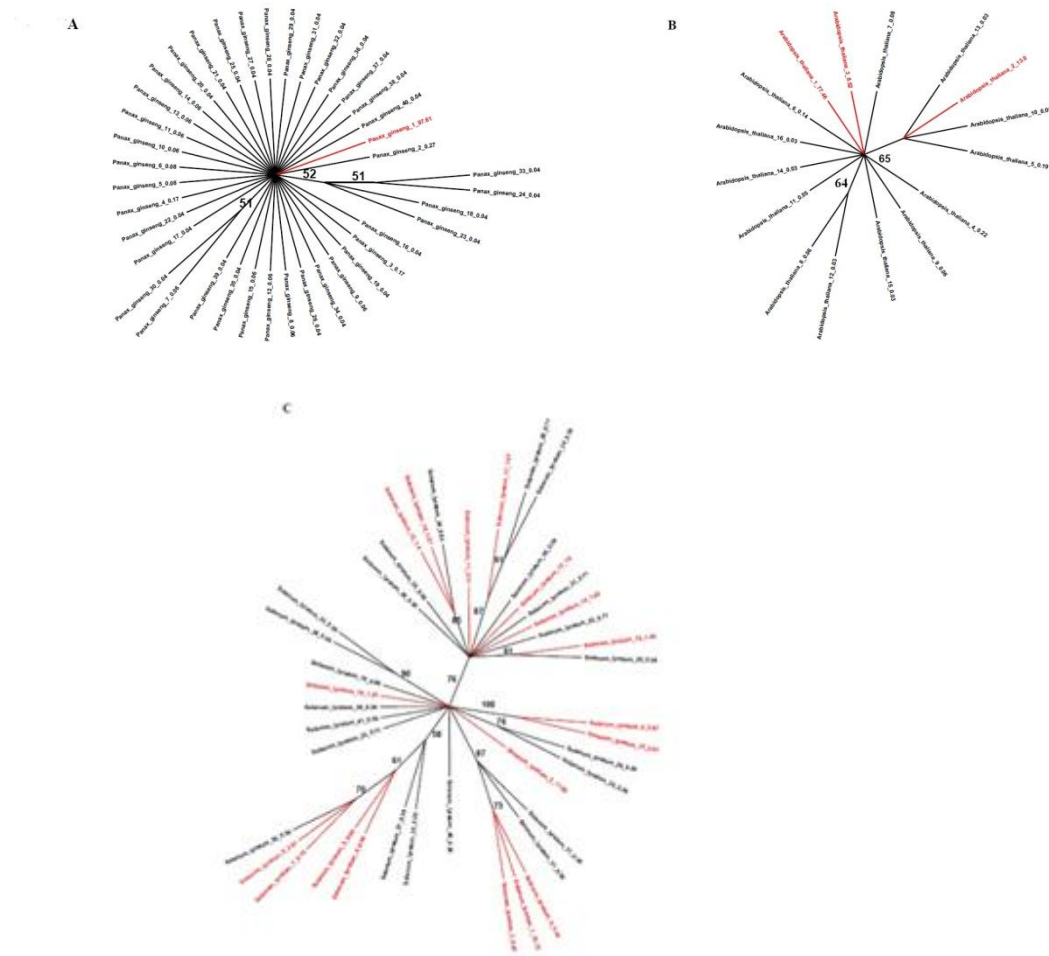
Η εναρμονισμένη εξέλιξη (concerted evolution) ή λιγότερο συχνά, συνεξέλιξη (coevolution) είναι το φαινόμενο κατά το οποίο δυο γονίδια εξελίσσονται μαζί. Τα ριβοσωμικά γονίδια παρά το ότι απαντώνται σε πολλά αντίγραφα, θεωρείται ότι συνήθως ακολουθούν εναρμονισμένη εξέλιξη (concerted evolution) και ουσιαστικά όλα τα αντίγραφα έχουν την ίδια αλληλουχία (Graur and Li, 1999; Zhang and Hewitt, 2003). Η ευρεία χρήση των ριβοσωμικών γονιδίων σε εξελικτικές μελέτες αποδίδεται και στο γεγονός ότι διαθέτουν μια σειρά από γνωρίσματα, όπως είναι η δευτεροταγής δομή τους, η διαφορετικοί ρυθμοί εξέλιξης των περιοχών τους και ο τυχαίος αριθμός επαναλήψεων τους, που εξυπηρετούν στην αντιμετώπιση διαφόρων ερωτημάτων εξελικτικής φύσης.

Τα ριβοσωμικά γονίδια είναι διατεταγμένα σε διαδοχικές επαναλήψεις και χαρακτηρίζονται από χαμηλή ενδογονιδιωματική ποικιλομορφία ως συνέπεια της εναρμονισμένης εξέλιξης (Dover *et al.*, 1982; Baldwin *et al.*, 1995; Elder and Turner,

1995). Πολλοί μηχανισμοί φαίνεται να ευθύνονται για το φαινόμενο αυτό, αλλά οι πιο σημαντικοί φαίνεται να είναι ο άνισος ανασυνδυασμός (unequal crossing over) και η αντικατάσταση γονιδίων (gene conversion), με τον πρώτο να υποστηρίζεται ότι είναι πιο σημαντικός αφού καταλήγει σε διπλασιασμό ή έλλειψη πολλών επαναλήψεων, ενώ ο δεύτερος επηρεάζει πολύ λίγες επαναλήψεις (Hribova *et al.*, 2011). Αφενός η σταθερότητα του rRNA εντός της οικογένειας και εντός του πληθυσμού και αφ' εταίρου η σχετικά γρήγορη εξέλιξη των ITS1 και ITS2 που βρίσκονται κάτω από χαμηλή επιλεκτική πίεση, έκανε την ITS περιοχή έναν από τους πιο δημοφιλείς δείκτες σε φυλογενετικές μελέτες (Alvarez and Wendel, 2003; Francisco-Ortega *et al.*, 2001; Renner *et al.*, 2007; Pettengill and Neel, 2008). Η ανάλυση των ITS χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον εντοπισμό προγόνων των υβριδικών ειδών και για τη μελέτη της προέλευσης των πολυπλοειδών ειδών (Sun *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Ωστόσο, η εξέλιξη των rDNA σε υβρίδια και σε αλλοπολυπλοειδή ειδικότερα, μπορεί να είναι περίπλοκη ως προς τον τρόπο που αλληλεπιδρούν τα μητρικά rDNA. Σε ορισμένα είδη, όπως *Arabidopsis*, *Brassica* ή *Silene*, οι αποκλίνουσες μητρικές αλληλουχίες rDNA εξακολουθούν να παραμένουν συντηρημένες και εξελίσσονται ανεξάρτητα χωρίς καμία αλληλεπίδραση (O'Kane *et al.*, 1996; Popp and Oxelman, 2001; Bennet and Smith, 1991). Σε άλλες περιπτώσεις, όπως σε αλλοπολυπλοειδή του *Nicotiana* ή *Dendrochilum*, τα μητρικά rDNA φαίνεται να ανασυνδυάζονται όπως κρίνεται από την παρουσία χιμαιρικών ITS αλληλουχιών (Barkman and Simpson, 2002; Volkov *et al.*, 2007). Η κυρίαρχη αλληλουχία rDNA μπορεί να αντικαταστήσει μια από τις γονικές αλληλουχίας rDNA όταν ένας τύπος rDNA χαθεί ή απαλειφθεί ή μπορεί να είναι μία χιμαιρική αλληλουχία που προκύπτει από ενδογονιδιωματικό ανασυνδυασμό (Hribova *et al.*, 2011). Προφανώς, εάν η εναρμονισμένη εξέλιξη δεν ολοκληρωθεί, διαφορετικοί τύποι παραλόγων και ορθολόγων rDNA αλληλουχιών μπορεί να βρεθούν στο γονιδίωμα, που συχνά περιλαμβάνουν σιωπηλές και μη λειτουργικές ITS ακολουθίες rDNA που αναφέρονται ως ψευδογονίδια. Η παρουσία των ψευδογονιδίων στα σύνολα των φυλογενετικών δεδομένων μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα φυλογενετικά συμπεράσματα (Mayol and Rosselló, 2001).

Σύμφωνα με τα φυλογενετικά δέντρα της ενδογονιδιωματικής ποικιλομορφίας όλων των ειδών που ερευνήθηκαν, ο ενδογονιδιωματικός πολυμορφισμός των ITS2 αλληλουχιών οφείλεται στους τρεις καθιερωμένους μηχανισμούς εξέλιξης (Nei and

Rooney, 2005). Ο πρώτος μηχανισμός είναι η εναρμονισμένη εξέλιξη, σύμφωνα με την οποία οι παραλλαγές του ITS2 εξελίχθηκαν ως μονάδες σε φυτικά γονιδιώματα από τους μηχανισμούς του ανασυνδυασμού (unequal crossing over) ή και της αντικατάστασης γονιδίων (gene conversion). Στο γονιδίωμα του *Panax Ginseng* σχεδόν όλα (<97%) τα ITS2 είναι πανομοιότυπα (one major variant) ως αποτελέσματα του μηχανισμού της εναρμονισμένης εξέλιξης (Εικόνα 1.6). Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η εξέλιξη γέννησης και θανάτου (birth-and-death evolution), στην οποία μερικές παραλλαγές (variants) του ITS2 παρήχθησαν από διπλασιασμό γονιδίου ενώ κάποιες από αυτές στη συνέχεια χάθηκαν από απαλοιφές (deletions), μετατοπίσεις (translocations) ή και κάποια αλλαγή στον αριθμό των χρωμοσωμάτων. Στο γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* οι παραλλαγές του ITS2 σχηματίζουν δυο ομάδες και θεωρείται μια περίπτωση του εν λόγω μηχανισμού (Εικόνα 1.6). Ο τρίτος μηχανισμός είναι η αποκλίνουσα εξέλιξη (divergent evolution), σύμφωνα με την οποία οι ITS2 παραλλαγές μέσα σε ένα φυτικό γονιδίωμα εξελίχθηκαν ανεξάρτητα και με κάποια απόκλιση. Το γονιδίωμα του *Solanum lycopersicon* έχει πολλαπλές ομάδες μεγάλων παραλλαγών γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί καλύτερα με αυτόν τον μηχανισμό (Εικόνα 1.6). Στη μελέτη των Song και συνεργατών (2012), η εναρμονισμένη εξέλιξη φαίνεται να είναι ο καλύτερος μηχανισμός που εξηγεί την ενδογονιδιωματική διακύμανση των αλληλουχιών ITS2 για το 65,7% των ειδών, ενώ η εξέλιξη γέννησης και θανάτου και η αποκλίνουσα εξέλιξη είναι ο καλύτερος μηχανισμός για να εξηγήσει το 27% και το 7.3% των ειδών, αντίστοιχα. Ωστόσο, ο Wolf και οι συνεργάτες (2013) χρησιμοποίησαν τα δεδομένα 454 Pyrosequencing των Song και συνεργατών (2012) και επανεξέτασαν το κριτήριο σχετικά με αντισταθμιστικές αλλαγές βάσεων (CBCs) εν όψει της ενδογονιδιωματικής μεταβλητότητας. Η μελέτη διαπίστωσε ότι οι ενδογονιδιωματικές αλλαγές βάσεων στα ITS2 αντίγραφα δεν ήταν σημαντικές ώστε να επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή της περιοχής ITS2 και τη φυλογενετική σχέση μεταξύ των φυτών και ως εκ τούτου κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ITS2 περιοχή θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο barcode για τα φυτά.



Εικόνα 1.6. Φυλογενετικά δένδρα των διαφόρων περιοχών ITS2 που απαντώνται στο γονιδίωμα του *Panax Ginseng* (A), *Arabidopsis thaliana* (B) και *Solanum lyratum* (C).

1.6. Το ITS1 και ITS2 ως γραμμωτός κώδικας DNA

Ο γραμμωτός κώδικας DNA (Barcoding DNA) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των ειδών με βάση τις διαφορές σε μικρές περιοχές του DNA (Hebert *et al.*, 2003). Από την εισαγωγή του το 2003, η μέθοδος αυτή έχει συγκεντρώσει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον (Blaxter, 2003; Marshall, 2005; Miller, 2007; Schindel and Miller, 2005). Ο γραμμωτός κώδικας DNA δεν περιορίζεται από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τις φυσιολογικές συνθήκες και επιτρέπει την πιστοποίηση ειδών χωρίς εξειδικευμένες γνώσεις ταξινόμησης. Η

μέθοδος είναι επίσης τυποποιημένη για συγκεκριμένους γραμμωτούς κώδικες DNA και καθολικούς (universal) εκκινητές, η οποία είναι ευνοϊκή για τη δημιουργία βάσεων δεδομένων και τη θέσπιση ενός οικουμενικού προτύπου για την ταυτοποίηση (Hajibabaei, 2005; Hebert and Gregory, 2005).

Ο όρος «γραμμωτός κώδικας DNA» ως αναγνωριστική ταξινομική ομάδα προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Paul Hebert του Πανεπιστημίου του Guelph το 2003. Εισηγήθηκε ότι το 5 'άκρο του κυτοχρώματος c οξειδάσης 1 (CO 1) από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα ήταν αρκετό για να δημιουργήσει γραμμωτούς κώδικες DNA για την ταυτοποίηση των ζώων (Singh *et al.*, 2012). Ωστόσο, στα φυτά τα μιτοχονδριακά γονίδια είναι αργά εξελισσόμενα, με πολύ χαμηλά ποσοστά υποκατάστασης και δεν είναι κατάλληλα για barcoding. Ως εκ τούτου, η αναζήτηση για τα φυτικά barcode μετατοπίζεται προς τα χλωροπλαστικά και πυρηνικά γονιδιώματα τα οποία διαθέτουν υψηλά ποσοστά υποκατάστασης. Μία αλληλουχία DNA που θεωρείται ότι είναι χρήσιμη ως ένας γραμμωτός κώδικας πρέπει να διαθέτει τρία βασικά χαρακτηριστικά:

- i) Η ύπαρξη ουσιαστικής γενετικής μεταβλητότητας σε επίπεδο είδους για να επιτρέψει διάκριση των ειδών.
- ii) Μία μικρού μήκους αλληλουχία για να διευκολύνει την εκχύλιση του DNA και την ενίσχυση του.
- iii) Συντηρημένες πλευρικές περιοχές για την ανάπτυξη των καθολικών εκκινητών για όλα τα ταξινομικά είδη (Hollingsworth *et al.*, 2009).

Έτσι, ένας άγνωστος οργανισμός ή ιστός θα μπορούσε να αποδοθεί σε ένα είδος όταν μια τέτοια αλληλουχία συγκρίνεται με τις αντίστοιχες αλληλουχίες που απαντώνται σε άλλους οργανισμούς. (Hebert *et al.*, 2003). Ως εκ τούτου, εάν η αλληλουχία DNA από έναν άγνωστο οργανισμό ή ιστό δεν παρουσιάζει ομολογία με οποιαδήποτε από τις αλληλουχίες που αναφέρονται, το δείγμα θα πρέπει να επισημανθεί ως πιθανό νέο είδος, που απαιτεί μια λεπτομερή μελέτη. Επίσης, εκτός από την παροχή μιας ταχείας αναγνώρισης, χρησιμοποιώντας μόνο ένα μικρό ποσό ιστού από οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης ενός φυτού ή ζώου, ο γραμμωτός κώδικας DNA θα μπορούσε να ενισχύσει την ανακάλυψη νέων ειδών ή στην ταυτοποίηση κρυπτικών και πολυμορφικών ειδών (Singh *et al.*, 2012). Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταχεία απογραφή της βιοποικιλότητας (Lahaye *et al.*, 2008),

στον έλεγχο των φυτικών σκευασμάτων και τροφίμων για νοθεία ή για προσμίξεις, σε ιατροδικαστικές έρευνες (Chen *et al.*, 2010; Valentini *et al.*, 2010; Srirama *et al.*, 2010), στην αντιμετώπιση του παράνομου εμπορίου των απειλούμενων φυτικών και ζωικών ειδών (Parveen *et al.*, 2012; Mueller *et al.*, 2011; Yesson *et al.*, 2011) και γενικότερα σε οικολογικές και περιβαλλοντικές μελέτες.

Ένας αριθμός περιοχών από το γονιδίωμα του πλαστιδίου, που περιλαμβάνει τα γονίδια *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *psbA-trnH* και *matK*, έχουν δοκιμαστεί για barcoding DNA (μοριακοί δείκτες) των φυτών με διαφορετικούς βαθμούς επιτυχίας. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει συναίνεση για ένα παγκόσμιο γραμμωτό κώδικα DNA για τα φυτά. Ωστόσο, η πλειοψηφία των επιστημόνων υποστηρίζει ότι για την ακριβή ταυτοποίηση των ειδών απαιτείται η χρήση περισσότερων του ενός μοριακού δείκτη. Έτσι, ο Chase και οι συνεργάτες (2007) πρότειναν ότι μπορεί να χρειαστεί ένας συνδυασμός τριών μοριακών δεικτών για την ταυτοποίηση φυτών σε επίπεδο είδους. Δύο συνδυασμοί που προτείνονται ήταν, *rpoC1*, *rpoB*, *matK* και *rpoC1*, *matK*, *psbA-trnH*. Αντιθέτως, ο Kress και ο Erickson (2007) πρότειναν δυο μοριακούς δείκτες για ένα παγκόσμιο γραμμωτό κώδικα DNA που αποτελείται από το κωδικοποιημένο *rbcL* και από την περιοχή *psbA-trnH*. Ο Lahaye και οι συνεργάτες (2008) με βάση τη μελέτη περισσότερων από 1000 φυτών, κυρίως ορχιδέων, υποστηρίζει ότι μια μικρή περιοχή του πλαστιδιακού γονιδίου *matK* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ως ένας καθολικός γραμμωτός κώδικας DNA. Η ομάδα εργασίας των φυτών CBOL, συνιστά το συνδυασμό δύο γονιδιακών τόπων του *matK* και *rbcL* ως φυτικό barcode, όμως η διάκριση των ειδών με την χρήση αυτού του συνδυασμού περιορίστηκε στο 72% των φυτών. Η ITS περιοχή έχει επίσης προταθεί ως ένα πιθανό barcode για ορισμένες ομάδες φυτών. Η δεύτερη ενδομεταγραφόμενη περιοχή (ITS2) παρουσίασε ικανότητα διάκρισης 92,7% σε επίπεδο είδους σε περισσότερα από 6600 δείγματα φυτών, εκ των οποίων τα 4800 είδη ήταν από 753 ξεχωριστά γένη. Ωστόσο, σε πρόσφατες *in silico* μελέτες το ITS1 έχει σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις από ότι το ITS2 λόγω του μικρότερου μήκους του προϊόντος ενίσχυσης και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε GC (Wang *et al.*, 2015).

1.7. Το *psbA-trnH* ως γραμμωτός κώδικας

Το *psbA-trnH* αποτελεί τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο χλωροπλαστικό γραμμωτό δείκτη στα φυτά. Αυτό οφείλεται τόσο στην παρουσία συντηρημένων εκκινήτων οι οποίοι ενισχύουν τη σύνθεση προϊόντος σχεδόν σε όλα τα αγγειόσπερμα όσο και στην παρουσία εξαιρετικά μεγάλης διαγονιδιακής παραλλακτικότητας στις αλληλουχίες της περιοχής (Kress and Erickson, 2007; Shaw *et al.*, 2007). Μελέτες έχουν δείξει ότι σε διάφορες ομάδες φυτών όπως τα πτερυδόφυτα η ανάλυση της περιοχής *psbA-trnH* ήταν ικανή για τον προσδιορισμό σχεδόν όλων των ειδών (van de Wiel *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010). Ωστόσο, η ανάλυση της περιοχής *psbA-trnH* σε όλα τα φυτά παρουσιάζει προβλήματα διότι σε ορισμένες οικογένειες φυτών οι αλληλουχίες της περιοχής *psbA-trnH* περιέχουν αναστροφές οι οποίες οδηγούν σε μια υπερεκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας με αποτέλεσμα τη λανθασμένη φυλογενετική σχέση μεταξύ των φυτών (Whitlock *et al.*, 2010). Ως εκ τούτου είναι συχνά αναγκαίο να χρησιμοποιείται το *psbA-trnH* σε συνδυασμό με το ITS2 ή και με το ITS1 (Whitlock *et al.*, 2010).

1.8 Η συκιά

Η συκιά είναι δένδρο που κατάγεται από τις θερμές χώρες της Ασίας. Στην Ελλάδα άρχισε να καλλιεργείται το 700-800 π.Χ. Στην Κρήτη υπολογίζεται πως την καλλιεργούσαν πολύ νωρίτερα (πριν από το 1600 π.Χ). Υπολείμματα εδάδιμων σύκων έχουν ανακαλυφθεί σε ανασκαφές στην κοιλάδα του Ιορδάνη και χρονολογούνται στο 11.400 π.Χ. (Krislev *et al.*, 2006). Από την Ελλάδα διαδόθηκε στην Ιταλία και τις άλλες χώρες της Ευρώπης (Ισπανία, Πορτογαλία) καθώς και τις χώρες της βόρειας Αφρικής. Στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α, όπου εισήχθη σχετικά πρόσφατα καλλιεργείται επίσης αρκετά εκτεταμένα και στην Αυστραλία (Νούσης, 1984). Η συκιά ευδοκιμεί γενικά σε υποτροπικές και τροπικές περιοχές, ακόμα και σε ήπιες κλιματικά περιοχές της εύκρατης ζώνης. Οι κυριότερες χώρες παραγωγής σύκων είναι η Ισπανία, Ιταλία, Τουρκία, Ελλάδα, Πορτογαλία, Η.Π.Α κ.α.

Στην Ελλάδα η συκιά καλλιεργείται κυρίως στην Πελοπόννησο, Στερεά Ελλάδα και Εύβοια, στα νησιά του Αιγαίου, στα Επτάνησα και στην Κρήτη. Διάσπαρτα απαντάται σ' όλα διαμερίσματα της χώρας. Για την παραγωγή ξηρών σύκων

καλλιεργείται κυρίως στην Μεσσηνία, Λακωνία, Εύβοια και νησιά του Αιγαίου (Ποντίκης, 1996).

1.9. Βοτανική ταξινόμηση και μορφολογία

Η συκιά ανήκει στο γένος *Ficus* και στο είδος *carica*. Είναι μέλος της οικογένειας των *Moraceae* στην οποία ανήκουν φυτά με γαλακτώδη χυμό. Είναι δένδρο με μέτρια ανάπτυξη που φτάνει συνήθως σε ύψος 5-7 μέτρων (Σφακιωτάκης, 1985). Το είδος *F. carica* είναι ένα θηλυκοδίοικο είδος που περιλαμβάνει δυο ευκρινείς τύπους δένδρων, την αρρενοσυκιά, που είναι μονόικη, δηλαδή έχει αρσενικά και θηλυκά άνθη και την ημεροσυκιά, που έχει μόνο θηλυκά άνθη. Η καλλιεργούμενη συκιά είναι δένδρο φυλλοβόλο, μετρίου έως μεγάλου μεγέθους, με μαλακό ξύλο. Τα φύλλα είναι απλά, μεγάλα, παχιά, τρίλοβα έως πεντάλοβα (Εικόνα 1.7), μακρόμισχα, με τραχεία επιφάνεια και χνουδωτά στην κάτω επιφάνεια (Ποντίκης, 1996). Οι οφθαλμοί είναι επίσης μεγάλοι, ωοειδείς και οξείς και εμφανίζονται πάνω από μια πλατιά ουλή που δημιουργεί ο μίσχος του φύλλου. Τα άνθη χωρίζονται σε αρσενικά και θηλυκά καθώς φέρονται στην εσωτερική παρεία κοίλης ανθοδόχης που ονομάζεται συκόνιο. Μέσα σ' αυτήν την ανθοδόχη θα σχηματιστεί ο καρπός (Genders, 1987).



Εικόνα 1.7. Πεντάλοβο φύλλο συκιάς (αριστερά) και τρίλοβο φύλλο συκιάς (δεξιά).

1.10. Πολλαπλασιασμός

Σε γενικές γραμμές ο πολλαπλασιασμός της συκιάς είναι πολύ εύκολος και μπορεί να γίνει με μοσχεύματα, με παραφιάδες, με σπόρο ή με καταβολάδες. Ο καλύτερος τρόπος πολλαπλασιασμού είναι με μοσχεύματα, χρησιμοποιώντας κλωνάρια ενός χρόνου καλά ανεπτυγμένα και χωρίς αρρώστιες που λαμβάνονται αργά το φθινόπωρο ή και στο τέλος του χειμώνα (Ζαχαρόπουλος, 1997).

1.11. Ποικιλίες συκιάς

Οι ποικιλίες της συκιάς είναι πολυάριθμες και χωρίζονται ανάλογα με τον αριθμό των καρποφοριών που δίνουν σε μια καλλιεργητική περίοδο σε μονόφορες και δίφορες καθώς και με βάση το χρωματισμό του φλοιού του συκόνιου σε λευκές και έγχρωμες. Οι σπουδαιότερες καλλιεργούμενες ποικιλίες στην Ελλάδα είναι η Καλαμών, η Κύμης (μονόφορη, λευκή), η Βασιλική Μαύρη (μονόφορη, έγχρωμη), το Πολίτικο (μονόφορη, λευκή), η Πρασινοσυκιά Λέσβου, η Φρακασάνα (δίφορη, λευκή), η Βασιλική λευκή (μονόφορη), η Λιβανό (μονόφορη, λευκή) και η Μαύρη Βοτανικού. Από τις ξένες ποικιλίες οι κυριότερες είναι οι εξής: Mission (μαύρη, δίφορη), Dottato (δίφορη, άσπρη), Alfioe και Braziliانا (μονόφορη, λευκή).

Γενικώς ένα θέμα που έχει προκύψει διεθνώς είναι η ονοματολογία, με τις καλλιεργούμενες ποικιλίες της συκιάς να διαφέρουν από χώρα σε χώρα. Σε αρκετές περιπτώσεις όταν μια ποικιλία συκιάς εισάγεται σε μια χώρα αποκτά νέα ονομασία όπως με την Συμυρναϊκή ποικιλία που ονομάστηκε Calimyrna στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α. αλλά και στην Ελλάδα πολλές ποικιλίες έχουν πάρει το όνομα τους από την περιοχή όπου βρεθήκαν ή καλλιεργήθηκαν αρχικά όπως Σμύρνης, Καλαμών, Σύμης κτλ (Μαλαπάνη, 2011).

1.11.1. Κύμης

Ο καρπός έχει μεσαίο μέγεθος με σχήμα αχλαδόμορφο και εξωτερικά πράσινο χρώμα (Εικόνα 1.8) ενώ εσωτερικά η σάρκα κόκκινη και γλυκιά. Ωριμάζει τέλη Αυγούστου με αρχές Σεπτεμβρίου. Είναι ποικιλία αρκετά παραγωγική και κατάλληλη για νωπή και ξηρή κατανάλωση (Δούκα, 2011).



Εικόνα 1.8. Σύκο ποικιλίας Κύμης.

1.11.2. Μίσιον (Mission)

Ο καρπός αυτής της ποικιλίας έχει μεγάλο μέγεθος, σφαιρικό σχήμα και χοντρό ποδίσκο (Εικόνα 1.9). Ο φλοιός είναι σκούρος μωβ, ενώ η σάρκα ανοιχτή κόκκινη και πολύ γλυκιά. Ζωηρό και παραγωγικό δέντρο. Ποικιλία εκλεκτής ποιότητας που προορίζεται για νωπή κατανάλωση. Η ωρίμανση της είναι τον Αύγουστο (Ευστρατίου, 2015).



Εικόνα 1.9. Σύκο ποικιλίας Μίσιον (mission).

1.11.3. Βασιλική Μαύρη

Είναι ποικιλία μονόφορη, ο καρπός είναι μεγάλος έχει σχήμα αχλαδόμορφο (Εικόνα 1.10). Εξωτερικά ο φλοιός έχει χρώμα μωβ σκούρο ενώ εσωτερικά η σάρκα είναι κόκκινη. Ωριμάζει τον Αύγουστο και το δένδρο έχει μεγάλη παραγωγικότητα. Είναι κατάλληλη για νοπή κατανάλωση (Δούκα, 2011).



Εικόνα 1.10. Σύκο ποικιλίας Βασιλική Μαύρη.

1.11.4. Ντοτάτο (Dottato)

Ποικιλία με μεγάλο καρπό και σχήμα στρογγυλό, κάπως αχλαδόμορφο (Εικόνα 1.11). Έχει πρασινοκίτρινο φλοιό και γλυκιά σάρκα. Είναι πολύ παραγωγικό και πολύ ζωηρό δέντρο. Θεωρείται ποικιλία εκλεκτής ποιότητας, κατάλληλη για νοπή κατανάλωση και για ξήρανση. Ωριμάζει και αυτή τον Αύγουστο (Ευστρατίου, 2015).



Εικόνα 1.11. Σύκο ποικιλίας ντοτάτο (dottato).

1.12. Κλίμα και έδαφος

Η συκιά είναι δέντρο ξηρών και θερμών περιοχών. Τα δέντρα αναπτύσσονται και παράγουν ικανοποιητικά όταν η θερμοκρασία την ημέρα του καλοκαιριού φτάνει στους 30-37°C. Μπορεί να αντέξει και σε υψηλότερες θερμοκρασίες πάνω από 40° C αλλά η ποιότητα του καρπού υποβαθμίζεται. Την περίοδο του χειμώνα ανάλογα με την ποικιλία, τα δέντρα ανέχονται θερμοκρασίες έως και (-8° C). Όσο αφορά την ξηρασία θεωρείται από τα πιο ανθεκτικά δέντρα.

Το δέντρο της συκιάς προσαρμόζεται εύκολα, γι'αυτό και αναπτύσσεται σε μια ευρεία ποικιλία εδαφών, αλλά αποδίδει καλύτερα σε βαθιά αργιλλοπηλώδη ή πηλώδη εδάφη, που αποστραγγίζονται καλά και έχουν μεγάλη περιεκτικότητα ασβεστίου ενώ ανέχεται και μέτρια αλκαλικά εδάφη. Το pH του εδάφους πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 έως 8 (Ποντίκης, 1996; Σφακιωτάκης, 1985; Genders, 1987).

1.13. Τύποι και τρόποι καρποφορίας της συκιάς

Υπάρχουν τρεις τύποι συκιάς, ανάλογα με τον τρόπο καρποφορίας της :

- Η ήμερη-μονόφορη συκιά: η οποία καρποφορεί πλάγια πάνω στην τρέχουσα ετήσια βλάστηση, στις μασχάλες των φύλλων, όπου σχηματίζονται συνήθως ένα και σπάνια δυο η τρία σύκα, ανάλογα με την ποικιλία.
- Η ήμερη-δίφορη συκιά: που είναι παρεμφερές δέντρο με την ήμερη συκιά με την διαφορά ότι ο τύπος αυτής της συκιάς δίνει δυο καρποφορίες το χρόνο. Η

πρώτη καρποφορία εμφανίζεται σε ξύλο της προηγούμενης χρονιάς ενώ η δεύτερη σε ξύλο της τρέχουσας χρονιάς.

- Η αρρενοσυκιά ή αγριοσυκιά : εμφανίζει τρεις ή και τέσσερις καρποφορίες το χρόνο. Η μια καρποφορία είναι σε ξύλο προηγούμενης χρονιάς ενώ οι υπόλοιπες είναι σε ξύλο της τρέχουσας περιόδου. Χαρακτηριστική ιδιότητα της αρρενοσυκιάς σε σχέση με την ήμερη συκιά είναι ότι φέρει πάνω της σύκα όλο το χρόνο τα οποία όμως είναι ακατάλληλα για τροφή (Δούκα, 2011).

1.14. Επικονίαση και γονιμοποίηση

Σε ορισμένες ποικιλίες τα σύκα εξελίσσονται σε εδώδιμο καρπό παρθενοκαρπικά και έτσι δεν έχουν ανάγκη επικονίασης. Όμως άλλες ποικιλίες όπως είναι οι ποικιλίες Κύμης, Αϊδινίου, Ιστιαίας κ.τ.λ έχουν ανάγκη γονιμοποίησης. Σε περίπτωση που δεν γονιμοποιηθούν, το σύνολο αυτών των καρπών πέφτει από τα δέντρα λίγες μέρες πριν από την ωρίμανση (Σφιχτέλλης, 2009).

Η επικονίαση των ανθέων της συκιάς, δηλαδή η μεταφορά της γύρης από τα άνθη της άγριας συκιάς προς τα άνθη της ήμερης συκιάς είναι μια πολύπλοκη και δύσκολη διαδικασία η οποία γίνεται με τη βοήθεια ενός εντόμου που ονομάζεται ψήνας (Εικόνα 1.12), (*Blastophaga psenes*, υμενόπτερο που ανήκει στην οικογένεια *Agaonidae*). Οι ψήνες είναι έντομα τα οποία μπορούν να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο μόνο εντός των συκών της άγριας συκιάς. Αυτά τα έντομα στην προσπάθειά τους να φτάσουν στην ωοθήκη της ήμερης συκιάς για να γεννήσουν τα αυγά τους (το οποίο δεν είναι εφικτό λόγω της κατασκευής των ανθέων της ήμερης συκιάς), μεταφέρουν την γύρη της άγριας συκιάς στην ήμερη και έτσι με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η επικονίαση και στην συνέχεια η γονιμοποίηση της ήμερης συκιάς (Μαλαπάνη, 2011).



Εικόνα 1.12. Θηλυκός ψήνας. Διακρίνεται γύρη πάνω του.

1.15. Εχθροί και ασθένειες

Οι κυριότεροι εχθροί της συκιάς, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν ζημιές στην παραγωγή και να υποβαθμίσουν ποιοτικά το παραγόμενο προϊόν, είναι ο κηροπλάστης ή ψώρα της συκιάς (*Ceroplastes rusci* L., *Homoptera*), η λογχαία ή μαύρη μύγα των σύκων (*Silba adipata* ή *Carpolonchaea aristella*, *Diptera*), η ψύλλα (*Homotoma ficus* L., *Homoptera*) και τέλος η μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*, *Diptera*) (Μαλαπάνη, 2011).

Οι ασθένειες της συκιάς είναι κυρίως:

1. Σηψιρριζία: που προκαλείτε από τους μύκητες *Armillaria mellea* και *Rosellinia necatrix*.
2. Ενδόσηψη: η οποία οφείλεται στον μύκητα *Fusarium moniliformae*.
3. Σκωρίαση: που προκαλείται από τους μύκητες *Uredo fici* και *Cercospora bollena*.
4. Μωσαϊκωση της συκιάς: η οποία είναι ίωση (Νούσης, 1984).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Μια σειρά από μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει μοριακούς δείκτες σε μια προσπάθεια να πλησιάσουν και να ερευνήσουν το μοριακό πολυμορφισμό και την γενετική σχέση μεταξύ των ποικιλιών *F. carica*. Μεταξύ αυτών των μοριακών δεικτών, το ITS φαίνεται να αποτελεί ένα επιτυχημένο εργαλείο για την ανάλυση των ποικιλιών *F. carica* της Τυνησίας (Baraket *et al.*, 2009a) και της Λατινικής Αμερικής (Castro *et al.*, 2015). Στην παρούσα μελέτη, σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί η γενετική ποικιλομορφία των 20 ελληνικών ποικιλιών *F. carica*, αναλύθηκαν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ITS1, ITS2 και 5.8S rRNA και παράλληλα εξετάσαμε τις δευτεροταγείς δομές τους. Επίσης εξετάσαμε κατά πόσο οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του psbA-trnH μοριακού δείκτη μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα εργαλείο για τη διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ αυτών των ποικιλιών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Φυτικό υλικό

Φυτικός ιστός (οφθαλμοί) από 20 ποικιλίες του *Ficus carica* παραχωρήθηκαν από τον κ. Κ. Δελλή καθηγητή εφαρμογών του ΑΤΕΙ Καλαμάτας. Οι ποικιλίες της συκίας αποτελούν μέρος της συλλογής του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας. Οι ποικιλίες αναφέρονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Ποικιλίες του είδους *F.carica* της Καλαμάτας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

A/Δ	Τοποθεσία	Είδος φυτού	Ποικιλία
Fig 1	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΛΕΥΚΑ ΜΕΓΑΛΑ ΑΝΔΡΟΥΣΗΣ
Fig 2	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΒΑΖΑΝΑΤΑ
Fig 4	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΠΕΡΔΙΚΟΣΥΚΑ
Fig 5	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΜΑΥΡΑ ΒΑΣΙΛΙΚΑ
Fig 8	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	PARADISO
Fig 9	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΠΡΑΣΙΝΟΣΥΚΑ ΛΕΣΒΟΥ
Fig 10	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΛΙΒΑΝΟ
Fig 11	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΜΕΓΑΛΟΜΙΣΧΟ ΛΕΣΒΟΥ
Fig 12	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΚΥΜΗΣ
Fig 14	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΒΑΣΙΛΙΚΑ ΜΕΛΙΣΣΗ
Fig 19	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΚΑΛΑΜΩΝ ΙΣΤΙΑΙΑΣ ΕΥΒΟΙΑΣ
Fig 20	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΚΑΛΑΜΩΝ ΤΣΑΠΕΛΟΣΥΚΙΑ
Fig 22	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΑΓΡΙΟΣΥΚΙΑ ΦΙΛΙΑ
Fig 25	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	GENTILE BIANCO
Fig 30	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	BIANKA ALFIORRE
Fig 31	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΤΖΟΥΛΙΑ
Fig 32	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΜΑΥΡΗ ΔΙΦΟΡΗ
Fig 33	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΑΡΡΕΝΟΣΥΚΙΑ
Fig 34	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΑΡΡΕΝΟΣΥΚΙΑ
Fig 35	Καλαμάτα	<i>Ficus carica</i>	ΑΡΡΕΝΟΣΥΚΙΑ

3.2. Απομόνωση ολικού DNA από το φυτικό ιστό

- Τμήματα των οφθαλμών, 100 με 120 mg τοποθετούνται στο γουδί, προστίθεται υγρό άζωτο και λειοτριβούνται. Ο ιστός μεταφέρεται σε eppendorf των 2 ml.
- Προετοιμασία του CTAB¹ (προθέρμανση στους 65°C).

- Προστίθεται σε κάθε δείγμα 500μl CTAB¹.
- Επώαση στους 65°C για 30 λεπτά.
- Στη συνέχεια προστίθεται 500 μl seveg² (χλωροφόρμιο) και πραγματοποιείται ισχυρή ανάδευση.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 6 λεπτά στις 12.800 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erpendorf και μετράται ο όγκος του.
- Ακολούθως, ίσος όγκος seveg² (χλωροφόρμιο) με τον όγκο του υπερκειμένου του δείγματος.
- Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση για 4 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφέρεται η υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο erpendorf και μετράται ο όγκος της.
- Προστίθεται 0,7 του όγκου του υπερκειμένου 100% ισοπροπανόλη και γίνεται ήπια ανάδευση με το χέρι.
- Τα erpendorf αφήνονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στις 12.800 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει κατακρήμνιση του DNA και να δημιουργηθεί ίζημα.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο αφήνοντας μόνο το ίζημα και προστίθονται 230 μl 70% EtOH (αιθανόλη).
- Τα δείγματα με την αιθανόλη φυγοκεντρούνται για 8 λεπτά στις 12.800 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομακρύνεται η αιθανόλη και στεγνώνει καλά το ίζημα στους 37°C για 30 με 40 λεπτά.
- Επαναδιαλύεται το ίζημα σε 40 μl BE³ ή ddH₂O και τοποθετείται στους 60°C.
- Προσδιορίζεται η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων με την χρήση του σπεκτροφωτομέτρου (nanodrop).
- Φύλαξη των δειγμάτων στους -20°C.

3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain reaction, PCR)

3.3.1. Αρχή της μεθόδου

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η τεχνική αυτή (Mullis *et al.*, 1986) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης αλληλουχιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*.

Η PCR είναι μια σχετικά απλή και ταχεία μέθοδος πολλαπλασιασμού μιας μικρής αλληλουχίας DNA και επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση και ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (primers) σε συνδυασμό και με άλλα αντιδραστήρια τα οποία είναι απαραίτητα για την αντίδραση. Η DNA πολυμεράση είναι ένζυμο που χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας με κατεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου που είναι δίκλωνο. Για τη σύνθεση αυτή απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων και ιόντων Mg^{2+} . Η DNA πολυμεράση απομονώνεται από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες 72-80°C, διατηρώντας επαρκή ενζυματική δραστηριότητα στις συνθήκες της αντίδρασης. Σήμερα με την βοήθεια μεθοδολογιών της Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας έχουν αναπτυχθεί διάφορα παράγωγα της Taq πολυμεράσης με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη εξειδίκευση. Αυτές οι πολυμεράσες δεν επιτρέπουν την λάθος τοποθέτηση βάσεων κατά την σύνθεση του DNA, εξαιτίας της 3' προς 5' επιδιορθωτικής ικανότητας (proofreading activity) που έχουν. Η Taq πολυμεράση δεν παρουσιάζει τέτοια ικανότητα και γι' αυτό υπάρχει πιθανότητα να έχουμε παραγωγή προϊόντων με τυχαίες τοποθετήσεις νουκλεοτιδίων στις νέες αλυσίδες DNA (με μικρή συχνότητα) (Berg *et al.*, 2002). Ακόμη στην αντίδραση απαιτείται ζευγάρι ειδικά σχεδιασμένων ολιγονουκλεοτιδίων – εκκινητών (primers), μήκους λίγων βάσεων συμπληρωματικών στις αλληλουχίες των άκρων του προς ενίσχυση τμήματος DNA. Συγκεκριμένα κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών, θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν τα παρακάτω:

- Το μέγεθος των εκκινητών (15-30 νουκλεοτίδια) θα πρέπει να είναι τέτοιο,

ώστε η θερμοκρασία για τον υβριδισμό τους στο DNA να κυμαίνεται σε λογικά πλαίσια.

- Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή να είναι μοναδική και να υβριδίζεται σε μια μόνο περιοχή του DNA.
- Η δομή των εκκινητών δεν θα πρέπει να είναι δευτεροταγής. Στην αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών δε θα πρέπει τα 3' άκρα τους να είναι συμπληρωματικά.
- Η σύνθεση των βάσεων των εκκινητών θα πρέπει να είναι περίπου 50% σε GC και 50% σε AT.
- Ο κάθε εκκινητής θα πρέπει να περιέχει στα άκρα του G ή C.

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε κατάλληλη συσκευή ειδικού θερμικού κυκλοποιητή. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία. Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να θερμάνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρόνο. Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής: 1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation), 2) Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου, 3) Επιμήκυνση εκκινητών (μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια) (extension).

Κατά την διάρκεια του πρώτου σταδίου το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει επωάζεται σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 95°C), με αποτέλεσμα την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA (αποδιάταξη/denaturation). Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60°C και έτσι οι εκκινητές της αντίδρασης υβριδίζονται με τη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing). Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3'.

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

- Εκθετική (exponential) φάση: Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA .
- Γραμμική (linear) φάση: Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων.
- Φάση Plateau: Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων.

3.3.2. Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων DNA απευθείας από το DNA των υπό μελέτη φυτικών ιστών με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών. Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR εξαρτώνται από τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος. Η ποσότητα της μήτρας DNA, που προστίθεται κάθε φορά, εξαρτάται από την πηγή προέλευσής του. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιείται ποσότητα 30-60 ng. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεώς τους (Tm). Οι ακριβείς συνθήκες, υπό τις οποίες τελούνται οι αντιδράσεις της PCR για την κάθε περιοχή που μελετήθηκε στην παρούσα έρευνα, αναφέρονται στην συνέχεια.

3.3.3. Ενίσχυση τμήματος της περιοχής ITS

Ενισχύθηκε τμήμα περίπου 700 βάσεων με χρήση της τεχνικής PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR του τμήματος ITS είναι οι ακόλουθοι:

Forward:

ITS-F: 5'- AAGGTTTCCGTAGGTGAAC- 3'

Reverse:

ITS-R: 5'- GCATATCAATAAGCGGAGGA- 3'

Για την ενίσχυση της περιοχής ITS, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν οι παρακάτω:

1. Σε ειδικό σωλήνα erpendorf προστίθενται:

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Γονιδιωματικό DNA	2 μl
Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10 μM)	0.5 μl
Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10 μM)	0.5 μl
Μίγμα dNTPs (10mM)	1 μl
5 x PCR ρυθμιστικό διάλυμα	6 μl
DMSO	1μl
Taq DNA πολυμεράση (1unit/μl)	0.3μl
ddH ₂ O	έως τελικό όγκο 30 μl

2. Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι:

Στάδιο	ITS
Αρχική αποδιάταξη	94 ⁰ C για 3:30 λεπτά
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	50 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα
Επανάληψη βημάτων 2-4 για 35 κύκλους	
Τελική επιμήκυνση	72 ⁰ C για 8 λεπτά

3.3.4. Ενίσχυση τμήματος της περιοχής psbA-trnH

Ενισχύθηκε τμήμα περίπου 500 βάσεων με χρήση της τεχνικής PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR του τμήματος psbA-trnH είναι οι ακόλουθοι:

Forward:

psbA-trnH -F: 5'-GTTTGCATGAACGTAATGCTC- 3'

Reverse:

psbA-trnH -R: 5'- CGCGCATGGTGGATTCACAATCC- 3'

Για την ενίσχυση της περιοχής psbA-trnH, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν οι παρακάτω:

1. Σε ειδικό σωλήνα erpendorf προστίθενται:

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Γονιδιωματικό DNA	1 μl
Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10 μM)	0.5 μl
Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10 μM)	0.5 μl
Μίγμα dNTPs (10mM)	1 μl
5 x PCR ρυθμιστικό διάλυμα	6 μl
DMSO	1 μl
Taq DNA πολυμεράση (1unit/μl)	0.3 μl
ddH ₂ O	έως τελικό όγκο 30 μl

2. Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι:

Στάδιο	psbA-trnH
Αρχική αποδιάταξη	94 ⁰ C για 3:30 λεπτά
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός εκκινητών	57 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 50 δευτερόλεπτα
Επανάληψη βημάτων 2-4 για 35 κύκλους	
Τελική επιμήκυνση	72 ⁰ C για 8 λεπτά

3.4. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυρυβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Σε περίπτωση γραμμικών κλασμάτων DNA ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους τους. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και κυμαίνεται από 0,1 έως 100Kb. Στον πίνακα 3.2 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αγαρόζης σε σχέση με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA (kb)
0.3	1.0-70
0.5	0.7-45
0.8	0.4-20
1	0.3-10
1.2	0.2-8
1.5	0.2-6
2.0	0.1-5

Πίνακας 3.2. Συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Τα μόρια DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου⁸, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης πραγματοποιείται με την ακόλουθη διαδικασία:

- Ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται σε κωνική φιάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1xTAE⁷. Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανάλογη του μεγέθους των γραμμικών μορίων που ηλεκτροφορούνταν κάθε φορά.
- Ακολουθεί σταδιακή θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί εντελώς.
- Η θερμοκρασία του διαλύματος αφήνεται να πέσει έως τους 60⁰C και αφού

προσθεθεί διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου⁸ (10 mg/ml) τελικής συγκέντρωσης 0,5 µg/ml, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη "χτένα" έτσι ώστε να σχηματιστούν στην πηκτή τα βοηθία φόρτωσης ("πηγαδάκια").

- Αφού η πηκτή έχει σταθεροποιηθεί απομακρύνεται από αυτήν η «χτένα». Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE⁷ έτσι ώστε η πηκτή να παραμένει βυθισμένη 1-2mm από την επιφάνειά του.
- Τα δείγματα των νουκλεϊνικών οξέων, αφού αναμιχθούν σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης⁹, τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης ("πηγαδάκια") της πηκτής.
- Τέλος τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο με κατάλληλη τάση που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής.

3.5. Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο της NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up και έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- Έπειτα από το πέρας της ηλεκτροφόρησης, απομονώνεται από την πηκτή αγαρόζης με τη χρήση καθαρού νυστεριού, το τμήμα εκείνο το οποίο περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA. Εν συνεχεία τοποθετείται σε σωλήνα τύπου erpendorf, ζυγίζεται και προστίθενται διπλάσιος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος NT (περιέχει άλατα) (για παράδειγμα για 65mg πηκτής αγαρόζης απαιτούνται 130 µl διαλύματος NT).
- Ακολουθεί επώαση στους 50°C για περίπου 10 λεπτά, έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη. Για να διαλυθεί πλήρως, αναδεύουμε ήπια το δείγμα κάθε 2 λεπτά, καθ'όλη τη διάρκεια της επώασης. Εάν χρειαστεί παρατείνεται ο χρόνος επώασης.
- Το διάλυμα τοποθετείται στη στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.600 στροφές/λεπτό για 30 δευτερόλεπτα. Το DNA προσδένεται στην στήλη ενώ το διάλυμα που την διαπέρασε απομακρύνεται.
- Η στήλη ξεπλένεται με προσθήκη 700 µl διαλύματος NT3 (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 30 δευτερόλεπτα.

- Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη απομακρύνεται και η διαδικασία της φυγοκέντρωσης επαναλαμβάνεται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα NT3 καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Η στήλη τοποθετείται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και το DNA εκλύεται με την προσθήκη 30 μl διαλύματος NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Το δείγμα επωάζεται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση της στήλης στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

3.6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Ο προσδιορισμός τόσο της συγκέντρωσης όσο και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα, πραγματοποιείται με τη χρήση φασματοφωτομέτρου (NanoDrop® ND1000 Spectrophotometer). Πριν από τη μέτρηση επιλέγεται στο λογισμικό της συσκευής από τον χειριστή η ένδειξη DNA.

Η χρήση του μηχανήματος έχει ως εξής:

- Αρχικά για τον μηδενισμό του οργάνου μεταφέρεται 1 μl (ddH₂O ή άλλος διαλύτης) στην υποδοχή της συσκευής.
- Στη συνέχεια 1 μl από το δείγμα μεταφέρεται στην υποδοχή της συσκευής και λαμβάνονται οι λόγοι OD₂₆₀/OD₂₈₀ και OD₂₆₀/OD₂₃₀ βάσει των οποίων γίνεται η εκτίμηση της καθαρότητας των δειγμάτων των νουκλεϊνικών οξέων.
- Για να θεωρείται ένα δείγμα νουκλεϊνικών οξέων καθαρό, ο δείκτης OD₂₆₀/OD₂₈₀ πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0. Μικρότερες τιμές της τιμής αυτής αποτελούν ένδειξη μόλυνσης, π.χ. από την παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης ή άλλων ουσιών.
- Ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₃₀ αποτελεί ένα δεύτερο μέτρο της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας ο συγκεκριμένος

λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2. Μικρότερες τιμές αποτελούν συνήθως ένδειξη μόλυνσης.

3.7. Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα

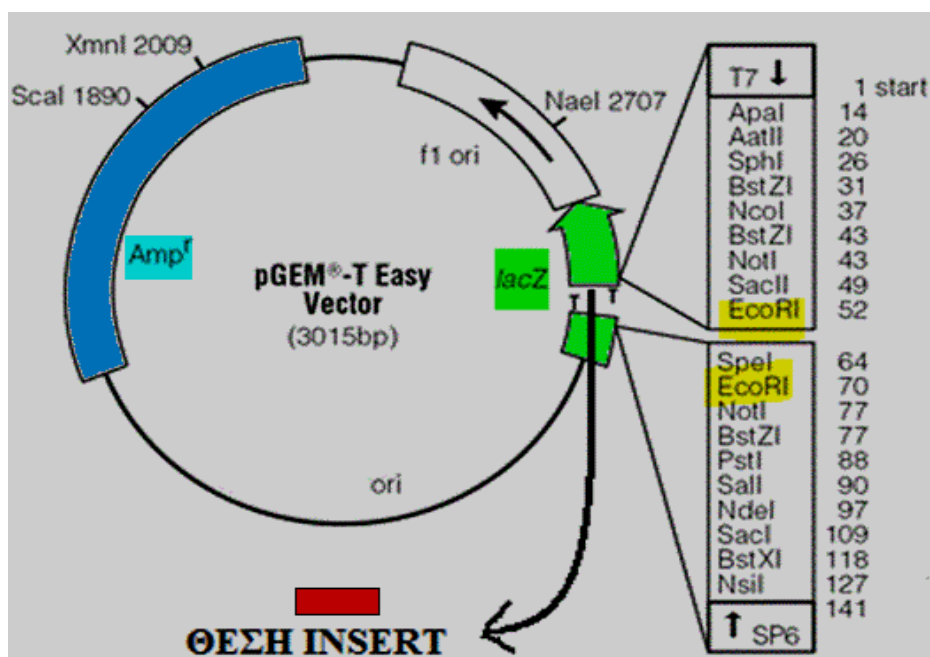
3.7.1. Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα

Για την αλληλούχηση ενισχυμένων με PCR τμημάτων DNA χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας της εταιρείας Promega με την ονομασία pGEM-T Easy Vector. Ο φορέας αυτός είναι μεγέθους της τάξης των 3.015bp (Εικόνα 3.1). Σκοπός της χρήσης του, είναι η υποκλωνοποίηση των τμημάτων DNA, προκειμένου να καταστεί ευκολότερος ο χειρισμός τους και να επιτραπεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων τους και γενικότερα ο χαρακτηρισμός τους.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του φορέα είναι τα εξής: οι πλασμιδιακοί φορείς pGEM-T easy διαθέτουν μια αρχή αντιγραφής (ori), τμήμα του γονιδίου lacZ του *E.coli*, που κωδικοποιεί για το α-πεπτίδιο του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Επιπλέον, φέρουν μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (πολυσύνδεσμος) εντός του γονιδίου lacZ καθώς και τους προαγωγείς της RNA πολυμεράσης, T7 και SP6, οι οποίοι βρίσκονται ένθεν και ένθεν του πολυσυνδέσμου (Εικόνα 3.1).

Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο των παραπάνω προαγωγέων ενώ η μεταγραφή μπορεί και επάγεται παρουσία του χημικού ανάλογου της λακτόζης IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοσίδιο). Η β-γαλακτοσιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση X-gal, παράγοντας μια αδρανή μπλε ουσία. Η ένθεση ξένου DNA στην περιοχή του πολυσυνδέσμου, ωστόσο, διακόπτει τη μεταγραφή του γονιδίου lacZ με αποτέλεσμα την αδυναμία μεταβολισμού της X-gal και κατά συνέπεια, την απουσία ανάπτυξης μπλε χρώματος στις βακτηριακές καλλιέργειες. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τον εντοπισμό των ανασυνδιασμένων κλώνων με βάση το χρώμα των αποικιών όταν σε αυτές προστεθεί X-gal και IPTG.

Τέλος, οι συγκεκριμένοι φορείς φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, γεγονός το οποίο επιτρέπει την επιλογή των μετασηματισμένων βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 3.1. Χάρτης πλασμιδιακού φορέα PGEM-T easy (Promega).

3.7.2. Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Τμήματα DNA τα οποία προκύπτουν από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης φέρουν κολλώδη άκρα, οπότε για την κλωνοποίησή τους χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (Promega).

Στην αντίδραση ενσωμάτωσης (ligation), για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του προς ένθεση τμήματος DNA ρυθμίζεται στο 1:3. Η αντίδραση ενσωμάτωσης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μ l και περιλαμβάνει:

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μ l)
2 x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	5
DNA πλασμιδιακός φορέας	0.5
Ένζυμο λιγάση T4 (1 unit/ μ l)	0.5
DNA ένθεσης	1
ddH ₂ O (έως τελικό όγκο 10 μ l)	3
ΣΥΝΟΛΟ	10

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες.

3.8. Μετασχηματισμός ικανών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδια

3.8.1. Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων *E. coli* σε υγρό ή στερεό υπόστρωμα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. coli* XL-Blue, το οποίο καλλιεργήθηκε σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο LB¹², παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (Παράρτημα Α'). Η ανάπτυξή του πραγματοποιήθηκε κατόπιν επώασης στους 37°C για 16h. Στην περίπτωση υγρής καλλιέργειας, η επώαση τελούνταν υπό ανάδευση.

3.8.2. Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells)

Περιγραφή διαδικασίας δημιουργίας βακτηριακών κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells):

- Εμβολιασμός 10 ml LB¹² με βακτηριολογικό κρίκο από στοκ γλυκερόλης *E. coli* (XL-Blue) και επώαση υπό ανάδευση, για περίπου 18 ώρες στους 37°C.
- 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB¹². Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37°C για 2 h, έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να κυμαίνεται από 0.3-0,4 (O.D.₆₀₀=0,3-0,4).
- Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά. Μοίρασμα της καλλιέργειας και φυγοκέντρηση στις 4.200 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C.
- Τοποθέτηση στον πάγο και επαναιώρηση του ιζήματος σε 50 ml CaCl₂ 80mM.
- Επώαση στον πάγο για 45 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 4.200 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 5 ml CaCl₂ 80mM.
- Επώαση στον πάγο για 45 λεπτά και προσθήκη 15% γλυκερόλης (900 μl γλυκερόλης στα 5 ml κυττάρων).
- Τα κύτταρα αφού τοποθετηθούν σε σωλήνες τύπου eppendorf φυλάσσονται στους -80°C.

3.8.3. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδιο

- Σε σωλήνα τύπου erpendorf, 60-80μl, δεκτικά για μετασχηματισμό κύτταρα *E. coli*.
- Προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακού DNA (αφού τα κύτταρα ξεπαγώσουν), σε όγκο ο οποίος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των προς μετασχηματισμό κυττάρων.
- Το μίγμα κυττάρων-πλασμιδιακού DNA τοποθετείται στον πάγο για περίπου 10 λεπτά.
- Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ στους 42⁰C για 1-2 λεπτά και την απ'ευθείας μεταφορά τους στη συνέχεια στον πάγο.
- Προστίθενται 200 μl LB¹² θρεπτικού διαλύματος και τα δείγματα επωάζονται στους 37⁰C για 1 ώρα.
- Έπειτα τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων. Για τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (pGEM-T Easy) χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB¹² και αμικικίνη.
- Στην περίπτωση που επιθυμείται η επιλογή αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προστίθενται στα κύτταρα 10 μl IPTG¹⁰ 100 mM και 50 μl X-Gal¹¹ 2% (w/v). Οι αποικίες που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, λόγω της διακοπής του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοζιδάση από το ένθεμα, εμφανίζονται λευκές. Αντίθετα, οι αποικίες με μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, λόγω της δράσης του ενζύμου, εμφανίζουν μπλε χρώμα.
- Τέλος, τα τρυβλία με το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάζονται στους 37⁰C για 18 h.

3.9. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli*

Στην παρούσα μελέτη η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους: Η πρώτη μέθοδος (Boiling preparation) ακολουθείται κυρίως για επιβεβαίωση της ενσωμάτωσης του insert στο πλασμίδιο, ενώ η δεύτερη (Qia Prep) για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και τον καθαρισμό αυτού, με σκοπό δείγμα αυτού να σταλεί προς αλληλούχιση, για εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

3.9.1. Μέθοδος βρασμού (Boiling Preparation), (Holmes & Quigley, 1981)

- 6 ml θρεπτικού υλικού LB¹², που περιέχουν το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασχηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση στους 37°C για περίπου 16 ώρες.
- Από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται 2 x 750 μl σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά αφήνοντας το ίζημα των κυττάρων όσο το δυνατόν στεγνό.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 150μl διαλύματος STET⁴, παρουσία 2μl λυσοζύμης⁵ (50 mg/ml).
- Ακολουθεί βρασμός του δείγματος για 45 δευτερόλεπτα και μετά φυγοκέντρηση του στις 13.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά τη φυγοκέντρηση, το ίζημα που αποτελείται από τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνεται με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθενται στο υπερκείμενο 180 μl ισοπροπανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 6 λεπτά.
- Αφού το ίζημα στεγνώσει στον αέρα ώστε να εξατμιστεί πλήρως η ισοπροπανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις, επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος BE³ ή ddH₂O

- Το ίζημα φυλάσσεται στους -20°C

Ακολουθεί πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού (EcoRI). Σε μία αντίδραση πέψης τελικού όγκου 20 μl αναμειγνύονται:

Αντιδραστήρια πέψης	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
10x buffer	2
RNAse A ⁶ (1 mg/ml)	0,5
EcoRI enzyme	1
Πλασμιδιακό DNA	3
ddH ₂ O (έως τελικό όγκο 20 μl)	13,5
ΣΥΝΟΛΟ	20

Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1:30 ώρα και ηλεκτροφόρηση όλου του προϊόντος πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%).

3.9.2. Μέθοδος απομόνωσης με στήλη (QIAprep)

Για την απομόνωση με στήλη χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο της NucleoSpin® Plasmid και έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- 6 ml θρεπτικού υλικού LB¹², που περιέχουν το αντιβιοτικό αμικιλίνη, εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασχηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση με συνεχή ανακίνηση στους 37°C για περίπου 16 ώρες
- 2 x 1,5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα erppendorf και φυγοκεντρώνται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 230 μl διαλύματος A1 (περιέχει RNAse A).
- Προστίθενται 230 μl διαλύματος A2, το διάλυμα ανακινείται απαλά και αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 3 λεπτά.
- Προστίθενται 270 μl διαλύματος A3, ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται σε στήλη QIAprep.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη απορρίπτεται, σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA είναι προσδεδεμένο στην στήλη.
- Προστίθενται 600μl διαλύματος A4 (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπερνά την στήλη απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα A4 καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf και ακολουθεί έκλουση, του προσδεδεμένου στη στήλη DNA, με την προσθήκη 30 μl διαλύματος AE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Το δείγμα επωάζεται για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C .

Ακολουθεί πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού (EcoRI) για επαλήθευση. Σε μία αντίδραση πέψης τελικού όγκου 20 μl αναμιγνύονται:

Αντιδραστήρια πέψης	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
10x buffer	2
EcoRI enzyme	1
Πλασμιδιακό DNA	2
ddH ₂ O (έως τελικό όγκο 20 μl)	15
ΣΥΝΟΛΟ	20

Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 90 min και ηλεκτροφόρηση όλου του προϊόντος πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) για επιβεβαίωση της πέψης. Κατόπιν

προσδιορίζεται η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA με φωτομέτρηση στο σπεκτροφωτόμετρο.

3.10. Σύγκριση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση

Τα δείγματα εστάλησαν σε αναλυτικό εργαστήριο Βιοχημείας στη Λάρισα για ανάγνωση των αλληλουχιών (sequencing). Οι αλληλουχίες αυτές συγκρίθηκαν με τις ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες της GenBank, με χρήση του αλγόριθμου BLAST (Basic Local Alignment Tool, Altschul *et al.*, 1990), μέσω της βάσης δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Οι ακολουθίες ευθυγραμμίστηκαν με χρήση του αλγόριθμου ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) μέσω του προγράμματος Mega 6.0. (Tamura *et al.*, 2013).

Ακολούθως, οι ακριβείς αλληλουχίες των συνόρων της περιοχής ITS2 προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό annotate της βάσης δεδομένων ITS2database (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) ενώ οι συντηρημένες αλληλουχίες της περιοχής ITS2 μέσω του προγράμματος motif της βάσης δεδομένων ITS2database.

Στην συνέχεια αναλύθηκαν οι δευτεροταγείς δομές των περιοχών ITS1, 5.8S, ITS2 καθώς και της περιοχής psbA-trnH μέσω του προγράμματος Freiburg RNA tools (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/>). Για την ITS2 περιοχή η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής έγινε με την βοήθεια του λογισμικού predict που προσφέρεται από την βάση δεδομένων ITS2database, καθώς και μέσω του προγράμματος Freiburg RNA tools.

Τέλος αναλύθηκε η φυλογενετική σχέση μέσω των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των δειγμάτων με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

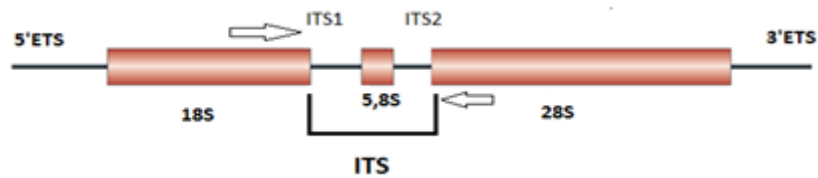
4.1. Χαρακτηριστικά της περιοχής ITS

Η ενίσχυση της περιοχής ITS με χρήση της τεχνικής PCR πραγματοποιήθηκε και στις 20 ποικιλίες *Ficus carica*. Σε όλα τα δείγματα ενισχύθηκε ένα τμήμα ITS περίπου 700 bp με εξαίρεση τα δείγματα Fig 1 και Fig 35 τα οποία έδωσαν δύο τμήματα διαφορετικού μήκους. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι περίπου 700 bp και 680 bp τα οποία αναφέρονται ως Fig 1.1 και 1.2 ή Fig 35.1 και 35.2 αντίστοιχα (Πίνακας 1). Τα προϊόντα της PCR που προέκυψαν κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy και προσδιορίστηκε η αλληλουχία βάσεων 2 ή 4 κλώνων από κάθε μια ποικιλία.

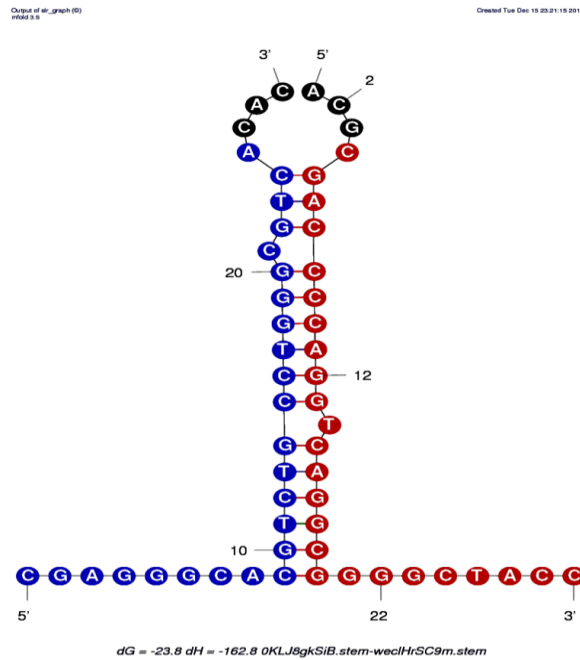
Η υπό μελέτη περιοχή ITS περιλαμβάνει το 3' άκρο της περιοχής 18S rDNA, την περιοχή ITS1, το 5.8S γονίδιο, την περιοχή ITS2 και το 5' άκρο της περιοχής 28S rDNA (Εικόνα 4.1). Δεδομένου ότι υπάρχει ασάφεια όσον αφορά τις συνοριακές αλληλουχίες της περιοχής ITS2 στο *F. carica* που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων (Genebank) του NCBI από άλλους ερευνητές, ήταν σημαντικό να εξακριβωθεί αν οι ITS2 αλληλουχίες μας ακολουθούν τους γενικά αποδεκτούς κανόνες (Koetschan *et al.*, 2010). Για το σκοπό αυτό, οι ακριβείς συνοριακές αλληλουχίες της περιοχής ITS2 προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό annotate της ITS2 βάσης δεδομένων (ITS2 database). Σε όλες τις αλληλουχίες μας το 5.8S-28S rRNA παρουσίασε μια κατάλληλη stem loop διαμόρφωση (Εικόνα 4.2). Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει επίσης τον ακριβή προσδιορισμό του 3' άκρου του 5.8S rDNA ενώ ο ακριβής καθορισμός του 5' άκρου του γονιδίου 5.8S βασίστηκε στις συντηρημένες ακολουθίες του 5.8S γονιδίου στο γένος *Ficus* και στα είδη *F. carica* που έχουν κατατεθεί στην δημόσια βάση δεδομένων του NCBI. Στη συνέχεια, με βάση τις διάφορες αλληλουχίες των ITS των *Ficus* και *F. carica* που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων του NCBI, καθορίσαμε τις ακριβείς συνοριακές ακολουθίες του 3' άκρου του 18S rDNA και κατά συνέπεια εκτιμήθηκαν οι ακριβείς ακολουθίες των συνόρων της περιοχής ITS1. Όλες οι ITS αλληλουχίες συγκρίθηκαν με τις ITS αλληλουχίες ειδών του γένους *Ficus* που είναι καταχωρημένες σε δημόσιες βάσεις δεδομένων μέσω της μεθόδου BLASTN. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι 23 ITS αλληλουχίες παρουσίασαν μεγάλο ποσοστό ομολογίας (>99%) αποκλειστικά με ITS

αλληλουχίες της Genbank οι οποίες είχαν καταχωρηθεί ως αλληλουχίες του είδους *F. palmata*, *F.johannis* και *F.carica*.

Τα χαρακτηριστικά (μέγεθος, περιεχόμενο G+C) των rDNA αλληλουχιών ITS1, ITS2 και 5,8S συνοψίζονται στον πίνακα 4.1. Το μήκος του ITS1 είναι 209 bp με περιεκτικότητα σε G+C να κυμαίνεται από 66,5 έως 68,4%. Το ITS2 ήταν μεγαλύτερο από το ITS1 με ένα μήκος που κυμαίνεται από 226 - 239 bp και ένα περιεχόμενο σε G+C που κυμαίνεται από 66,9 έως 67,8%. Το μέγεθος του 5.8S είναι 161 bp και το περιεχόμενο του σε G+C κυμαίνεται περίπου από 54 με 54,7%.



Εικόνα 4.1. Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης της περιοχής ITS.



Εικόνα 4.2. Σχηματική αναπαράσταση της αναδίπλωσης του 5'-ακρου του 5.8S (μπλε) και του 3'-ακρου του 28S rRNA (κόκκινο) στο πρόδρομο rRNA. Ενδεικτικά περιγράφονται οι αλληλουχίες της περιοχής ITS2 (μαύρο).

Πίνακας 4.1. Μέγεθος βάσεων και περιεχόμενο σε G+C όλων των αλληλουχιών της περιοχής ITS1, ITS2 και 5.8S των ποικιλιών του είδους *F.carica*. Στις στήλες NCBI, ITS1 και NCBI, ITS2 καταγράφεται ο αριθμός των ITS1 και ITS2 αλληλουχιών που εντοπίστηκαν στην Genebank και παρουσιάζουν 100% ομολογία με το αντίστοιχο ITS1 ή ITS2 του *F. carica*.

	Ποικιλία Συκιάς	NCBI ITS1	NCBI ITS2	ITS1		ITS2		5.8S	
No				Μέγεθος (bp)	G+C (%)	Μέγεθος (bp)	G+C (%)	Μέγεθος (bp)	G+C (%)
Fig 1.1	ΛΕΥΚΑ ΜΕΓΑΛΑ ΑΝΔΡΟΥΣΗΣ	11	13	209	67	226	67.3	161	54.7
Fig 1.2	ΛΕΥΚΑ ΜΕΓΑΛΑ ΑΝΔΡΟΥΣΗΣ	11	0	209	67	239	67.4	161	54.7
Fig 2	ΒΑΖΑΝΑΤΑ	5	12	209	67.5	239	67.4	161	54.7
Fig 4	ΠΕΡΔΙΚΟΣΥΚΑ	0	12	209	66.5	239	67.4	161	54.7
Fig 5	ΜΑΥΡΑ ΒΑΣΙΛΙΚΑ	11	12	209	67	239	67.4	161	54.7
Fig 8	PARADISO	11	12	209	67	239	67.4	161	54
Fig 9	ΠΡΑΣΙΝΟΣΥΚΑ ΛΕΣΒΟΥ	11	0	209	67	239	67.4	161	54.7
Fig 10	ΛΙΒΑΝΟ	0	12	209	67	239	67.4	161	54.7
Fig 11	ΜΕΓΑΛΟΜΙΣΧΟ ΛΕΣΒΟΥ	0	12	209	67.9	239	67.4	161	54.7
Fig 12	ΚΥΜΗΣ	0	12	209	67.5	239	67.4	161	54.7
Fig 14	ΒΑΣΙΛΙΚΑ ΜΕΛΙΣΣΗ	11	0	209	67	239	67.4	161	54.7
Fig 19	ΚΑΛΑΜΩΝ ΙΣΤΙΑΙΑΣ ΕΥΒΟΙΑΣ	0	12	209	68.4	239	67.4	161	54.7
Fig 20.1	ΚΑΛΑΜΩΝ ΤΣΑΠΕΛΟΣΥΚΙΑ	11	12	209	67	239	67.4	161	54.7
Fig 20.2	ΚΑΛΑΜΩΝ ΤΣΑΠΕΛΟΣΥΚΙΑ	0	0	209	67	239	68.2	161	54.7
Fig 22	ΑΓΡΙΟΣΥΚΙΑ ΦΙΛΙΑ	5	0	209	67.5	239	67.8	161	54.7
Fig 25	GENTILE BIANCO	0	0	209	67.5	239	66.9	161	54.7
Fig 30	ΒΙΑΝΚΑ ALFIORRE	11	12	209	67	239	67.4	161	54
Fig 31	ΤΖΟΥΛΙΑ	0	12	209	67.5	239	67.4	161	54.7
Fig 32	ΜΑΥΡΗ ΔΙΦΟΡΗ	0	12	209	67	239	67.4	161	54.7
Fig 33	ΑΡΡΕΝΟΣΥΚΙΑ	0	12	209	66.5	239	67.4	161	54.7
Fig 34	ΑΡΡΕΝΟΣΥΚΙΑ	5	12	209	67.5	239	67.4	161	54.7
Fig 35.1	ΑΡΡΕΝΟΣΥΚΙΑ	0	12	209	67.9	239	67.4	161	54.7
Fig 35.2	ΑΡΡΕΝΟΣΥΚΙΑ	5	13	209	67.5	226	67.3	161	54.7

4.2. Ενδο-γονιδιωματικός πολυμορφισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των περιοχών ITS1 και ITS2 στις ποικιλίες *F. carica*

Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών ITS2 των κλώνων Fig.1.1 και Fig.1.2 αποκάλυψαν την παρουσία δυο υποκαταστάσεων (T/C και C/A) και μια έλλειψη (Indel) 13 bp που βρίσκεται στο 3' άκρο του ITS2. Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών ITS2 των κλώνων Fig.35.1 και Fig.35.2 έδειξε ότι οφείλουν την παραλλακτικότητα τους στην παρουσία μιας έλλειψης (Indel) 13 bp η οποία είναι πανομοιότυπη με αυτήν που βρέθηκε στο κλώνο ITS2 Fig.1.1. Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών ITS2 έδειξε ότι οι αλληλουχίες Fig.20.1 και Fig.20.2 παρουσιάζουν δυο σημειακές μεταλλάξεις (A/G και A/G) (Πίνακας 4.3). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι εντός του ίδιου γονιδιώματος υπάρχουν πολυμορφικές θέσεις στα ITS2 αντίγραφα (ενδο-γονιδιωματικός πολυμορφισμός).

Ο ενδο-γονιδιωματικός πολυμορφισμός βρέθηκε και στις ITS1 ακολουθίες των ποικιλιών Fig.20 και Fig.35. Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών ITS1 των ποικιλιών Fig.20.1 και Fig.20.2 έδειξε την παρουσία πολυμορφικών θέσεων. Ο πολυμορφισμός οφειλόταν σε δυο υποκαταστάσεις (C/T και A/G). Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών Fig.35.1 και Fig.35.2 ITS1 έδειξε την παρουσία μιας υποκατάστασης (C/T) (Πίνακας 4.2). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι εντός του ίδιου γονιδιώματος υπάρχουν πολυμορφικές θέσεις στα ITS1 αντίγραφα.

4.3. Πολυμορφισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στις περιοχές ITS1, ITS2 και 5.8S στις διάφορες ποικιλίες *F. carica*

Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών ITS1 από τις διάφορες ποικιλίες έδειξε την ύπαρξη δεκατεσσάρων πολυμορφικών θέσεων, οι οποίες χαρακτηρίζουν δεκατρείς ριβότυπους (ribotypes) (Πίνακας 4.2). Δύο ριβότυποι ανακτήθηκαν πολλές φορές και αναφέρονται ως κύριοι ριβότυποι (major ribotypes), ενώ έντεκα ριβότυποι ήταν μονήρεις (minor ribotypes). Οκτώ από τις αλληλουχίες του ITS1 του *F. carica* (ποικιλίες Fig.1.1, 1.2, 5, 8, 9, 14, 20.1 και 30) εμφανίζουν 100 % ομολογία της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας (Rib 1). Η αναζήτηση στη βάση δεδομένων (BLASTN) αποκάλυψε ακόμη έντεκα ITS1 *F. carica* με πανομοιότυπες αλληλουχίες

με τον ριβότυπο 1. Τέσσερις από τις αλληλουχίες του ITS1 στο *F. carica* (ποικιλίες Fig. 2, 22, 34 και 35.2) εμφανίζουν 100% ομολογία (ριβότυπος 2, Rib 2) και η αναζήτηση μέσω του BLASTN είχε ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό ακόμη πέντε ταυτόσημων αλληλουχιών με ριβότυπο 2 του ITS1. Οι υπόλοιποι ITS1 ριβότυποι διαθέτουν μία ή δύο διακριτές θέσεις πολυμορφισμού. Οι γενετικές αποστάσεις στις αλληλουχίες ITS1 εκτιμήθηκαν σύμφωνα με τον τύπο του Kimura-2 (Πίνακας 4.5). Οι γενετικές αποστάσεις κυμαινόταν από 0,025 (μέγιστο) έως 0,00 (ελάχιστο). Η μέγιστη απόσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των δειγμάτων Fig.19 και Fig.12 καθώς και μεταξύ των δειγμάτων Fig.19 και Fig.20.2.

Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών ITS2 από τις διάφορες ποικιλίες έδειξε την ύπαρξη εννέα πολυμορφικών θέσεων (αντικαταστάσεις και μια έλλειψη), οι οποίες χαρακτηρίζουν οκτώ ριβότυπους (ribotypes) (Πίνακας 4.3). Δύο ριβότυποι ανακτήθηκαν πολλές φορές και αναφέρονται ως κύριοι ριβότυποι (major ribotypes), ενώ έξι ριβότυποι ήταν μονήρεις (minor ribotypes). Δεκαπέντε από τις αλληλουχίες του ITS2 του *F. carica* (ποικιλίες Fig. 2, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 19, 20.1, 30, 31, 32, 33, 34 και 35.1) εμφανίζουν 100 % ομολογία (ριβότυπος 1, Rib 1). Η ανάλυση BLASTN έδειξε την παρουσία δώδεκα ITS2 αλληλουχιών *F. carica* ταυτόσημες με τον ριβότυπο 1. Δύο από τις αλληλουχίες του ITS2 στο *F. carica* (ποικιλίες Fig.1.1 και Fig.35.2) εμφανίζουν 100% ομολογία (ριβότυπος 2, Rib 2). Η ανάλυση BLASTN αποκάλυψε την παρουσία δεκατριών ITS2 αλληλουχιών *F. carica* ταυτόσημες με τον ριβότυπο 2. Οι υπόλοιποι ITS2 ριβότυποι έχουν μία ή δύο διακριτές θέσεις πολυμορφισμού. Οι γενετικές αποστάσεις των αλληλουχιών ITS2 εκτιμήθηκαν σύμφωνα με τον τύπο του Kimura-2 (Πίνακας 4.6). Οι γενετικές αποστάσεις κυμαινόταν από 0,018 (μέγιστο) έως 0,00 (ελάχιστο). Η μέγιστη απόσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των Fig.1.2 και Fig.20.2 καθώς και μεταξύ των Fig.9 και Fig. 20.2. Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών της 5.8S περιοχής είχε ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό τριών πολυμορφικών θέσεων (αντικαταστάσεις) το οποίο ορίζει τέσσερις 5.8S ριβότυπους στο *F. carica*. (Πίνακας 4.4). Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν την παρουσία παραλλακτικότητας των αλληλουχιών της περιοχής ITS1 και της ITS2 εντός των ποικιλιών του είδους *F.carica*.

Πίνακας 4.2. Πολυμορφικές θέσεις (αντικαταστάσεις) της ITS1 αλληλουχίας των ποικιλιών του είδους *F.carica*.

Θέση επί της αλληλουχίας																
Ποικιλίες	Ριβότυποι	8	79	80	95	96	123	124	131	164	166	170	173	188	206	-209
Fig 1.1	Rib 1	A	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 1.2	Rib 1	A	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 2	Rib 2	G	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 4	Rib 3	A	T	T	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 5	Rib 1	A	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 8	Rib 1	A	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 9	Rib 1	A	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 10	Rib 4	A	T	C	A	C	A	A	C	G	T	A	G	T	A	TGA
Fig 11	Rib 5	G	T	C	A	C	G	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 12	Rib 6	A	T	C	A	C	G	A	G	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 14	Rib 1	A	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 19	Rib 7	G	T	C	G	C	A	A	C	G	T	T	G	C	A	TGA
Fig 20.1	Rib 1	A	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 20.2	Rib 8	A	T	C	A	T	A	G	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 22	Rib 2	G	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 25	Rib 9	A	C	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 30	Rib 1	A	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 31	Rib 10	A	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	G	TGA
Fig 32	Rib 11	G	T	C	A	C	A	A	C	A	T	T	G	T	A	TGA
Fig 33	Rib 12	A	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	A	T	A	TGA
Fig 34	Rib 2	G	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA
Fig 35.1	Rib 13	G	T	C	A	C	A	A	C	G	C	T	G	T	A	TGA
Fig 35.2	Rib 2	G	T	C	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T	A	TGA

Πίνακας 4.3. Πολυμορφικές θέσεις (αντικαταστάσεις) της ITS2 αλληλουχίας εντός των ποικιλιών του είδους *F.carica*.

Θέση επί της αλληλουχίας													
Ποικιλίες	Ριβότυποι	17	53	57	96	100	112	149	211	212	213	226	239
Fig 1.2	Rib 3	T	A	T	A	G	A	T	C	C	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 1.1	Rib 2	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACG		
Fig 2	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 4	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 5	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 8	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 9	Rib 4	C	A	C	A	A	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 10	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 11	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 12	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 14	Rib 5	C	A	T	T	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 19	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 20.1	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 20.2	Rib 6	C	G	T	A	G	G	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 22	Rib 7	C	A	T	A	G	A	C	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 25	Rib 8	C	A	T	A	G	A	T	T	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 30	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 31	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 32	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 33	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 34	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 35.1	Rib 1	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACGGGTGCCTCCAACG		
Fig 35.2	Rib 2	C	A	T	A	G	A	T	C	A	ATGCGCCCGTCACG		

Πίνακας 4.4. Πολυμορφικές θέσεις (αντικαταστάσεις) της 5.8S αλληλουχίας των ποικιλιών του είδους *F.carica*.

Θέση επί της αλληλουχίας			
Ποικιλίες	5	18	102
Fig 1.1	C	C	T
Fig 1.2	C	C	T
Fig 2	C	C	T
Fig 4	C	C	T
Fig 5	C	C	T
Fig 8	C	T	T
Fig 9	C	C	T
Fig 10	C	C	T
Fig 11	C	C	A
Fig 12	C	C	T
Fig 14	C	C	T
Fig 19	C	C	T
Fig 20.1	C	C	T
Fig 20.2	C	C	T
Fig 22	C	C	T
Fig 25	C	C	T
Fig 30	T	C	T
Fig 31	C	C	T
Fig 32	C	C	T
Fig 33	C	C	T
Fig 34	C	C	T
Fig 35.1	C	C	T
Fig 35.2	C	C	T

Πίνακας 4.5. Οι γενετικές αποστάσεις της ITS1 αλληλουχίας των ποικιλιών του είδους *F.carica*.

Γενότυποι	1.1	1.2	2	4	5	8	9	10	11	12	14	19	20.1	20.2	22	25	30	31	32	33	34	35.1	35.2	
Fig1.1	0,000																							
Fig1.2	0,000	0,000																						
Fig2	0,005	0,005	0,000																					
Fig4	0,005	0,005	0,010	0,000																				
Fig5	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000																			
Fig8	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000																		
Fig9	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000																	
Fig10	0,005	0,005	0,010	0,010	0,005	0,005	0,005	0,000																
Fig11	0,010	0,010	0,005	0,015	0,010	0,010	0,010	0,015	0,000															
Fig12	0,010	0,010	0,015	0,015	0,010	0,010	0,010	0,015	0,010	0,000														
Fig14	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,005	0,010	0,010	0,000													
Fig19	0,015	0,015	0,010	0,020	0,015	0,015	0,015	0,020	0,015	0,025	0,015	0,000												
Fig20.1	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,005	0,010	0,010	0,000	0,015	0,000											
Fig20.2	0,010	0,010	0,015	0,015	0,010	0,010	0,010	0,015	0,020	0,020	0,010	0,025	0,010	0,000										
Fig22	0,005	0,005	0,000	0,010	0,005	0,005	0,005	0,010	0,005	0,015	0,005	0,010	0,005	0,015	0,000									
Fig25	0,005	0,005	0,010	0,010	0,005	0,005	0,005	0,010	0,015	0,015	0,005	0,020	0,005	0,015	0,010	0,000								
Fig30	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,005	0,010	0,010	0,000	0,015	0,000	0,010	0,005	0,005	0,000							
Fig31	0,005	0,005	0,010	0,010	0,005	0,005	0,005	0,010	0,015	0,015	0,005	0,020	0,005	0,015	0,010	0,010	0,005	0,000						
Fig32	0,010	0,010	0,005	0,015	0,010	0,010	0,010	0,015	0,010	0,020	0,010	0,015	0,010	0,020	0,005	0,015	0,010	0,015	0,000					
Fig33	0,005	0,005	0,010	0,010	0,005	0,005	0,005	0,010	0,015	0,015	0,005	0,020	0,005	0,015	0,010	0,010	0,005	0,010	0,015	0,000				
Fig34	0,005	0,005	0,000	0,010	0,005	0,005	0,005	0,010	0,005	0,015	0,005	0,010	0,005	0,015	0,000	0,010	0,005	0,010	0,005	0,010	0,000			
Fig35.1	0,010	0,010	0,005	0,015	0,010	0,010	0,010	0,015	0,010	0,020	0,010	0,015	0,010	0,020	0,005	0,015	0,010	0,015	0,010	0,015	0,005	0,000		
Fig35.2	0,005	0,005	0,000	0,010	0,005	0,005	0,005	0,010	0,005	0,015	0,005	0,010	0,005	0,015	0,000	0,010	0,005	0,010	0,005	0,010	0,000	0,005	0,000	

Πίνακας 4.6. Οι γενετικές αποστάσεις της ITS2 αλληλουχίας των ποικιλιών του είδους *F.carica*.

Γενότυποι	1.2	1.1	2	4	5	8	9	10	11	12	14	19	20.1	20.2	22	25	30	31	32	33	34	35.1	35.2	
Fig1.2	0,000																							
Fig1.1	0,009	0,000																						
Fig2	0,009	0,000	0,000																					
Fig4	0,009	0,000	0,000	0,000																				
Fig5	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000																			
Fig8	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																		
Fig9	0,018	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,000																	
Fig10	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000																
Fig11	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000															
Fig12	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000														
Fig14	0,014	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,013	0,004	0,004	0,004	0,000													
Fig19	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000												
Fig20.1	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000											
Fig20.2	0,018	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,018	0,009	0,009	0,009	0,013	0,009	0,009	0,000										
Fig22	0,013	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,013	0,004	0,004	0,004	0,009	0,004	0,004	0,013	0,000									
Fig25	0,013	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,013	0,004	0,004	0,004	0,009	0,004	0,004	0,013	0,009	0,000								
Fig30	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,009	0,004	0,004	0,000							
Fig31	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,009	0,004	0,004	0,000	0,000						
Fig32	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,009	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000					
Fig33	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,009	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000				
Fig34	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,009	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
Fig35.1	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,009	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Fig35.2	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,009	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

4.4. Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των αλληλουχιών ITS1, ITS2 και 5.8S

Η περιοχή ITS1 και ITS2 στις διάφορες ποικιλίες παρουσίασε σημαντικό αριθμό πολυμορφικών θέσεων στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Ως εκ τούτου ήταν ενδιαφέρον να εξετάσουμε εάν οι μεταβολές αυτές επηρεάζουν την δευτεροταγή δομή τους.

Στην προσπάθεια αυτή κατ' αρχήν διερευνήθηκε εάν οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν ορισμένες συντηρημένες αλληλουχίες που απαντώνται είτε στη περιοχή ITS1 είτε στη ITS2. Στη συνέχεια διερευνήθηκε η προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή κάθε μίας από τις περιοχές ITS1 και ITS2 με τη χρήση του λογισμικού ExpaRNA το οποίο επιτρέπει τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής δυο αλληλουχιών. Τέλος προσδιορίστηκε η συναινετική δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS1 και ITS2 με την χρήση του λογισμικού πρόβλεψης της συναινετικής δομής LocARNA-P το οποίο επιτρέπει τον προσδιορισμό της συναινετικής δευτεροταγούς δομής πολλών αλληλουχιών.

4.4.1. Συντηρημένες αλληλουχίες της περιοχής ITS1 και της ITS2

Η ανάλυση της πρωτοταγούς και δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2 στα αγγειόσπερμα έχει δείξει την παρουσία συντηρημένων αλληλουχιών οι οποίες εντοπίζονται σχετικά εύκολα μέσω της λειτουργίας motifs του λογισμικού ITS2 database (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>). Η ανάλυση όλων των ITS2 ριβότυπων μέσω του λογισμικού ITS2 database έδειξε ότι οι συντηρημένες αλληλουχίες M1 (5'-TGATGACCTCCCGTG-3') και M2 (5'-CGGTTGGTCCAAAAA-3') εντοπίστηκαν σε όλους τους ITS2 ριβότυπους. Ωστόσο, η διερεύνηση αυτή απέτυχε να εντοπίσει τη συντηρημένη αλληλουχία M3 5'-TGGT-3' η οποία εδράζεται κοντά στην κορυφή της έλικας III (Εικόνα 4.3).

Η προσεκτική εξέταση των αλληλουχιών που μετέχουν στον σχηματισμό της έλικας III κατέδειξε την παρουσία τριών αλληλουχιών (5'-TGGC-3', 5'-AGGT-3', 5'-CGGT-

3') οι οποίες έχουν σημαντική ομολογία με την M3 αλληλουχία και τυπολογικά εδράζονται κοντά στην κορυφή της έλικας III (Εικόνα 4.5). Η *In silico* ανάλυση έδειξε ότι σε όλα τα είδη *Ficus* εντοπίστηκαν οι συντηρημένες αλληλουχίες 5'-CGGTGCC-3', 5'-AGGT-3', 5'-CGGT-3' κοντά στην κορυφή της έλικας III. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι πιθανά στο γένος *Ficus* η γενικά αποδεκτή συντηρημένη αλληλουχία M3 απαντάται με την μορφή 5'-CGGTGCC-3' ή 5'-AGGT-3' ή 5'-CGGT-3'.

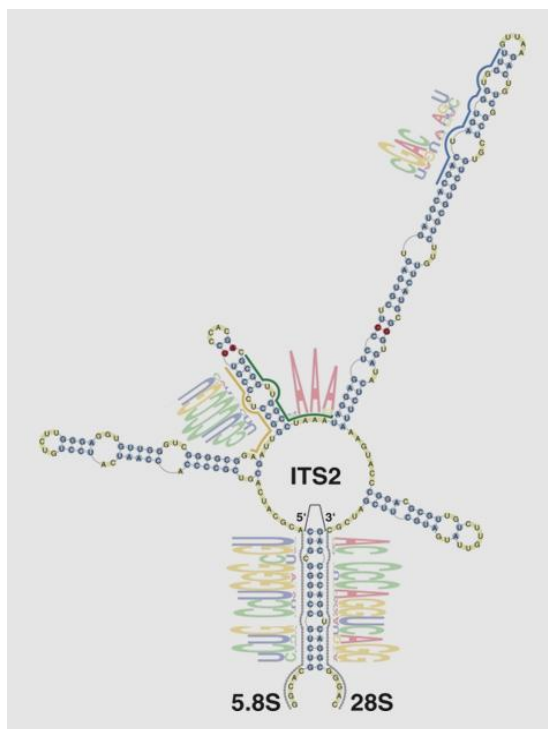
Η περιοχή ITS1 στα αγγειόσπερμα φέρει μια συντηρημένη αλληλουχία 5'-GGCRY (4-7n) GYGYCAAGGAA-3' (Liu and Schardl, 1994). Η ευθυγράμμιση όλων των ITS1 ριβότυπων έδειξε ότι η προαναφερόμενη συντηρημένη αλληλουχία εμφανίστηκε στο *F. carica* ως 5'-GGCGC (GGAAT) GCGTCAAGGAA-3' (Εικόνα 4.3).

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGCGCGAACACGCCCCGGACCCTCCTC
 GCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCACCAAACGAACCCC **GGCGCG**
GAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAAC
 GGTGACTCTGCCTCGGTGGTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA**AGAACGACT**
CTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGAT
ACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTC**TTTGAACGCA**AGTTGC
GCCCCAAGCCATCAGGTTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACACGTCGTTGCC
 CCCCCAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGG
 CGGAT**TGATGACCTCCCGTG**CGTGCTTTGACCCG**CGGTTGGTCCAAAA**CCGAGTC
 CCCTGTCACGTCGTCT**TGGC**AAC**AGGT**AGTCGATCAT**TCGGT**GCCGCCGCCACGT
 GCGTCGGACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTCACGGGTGC
 CTCCAACG

Εικόνα 4.3. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής ITS (ITS1, 5.8S και ITS2). Με μαύρο χρώμα παρουσιάζεται η αλληλουχία του ITS1, με κόκκινο η αλληλουχία του 5.8S ενώ με μπλε η αλληλουχία του ITS2. Τα συντηρημένα μοτίβα έχουν μαρκαριστεί με κίτρινο χρώμα.

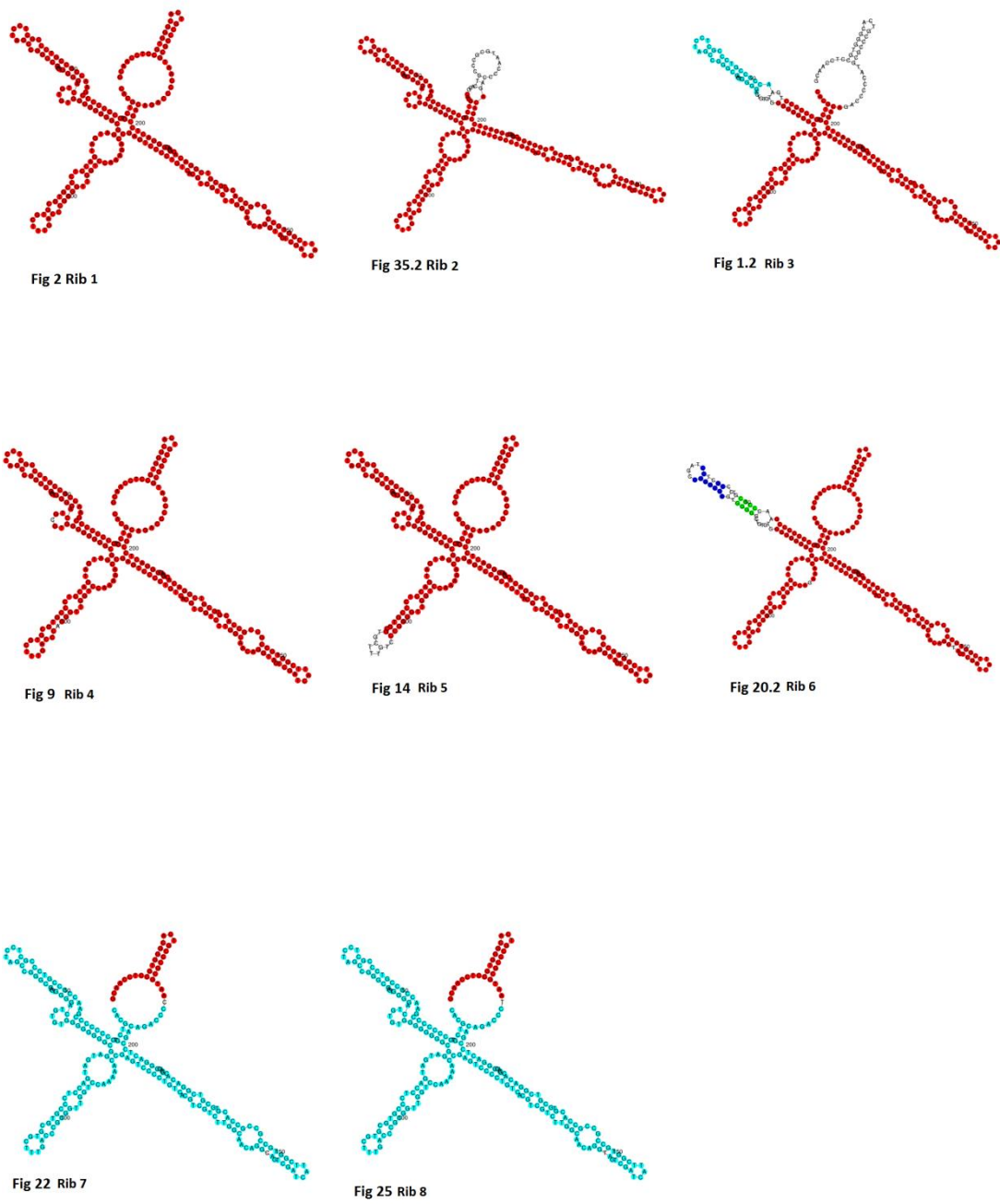
4.4.2. Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 και της ITS2

Τα μοντέλα αναδίπλωσης του ITS2-RNA σε θερμοδυναμικά σταθερές δευτεροταγείς δομές (- ΔG) έχουν δείξει ότι η περιοχή ITS2 στα φυτά αναδιπλώνεται και σχηματίζει τέσσερις έλικες με την τρίτη έλικα να σχηματίζει το μακρύτερο κλάδο (branch) (Εικόνα 4.4) (Coleman, 2015; Mai and Coleman 1997; Schultz *et al.*, 2005). Ωστόσο, δεν υπάρχει μια γενικά αποδεκτή δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS1 (Coleman, 2015).

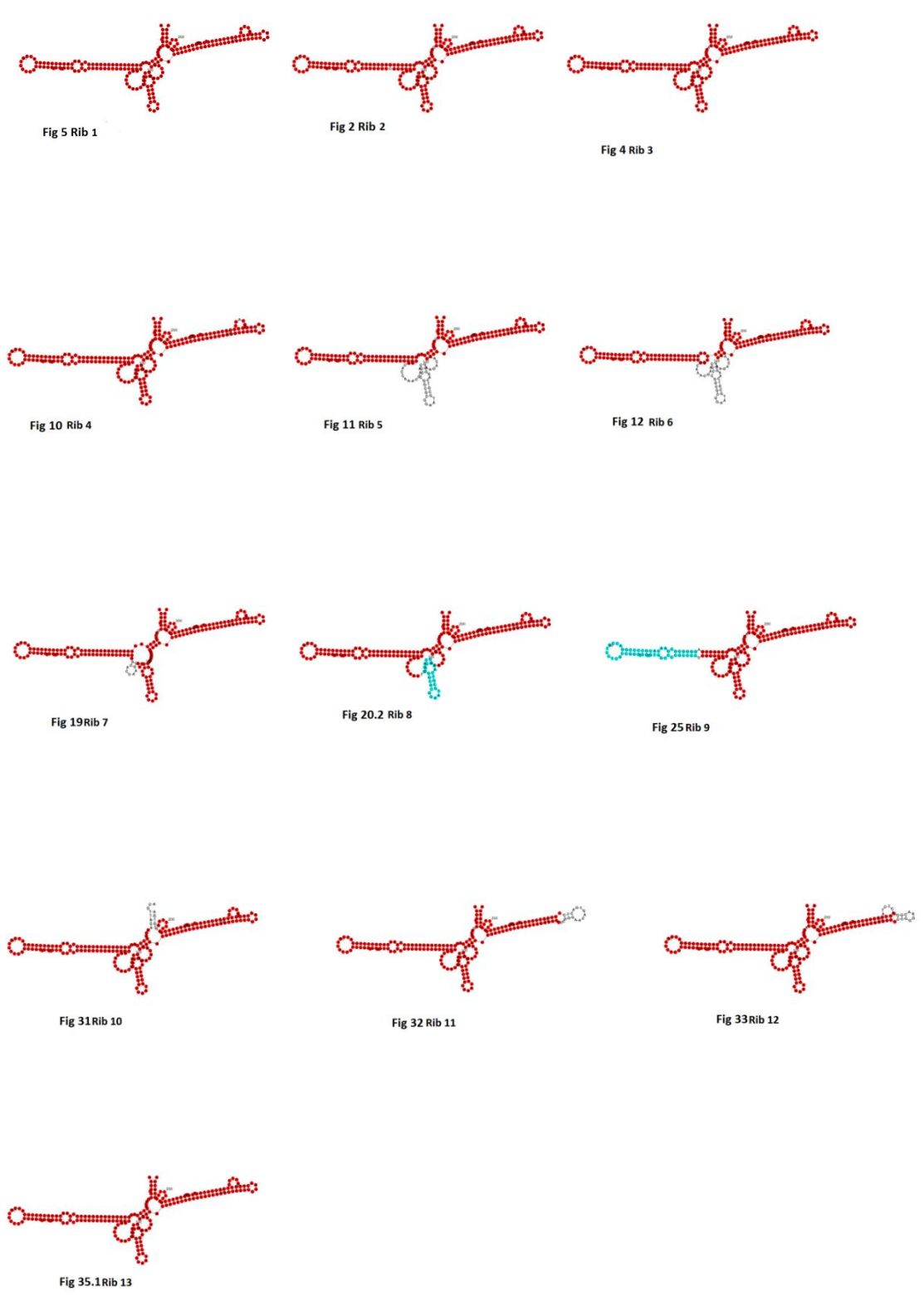


Εικόνα 4.4. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2.

Μια πρώτη εκτίμηση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 και ITS2 των διαφόρων ριβότυπων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού ExpaRNA το οποίο επιτρέπει τον προσδιορισμό των κοινών στοιχείων πρωτοταγούς αλληλουχίας-δευτεροταγούς δομής μεταξύ δυο RNAs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλοι οι ITS2 ριβότυποι, με εξαίρεση τον Fig 35.2, αναδιπλώνονται σε τέσσερις έλικες (Εικόνα 4.5) ενώ όλοι οι ITS1 ριβότυποι αναδιπλώνονται σε τρεις έλικες (Εικόνα 4.6).

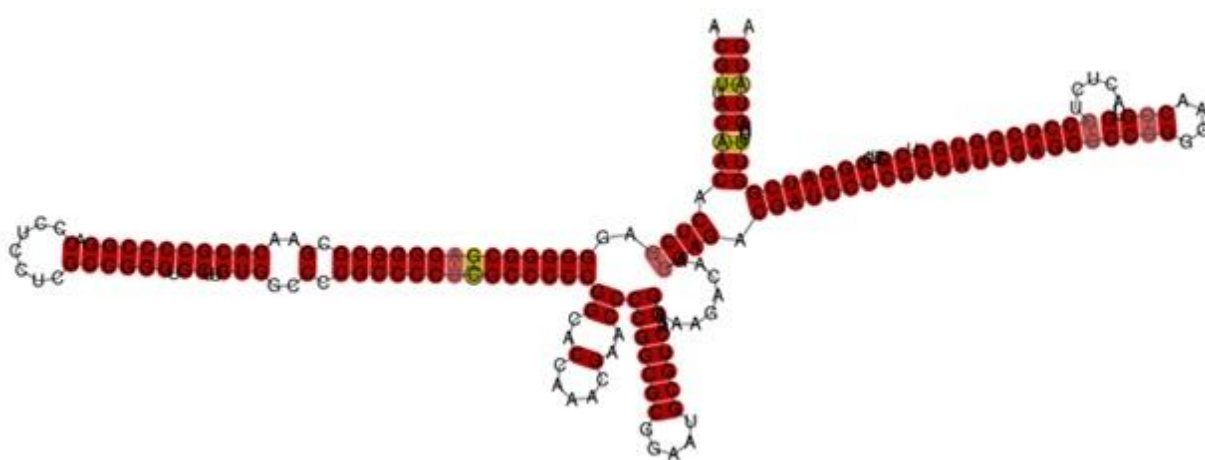


Εικόνα 4.5. Δευτεροταγής δομή της αλληλουχίας ITS2 των διαφόρων ριβότυπων.

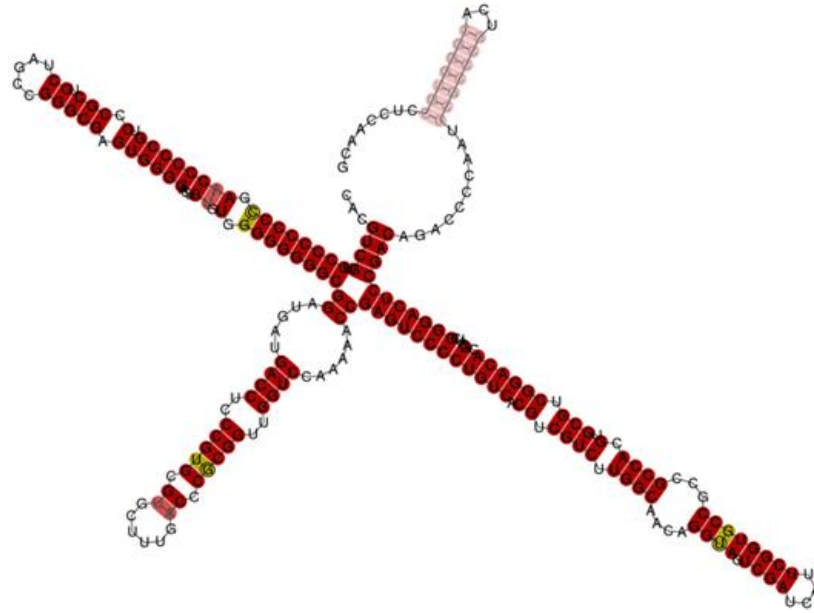


Εικόνα 4.6. Δευτεροταγής δομή της αλληλουχίας ITS1 των διαφόρων ριβότυπων.

Ωστόσο το λογισμικό ExraRNA επιτρέπει την ανάλυση της δευτεροταγούς δομής μόνο δυο RNAs και ο εντοπισμός των διαφορών στην δευτεροταγή δομή μεταξύ των ριβότυπων καθίσταται δύσκολος. Ως εκ τούτου, κρίθηκε αναγκαία η χρήση του λογισμικού LocARNA-P. Το λογισμικό LocARNA-P εκτελεί την ευθυγράμμιση πολλαπλών RNA αλληλουχιών κατά στήλες με βάση τις ομοιότητες στην πρωτοταγή δομή και την δευτεροταγή δομή τους και επιτρέπει την πρόβλεψη της συναινετικής δευτεροταγούς δομής. Οι προβλεπόμενες συναινετικές δευτεροταγείς δομές της περιοχής ITS1 και ITS2 απεικονίζονται στην εικόνα 4.7 και στην εικόνα 4.8, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η παρουσία των σημειακών μεταλλάξεων στους διάφορους ριβότυπους δεν φαίνεται να επηρεάζουν την δευτεροταγή δομή του ITS1 ή του ITS2. Τούτο οφείλεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα οι μεταλλάξεις στους ριβότυπους είναι αντισταθμιστικές και ως εκ τούτου δεν επηρεάζουν την τελική διαμόρφωση της έλικας.



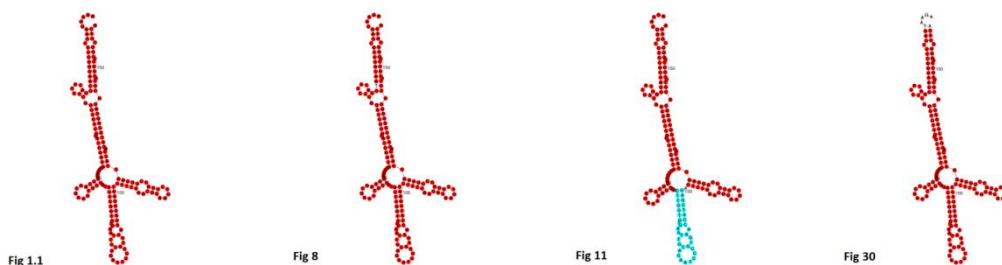
Εικόνα 4.7. Προβλεπόμενη συναινετική δευτεροταγής δομή των ITS1 ριβότυπων.



Εικόνα 4.8. Προβλεπόμενη συναινετική δευτεροταγής δομή των ITS2 ριβότυπων.

4.4.3. Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των αλληλουχιών 5.8S

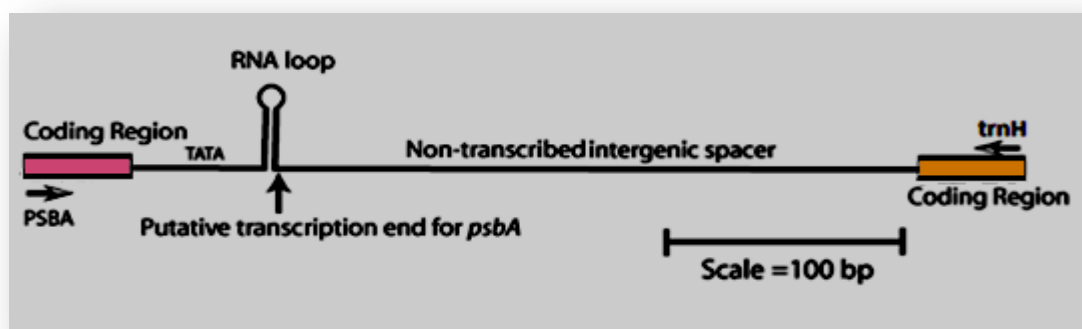
Οι προβλεπόμενες αναλύσεις των δευτεροταγών δομών στις 5.8S ακολουθίες σε όλους τους ριβότυπους, αποκάλυψαν ότι οι μεταβολές δεν επηρέασαν τις δευτεροταγείς δομές του 5.8S RNA, υποδηλώνοντας ότι η διατήρηση της δευτεροταγούς δομής μπορεί να παίζει σημαντικό βιολογικό ρόλο στη λειτουργία του 5.8S RNA (Εικόνα 4.9). Τα τρία μοτίβα στο 5.8S, που είναι συντηρημένα στα αγγειόσπερμα M1 (5'-CGATGAAGAACGTAGC-3'), M2 (5'-GAATTGCAGAATCC-3') και M3 (5'-TTTGAACGCA-3') (Rampersad, 2014), βρέθηκαν σε όλους τους ριβότυπους (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.9. Προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή των αλληλουχιών 5.8S ομαδοποιημένων σε ριβότυπους με βάση το λογισμικό ExpaRNA.

4.5. Χαρακτηριστικά της psbA-trnH περιοχής

Η περιοχή psbA-trnH αποτελεί τη λιγότερο συντηρημένη (συχνή παρουσία μεταλλάξεων) στο χλωροπλαστικό γονιδίωμα στα αγγειόσπερμα. Είναι σημαντικός δείκτης γενετικής διάκρισης και φυλογένειας μεταξύ διαφόρων φυτικών ειδών. Έχει προταθεί ως κατάλληλος μοριακός δείκτης για DNA barcoding. Η περιοχή psbA-trnH περιλαμβάνει τμήμα της κωδικής περιοχής του γονιδίου psbA, την psbA μη-κωδική περιοχή (untranslated region), την περιοχή λήξης της μεταγραφής του γονιδίου psbA, μια διαγονιδιακή περιοχή (not transcribed spacer) και ένα τμήμα του γονιδίου trnH. Στο 5' άκρο της διαγονιδιακής περιοχής του psbA παρουσιάζεται μια αλληλουχία παλίνδρομη (palindrome) μεγέθους 72 bp με διαμόρφωση φουρκέτας (loop) (Εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.8 . Οργάνωση της περιοχής psbA-trnH.

Η ενίσχυση της περιοχής psbA-trnH με χρήση της τεχνικής PCR έγινε σε διάφορα δείγματα *F. carica* (Fig. 1, 2, 5, 19, 20, 22, 30, 31 ,32). Το μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύθηκε κυμαίνεται από 476 bp (Fig.20 και Fig.22) έως 486 bp (Fig.19). Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών psbA-trnH αποκάλυψε ότι στις δυο από τις αλληλουχίες του *F. carica* ποικιλίες Fig.20 και Fig.22 παρατηρήθηκε μία έλλειψη (indel) 10 bp στη διαγονιδιακή περιοχή (Εικόνα 4.9). Οι ποικιλίες που φέρουν το indel θα αναφέρονται ως συν (+) ενώ σ' αυτές που λείπει θα αναφέρονται ως μείον (-).

Η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της psbA-trnH διαγονιδιακής περιοχής των ποικιλιών *F.carica* Fig.19 και Fig.20 (Εικόνα 4.10) έδειξε ότι η έλλειψη δεν

επηρέασε σημαντικά τη δομή. Επίσης διαπιστώθηκε η παρουσία μιας παλίνδρομης αλληλουχίας μεγέθους 72bp (Εικόνα 4.11) η οποία πιθανά σηματοδοτεί το τέλος της μεταγραφής του *psbA*. Η αναζήτηση στο GeneBank έδειξε ότι όλα τα είδη *Ficus* φιλοξενούν μια σχεδόν πανομοιότυπη παλινδρομική ακολουθία. Η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της παλίνδρομης αλληλουχία έδειξε ότι η διαμόρφωση της έχει σχήμα φουρκέτας (Εικόνα 4.12).

```

Fig5      AATAAAATTATTTGTTAGTCTTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTTCTTTACTTCTTC
Fig19     AATAAAATTATTTGTTAGTCTTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTTCTTTACTTCTTC
Fig20     AATAAAATTATTTGTTAGTCTTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTTCTTTACTTCTTC
Fig22     AATAAAATTATTTGTTAGTCTTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTTCTTTACTTCTTC
Fig30     AATAAAATTATTTGTTAGTCTTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTTCTTTACTTCTTC
Fig31     AATAAAATTATTTGTTAGTCTTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTTCTTTACTTCTTC
Fig32     AATAAAATTATTTGTTAGTCTTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTTCTTTACTTCTTC
Fig1      AATAAAATTATTTGTTAGTCTTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTTCTTTACTTCTTC
Fig2      AATAAAATTATTTGTTAGTCTTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTTCTTTACTTCTTC
*****
ATATTTTTTCGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTTCTTAAATATTTTATTTTACATTT
Fig5      ATATTTTTTCGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTTCTTAAATATTTTATTTTACATTT
Fig19     ATATTTTTTCGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTTCTTAAATATTTTATTTTACATTT
Fig20     ATATTTTTTCGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTTCTTAAATATTTTATTTTACATTT
Fig22     ATATTTTTTCGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTTCTTAAATATTTTATTTTACATTT
Fig30     ATATTTTTTCGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTTCTTAAATATTTTATTTTACATTT
Fig31     ATATTTTTTCGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTTCTTAAATATTTTATTTTACATTT
Fig32     ATATTTTTTCGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTTCTTAAATATTTTATTTTACATTT
Fig1      ATATTTTTTCGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTTCTTAAATATTTTATTTTACATTT
Fig2      ATATTTTTTCGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTTCTTAAATATTTTATTTTACATTT
*****
TAAATAAAATATAAAATAAATAAAGGTTTCCATTATTTTTTGTGATTTGATTGTAGA
Fig5      TAAATAAAATATAAAATAAATAAAGGTTTCCATTATTTTTTGTGATTTGATTGTAGA
Fig19     TAAATAAAATATAAAATAAATAAAGGTTTCCATTATTTTTTGTGATTTGATTGTAGA
Fig20     TAAATAAAATATAAAATAAATAAAGGTTTCCATTATTTTTTGTGATTTGATTGTAGA
Fig22     TAAATAAAATATAAAATAAATAAAGGTTTCCATTATTTTTTGTGATTTGATTGTAGA
Fig30     TAAATAAAATATAAAATAAATAAAGGTTTCCATTATTTTTTGTGATTTGATTGTAGA
Fig31     TAAATAAAATATAAAATAAATAAAGGTTTCCATTATTTTTTGTGATTTGATTGTAGA
Fig32     TAAATAAAATATAAAATAAATAAAGGTTTCCATTATTTTTTGTGATTTGATTGTAGA
Fig1      TAAATAAAATATAAAATAAATAAAGGTTTCCATTATTTTTTGTGATTTGATTGTAGA
Fig2      TAAATAAAATATAAAATAAATAAAGGTTTCCATTATTTTTTGTGATTTGATTGTAGA
*****
AGAAAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACTAA
Fig5      AGAAAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACTAA
Fig19     AGAAAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACTAA
Fig20     AGAAAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACTAA
Fig22     AGAAAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACTAA
Fig30     AGAAAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACTAA
Fig31     AGAAAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACTAA
Fig32     AGAAAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACTAA
Fig1      AGAAAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACTAA
Fig2      AGAAAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACTAA
*****
TCATATTGGG
Fig5      TCATATTGGG
Fig19     TCATATTGGG
Fig20     TCATATTGGG
Fig22     TCATATTGGG
Fig30     TCATATTGGG
Fig31     TCATATTGGG
Fig32     TCATATTGGG
Fig1      TCATATTGGG
Fig2      TCATATTGGG
*****

```

Εικόνα 4.9. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών της διαγονιδιακής περιοχής στις ποικιλίες Fig. 1,2,5,19,20,22,30,31,32 με χρήση του προγράμματος Clustal W. Οι αλληλουχίες που αποτελούν την έλλειψη (indel) είναι χρωματισμένες με κόκκινο χρώμα.

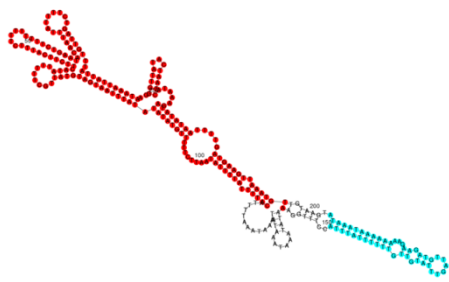


Fig.19

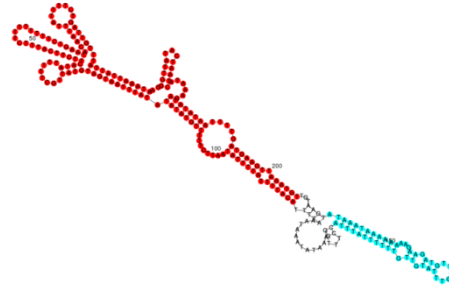


Fig.20

Εικόνα 4.10. Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της διαγονιδιακής περιοχής των Fig.19 και Fig.20 με τη χρήση του λογισμικού ExpaRNA.



ATGAAAAAATAAAGGAGCAATAATAAACCTCTTGTATATCAAGAGGTTATTATTGCTCCTTATTTTCAT



Εικόνα 4.11. Η παλίνδρομη αλληλουχία του *F. carica* psbA.



Εικόνα 4.12. Σχηματική αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής της παλίνδρομης αλληλουχίας με τη χρήση του λογισμικού ExpaRNA.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο αριθμός των αντιγράφων του nrDNA ποικίλει στους διάφορους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Εκτιμάται ότι κυμαίνεται περίπου από 50 έως 150 στα είδη μυκήτων, 55 έως 320 στους νηματώδεις και περίπου 200 έως 250 στη *Drosophila melanogaster*, ενώ τα είδη των φυτών μπορεί να περιέχουν περισσότερα από 1500 αντίγραφα nrDNA (Simon *et al.*, 2012; Weitemier *et al.*, 2015). Ως εκ τούτου τα φυτά περιέχουν ανάλογο αριθμό περιοχών ITS. Η περιοχή ITS είναι ένα τμήμα του nrDNA και αποτελείται από δύο εξαιρετικά μεταβλητά τμήματα, την περιοχή ITS1 και την ITS2 και το 5.8S γονίδιο του οποίου οι αλληλουχίες είναι εξαιρετικά συντηρημένες μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Έχει δειχτεί, μέσω της αλληλούχισης κλωνοποιημένων περιοχών ITS, ότι στα φυτά (Xiao *et al.*, 2010; Hribova *et al.*, 2011), αλλά και στους άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως μύκητες (Freire *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2015; Poczai *et al.*, 2015), χλωρόφυτα (Fama *et al.*, 2000), διάτομα (MacGillivray and Kaczmarek, 2015) και νηματώδεις (Ma *et al.*, 2008) τα αντίγραφα της περιοχής ITS παρουσιάζουν intra-individual (στο ίδιο γονιδίωμα) ή intra-species or intra-cultivar (διαφορετικά γονιδιώματα οργανισμών του ίδιου είδους) παραλλακτικότητα. Για παράδειγμα, η ανάλυση της περιοχής ITS σε άτομα του είδους *Vigna unguiculata* έδειξε σημαντική παραλλακτικότητα της περιοχής ITS1 ή της ITS2 είτε σε άτομα του ίδιου είδους (intra-cultivar) είτε σε ένα μεμονωμένο άτομο (intra-individual) (Saini *et al.*, 2008; Vijaykumar *et al.*, 2010). Επίσης πρόσφατες μελέτες, με τη χρήση μαζικής αλληλούχισης (Pyrosequencing) της περιοχής ITS2 ή με την ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος, επέτρεψαν μια εκτίμηση του αριθμού των παραλλαγών στην περιοχή ITS1 ή στην ITS2 εντός του γονιδιώματος των δειγμάτων. Αυτή η ανάλυση έδειξε ότι κάθε παραλλαγή μπορεί να υπάρχει είτε σε πολλαπλά αντίγραφα (> 1% συχνότητας εμφάνισης) που ορίζεται ως κυρίαρχη παραλλαγή (major variant) ή να υπάρχουν πολλαπλά διακριτά major variants, ενώ μονήρη ή λίγα αντίγραφα χαρακτηρίζονται ως ήσσονος σημασίας παραλλαγές (minor variants) (Song *et al.*, 2012). Ο αριθμός των major variants και minor variants φαίνεται να ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των φυτικών ειδών (Song *et al.*, 2012). Για παράδειγμα, στο *Panax ginseng* εμφανίζονται 40 variants της ITS2 με το major variant να περιέχει περίπου 97.61% όλων των ITS2 αλληλουχιών του γονιδιώματος. Στο *Panax japonicus* εμφανίζονται συνολικά 90

variants και υπάρχουν τέσσερις major variants που περιέχουν 50,98%, 18,72%, 13,93%, 7,13% και 6,24% του συνόλου των αλληλουχιών ITS2 του γονιδιώματος (Chen *et al.*, 2013).

Η ανάλυση της περιοχής ITS σε 20 ελληνικές ποικιλίες *F. carica* έδειξε ότι υπάρχει παραλλακτικότητα είτε στις ITS1 είτε στις ITS2 αλληλουχίες μεταξύ των ποικιλιών. Τα παρατηρούμενα επίπεδα του πολυμορφισμού μεταξύ των ποικιλιών ως προς την περιοχή ITS1 ήταν υψηλότερα από ότι για την ITS2. Παράλληλα, εντοπίστηκε σημαντική intra-individual παραλλακτικότητα της περιοχής ITS2 στη Τσαπελοσικιά (Fig.20), στα Λευκά μεγάλα Ανδρούσης (Fig.1) και σε αρσενικά δένδρα (Fig.35). Ως εκ τούτου οποιαδήποτε ITS1 ή ITS2 αλληλουχία μπορεί να αξιοποιηθεί ως barcoding δείκτης.

Το *F.carica*, όπως και τα περισσότερα διπλοειδή αγγειόσπερμα, έχουν δύο ή τρεις οργανωτές πυρηνίσκου που βρίσκονται σε δύο με τρία μικρά χρωμοσώματα (Falistocco, 2009). Ως εκ τούτου, η περιορισμένη ομαδοποίηση των rDNA γονιδίων σε δυο ή τρεις τύπους και ο συνεχής αγενής πολλαπλασιασμός του δέντρου αναμένεται να διευκολύνει την ομογενοποίηση των rDNA γονιδίων μέσω των μηχανισμών της εναρμονισμένης εξέλιξης. Η ανάλυση της περιοχής ITS1 και ITS2 στις διάφορες ποικιλίες του *F. carica* έδειξε την παρουσία τουλάχιστον δύο major variants της περιοχής ITS1 και μία ή δύο major variants της περιοχής ITS2, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ομογενοποίηση (εναρμονισμένη εξέλιξη) του rDNA στο *F. carica* δεν έχει ολοκληρωθεί. Οι κυρίαρχες παραλλαγές μπορεί να εξαπλωθούν μέσα στο γονιδίωμα των ατόμων κατά τον αγενή πολλαπλασιασμό. Σε μια πρόσφατη μελέτη, η ανάλυση των ITS σε ποικιλίες *F. carica* αποκάλυψε ότι μια major variant φαίνεται να έχει επικρατήσει στις ποικιλίες *F. carica* της Λατινικής Αμερικής (Castro *et al.*, 2015).

Οι αλληλουχίες των περιοχών ITS1 και ITS2 είναι οι πιο δημοφιλείς και οι πιο αξιόπιστοι τόποι για μοριακή φυλογενετική ανάλυση του γένους *Ficus* (Li *et al.*, 2012a; Li *et al.*, 2012b). Αυτοί οι τόποι έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της γενετικής συγγένειας των ποικιλιών *Ficus carica* (Castro *et al.*, 2015). Οι εκτιμήσεις της γενετικής απόστασης της περιοχής ITS1 ή της ITS2 για τις ελληνικές ποικιλίες *F.carica* έδωσε τιμές που κυμαίνονται από 0.00 έως 0.015. Οι τιμές αυτές δεν επιτρέπουν την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου. Ωστόσο,

πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι στις ITS1 και ITS2 αλληλουχίες εμφανίζεται μια ασυνήθιστη απόκλιση εντός των ειδών και μεταξύ των ποικιλιών *F.carica* της Τυνησίας. Η γενετική απόσταση, που βασίζεται στις ITS2 αλληλουχίες, κυμαίνεται από 0,043 έως 0,652 επιτρέποντας την κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου μεταξύ των ποικιλιών (Baraket *et al.*, 2009a). Ωστόσο, οι τιμές αυτές υπερέβαιναν κατά πολύ τις εντός των ειδών γενετικές αποστάσεις σε είδη *Ficus* (Li *et al.*, 2012a; Li *et al.*, 2012b). Λεπτομερής ανάλυση της περιοχής ITS1 και ITS2 άλλα και ολόκληρης της περιοχής ITS των Τυνησιακών ποικιλιών έδειξε ότι υπήρχαν σφάλματα στο μέγεθος της περιοχής ITS και στις αλληλουχίες κυρίως του ITS2. Για παράδειγμα οι συγγραφείς δεν εξέτασαν αν το 3'-άκρο των ITS2 αλληλουχιών συμμορφώνεται με τους γενικούς κανόνες (π.χ. η παρουσία της δομής κοτσανιού μεταξύ του 3' άκρου του 5.8S και του 5' άκρου του 28S rRNA). Έτσι εσφαλμένες αλληλουχίες στο 3' άκρο του ITS2 ελήφθησαν υπόψη στην ανάλυση τους η οποία οδήγησε στην εσφαλμένη διάκριση των Τυνησιακών ποικιλιών *Ficus carica* με βάση τις αλληλουχίες της περιοχής ITS (Baraket *et al.*, 2009a, Baraket *et al.*, 2009b, Baraket *et al.*, 2013).

Η ανάλυση και η μοντελοποίηση της δευτεροταγούς δομής των ITS2, ITS1 και 5.8S nrDNA μπορεί να βοηθήσει στην αλληλούχιση με σκοπό την αποκάλυψη λανθασμένων πολυμορφισμών που στις περισσότερες περιπτώσεις είναι αναπόφευκτη. Εάν το προϊόν της PCR είναι απευθείας αλληλουχημένο, ο ενδο-ατομικός πολυμορφισμός μπορεί να υποδεικνύεται από διαφορετικές ζώνες στο πήκτωμα, καθώς επίσης και από μη αναγνώσιμα μέρη και διπλές κορυφές στο χρωματογράφημα. Η αλληλούχιση των κλωνοποιημένων προϊόντων της PCR ελαχιστοποίησε τις τεχνητές παραλλαγές που προκαλούνται και μαζί με την ανάλυση της δευτεροταγούς δομής και με την εξέταση των μοτίβων μπορεί να εξαλειφθεί ο ψευδής πολυμορφισμός (Freire *et al.*, 2012; Poczai *et al.*, 2015).

Στις μελέτες μας, οι ITS2, ITS1 και 5.8S αλληλουχίες περιείχαν όλα τα συντηρημένα μοτίβα που προσδιορίζονται στα φυτά. (με εξαίρεση το TGGT μοτίβο που δεν βρέθηκε στην ITS2). Παρ'όλα αυτά, η συγκριτική ανάλυση του μοντέλου της δευτεροταγούς δομής αποκάλυψε ότι ούτε η απουσία αυτού του μοτίβου από την ITS2 περιοχή στο *F.carica*, ούτε η παρουσία πολυμορφισμών επιπέδου ενός νουκλεοτιδίου, ούτε η παρουσία της έλλειψης (indel) 13 bp επηρέασε την γενικά

αποδεκτή δευτεροταγή δομή των τεσσάρων ελίκων που προσδιορίζονται σε άλλα φυτικά είδη (Schultz *et al.*, 2005).

Η ανάλυση των αλληλουχιών του *psbA-trnH* έδειξε κάποια μεταβολή μεταξύ των ποικιλιών *F.carica*. Το μήκος της περιοχής *psbA-trnH* κυμαίνονταν από 476 bp στις ποικιλίες Fig. 20 και Fig. 22 και 486 bp στις υπόλοιπες ποικιλίες (Fig 1, 2, 5, 19, 30, 31 και 32). Αυτή η διαφορά οφείλεται σε μια διαγραφή/ έλλειψη βάσεων που βρίσκεται στην διαγονιδιακή περιοχή. Όλες οι ποικιλίες εμφανίζουν μια συντηρημένη παλίνδρομη και αντίστροφη αλληλουχία η οποία επίσης βρέθηκε στην *psbA-trnH* στις πορτογαλικές ποικιλίες *F.carica* (Oliveira *et al.*, 2012) και γενικά στην *psbA-trnH* περιοχή των ειδών *Ficus*.

Η ανάλυση των διαγονιδιακών περιοχών *psbA-trnH* των ελληνικών ποικιλιών *F. carica* έδειξε ότι οι ποικιλίες μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες, με βάση την παρουσία μιας αλληλουχίας 10 bp όπως ποικιλίες (Indel +) (Fig. 1, 2, 5, 19, 30, 31 και 32) και ποικιλίες (Indel -) (Fig.20 και Fig.22). Η BlantN ανάλυση αποκάλυψε ότι η παρουσία του Indel + *psbA-trnH* εμφανίζεται στη συντριπτική πλειοψηφία των *Ficus* συμπεριλαμβανομένων των *F.carica* ενώ Indel - *psbA-trnH* ακολουθίες βρέθηκαν μόνο στα *F.sintenisii*, *F.ampelas*, *F.irisana*, *F.costaricana*, *F.bullenei*, *F.citrifolia*, *F.ropenoei*, *F.trigonata*, *F.obtusifolia*, *F.crassinervium*. Δεδομένου ότι τα γονιδιώματα των οργανιδίων μεταδίδονται από το μητρικό φυτό στους απογόνους, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι οι ποικιλίες Fig.20 και Fig.22 και οι ποικιλίες Fig. 19 προέρχονται από διαφορετικό πρόγονο.

Προκειμένου να διατηρηθούν οι τοπικοί γενετικοί πόροι, αρκετές έρευνες επικεντρώθηκαν στο χαρακτηρισμό και τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας. Προκειμένου να αξιολογηθούν οι ποικιλίες της Ελλάδος ή της Τυνησίας έγινε χρήση μορφομετρικών και δενδροκομικών παραμέτρων, καθώς και δείκτες ισοενζύμου για την διάκριση των ποικιλιών συκιάς. Δυστυχώς, αυτές οι παράμετροι επηρεάζονται ιδιαίτερα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το στάδιο ανάπτυξης των ιστών. Για να ξεπεραστούν αυτές οι δυσκολίες, μοριακοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς. Μεταξύ αυτών, Τυχαία ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), Ενδο-επαναλαμβανόμενες Απλές Ακολουθίες (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR), (Random Amplified Microsatellite Polymorphism, RAMP), Μοριακοί δείκτες βασισμένοι σε απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Simple Sequence Repeats, SSR), Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων

(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) έχουν εφαρμοστεί και έχει δειχθεί ότι είναι κατάλληλοι για διερεύνηση του μοριακού πολυμορφισμού και για να εξετάσουν τις σχέσεις μεταξύ των ποικιλιών του *F.carica* (Salhi *et al.*, 2006; Papadopoulou *et al.*, 2002; Ganopoulos *et al.*, 2015).

Ωστόσο, σημαντική συνεισφορά στην ανάλυση ποικιλιών ενός φυτικού είδους προσφέρει και η παραλλακτικότητα της περιοχής ITS1 ή της ITS2 μεταξύ των ποικιλιών. Για παράδειγμα, η ανάλυση της περιοχής ITS1 σε τέσσερεις ποικιλίες τομάτας επέτρεψε την διάκριση των ποικιλιών (Liu and Louws 2013). Επίσης μαζική αλληλούχιση (pyrosequencing) της περιοχής ITS1 ή της ITS2 σε δυο οικοτύπους της *A. Thaliana* κατέδειξε ότι τόσο η ενδογονιδιωματική παραλλακτικότητα είτε της περιοχής ITS1 είτε της ITS2 όσο και η συχνότητα εμφάνισης πανομοιότυπων αντιγράφων τους ήταν ικανή για την διάκριση των δυο οικοτύπων (Simon *et al.*, 2012). Επιπλέον, η παραλλακτικότητα της περιοχής ITS1 ή της ITS2 σε διάφορες ποικιλίες μπορεί να διερευνηθεί μέσω της προσέγγισης η οποία αναφέρεται ως υψηλής ευκρίνειας καμπύλη τήξης υβριδίων (High Resolution Melting Curve) (Herrmann *et al.*, 2006).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Altschul S.F., Gish W., Miller W., *et al.*, (1990). Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.

Álvarez, I. and Wendel, J. F., (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference, *Molecular phylogenetics and evolution*, 29: 417-434.

Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., *et al.*, (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 247-277.

Baraket, G., Ahmed, B. A., Messaoud, M., *et al.*, (2013). Genetic diversity and molecular evolution of the internal transcribed spacer (ITSs) of nuclear ribosomal DNA in the Tunisian fig cultivars (*Ficus carica L.*; *Moracea*), *Biochemical Systematics and Ecology*, 48: 20-33.

Baraket, G., Chatti, K., Saddoud, O., *et al.*, (2009b). Genetic analysis of Tunisian fig (*Ficus carica L.*) cultivars using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers, *Scientia horticulturae*, 120: 487-492.

Baraket, G., Saddoud, O., Chatti, K., *et al.*, (2009a). Sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in fig cultivars (*Ficus carica L.*), *Scientia Horticulturae*, 120: 34-40.

Barkman, T. J. and Simpson, B. B., (2002). Hybrid origin and parentage of *Dendrochilum acuíferum* (*Orchidaceae*) inferred in a phylogenetic context using nuclear and plastid DNA sequence data, *Systematic Botany*, 27: 209-220.

Bennett, R. I. and Smith, A. G., (1991). Use of a genomic clone for ribosomal RNA from *Brassica oleracea* in RFLP analysis of *Brassica* species, *Plant molecular biology*, 16: 685-688.

Berg J., Tymoczko J. and Stryer L., (2002). *Biochemistry*, 5th edition, W.H. Freeman and Company, New York.

- Blaxter, M., (2003). Molecular systematics: counting angels with DNA, *Nature*, 421: 122-124.
- Castro, C., Hernandez, A., Alvarado, L., *et al.*, (2015). DNA Barcodes in Fig Cultivars (*Ficus carica* L.) Using ITS Regions of Ribosomal DNA, the psbA-trnH Spacer and the matK Coding Sequence, *American Journal of Plant Sciences*, 6: 95.
- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., *et al.*, (2007). A proposal for a standardisez protocol to barcode all land plants, *Taxon*, 56: 295-299.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., *et al.*, (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species, *PloS one*, 5: e8613.
- Chen, X., Liao, B., Song, J., *et al.*, (2013). A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding, *Gene*, 530: 39-43.
- Coleman, A. W. (2015). Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure, *Trends in Genetics*, 31: 157-163.
- Dover, G. A., Strachan, T., Coen, E. S., *et al.*, (1982). Molecular drive, *Science* (New York, NY), 218: 1069.
- Elder Jr, J. F. and Turner, B. J., (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes, *Quarterly Review of Biology*, 297-320.
- Falistooco, E., (2009). Presence of triploid cytotypes in the common fig (*Ficus carica* L.), *Genome*, 52: 919-925.
- Famá, P., Olsen, J. L., Stam, W. T., *et al.*, (2000). High levels of intra-and inter-individual polymorphism in the rDNA ITS1 of *Caulerpa racemosa* (Chlorophyta), *European Journal of Phycology*, 35: 349-356.
- Ferri, G., Alù, M., Corradini, B., *et al.*, (2009). Forensic botany: species identification of botanical trace evidence using a multigene barcoding approach, *International Journal of Legal Medicine*, 123: 395-401.
- Francisco-Ortega, J., Barber, J. C., Santos-Guerra, A., *et al.*, (2001). Origin and evolution of the endemic genera of Gonosperminae (*Asteraceae: Anthemideae*) from

the Canary Islands: evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA, *American Journal of Botany*, 88: 161-169.

Freire, M. C. M., da Silva, M. R., Zhang, X., *et al.*, (2012). Nucleotide polymorphism in the 5.8 S nrDNA gene and internal transcribed spacers in *Phakopsora pachyrhizi* viewed from structural models, *Fungal Genetics and Biology*, 49: 95-100.

Ganopoulos, I., Kalivas, A., Kavroulakis, N., *et al.*, (2015). Genetic diversity of Barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) collection in Greece with ISSR molecular markers, *Plant Gene*, 2: 29-33.

Graur D. and Li W.H. (1999). *Fundamentals of molecular evolution*, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.

Hajibabaei, M., Ivanova, N. V., Ratnasingham, S., *et al.*, (2005). Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360: 1959-1967.

Hebert, P. D. and Gregory, T. R., (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy, *Systematic biology*, 54: 852-859.

Hebert, P. D., Cywinska, A. and Ball, S. L., (2003). Biological identifications through DNA barcodes, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270: 313-321.

Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M. F., *et al.*, (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes, *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6: 225-242.

Herrmann, M. G., Durtschi, J. D., Bromley, L. K., *et al.*, (2006). Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes, *Clinical chemistry*, 52: 494-503.

Hollingsworth, M. L., Andra Clark, A., Forrest, L. L., *et al.*, (2009). Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants, *Molecular Ecology Resources*, 9: 439-457.

Hřibová, E., Čížková, J., Christelová, P., *et al.*, (2011). The ITS1-5.8 S-ITS2 sequence region in the *Musaceae*: structure, diversity and use in molecular phylogeny, PLoS One, 6: e17863.

Khadari, B., Grout, C., Santoni, S. *et al.*, (2005). Contrasted genetic diversity and differentiation among Mediterranean populations of *Ficus carica* L.: a study using mtDNA RFLP, Genetic resources and crop evolution, 52: 97-109.

Koetschan, C., Förster, F., Keller, A., *et al.*, (2010). The ITS2 Database III—sequences and structures for phylogeny, Nucleic Acids Research, 38: D275-D279.

Kress, W. J. and Erickson, D. L., (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region, Plos one, 2: e508.

Krislev, M.E., Hartmann, A. and O. Bar-Yosef., (2006). "Early Domesticated Fig in the Jordan Valley", Science 312: 1273-1275.

Lafontaine, D. L. (2015). Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function, Nature structural & molecular biology, 22: 11-19.

Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., *et al.*, (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots, Proceedings of the National Academy of Sciences, 105: 2923-2928.

Li, H. Q., Chen, J. Y., Wang, S., *et al.*, (2012a). Evaluation of six candidate DNA barcoding loci in *Ficus* (*Moraceae*) of China, Molecular ecology resources, 12: 783-790.

Li, H. Q., Wang, S., Chen, J. Y., *et al.*, (2012b). Molecular phylogeny of *Ficus* section *Ficus* in China based on four DNA regions, Journal of Systematics and Evolution, 50: 422-432.

Liao, B., Chen, X., Han, J., *et al.*, (2015). Identification of commercial *Ganoderma* (*Lingzhi*) species by ITS2 sequences, Chinese medicine, 10: 1-9.

- Liu, B. and Lowes, F., (2013). Multiple Divergent ITS1 Copies Were Identified in Single Tomato Genome Using DGGE Analysis, *Plant Molecular Biology Reporter*, 31: 272-279.
- Liu, J. S. and Schardl, C. L., (1994). A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes, *Plant molecular biology*, 26: 775-778.
- Liu, Q., Ge, S., Tang, H., *et al.*, (2006). Phylogenetic relationships in *Elymus* (*Poaceae: Triticeae*) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast trnL-F sequences, *New Phytologist*, 170: 411-420.
- Ma, H., Overstreet, R. M. and Subbotin, S. A., (2008). ITS2 secondary structure and phylogeny of cyst-forming nematodes of the genus *Heterodera* (*Tylenchida: Heteroderidae*), *Organisms Diversity and Evolution*, 8: 182-193.
- Ma, X. Y., Xie, C. X., Liu, C., *et al.*, (2010). Species identification of medicinal pteridophytes by a DNA barcode marker, the chloroplast psbA-trnH intergenic region, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33: 1919-1924.
- MacGillivray, M. L. and Kaczmarska, I. (2015). *Paralia* (*Bacillariophyta*) stowaways in ship ballast: implications for biogeography and diversity of the genus, *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 22: 2.
- Mai, J. C. and Coleman, A. W. (1997). The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants, *Journal of Molecular Evolution*, 44: 258-271.
- Marshall, E., (2005). Will DNA bar codes breathe life into classification?, *Science*, 307: 1037.
- Mayol, M. and Rosselló, J. A., (2001). Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus*, *Molecular phylogenetics and evolution*, 19: 167-176.
- Miller, S. E., (2007). DNA barcoding and the renaissance of taxonomy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 4775-4776.
- Muellner, A. N., Schaefer, H. and Lahaye, R., (2011). Evaluation of candidate DNA barcoding loci for economically important timber species of the mahogany family (*Meliaceae*), *Molecular Ecology Resources*, 11: 450-460.

- Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S., *et al.*, (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273.
- Nei, M. and Rooney, A. P., (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families, *Annual review of genetics*, 39: 121.
- O'Kane Jr, S. L., Schaal, B. A. and Al-Shehbaz, I. A., (1996). The origins of *Arabidopsis suecica* (*Brassicaceae*) as indicated by nuclear rDNA sequences, *Systematic Botany*, 559-566.
- Oliveira, A. P., Baptista, P., Andrade, P. B., *et al.*, (2012). Characterization of *Ficus carica* L. cultivars by DNA and secondary metabolite analysis: Is genetic diversity reflected in the chemical composition?, *Food research international*, 49: 710-719.
- Papadopoulou, K., Ehaliotis, C., Tourna, M., *et al.*, (2002). Genetic relatedness among dioecious *Ficus carica* L. cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis, and evaluation of agronomic and morphological characters, *Genetica*, 114: 183-194.
- Parveen, I., Singh, H. K., Raghuvanshi, S., *et al.*, (2012). DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species, *Molecular ecology resources*, 12: 82-90.
- Pettengill, J. B. and Neel, M. C., (2008). Phylogenetic patterns and conservation among North American members of the genus *Agalinis* (*Orobanchaceae*), *BMC evolutionary biology*, 8: 1.
- Poczai, P. and Hyvönen, J., (2010). Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects, *Mol. Biol. Rep.* 37: 1897-1912.
- Poczai, P., Varga, I. and Hyvönen, J., (2015). Internal transcribed spacer (ITS) evolution in populations of the hyperparasitic European mistletoe pathogen fungus, *Sphaeropsis visci* (*Botryosphaeriaceae*): The utility of ITS2 secondary structures, *Gene*, 558: 54-64.
- Popp, M. and Oxelman, B., (2001). Inferring the history of the polyploid *Silene aegaea* (*Caryophyllaceae*) using plastid and homoeologous nuclear DNA sequences, *Molecular phylogenetics and evolution*, 20: 474-481.

- Rampersad, S. N., (2014). ITS1, 5.8 S and ITS2 secondary structure modelling for intra-specific differentiation among species of the *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* species complex, Springer Plus, 3: 10.
- Renner, S. S., Schaefer, H. and Kocyan, A., (2007). Phylogenetics of *Cucumis* (*Cucurbitaceae*): *Cucumber* (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian clade far from *melon* (*C. melo*), BMC Evolutionary Biology, 7: 1.
- Saini, A., Reddy, S. K. and Jawali, N., (2008). Intra-individual and intra-species heterogeneity in nuclear rDNA ITS region of *Vigna* species from subgenus *Ceratotropis*, Genetics research, 90: 299-316.
- Salhi, H., Chatti, K., Saddoud, O., *et al.*, (2006). Genetic diversity of different Tunisian fig (*Ficus carica* L.) collections revealed by RAPD fingerprints, Hereditas, 143: 15-22.
- Schindel, D. E. and Miller, S. E., (2005). DNA barcoding a useful tool for taxonomists, Nature, 435: 17-17.
- Schultz, J., Maisel, S., Gerlach, D., *et al.*, (2005). A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota, Rna, 11: 361-364.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., *et al.*, (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III, American journal of botany, 94: 275-288.
- Simon, U. K., Trajanoski, S., Kroneis, T., *et al.*, (2012). Accession-specific haplotypes of the internal transcribed spacer region in *Arabidopsis thaliana*—a means for barcoding populations, Molecular biology and evolution, mss093.
- Singh, H. K., Parveen, I., Raghuvanshi, S., *et al.*, (2012). The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species, BMC research notes, 5: 42.

Song, J., Shi, L., Li, D., *et al.*, (2012). Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA, *PloS one*, 7: e43971.

Srirama, R., Senthilkumar, U., Sreejayan, N., *et al.*, (2010). Assessing species admixtures in raw drug trade of *Phyllanthus*, a hepato-protective plant using molecular tools, *Journal of ethnopharmacology*, 130: 208-215.

Sun, K., Chen, X. L., Ma, R. J., *et al.*, (2002). Molecular phylogenetics of *Hippophae L.(Elaeagnaceae)* based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nrDNA, *Plant Systematics and Evolution*, 235: 121-134.

Tamura K., Nei M. and Kumar S., (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 101: 11030-11035.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., *et al.*, (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J., (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.

Valentini, A., Miquel, C. and Taberlet, P., (2010). DNA barcoding for honey biodiversity, *Diversity*, 2: 610-617.

Van De Wiel, C. C. M., Van Der Schoot, J., Van Valkenburg, J. L. C. H., (2009). DNA barcoding discriminates the noxious invasive plant species, floating pennywort (*Hydrocotyle ranunculoides Lf*), from non-invasive relatives, *Molecular Ecology Resources*, 9: 1086-1091.

Vijaykumar, A., Saini, A. and Jawali, N., (2010). Phylogenetic analysis of subgenus *Vigna* species using nuclear ribosomal RNA ITS: Evidence of hybridization among *Vigna unguiculata* subspecies, *Journal of Heredity*, 101: 177-188.

- Volkov, R. A., Komarova, N. Y. and Hemleben, V., (2007). Ribosomal DNA in plant hybrids: inheritance, rearrangement, expression, *Systematics and Biodiversity*, 5: 261-276.
- Wang, Q. D., Zhang, T. and Wang, J. B., (2007). Phylogenetic relationships and hybrid origin of *Potamogeton* species (*Potamogetonaceae*) distributed in China: insights from the nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequence (ITS), *Plant Systematics and Evolution*, 267: 65-78.
- Wang, X. C., Liu, C., Huang, L., *et al.*, (2015). ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?, *Molecular ecology resources*, 15: 573-586.
- Weitemier, K., Straub, S. C., Fishbein, M., *et al.*, (2015). Intragenomic polymorphisms among high-copy loci: a genus-wide study of nuclear ribosomal DNA in *Asclepias* (*Apocynaceae*), *PeerJ*, 3: e718.
- Whitlock, B. A., Hale, A. M. and Groff, P. A., (2010). Intraspecific inversions pose a challenge for the trnH-psbA plant DNA barcode, *PloS one*, 5: e11533.
- Wolf, M., Chen, S., Song, J., *et al.*, (2013). Compensatory base changes in ITS2 secondary structures correlate with the biological species concept despite intragenomic variability in ITS2 sequences—a proof of concept, *PloS one*, 8: e66726.
- Xiao, L. Q., Möller, M. and Zhu, H., (2010). High nrDNA ITS polymorphism in the ancient extant seed plant *Cycas*: incomplete concerted evolution and the origin of pseudogenes, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 168-177.
- Yao, H., Song, J. Y., Ma, X. Y., *et al.*, (2009). Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast psbA-trnH intergenic region, *Planta medica*, 75: 667-669.
- Yesson, C., Barcenas, R. T., Hernandez, H. M., *et al.*, (2011). DNA barcodes for Mexican *Cactaceae*, plants under pressure from wild collecting, *Molecular ecology resources*, 11: 775-783.
- Zhang, D. X. and Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects, *Molecular ecology*, 12: 563-584.

Genders, R., (1987). Τα φρούτα του κήπου σας . Εκδόσεις Κουτσουμπός, Αθήνα.

Δούκα, Β., (2011). `` Παραγωγή και επεξεργασία ξηρών σύκων στην Εύβοια `` , Εκδότης ιστοσελίδας Κεντρική βιβλιοθήκη ΤΕΙ Κρήτης. Διαθέσιμο online<http://nefeli.lib.teicrete.gr/browse/steg/fp/2011/DoukaVasiliki,LydakisDimitrios/attached-document-1314173533-816235-24335/douka_lydaki2011.pdf>.

Ευστρατίου, Κ., (2015). ``Η καλλιέργεια της συκιάς νέες τεχνικές και προοπτική ανάπτυξης των εξαγωγών``, Εκδότης ιστοσελίδας Κεντρική βιβλιοθήκη ΤΕΙ Κρήτης. Διαθέσιμο online<http://nefeli.lib.teicrete.gr/browse/steg/agr/2015/EfstratiouKostas/attached-document-1432020153-544440-22655/EfstratiouKostas2015.pdf>

Ζαχαρόπουλος, Ι., (1997). Δενδροκομία - Δενδροτεχνική Γενική & Ειδική, Εκδόσεις Ψυχαλός .

Μαλαπάνη, Α., (2011). `` Η επίδραση διαφορετικών επιπέδων λίπανσης στην ποιότητα σύκων ποικιλίας Καλαμών``, Εκδότης ιστοσελίδας Νημερτής- Το ιδρυματικό καταθετήριο του Πανεπιστημίου Πατρών. Διαθέσιμο online <<http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/4312/1/Anna%20Malapani.pdf>>

Νούσης, Ι., Κ., (1984). Η Νέα Δενδροκομία. Τόμος Β', Έκδοση Δεύτερη.

Ποντίκης, Κ., (1996). Ειδική δενδροκομία τόμος Β΄ Ακρόδρυα, πυρηνόκαρπα, λοιπά καρποφόρα. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα.

Σφακιωτάκης, Ε.Μ., (1954). Δενδρώδεις καλλιέργειες: Ίδρυμα Ευγενίδου.

Σφιχτέλλης, Σ., (2009). `` Η καλλιέργεια και η γονιμοποίηση της συκιάς``, Εκδότης ιστοσελίδας ΕΛΓΑ (Οργανισμός Ελληνικών Γεωργικών Ασφαλίσεων). Διαθέσιμο online <http://www.elga.gr/downloads/texts/4026.pdf>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

I. Διαλύματα απομόνωσης ολικού γονιδιωματικού DNA από φυτικό ιστό

1. CTAB: 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA (Ph 8), 1.4 M NaCl, 1% PVP-40
2. SEVEG: χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1
3. BE: 100 mM Tris-HCl pH 8,0 , 1 mM EDTA.

II. Διαλύματα για εκχύλιση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο βρασμού

4. STET Medium: Σακχαρόζη 8%, Triton-X 100 5%, 50 mM Tris-HCl pH 8,50 mM EDTA pH 8 5. Διατήρηση στους 4 °C.
5. Διάλυμα λυσοζύμης: Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O διαλύονται 50 mg λυσοζύμης. Διατήρηση στους -20 °C.

III. Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων

6. RNAse A: 10 mg RNAse A διαλύονται σε 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5/15 mM NaCl. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100°C για 15 λεπτά, με σκοπό την αδρανοποίηση τυχόν δράσης DNase, αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται στους -20°C.
7. 1 x TAE: Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 50 x TAE το οποίο αραιώνεται 50 φορές. 50 x TAE: διαλύονται 242g Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 100ml 0,5 M EDTA pH 8,0 σε ddH₂O, μέχρι τελικό όγκο 1lt.
8. Βρωμιούχο αιθίδιο: Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH₂O και φυλάσσεται στους 4°C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5μg/ml.
9. Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer): 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη.

IV. Διαλύματα μετασχηματισμού κυττάρων E.coli

10. IPTG 1M (Μοριακό Βάρος: 238.31): Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O διαλύονται 0,23831 g IPTG. Αποστείρωση του διαλύματος με φιλτράρισμα αυτού μέσα από διηθητικό φίλτρο (0.22 μm). Διατήρηση στους -20°C.
11. 2% X-Gal: 0,02 g X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase, SIGMA) προστίθενται σε 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιο (Sigma). Διατήρηση στους -20 °C.

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ

12. LB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων E. coli

Για την παρασκευή 1 lt θρεπτικού διαλύματος LB, σε τελικό όγκο 1 lt dH₂O προστίθενται 10 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton (Casein) και 5 g Yeast extract. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 121°C. Μετά την αποστείρωση του υλικού, αφήνουμε το θρεπτικό να κρυώσει, και μετά προστίθεται αντιβιοτικό αμπικιλίνης (100 mg/ml) σε αναλογία 1:1000. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4°C

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Διάλυμα αμπικιλίνης (100 mg/ml): Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O διαλύονται 100 mg αμπικιλίνης. Αποστείρωση του διαλύματος με φιλτράρισμα αυτού μέσα από διηθητικό φίλτρο (0,22 μm). Διατήρηση στους -20°C.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

i) Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ITS1 στις διάφορες ποικιλίες *F. carica*

Fig 1.1

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 1.2

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 2

ACGTTACGACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 4

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 5

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 8

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 9

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 10

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 11

ACGTTACGACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 12

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 14

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 19

ACGTTACGACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAGCGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTCCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 20.1

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 20.2

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAATGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAGAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 22

ACGTTACGACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 25

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 30

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 31

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 32

ACGTTACGACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACAGTACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 33

ACGTTACAACACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTACTCTACCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 34

ACGTTACGACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 35.1

ACGTTACGACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGCGACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

Fig 35.2

ACGTTACGACTCGAGGGGGGCGAGGGGGCGGAACACGCCCCGGACCCTCCTCGCCGGGTGCTTGTGGCCCCGCCCTCGCCCCGGCAC
CAAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGTCAAGGAAAGACAACGAGACGATCCCCGCCATCGAGGCCCGGGAACGGTACTCTGCCTCGGTG
GTCGCTTCGGGATCGGTTTTTAGTATGA

ii) Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 5.8S στις διάφορες ποικιλίες *F. carica*

Fig 1.1

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 1.2

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 2

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 4

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 5

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 8

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 9

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 10

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 11

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGACTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 12

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 14

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 19

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 20.1

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 20.2

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 22

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 25

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 30

AGAATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 31

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 32

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 33

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 34

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 35.1

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

Fig 35.2

AGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGTCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

iii) Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ITS2 στις διάφορες ποικιλίες *F. carica*

Fig 1.1

CACGTCGTTGCCSCCGAACCSCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCCTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCACGTGCCTCG
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTCAAG

Fig 1.2

CACGTCGTTGCCSCCGAACCSCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCCTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCACGTGCCTCG
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTCAAGGTCCTCAACG

Fig 2

CACGTCGTTGCCSCCGAACCSCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCCTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCACGTGCCTCG
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTCAAGGTCCTCAACG

Fig 4

CACGTCGTTGCCSCCGAACCSCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCCTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCACGTGCCTCG
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTCAAGGTCCTCAACG

Fig 5

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCGACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 8

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCGACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 9

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGCGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCGACGTGCGTGC
ACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 10

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCGACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 11

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCGACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 12

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCGACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 14

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCGACGTGCGTGC
ACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 19

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCGACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 20.1

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGAACAGGTAGTCGATCATTGGTCCCGCCGACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 20.2

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGGCTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGCGTCCCGCCACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 22

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGCGTCCCGCCACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 25

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGCGTCCCGCCACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 30

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGCGTCCCGCCACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 31

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGCGTCCCGCCACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 32

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGCGTCCCGCCACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 33

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGCGTCCCGCCACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 34

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGCGTCCCGCCACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 35.1

CACGTCGTTGCCCCCGAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCGTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAACCGAGTCCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGCGTCCCGCCACGTGCGTGC
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTACGGGTGCCTCCAACG

Fig 35.2

CACGTCGTTGCCCGGAAACCCCGTCCCGCTCCTAGCCGGGCGAGTGGGGACTGTGTGGGGGGGGCGGATGATGACCTCCCGTGCCTGC
TTTGACCCGCGGTTGGTCCAAAAACCGAGTCCCTGTACGTCGTCTTGGCAACAGGTAGTCGATCATTGCGGTCCCGCCGACGTCGCTCG
GACACGCATCGGGACTCCGACAGACCCCAATGCGCCCGTCACG

iv) Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας *psbA-trnH* στις διάφορες ποικιλίες *F. carica*

Fig 1

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTCCCTCTAGACCTAGCGGCTGTAGAAGTTCATCTACAAATGGATAAGACTTCTA
TAATTATATTAGTGATACGAGTTTTGAAAATGAAAAATAAAGGAGCAATAATAAACCTCTTGTATATCAAGAGGTTTATT
ATTGCTCCTTATTTTCATAATAAATTATTATTTGTTAGTCTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTCTTTACTTCTTCATATTTT
CGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTCTTAATATTTTATTTACATTTTAAATAAATAAATAAATAAAGGTTTCCATT
TATTTTTGTTGATTTGATTGTAGAAGAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATTGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACT
AATCATATTGGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG

Fig 2

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTCCCTCTAGACCTAGCGGCTGTAGAAGTTCATCTACAAATGGATAAGACTTCTA
TAATTATATTAGTGATACGAGTTTTGAAAATGAAAAATAAAGGAGCAATAATAAACCTCTTGTATATCAAGAGGTTTATT
ATTGCTCCTTATTTTCATAATAAATTATTATTTGTTAGTCTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTCTTTACTTCTTCATATTTT
CGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTCTTAATATTTTATTTACATTTTAAATAAATAAATAAATAAAGGTTTCCATT
TATTTTTGTTGATTTGATTGTAGAAGAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATTGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACT
AATCATATTGGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG

Fig 5

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTCCCTCTAGACCTAGCGGCTGTAGAAGTTCATCTACAAATGGATAAGACTTCTA
TAATTATATTAGTGATACGAGTTTTGAAAACGAAAAATAAAGGAGCAATAATAAACCTCTTGTATATCAAGAGGTTTATT
ATTGCTCCTTATTTTCATAATAAATTATTATTTGTTAGTCTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTCTTTACTTCTTCATATTTT
CGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTCTTAATATTTTATTTACATTTTAAATAAATAAATAAATAAAGGTTTCCATT
TATTTTTGTTGATTTGATTGTAGAAGAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATTGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACT
AATCATATTGGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG

Fig 19

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTCCCTCTAGACCTAGCGGCTGTAGAAGTTCATCTACAAATGGATAAGACTTCTA
TAATTATATTAGTGATACGAGTTTTGAAAATGAAAAATAAAGGAGCAATAATAAACCTCTTGTATATCAAGAGGTTTATT
ATTGCTCCTTATTTTCATAATAAATTATTATTTGTTAGTCTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTCTTTACTTCTTCATATTTT
CGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTCTTAATATTTTATTTACATTTTAAATAAATAAATAAATAAAGGTTTCCATT
TATTTTTGTTGATTTGATTGTAGAAGAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATTGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACT
AATCATATTGGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG

Fig 20

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTCCCTCTAGACCTAGCGGCTGTAGAAGTTCATCTACAAATGGATAAGACTTCTA
TAATTATATTAGTGATACGAGTTTTGAAAATGAAAAATAAAGGAGCAATAATAAACCTCTTGTATATCAAGAGGTTTATT
ATTGCTCCTTATTTTCATAATAAATTATTATTTGTTAGTCTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTCTTTACTTCTTCATATTTT
CGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTCTTAATATTTTATTTACATTTTAAATAAATAAATAAAGGTTTCCATTATTTTTGTT
GATTTGATTGTAGAAGAAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATTGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACTAATCATATTG
GGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG

Fig 22

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTCCCTCTAGACCTAGCGGCTGTAGAAGTTCATCTACAAATGGATAAGACTTCTA
TAATTATATTAGTGTATACGAGTTTTGAAAATGAAAAATAAAGGAGCAATAATAAACCTCTTGTATATCAAGAGGTTTATT
ATTGCTCCTTATTTTTATAATAAATTATTATTTGTTAGTCTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTCTTTACTTCTTCATATTTT
CGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTCTTAATATTTATTTTACATTTTAAATAAATATAAAGGTTTCCATTTATTTTTGTT
GTATTTGATTGTAGAAGAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATTGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACTAATCATATTG
GGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG

Fig 30

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTCCCTCTAGACCTAGCGGCTGTAGAAGTTCATCTACAAATGGATAAGACTTCTA
TAATTATATTAGTGTATACGAGTTTTGAAAATGAAAAATAAAGGAGCAATAATAAACCTCTTGTATATCAAGAGGTTTATT
ATTGCTCCTTATTTTTATAATAAATTATTATTTGTTAGTCTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTCTTTACTTCTTCATATTTT
CGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTCTTAATATTTATTTTACATTTTAAATAAATATAAATAAATAAAGGTTTCCATT
TATTTTTGTTGATTTGATTGTAGAAGAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATTGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACT
AATCATATTGGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG

Fig 31

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTCCCTCTAGACCTAGCGGCTGTAGAAGTTCATCTACAAATGGATAAGACTTCTA
TAATTATATTAGTGTATACGAGTTTTGAAAATGAAAAATAAAGGAGCAATAATAAACCTCTTGTATATCAAGAGGTTTATT
ATTGCTCCTTATCTTTATAATAAATTATTATTTGTTAGTCTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTCTTTACTTCTTCATATTTT
CGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTCTTAATATTTATTTTACATTTTAAATAAATATAAATAAATAAAGGTTTCCATT
TATTTTTGTTGATTTGATTGTAGAAGAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATTGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACT
AATCATATTGGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG

Fig 32

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTCCCTCTAGACCTAGCGGCTGTAGAAGTTCATCTACAAATGGATAAGACTTCTA
TAATTATATTAGTGTATACGAGTTTTGAAAATGAAAAATAAAGGAGCAATAATAAACCTCTTGTATATCAAGAGGTTTATT
ATTGCTCCTTATTTTTATAATAAATTATTATTTGTTAGTCTTTATTTAACATAAGTCTTTTTTTCTTTACTTCTTCATATTTT
CGTTATGTAGTAATTTATATATATGTTTTCTTAATATTTATTTTACATTTTAAATAAATATAAATAAATAAAGGTTTCCATT
TATTTTTGTTGATTTGATTGTAGAAGAAAAAATAAATATGAATGTTGTAATTGAAGTAGTTTTAATATATAGAAATACT
AATCATATTGGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG