



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΠΜΣ: ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«Επισκόπηση γενετικού υλικού καστανιάς στην περιοχή
Κυνουρίας με χρήση μοριακών δεικτών»**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Σ. ΚΑΜΠΟΥΡΟΛΙΑΣ

Επιβλέπων: Ρούσσος Πέτρος

ΑΘΗΝΑ 2019

Μεταπτυχιακή διατριβή

**«Επισκόπηση γενετικού υλικού καστανιάς στην περιοχή
Κυνουρίας με χρήση μοριακών δεικτών»**

**«Overview of chestnut genetic material in the Kynouria
region using molecular markers»**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Σ. ΚΑΜΠΟΥΡΟΛΙΑΣ

Επιβλέπων: Ρούσσος Πέτρος

Εξεταστική επιτροπή:

Ρούσσος Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μαριάννα Χατζηδημητρίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Τζουτζούκου Χρυσούλα, Λέκτορας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ύπαρξη της καστανιάς (*Castanea sativa* Mill.) στην Ευρώπη χρονολογείται πριν από την τριτογενή περίοδο. Οι ανατολικές μεσογειακές χώρες υπήρξαν τα σπουδαιότερα καλλιεργητικά κέντρα της καστανιάς. Η καστανιά μεταφέρθηκε στον ελλαδικό χώρο από τη Μ. Ασία και στη συνέχεια από την Ελλάδα εξαπλώθηκε στην Ιταλία. Στην Ελλάδα καταλληλότερες περιοχές για την καλλιέργεια της καστανιάς θεωρούνται οι νομοί Αρκαδίας, Κρήτης, Μαγνησίας, Ευρυτανίας και Χαλκιδικής. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας της καστανιάς σε ένα από τα κέντρα καλλιέργειάς της, την Αρκαδία. Με σκοπό τον έλεγχο της ενδοποικιλιακής παραλλακτικότητας συλλέχθηκαν νεαρά υγιή φύλλα από τα χωριά Καστάνιτσα, Πλάτανος, Άγιος Πέτρος, Καστρί και Δολιανά. Η απομόνωση του DNA έγινε σύμφωνα με τη χρήση του NucleoSpin Plant II kit. Στα πλαίσια της μοριακής ανάλυσης δοκιμάστηκαν συνολικά εννέα εκκινητές ISSR, εκ των οποίων επιλέχθηκαν πέντε. Ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR έγινε σε πηκτή αгарόζης 2,5 % w/v, ενώ η οπτικοποίηση έλαβε χώρα σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό NTSYS pc 2.2i. Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη χρήση του συντελεστή Jaccard και δημιουργήθηκαν δενδρογράμματα με την μέθοδο UPGMA και την μέθοδο N.J.. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει μία τάση ομαδοποίηση των δειγμάτων σύμφωνα με την προέλευσή τους. Η μία μεγάλη ομάδα αντιπροσωπεύει δείγματα των γειτονικών χωριών Καστάνιτσα και Πλάτανος, ενώ η δεύτερη ομάδα δείγματα από τα χωριά Άγιος Πέτρος, Καστρί και Δολιανά τα οποία και γειτνιάζουν. Φυσικά υπήρχαν επικαλύψεις στις δύο ομάδες που επιβεβαιώνουν το μικρό ποσοστό γενετικής παραλλακτικότητας. Η ανάλυση πλαισιώθηκε και από μετρήσεις μακροσκοπικών χαρακτηριστικών των καρπών καθώς και αναλύσεις σχετικά με τα μακροστοιχεία και τα μικροστοιχεία των καστώνων.

Εργαστήριο Δενδροκομίας, Γ.Π.Α.

Λέξεις-Κλειδιά: καστανιά, ISSR εκκινητές, Αρκαδία

ABSTRACT

The presence of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Europe dates back to the tertiary period. The eastern Mediterranean countries have been the most important chestnut growing centers. The chestnut came to Greece from Asia Minor and from Greece it spread to Italy. In Greece, the most suitable areas for the cultivation of chestnut trees are the regions of Arkadia, Crete, Magnesia, Evritania and Chalkidiki. The purpose of this postgraduate dissertation is to study the genetic diversity of chestnut trees in one of its culture centers, Arcadia. Young healthy leaves were collected from the villages of Kastanitsa, Platanos, Agios Petros, Kastri and Doliana. The DNA isolation was performed using the NucleoSpin Plant II kit. In the context of molecular analysis, a total of nine ISSR primers were tested, of which five were selected. Separation of the PCR products was performed on a 2.5% w/v agarose gel while the visualization took place on an ultraviolet bank. The analysis of the results was conducted with the NTSYS pc 2.2i software. Genetic distances were calculated using the Jaccard factor and tree patterns were created using the UPGMA method and the NJ method. The results showed that there is a tendency to group the samples according to their origin, one large group is representing samples of the neighboring villages Kastanitsa and Platanos , while the second group represents samples from the villages of Agios Petros, Kastri and Doliana, which are adjacent. Of course, there were overlaps in the two groups that confirm the low percentage of genetic variation. The analysis was also framed by measurements of the macroscopic characteristics of the chestnuts, as well as analysis of the chestnuts' macroelements and microelements.

Laboratory of Horticulture, A.U.A.

Keywords: chestnut, ISSR markers, Arcadia

Ευχαριστίες

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

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Σταύρο Βέμμο για την ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης και την καθοδήγησή του κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Πέτρο Ρούσσο για την πολύτιμη βοήθεια του και την αποδοχή να αναλάβει την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου διατριβής μετά την συνταξιοδότηση του κ. Βέμμου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την κατανόησή τους τόσο κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης όσο και κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο- ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Καταγωγή και εξάπλωση της καστανιάς.....	8
1.2 Σημασία της καλλιέργειας της καστανιάς.....	9
1.3 Βοτανική ταξινόμηση της καστανιάς.....	13
1.4 Μέθοδοι ταυτοποίησης ποικιλιών	15
1.4.1 Μορφολογικοί δείκτες	15
1.4.2 Καρυοτυπικοί δείκτες	15
1.4.3 Βιοχημικοί δείκτες.....	16
1.4.4 Μοριακοί δείκτες.....	16
1.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	19
1.5.1 Τα στάδια της PCR.....	21
1.5.2 Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της PCR.....	23
1.5.2.1 Πλεονεκτήματα.....	23
1.5.2.2 Μειονεκτήματα	23
1.6 Μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα.....	24
1.6.1 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat).....	24
1.6.2 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα της μεθόδου ISSR.....	24
1.7 Ηλεκτροφόρηση.....	25
1.8 Σκοπός του πειράματος.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο- ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.1 Φυτικό υλικό.....	28
2.2 Εκκινητές.....	30
2.3 Συσκευές.....	30
2.4 Διαδικασία απομόνωσης DNA	31
2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA.....	33
2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	33
2.7 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης.....	35
2.8 Φόρτωση δειγμάτων, ηλεκτροφόρηση και φωτογράφιση.....	36
2.9 Αριθμητική ανάλυση δεδομένων	37
2.10 Μετρήσεις χαρακτηριστικών καστανών το έτος 2015.....	39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
3.1 Ενισχυμένες ζώνες DNA.....	40
3.2 Κατασκευή δενδρογράμματος.....	42
3.3 Αποτελέσματα λοιπών μετρήσεων	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο-ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	47
4.1 Συζήτηση.....	47
4.2 Συμπεράσματα.....	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	52
Ξένη βιβλιογραφία.....	52
Ελληνική βιβλιογραφία.....	54
Διαδίκτυο	54
ΠΑΡΑΤΗΡΜΑ Α	55
ΠΑΡΑΤΗΡΜΑ Β	59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καταγωγή και εξάπλωση της καστανιάς

Η ύπαρξη της καστανιάς (*Castanea sativa*) στην Ευρώπη χρονολογείται πριν από την τριτογενή περίοδο. Απολιθώματα της τριτογενούς περιόδου από τις περιοχές της Αλάσκας και της Σκανδιναβίας περιέχουν ίχνη από φύλλα και καρπούς καστανιάς. Αυτή την περίοδο η καστανιά εντοπίζεται στον Καναδά, την Ιαπωνία, τη Γαλλία, την Ιταλία, την Αυστρία και την Ουγγαρία. Οι ανατολικές μεσογειακές χώρες υπήρξαν τα σπουδαιότερα καλλιεργητικά κέντρα της καστανιάς. Η καστανιά μεταφέρθηκε στον ελλαδικό χώρο από τη Μ. Ασία και στη συνέχεια από την Ελλάδα εξαπλώθηκε στην Ιταλία. Ο Όμηρος αναφέρει την καστανιά ως «ΜΑΡΡΟΝΙΑ», ο Θεόφραστος ως «ΔΙΟΣΒΑΛΛΑΝΟ» και ο Διοσκουρίδης ως «ΣΑΡΔΗΝΙΑΝΗ ΒΑΛΛΑΝΟ» (Θεριός και Δημάση-Θεριού, 2013).

Σήμερα η καλλιέργεια της καστανιάς εντοπίζεται σε 3 μεγάλες ζώνες, την αμερικάνικη, την ευρωπαϊκή και την ζώνη της Άπω Ανατολής. Στην περιοχή της Μεσογείου η καστανιά φύεται στην Ισπανία, την Ιταλία, τη Β. Γαλλία και την Ελλάδα. Επίσης, καλλιεργείται στην Κίνα, την Ιαπωνία, την Κορέα και την Τουρκία (Θεριός και Δημάση-Θεριού, 2013).

Στην Ελλάδα καταλληλότερες περιοχές για την καλλιέργεια της καστανιάς θεωρούνται οι νομοί Αρκαδίας, Κρήτης, Μαγνησίας, Ευρυτανίας και Χαλκιδικής



Εικόνα 1.1: *Castanea sativa*.

Ως είδος η καστανιά εντοπίζεται τόσο στην φύση (π.χ. δάση) ως ένα αυτοφυές είδος, όσο και σε καστανεώνες ή ακόμη και σε μικτές εκτάσεις καλλιέργειας οπωροφόρων δένδρων. Στην πρώτη περίπτωση η καστανιά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ξυλεία της ενώ στις τελευταίες δύο περιπτώσεις η καστανιά χρησιμοποιείται ως παραγωγικό είδος από το οποίο συγκομίζεται ο καρπός της (Coutinho et al., 2014).

1.2 Σημασία της καλλιέργειας της καστανιάς

Η καλλιέργεια της καστανιάς μπορεί να αποτελέσει πόλο οικονομικής ανάπτυξης σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές χαμηλού αγροτικού εισοδήματος. Η καστανιά αξιοποιεί φτωχά και ορεινά εδάφη προσφέροντας εισόδημα σε περιοχές που ουσιαστικά δεν υπάρχει δυνατότητα για εναλλακτικές καλλιέργειες. Είναι ένα δένδρο με ταχεία ανάπτυξη, το οποίο δίνει και ξυλεία κάθε χρόνο. Πολύ συχνά ως είδος έχει βρεθεί ότι βελτιώνει το τοπίο όταν έχει τη μορφή δάσους.

Η καστανοκαλλιέργεια έχει υποβαθμιστεί τα τελευταία χρόνια, και στην Ελλάδα είναι ένα είδος το οποίο μπορεί εύκολα να δώσει ένα επιπλέον εισόδημα σε παραγωγούς. Η μέση κατανάλωση καστανίων κατ' άτομο σε διαφορετικές χώρες δεν υπερβαίνει τα 1,8kg (Θεριός και Δημάση-Θεριού, 2013).

Πίνακας 1.1: Η κατανάλωση καστανίων κατ' άτομο σε διάφορες χώρες (Θεριός και Δημάση-Θεριού, 2013).

Χώρα ή Περιοχή	Κατά κεφαλή κατανάλωση (kg)
Κορέα	1,8
Ιαπωνία	0,5
Ευρώπη	0,45
Κίνα	0,2
Η.Π.Α	0,05

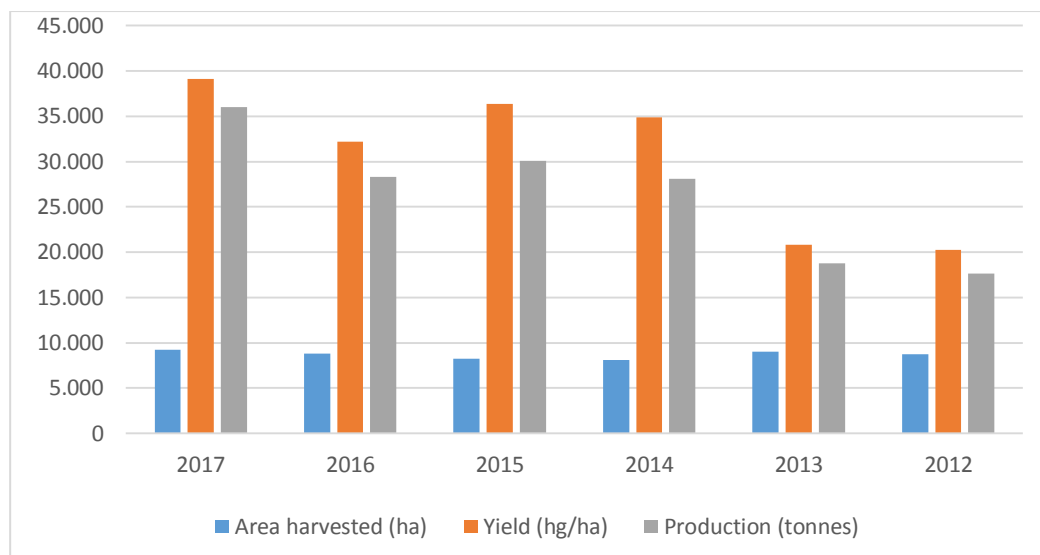
Η καστανιά είναι ένα είδος το οποίο καρποφορεί σε υψόμετρο έως 1.000 μέτρα και μπορεί να αντέξει θερμοκρασίες έως -20°C το χειμώνα. Σε περιοχές με λιγότερο από 700 χιλιοστά βροχόπτωσης χρειάζεται άρδευση. Αν και είναι ανθεκτική στη ξηρασία ως είδος, η υδατική καταπόνηση μειώνει τις αποδόσεις και οδηγεί στην παραγωγή μικρόκαρπων καστανίων.

Πίνακας 1.2: Διαιτητική αξία καστώνων (ανά 100gr αποφλοιωμένων καστώνων).

Θερμίδες	206,5	P	93 mg
Νερό	52	Cl	10 mg
Υδατάνθρακες	40	K	530 mg
Λίπη %	2,25	Mg	40 mg
Πρωτεΐνες %	3,70	Ca	35 mg
Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)	23 mg	Fe	1,1 mg
B₁	0,15 mg	Zn	0,19 mg
B₂	0,20 mg	Cu	0,60 mg
Νικοτινικό οξύ	0,4 mg	Mn	0,70 mg
Παντοθενικό οξύ	0,9 mg		



Εικόνα 1.2: Καρποί καστανιάς.



Γράφημα 1.1: Έκταση της περιοχής συγκομιδής της καστανιάς σε εκτάρια (ha), απόδοση της καλλιέργειας της καστανιάς σε hg/ha και παραγωγή της καστανοκαλλιέργειας σε τόνους σύμφωνα με στοιχεία του FAO (Food and Agriculture Organization) για την Ελλάδα.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 1.1** η Ελλάδα παρουσιάζει κατά το διάστημα 2012-2017 μία αυξητική τάση παραγωγής καστάνων. Το διάστημα 2012-2017 δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη μεταβολή στις καλλιεργήσιμες εκτάσεις καστάνων, αντιθέτως παρατηρήθηκε μία σταδιακή και αρκετά μεγάλη αύξηση στην απόδοση και στην παραγωγή της καλλιέργειας καστάνων. Ο λόγος που τα κάστανα είναι τόσο σημαντικά και που ταυτόχρονα έχει οδηγήσει στη βελτίωση των εφαρμοζόμενων καλλιεργητικών τεχνικών και κατ' επέκταση στην αυξημένη παραγωγή καστάνων, είναι η τιμή του κάστανου.

Η σημασία της καστανιάς σύμφωνα με τους Vazquez et al. (2008), φαίνεται από το γεγονός ότι αντιπροσωπεύει το 5% (σε m³ σε ξύλο) της συνολικής ξυλείας της Γαλικίας (ΒΔ της Ισπανίας). Η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί περίπου 7.000 τόνους ανά χρόνο κάστανα για την παραγωγή marron-glace³, πουρέ κάστανο κ.λπ. Τόσο το κέλυφος των καστάνων όσο και η σάρκα τους είναι πλούσια σε ταννίνες, και πιο συγκεκριμένα σε υδατοδιαλυτές ταννίνες. Τα υδατοδιαλυτά φαινολικά στοιχεία της καστανιάς πιστεύεται ότι μπορούν να παρενθέτονται στις κυτταρικές μεμβράνες εξαιτίας της αμφιπαθικής τους φύσης οδηγώντας στην εξομάλυνση αντιδράσεων από τον ανθρώπινο οργανισμό (Zinkovic et al., 2009). Ακόμη και τα φύλλα της καστανιάς έχει αποδειχθεί ότι περιέχουν φαινολικές ενώσεις, οι οποίες θεωρούνται φυσικά

αντιοξειδωτικά (Calliste et al., 2005). Σύμφωνα με τους Zivkovic et al. (2009), οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή τα οποία εντοπίστηκαν στα δείγματα είχαν την ακόλουθη φθίνουσα σειρά σε συγκέντρωση: φλούδα> ίουλος> φύλλο> σπέρμα> ξεφλουδισμένο σπέρμα. Επιπλέον, η συνολική ποσότητα των φαινολικών ουσιών της καστανιάς συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με πιθανή αντιοξειδωτική δράση όπως δείχνουν οι πρώτες έρευνες. Όλα τα εκχυλίσματα, εκτός αυτών των ίουλων, παρουσιάζουν την ικανότητα προστασίας των λιποσωμάτων από την περοξειδωση (Zivkovic et al., 2009).

Πίνακας 1.3: Η παραγωγή της καλλιέργειας καστώνων (σε τόνους) σύμφωνα με στοιχεία του FAO για κάποιες μεσογειακές χώρες.

Production (tonnes)				
Year/Country	2017	2016	2015	2014
France	8.406	8.642	7.943	8.668
Greece	36.000	28.280	30.049	28.100
Italy	52.356	52.240	51.601	51.100
Portugal	29.875	26.780	27.628	18.464
Spain	15.623	16.178	16.413	16.136
Turkey	62.904	64.750	63.750	63.762

Πηγή : www.faostat.com

Πίνακας 1.4: Η απόδοση της καλλιέργειας καστώνων σε hg/ha σύμφωνα με στοιχεία του FAO για κάποιες μεσογειακές χώρες.

Yield (hg/ha)				
Year/Country	2017	2016	2015	2014
France	10.938	10.797	10.193	11.173
Greece	39.130	32.173	36.401	34.873
Italy	24.208	24.061	23.914	23.767
Portugal	8.127	7.498	7.762	5.223
Spain	4.433	4.472	4.572	5.179
Turkey	15.893	16.603	15.874	16.013

Πηγή : www.faostat.com

Πίνακας 1.5: Η έκταση συγκομιδής καστώνων σε ha σύμφωνα με στοιχεία του FAO για κάποιες μεσογειακές χώρες.

Harvested Area (ha)				
Year/Country	2017	2016	2015	2014
France	7.686	8.004	7.793	7.758
Greece	9.200	8.790	8.255	8.058
Italy	21.627	21.711	21.577	21.500
Portugal	36.759	35.718	35.595	35.352
Spain	35.241	36.174	35.898	31.158
Turkey	39.580	39.000	40.160	39.820

Πηγή : www.faostat.com

1.3 Βοτανική ταξινόμηση της καστανιάς

Το επιστημονικό όνομα του δένδρου καστανιά είναι *Castanea sativa* και ανήκει στην τάξη Fagales, της οικογένειας Fagaceae και του γένους *Castanea* (Θεριός και Δημάση-Θεριού, 2013). Η οικογένεια Fagaceae εκπροσωπείται από περισσότερα από 900 είδη αγγειόσπερμων φυτών. Πρόκειται για την πιο μεγάλη και την πιο οικονομικά σημαντική οικογένεια της τάξης Fagales (Coutinho et al., 2014).

Τα είδη της καστανιάς είναι τα εξής:

- i. Ευρωπαϊκή καστανιά *Castanea sativa* (Mill) ή *Castanea vulgaris*.
- ii. Ιαπωνική καστανιά *Castanea crenata* (Sied. et Zucr)

Το είδος αυτό κατάγεται από την Ιαπωνία, όπου φύεται σε εδάφη πλούσια σε υψόμετρο έως και 1.200-1.300 μέτρα. Πρόκειται για ένα γονότυπο ανθεκτικό στην μελάνωση. Ως δένδρο χαρακτηρίζεται πλαγιόκλαδο, με σφαιρική κόμη, οφθαλμούς ωοειδείς χωρίς τρίχες και με φύλλα λογχοειδή, επιμήκη που φέρουν έλασμα το οποίο αναδιπλώνεται σε σχήμα V. Το είδος αυτό παράγει μικρούς καρπούς. Ο γονότυπος αυτός αντέχει στη μελάνωση, το έλκος (*Endothia*), τον καρκίνο και την ανθράκωση. Είναι πιο ανθεκτικό σε σχέση με την ευρωπαϊκή καστανιά στο βαλανίσκο και την καρπόκαψα.

- iii. Κινέζικη καστανιά *Castanea mollissima*

Το είδος αυτό καλλιεργείται στην Κίνα και αντέχει τα ασβεστούχα εδάφη. Το δένδρο μπορεί να φτάσει τα 12-15 μέτρα ύψος, συνήθως έχει πλαγιόκλαδη βλάστηση

και σπανιότερο ορθόκλαδη. Η κινέζικη καστανιά αντέχει στη μελάνωση, το έλκος (*Endothia*) και είναι ευαίσθητη στον καρκίνο του κορμού, την ανθράκωση, τον βαλανίσκο και την καρπόκαψα (Θεριός και Δημάση-Θεριού, 2013).

Πίνακας 1.6: Βοτανικά είδη καστανιάς.

ΕΙΔΗ		
Ευρωπαϊκά	Ασιατικά	Αμερικάνικα
<i>Castanea sativa</i>	<i>C. crenata</i> (ιαπωνική καστανιά)	<i>C. dentata</i> (Ανατολ. Πολιτείες)
	<i>C. mollissima</i> (κινέζικη καστανιά)	<i>C. pumila</i> (Ανατ. Πολιτείες)
		<i>C. ashei</i> (Νότιες Πολιτείες)
	<i>C. seguini</i> (Κίνα)	<i>C. floridana</i> (Νότιες Πολιτείες)
	<i>C. davidii</i> (Κίνα)	<i>C. alnifolia</i> (Νότιες Πολιτείες)
	<i>C. henryi</i> (Κίνα)	<i>C. raupispina</i> (Νότιες Πολιτείες)

Οι καρποί της καστανιάς διακρίνονται σε 2 κατηγορίες, τα κάστανα και τα μαρρόνια. Μαρρόνια συνηθίζεται να αποκαλούνται οι ποικιλίες των οποίων οι καρποί αποτελούνται από μόνο ένα σπέρμα, ενώ κάστανα ονομάζονται οι καρποί των οποίων το εδάδιμο κομμάτι αποτελείται από περισσότερα σπέρματα. Μία ποικιλία ονομάζεται μαρρόνι όταν το ποσοστό των καρπών της έχει διπλά σπέρματα είναι κάτω από 12%, ενώ κάστανο όταν το ποσοστό των καρπών της έχει διπλά σπέρματα πάνω από 12%. Κάποια ακόμη χαρακτηριστικά που πρέπει να παρουσιάζουν τα μαρρόνια είναι το μεγάλο μέγεθος (<70 καρποί ανά κιλό), το περικάρπιο να έχει ανοιχτό γυαλιστερό χρώμα με σκοτεινές ραβδώσεις, το επισπέρμιο να είναι λεπτό και να αφαιρείται εύκολα ενώ η σάρκα να είναι γλυκιά στο ψήσιμο (Θεριός και Δημάση-Θεριού, 2013).

Κάποιες ελληνικές ποικιλίες:

- Κρητικά μαρρόνια
- Μαρρόνια Τριπόλεως
- Μαρρόνια Καρπενησίου

1.4 Μέθοδοι ταυτοποίησης ποικιλιών

Τα πιο συχνά προβλήματα που εμφανίζονται κατά τις προσπάθειες ταξινόμησης και καθορισμού των φυλογενετικών σχέσεων φυτικών οργανισμών, είναι δυνατόν να επιλυθούν με τη χρήση διάφορων ειδών δεικτών όπως οι μορφολογικοί δείκτες, οι καρυοτυπικοί δείκτες, οι βιοχημικοί δείκτες και οι μοριακοί δείκτες.

1.4.1 Μορφολογικοί δείκτες

Οι μορφολογικοί δείκτες είναι πολυμορφικά, κληρονομήσιμα, μορφολογικά χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν για τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ ειδών και ποικιλιών (Χατζόπουλος, 2001). Ακόμη, είναι δυνατή η αξιοποίησή τους για εφαρμογές διαχείρισης γενετικού υλικού ενώ δεν απαιτούν ειδικό εξοπλισμό, αναλώσιμα ή/και εξειδικευμένο προσωπικό. Αυτές είναι και οι κύριες αιτίες που η καταγραφή μονογονιδιακών ή ολιγογονιδιακών χαρακτηριστικών αποτελεί μία γρήγορη και οικονομική μέθοδο. Η χρήση των μορφολογικών δεικτών για πολυγονιδιακά χαρακτηριστικά όμως δεν είναι εξίσου αποτελεσματική κυρίως εξαιτίας του χαμηλού συντελεστή κληρονομικότητας που τα χαρακτηρίζει (Patterson and Weatherup, 1984). Οι μορφολογικοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για τα περισσότερα φυτικά είδη με αποτέλεσμα να έχουν προκύψει οι περιγραφητές (descriptors) οι οποίοι χρησιμοποιούνται επίσημα για την ταυτοποίηση ποικιλιών (Δεσποτάκη, 2010).

1.4.2 Καρυοτυπικοί δείκτες

Οι καρυοτυπικοί δείκτες διακρίνονται σε τέσσερις τύπους:

- I. Ο χρωμοσωμικός αριθμός.
- II. Τα χρωμοσωμικά μορφολογικά χαρακτηριστικά.
- III. Τα ειδικά πρωτόκολλα χρώσης του κυττάρου.
- IV. Ο *in situ* υβριδισμός.

Οι καρυοτυπικές και οι κυτταρογενετικές παρατηρήσεις όμως απαιτούν ειδικό εξοπλισμό παρότι τα προπαρασκευαστικά πρωτόκολλα είναι απλά και χαμηλού κόστους (Bretting and Widrlechner, 1995). Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών των αναλύσεων θα πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή καθώς απαιτείται ιδιαίτερη εμπειρία και γνώση επί του αντικειμένου (Δεσποτάκη, 2010).

1.4.3 Βιοχημικοί δείκτες

Οι βιοχημικοί δείκτες αποτελούνται από τους δευτερογενείς μεταβολίτες και τις πρωτεΐνες (Χατζόπουλος, 2001). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οργανικές ενώσεις και προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού ανώτερων φυτών. Οι δείκτες αυτοί είναι κληρονομήσιμοι και πολυμορφικοί σε ενδοειδικό και διεϊδικό επίπεδο. Οι πρωτεϊνικοί δείκτες απαρτίζονται από πρωτεΐνες οι οποίες εξυπηρετούν συγκεκριμένες εφαρμογές διαχείρισης γενετικού υλικού. Οι πληροφορίες τους αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα των γονιδίων που κωδικοποιούν πολυπεπτίδια, τα οποία δεν είναι τυχαία διασκορπισμένα στο γονιδίωμα (Bretting and Windrlechner, 1995). Οι κυριότεροι πρωτεϊνικοί δείκτες είναι οι ορολογικές αναλύσεις, οι πρωτεΐνες αποθήκευσης και τα ισοένζυμα (Δεσποτάκη, 2010).

1.4.4 Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA τα οποία δεν έχουν άμεση επίδραση στο φαινότυπο και δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον. Αξιοποιούν το πολυμορφισμό που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA χωρίς να υφίσταται απαραίτητα κάποια επίπτωση στα προϊόντα που τυχόν κωδικοποιούν. Επιπροσθέτως, οι μοριακοί δείκτες δεν εξαρτώνται από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού ενώ είναι δυνατόν να καλύψουν ολόκληρο το γονιδίωμα σε προβλεπόμενες γενετικές αποστάσεις (Χατζόπουλος, 2001).

Οι μοριακοί δείκτες είναι μέρος της διακριτικής ικανότητας του γενετικού υλικού δύο ή περισσότερων ατόμων του ίδιου πληθυσμού (Χατζόπουλος, 2001). Η αυξητική τάση της χρήσης τους έχει οδηγήσει στη μείωση χρήσης φαινοτυπικών δεικτών. Οι φαινοτυπικοί δείκτες είναι ουσιαστικά ένα σύνολο ορατών μορφολογικών χαρακτηριστικών οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την διάκριση ατόμων ενός πληθυσμού (Δεσποτάκη, 2010). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά όμως επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό και από το περιβάλλον στο οποίο εκτίθεται ο φυτικός οργανισμός, στοιχείο το οποίο έχει συμβάλει στην αύξηση της χρήσης των μοριακών δεικτών οι οποίοι δεν επηρεάζονται από περιβαλλοντολογικούς παράγοντες.

Η χρήση μοριακών δεικτών ή πολυμορφικών DNA ακολουθιών ω χρωμοσωμικές αναφορές, είναι η βασική τεχνολογία πίσω από τη σχεδίαση γενετικών χαρτών για ποικίλα είδη. Με εξαίρεση ελάχιστους οργανισμούς μοντέλα, η συντριπτική πλειοψηφία των ειδών δεν διαθέτε πληροφορίες γενετικών χαρτών μέχρι και τα τέλη της δεκαετίας του 80'. Τότε συνέβη μία μεγάλη επανάσταση και

επέκταση πληροφοριών συνδεδεμένων ομάδων στα γονιδιώματα ποικίλων οργανισμών και σε σύντομη σχετικά χρονική περίοδο. Πολλοί κλάδοι της γενετικής επωφελήθηκαν από τη πληθώρα των δεδομένων που προέκυψαν από τη χρήση μοριακών δεικτών.

Οι πρώτοι γενετικοί χάρτες φυτών βασισμένοι σε δείκτες σχεδιάστηκαν μεταξύ του 1986 και 1988 για τον αραβόσιτο, την τομάτα και το ρύζι. Έκτοτε, γενετικοί χάρτες έχουν σχεδιαστεί για ένα μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών. Όσοι μοριακοί δείκτες είναι γενετικά χαρτογραφημένοι είναι χρήσιμοι στην μελέτη της κληρονομικότητας γενετικών χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ ατόμων αλλά και πληθυσμών. Επιπλέον χρησιμοποιούνται στο χρωμοσωμικό βάδισμα για απομόνωση γονιδίων. Η προσθήκη νέων δεικτών μπορεί να αλλάξει κάποιο προϋπάρχοντα γενετικό χάρτη χωρίς όμως να αντικρούει αλλά αντιθέτως να ενισχύει την άποψη ότι οι γενετικοί χάρτες εξελίσσονται, συμπληρώνονται και γίνονται πιο αξιόπιστοι με την πάροδο του χρόνου. Τέλος, μία ακόμη χρήση των μοριακών δεικτών είναι η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία δένδρων συγγένειας ή εξέλιξης διάφορων ποικιλιών ή οικοτύπων (Χατζόπουλος, 2001).

Η φύση των μοριακών δεικτών εξαρτάται από την χρήση για την οποία προορίζονται, αν θα χρησιμοποιηθούν για παράδειγμα σε προγράμματα βελτίωσης ή ταυτοποίησης και πιστοποίησης γενετικού υλικού. Η χρησιμότητα ενός μοριακού δείκτη εξαρτάται άμεσα από τα χαρακτηριστικά του. Τα χαρακτηριστικά είναι τα εξής:

- i. Η παρουσία πολυμορφισμού ή αλλιώς, ύπαρξη πολλών αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο.
- ii. Η απλή κληρονομικότητα η οποία ιδανικά ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχους αλληλόμορφους.
- iii. Ο υψηλός συντελεστής κληρονομικότητας που οδηγεί στην παρουσία του ίδιου φαινοτύπου σε ποικίλα περιβάλλοντα μέσω της αξιοποίησης του πολυμορφισμού της αλληλουχίας των βάσεων του DNA και όχι της παραλλακτικότητας της έκφρασης των γονιδίων.
- iv. Η διασπορά και η ιδανικά ισοκατανομή του σε ολόκληρο το γονιδίωμα.
- v. Η ανεξαρτησία της βιωσιμότητας και του φαινοτύπου του φυτού.

vi. Η μεθοδολογία της αναγνώρισης δεν πρέπει να κοστίζει πολύ, ούτε να έχει αρνητικές συνέπειες στο φυτό. Επιπλέον πρέπει να είναι εύκολη και δυνατή ακόμη και κατά τα νεαρά στάδια εξέλιξης του φυτού (Φανουράκης, 2002).

Υπάρχουν πολλά είδη μοριακών δεικτών και το είδος που θα χρησιμοποιηθεί από τον κάθε ερευνητή εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες. Η επιλογή της μεθοδολογίας βασίζεται:

- i. Στον αντικειμενικό σκοπό του κάθε πειράματος.
 - ii. Στον τρόπο που θα αξιοποιηθούν οι γενετικές πληροφορίες.
 - iii. Στις ιδιαιτερότητες του υπό μελέτη είδους ή ποικιλίας,
 - iv. Στη δομή του πληθυσμού:
 - a. Άγνωστη.
 - b. Μετά από διασταύρωση μέσα στο είδος.
 - c. Μετά από διασταύρωση ποικιλιών του είδους κ.λπ.
 - v. Στα τεχνικά χαρακτηριστικά της κάθε μεθοδολογίας:
 - a. Η διαθεσιμότητα του εξοπλισμού.
 - b. Την απαίτηση σε εξειδικευμένο προσωπικό.
 - c. Τον απαιτούμενο χρόνο και το απαιτούμενο κόστος για την ανάλυση κ.λπ.
- (Χατζόπουλος, 2001).

Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Gustavo and Gresshoff, 1997). Στην περίπτωση απαιτούνταν χρήση περιοριστικών ενζύμων για την κοπή τμημάτων DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Τα θραύσματα τα οποία προέκυπταν δεν είχαν το ίδιο μήκος και για τον διαχωρισμό τους χρησιμοποιούταν πηκτική αгарόζης, αποτύπωση κατά Southern, υβριδισμός με κατάλληλο ανιχνευτή DNA και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω ραδιογραφίας με ραδιενεργό ισότοπο (Bebeli and Kaltsikes, 1993). Η χρησιμότητα των RFLPs εντοπίζεται στην επαναληψιμότητα και στην συγκυριαρχία της κληρονομικότητάς τους (Tanksley et al., 1989). Η εκτέλεση των διαδικασιών που χρειάζονται για την χρήση τους όμως παραμένει χρονοβόρα και η ποσότητα του DNA η οποία απαιτείται είναι μεγάλη. Επιπροσθέτως, το κόστος των αναλύσεων είναι υψηλό και υπάρχουν και επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου εξαιτίας των ραδιενεργών στοιχείων που αξιοποιούνται σε αυτή τη μέθοδο (Σκαράκης, 2005).

Σημαντικές αλλαγές στον τομέα αυτό έγιναν μετά την ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR- Polymerase Chain Reaction). Αναπτύχθηκαν νέες μέθοδοι μοριακών δεικτών οι οποίες βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA (Gustavo and Gresshoff, 1997). Από τους πιο γνωστούς δείκτες που βασίζονται στην χρήση της PCR είναι οι RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs), ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), IFLPs (Intron Fragment Length Polymorphisms), SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), SSRs (Simple Sequence Repeats), SCARs (Sequence Characterize Amplified Regions), SPARs (Simple Primer Amplification Reaction) κ.ά. (Lande, 1991).

Οι μοριακοί δείκτες πλεονεκτούν έναντι των κλασικών μεθόδων (π.χ. χρήση μορφολογικών δεικτών) σε αρκετά σημεία. Αρχικά, απουσιάζει η επίδραση του περιβάλλοντος και η κυριαρχία. Οι γονότυποι μπορούν να προσδιοριστούν όχι μόνο σε επίπεδο φυτού αλλά και σε επίπεδο ιστού ή κυττάρου. Επιπλέον, παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία οπότε και δε χρειάζεται να δημιουργηθεί τεχνητά όπως με τους μορφολογικούς δείκτες. Ακόμη, οι μοριακοί δείκτες δεν επιφέρουν ανεπιθύμητες αλλαγές στο φαινότυπο του φυτού όπως συμβαίνει με τους μορφολογικούς δείκτες. Τέλος, ανιχνεύονται χωρίς επιστατικές αλληλεπιδράσεις κάτι που μας επιτρέπει στον ίδιο πληθυσμό να επιλέξουμε πολλούς μοριακούς δείκτες ταυτόχρονα (Φανουράκης, 2002).

Κάποιες κύριες κατηγορίες μοριακών δεικτών είναι :

- i. Δείκτες βασισμένοι σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-based markers).
- ii. Δείκτες βασισμένοι σε υβριδισμό (hybridization-based markers).
- iii. Δείκτες βασισμένοι σε αλληλούχιση (sequence-based markers).

1.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Το επίτευγμα της PCR οφείλεται στον Δρ. Kary Mullis ο οποίος εμπνεύστηκε την τεχνική της τον Δεκέμβριο του 1983 και βραβεύτηκε για αυτήν με το Νόμπελ Χημείας το 1993. Πρόκειται για μία τεχνική με άπειρες εφαρμογές στις βιολογικές επιστήμες, η οποία μπορεί να χαρακτηριστεί ως μία απλή και οικονομική μέθοδος (Χατζηαντωνίου, 2004).

Η τεχνική της PCR στηρίζεται στη δυνατότητα πολλαπλασιασμού οποιασδήποτε περιοχής του DNA γνωστής αλληλουχίας, παρουσία DNA πολυμεράσης. Η DNA πολυμεράση είναι μία κατηγορία ενζύμων τα οποία έχουν την ικανότητα να καταλύουν την σύνθεση του DNA. Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός επιτυγχάνεται υπό την απαραίτητη παρουσία μίας DNA πολυμεράσης αλλά και ζευγών εκκινητών (primers). Οι εκκινητές είναι ζεύγη νουκλεοτιδίων τα οποία συντίθενται από τον ερευνητή για την υποβοήθηση της αντιγραφής του DNA και τα οποία αναφέρονται στη βιβλιογραφία και ως εκκινητικά μόρια (Πελεκάνος, Russell, 2013).

Η επιτυχής λειτουργία της PCR βασίζεται στην απαραίτητη παρουσία τεσσάρων βασικών συστατικών. Αν κάποιο από αυτά τα στοιχεία απουσιάζει η σύνθεση του DNA δεν πραγματοποιείται. Τα συστατικά αυτά είναι:

- i. Οι τέσσερις τριφωσφορικοί δεσοξυριβονουκλεοζίτες ή αλλιώς dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP). Αν απουσιάζει κάποιο από τα τέσσερα dNTPs δεν μπορεί να ολοκληρωθεί η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του τμήματος του DNA που ενισχύεται κατά την PCR.
- ii. Το τμήμα του DNA το οποίο λειτουργεί ως μήτρα αντιγραφής και πολλαπλασιασμού.
- iii. Το ένζυμο της πολυμεράσης.
- iv. Τα ιόντα μαγνησίου τα οποία βελτιστοποιούν την ενεργότητα του ενζύμου (Πελεκάνος, Russell, 2013).

Το ένζυμο το οποίο χρησιμοποιείται στην PCR ονομάζεται *TaqI* και έχει απομονωθεί από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Επιπλέον το ένζυμο έχει την ικανότητα να διατηρεί την δραστηριότητά του σε θερμοκρασία 95°C για τουλάχιστον 40 λεπτά (Brown, 1994). Το χαρακτηριστικό αυτό έχει διευκολύνει κατά πολύ την χρήση της PCR καθώς δεν απαιτείται εκ νέου προσθήκη πολυμεράσης μετά από κάθε κύκλο αντίδρασης. Για να δράσει η *TaqI* απαραίτητη είναι η χρήση ενός κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Η *TaqI* δεν είναι το μοναδικό ένζυμο με αυτή την δράση το οποίο έχει απομονωθεί και το οποίο έχει αντοχή δράσης σε τέτοιες ακραίες θερμοκρασίες (Griffin and Griffin, 1994).

Πίνακας 1.7: Comparisons of the properties and application of various thermostable DNA polymerases.

Enzyme (DNA pol)	Source	Molecular weight (kDa)	Optimum range of reaction conditions				Exonuclease activity			General applications	Ref.
			MgCl ₂ (mM)	KCl (mM)	pH	Temperature (°C)	5'→3'	3'→5'	5'→3'		
Taq TM	<i>Thermus aquaticus</i>	94	2-4	50-55	7.8-9.4	70-80	Yes	No	PCR, cloning, direct sequencing, mutagenesis DNA sequencing, PCR of template with secondary structures, amplification of large quantity of PCR product, higher thermostability allows greater number of amplification cycles	2-4	
Stoffel TM	<i>Thermus aquaticus</i>	61.3	2-10	10	8.3	70-80	No	No		29	
Tth TM *	<i>Thermus thermophilus</i>	110-120	1.5-2.5	100	8-9.3	50-60	Yes	No	PCR from mRNA template with high sensitivity (DMSO is required for reverse transcription), cloning genes from cellular and viral RNA, PCR detection from blood samples	5,6	
Tli TM **	<i>Thermococcus litoralis</i>	92-97	2-8	0-50	8-9	72-80	No	Yes	PCR DNA synthesis with high fidelity, ligation of blunt-end DNA fragments, DNA sequencing, gene cloning, and site-directed mutagenesis	7-9	
pfu TM **	<i>Pyrococcus furiosus</i>	92	1.5-8	10	8-9	70-80	Yes	Yes	PCR DNA synthesis with high fidelity, cloning, sequencing, and site-directed mutagenesis	10-14	
Bst TM **	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	95	10-30	100-200	8-9	60-65	No	No	PCR and general sequencing with high sensitivity	15,16	
Sac TM **	<i>Safrifolobus acidocaldarius</i>	100	2-8	ND	7-8	70-80	No	Yes	DNA sequencing, site-directed mutagenesis, gene fusions by PCR	17-19	
Tac TM **	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	88	2-4	ND*	8-9	65	No	Yes	PCR for A-T rich templates in shorter cycling time	20	
T7/T7 TM **	<i>Thermus flavus</i>	66	10-15	5-10	7-8	70-50*	No	No	PCR amplification of large-template DNA (>10 kb)	21-23	
Tru TM **	<i>Thermus ruber</i>	70	2-3	15	7-12	50	No	No	Potential for PCR amplification of contaminated samples, DNA sequencing	24	
Tip TM **	<i>Thermotoga</i> sp.	85	10	10	7.5-8	80	No	No	Potential for PCR amplification	25	
Moh TM **	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	72	10-20	100-300	7-9	65	Yes	Yes	Potential for DNA sequencing, gene cloning, site-directed mutagenesis, PCR amplification of A-T rich DNA	26	

* TaqTM, TthTM, and StoffelTM DNA pols are registered trademarks of Perkin Elmer Corporation, 761 Main Ave., Norwalk, CT 06859.
 ** TliTM DNA pol is a registered trademark of New England Biolabs, Inc., 32 Tuxton Rd., Beverly, MA 01915-5599.
 * pfuTM DNA pol is a registered trademark of Stratagene Cloning Systems, Inc., 11099 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037.
 * BstTM DNA pol is a registered trademark of BioRad Laboratories, 3300 Regatta Blvd., Richmond, CA 94804.
 * T7/T7TM DNA pol is a registered trademark of Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399.
 † ND = not determined.
 * DNA template.
 * RNA template.

Η διαδικασία μίας ανάλυσης με τη χρήση της μεθόδου PCR ξεκινάει με την δημιουργία ενός μίγματος (Master Mix) το οποίο περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά πλην του γενετικού υλικού. Στη συνέχεια, το Master Mix μοιράζεται σε μικρούς σωλήνες (tubes) κατάλληλους για το θερμοκυκλοποιητή (το μηχάνημα της PCR). Στο κάθε tube αναγράφονται τα στοιχεία του δείγματος του οποίου το γενετικό υλικό προστίθεται και αναμειγνύεται με το Master Mix το οποίο έχει ήδη προστεθεί. Τα tubes μετά από καλή ανάδευση και μία σύντομη φυγοκέντρηση τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή ο οποίος λειτουργεί βάσει προκαθορισμένου προγράμματος. Το κάθε βήμα του προγράμματος έχει ένα μέσο όρο διάρκειας 1-3 λεπτά (Πελεκάνος, Russell, 2013).

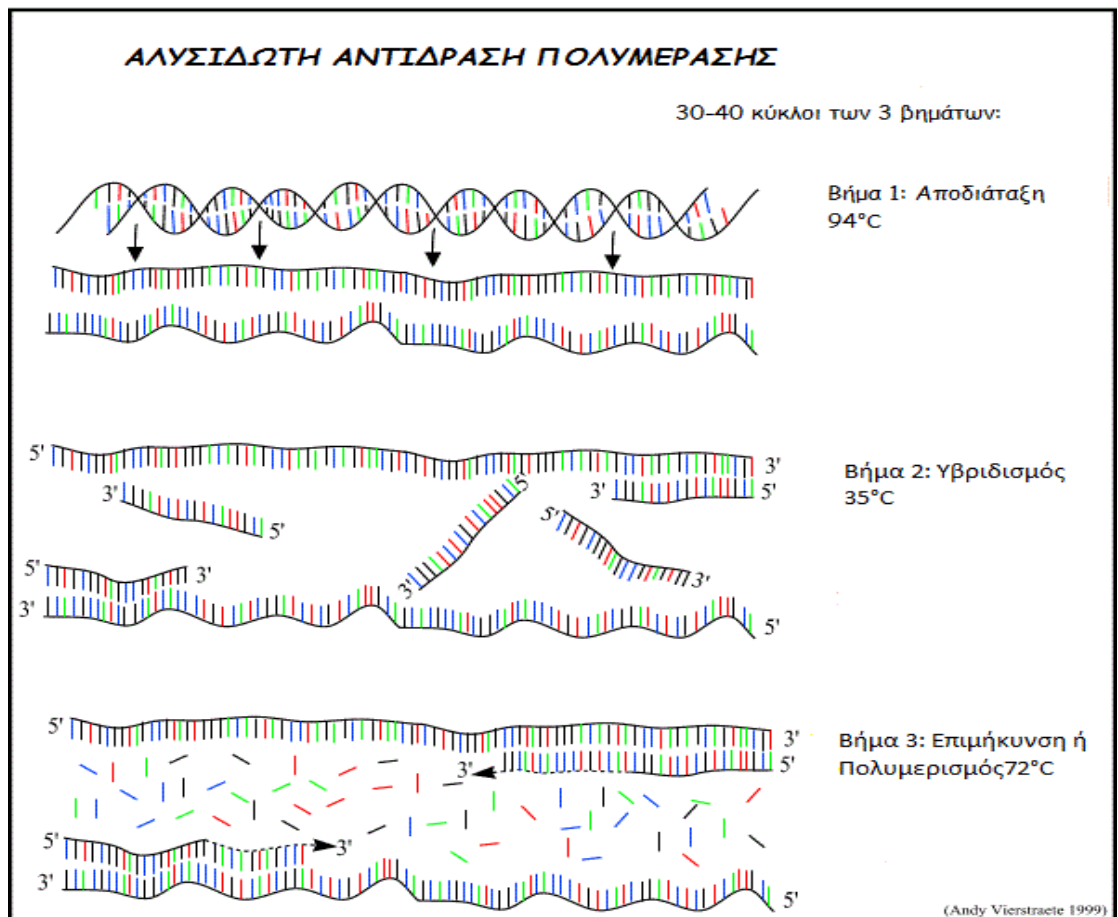
1.5.1 Τα στάδια της PCR

Πρώτο στάδιο- Αποδιάταξη του DNA: Σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία ανέρχεται στους 94-95°C. Η αύξηση αυτή της θερμοκρασίας προκαλεί την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA το οποίο φέρει την αλληλουχία-στόχο (Φανουράκης, 2002). Η υψηλή θερμοκρασία προκαλεί το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου οδηγώντας στην δημιουργία δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Σε αυτό το σημείο όλες οι ενζυματικές αντιδράσεις σταματούν (Δεσποτάκη, 2010).

Δεύτερο στάδιο- Υβριδισμός: Η θερμοκρασία κατεβαίνει στους 37-65°C ανάλογα με την μέθοδο που εφαρμόζεται και την αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιούνται (Φανουράκης, 2002). Στο στάδιο αυτό, οι εκκινητές προσδένονται στο αποδιατεταγμένο DNA με προσανατολισμό των 3' άκρων τους στο εσωτερικό της αλληλουχίας-στόχου. Αυτή η πρόσδεση είναι εφικτή εξαιτίας της παροδικής δημιουργίας ιοντικών δεσμών (Πελεκάνος, Russell, 2013). Οι δεσμοί αυτοί ισχυροποιούνται με την συμπλήρωση μερικών βάσεων της αλληλουχίας μέσω της δράσης της πολυμεράσης και πλέον δεν υπάρχει κίνδυνος να ξανασπάσουν (Griffin and Griffin, 1994). Ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3' άκρο της μίας αλυσίδας ενώ ο άλλος στο αντίστοιχο σημείο της συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο εκκινητής χρησιμοποιείται σε περίσσεια για να αποτρέπει την υβριδοποίηση του αρχικού DNA με τον εαυτό του (Δεσποτάκη, 2010).

Τρίτο στάδιο- Πολυμερισμός: Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 70-75°C (Φανουράκης, 2002). Όσοι εκκινητές έχουν αποκτήσει ισχυρούς δεσμούς με την μονόκλωνη αλυσίδα του DNA, συνεχίζουν να επιμηκύνονται υπό την δράση της πολυμεράσης. Όσοι εκκινητές δεν έχουν προσδεθεί καλά στην μονόκλωνη αλυσίδα του DNA αποκολλούνται εξαιτίας της υψηλής σχετικά θερμοκρασίας (Πελεκάνος, Russell, 2013).

Τα τρία στάδια επαναλαμβάνονται αρκετές φορές οδηγώντας στον εκθετικό πολλαπλασιασμό των τμημάτων-στόχων του DNA.



Εικόνα 1.3: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, Andy Vierstraete, 1999.

1.5.2 Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της PCR

1.5.2.1 Πλεονεκτήματα

- i. Με την PCR πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων τμημάτων του DNA.
- ii. Η τεχνική της PCR είναι πιο ευαίσθητη και ταχεία ως διαδικασία σε σχέση με άλλες μεθόδους όπως η κλωνοποίηση.
- iii. Η μέθοδος εκτός από ταχεία είναι και απλή.
- iv. Για να εκτελεστεί η PCR απαιτείται μικρή ποσότητα DNA (Πελεκάνος, Russell, 2013).

1.5.2.2 Μειονεκτήματα

- i. Για την τεχνική είναι απαραίτητη η χρήση εκκινητών.
- ii. Το μήκος του τμήματος του DNA το οποίο μπορεί να αντιγραφεί είναι περιορισμένο εξαιτίας αδυναμίας του ενζύμου να συνθέσει μεγαλύτερες αλυσίδες των 20kbp σε *in vitro* συνθήκες (Πελεκάνος, Russell, 2013).

1.6 Μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα

1.6.1 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Μία από τις κατηγορίες των μοριακών δεικτών είναι οι ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) ή ενδο-επαναλαμβανόμενες απλές αλληλουχίες. Οι ISSR δείκτες ανήκουν στην κατηγορία PCR-based markers, αυτοί βασίζονται στην ενίσχυση ενός τμήματος DNA το οποίο εντοπίζεται ανάμεσα σε δύο ταυτόσημες απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί επαναλαμβανόμενη αλληλουχία DNA (SSR) σαν ένα μονό εκκινητή σε αντιδράσεις PCR, επιτρέποντας έτσι την ταυτόχρονη ενίσχυση διαφορετικών περιοχών του γονιδιώματος (Zietkiewicz et al., 1994). Πρόκειται για μία απλή και γρήγορη τεχνική η οποία συνδυάζει ολοκληρωμένη κάλυψη του γονιδιώματος και επαναληψιμότητα με την ικανότητα ανάλυσης ενός μεγαλύτερου αριθμού τόπων ανά δοκιμή. Επιπρόσθετα, οι ISSRs δείκτες χρησιμοποιούν διεθνείς εκκινητές, δηλαδή, τυχαίους εκκινητές των οποίων οι αλληλουχίες είναι ανεξάρτητες από τα υπό μελέτη είδη, καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο την τεχνική κατάλληλη για μελέτες που περιέχουν την ανάλυση ποικίλων ειδών. Η συντριπτική πλειοψηφία των ISSRs διαχωρίζονται ως κυρίαρχοι δείκτες, γεγονός το οποίο συνεπάγεται με έναν περιορισμό στη χρήση τους καθώς δε προσφέρονται τόσες πληροφορίες όσες αν χρησιμοποιούνταν SSR δείκτες. Στη γενετική βελτίωση των φυτών οι ISSRs χρησιμοποιούνται ευρέως στη γενετική ποικιλότητα (genetic diversity), στη χαρτογράφηση (mapping) και στις μελέτες υποβοηθούμενης επιλογής (assisted selection studies) (Goulao et al., 2001).

Ένας από τους λόγους επιλογής των ISSR εκκινητών για τη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας της καστανιάς, έγκειται στη χρήση αυτών σε φυλογενετικές μελέτες οι οποίες έχουν διεξαχθεί για διάφορα είδη της οικογένειας Fagaceae (Coutinho et al., 2014).

1.6.2 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα της μεθόδου ISSR

Όλες οι μεθοδολογίες που βασίζονται σε PCR απαιτούν μικρή ποσότητα DNA. Από όλες τις μεθοδολογίες αυτής της κατηγορίας οι RAPDs θεωρείται η πιο απλή, διότι δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, το κόστος είναι χαμηλό, έχει μία καλή αποδοτική πολλαπλή αναλογία, ενώ δεν απαιτεί πολύ χρόνο και εργασία (Casasoli et al., 2001), έχει όμως μικρή επαναληψιμότητα. Το πρόβλημα αυτό υπερσκελίζεται με τη χρήση μεγαλύτερου αριθμού εκκινητών. Οι άλλες μεθοδολογίες (RFLP, AFLP κ.ά.) είναι χρονοβόρες, έχουν υψηλό κόστος, απαιτούν εξειδικευμένο

προσωπικό και πολύ εργασία αλλά έχουν υψηλή επαναληψιμότητα. Κάθε μεθοδολογία έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητα η αξιολόγηση της πιθανής χρησιμότητας της κάθε μίας. Τέλος, οι ISSR εκκινητές παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό πολυμορφισμού και παρέχουν κάλυψη σε ολόκληρο το γονιδίωμα με πολύ μεγάλη διακριτική ικανότητα (Coutinho et al., 2014).

1.7 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία από τις μεθόδους με τις οποίες είναι δυνατόν να διαχωρισθούν πρωτεΐνες αλλά και νουκλεϊκά οξέα. Μόρια πρωτεϊνών ή/και νουκλεϊκών οξέων τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό φορτίο τους, το μέγεθός τους και το σχήμα τους κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και έτσι είναι δυνατόν να διαχωρισθούν σε κατάλληλες συνθήκες χωρίς να υφίστανται απώλειες των βιολογικών τους ιδιοτήτων (Σκούρας, 1993). Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα τμήματα του DNA μέσα σε ένα πήκτωμα είναι συνάρτηση του μήκους τους, του φορτίου και του σχήματός τους. Τα θραύσματα του DNA που έχουν μικρό μοριακό βάρος κινούνται πιο γρήγορα μέσα στην πηκτή, διανύοντας μεγαλύτερες αποστάσεις σε σχέση με μόρια μεγαλύτερου μοριακού βάρους (Gustavo and Gresshoff, 1997). Τα υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ή/και των νουκλεϊκών οξέων διαφέρουν ανάλογα με τα απόλυτα μεγέθη των προς ανάλυση τμημάτων καθώς και τις σχετικές διαφορές μεγέθους μεταξύ τους. Τα τμήματα DNA με μέγεθος από 100bp έως αρκετές χιλιάδες bp είναι δυνατόν να διαχωρισθούν αποτελεσματικά σε ένα πήκτωμα με συγκέντρωση αгарόζης 1% (w/v), εφόσον το μέγεθος των τμημάτων αυτών διαφέρει κατά λίγες εκατοντάδες bp. Όταν πρόκειται να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός μικρών τμημάτων(δεκάδων έως εκατοντάδων bp) τα οποία διαφέρουν ακόμα και κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο (π.χ. κατά την αλληλούχιση του DNA), είναι απαραίτητη η χρήση πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης (Watson et al., 2007).

Η πηκτή αгарόζης είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο πολυμερών σακχάρων, του οποίου το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος και τη συγκέντρωση της αгарόζης (Χατζόπουλος, 2001). Η πηκτή έχει χαρακτηριστεί ως ένα μοριακό κόσκινο καθώς με ηλεκτροφόρηση διαχωρίζονται θραύσματα DNA ανάλογα με το μέγεθος τους (Gustavo and Gresshoff, 1997). Η ηλεκτροφόρηση καθιστά δυνατό το διαχωρισμό των τμημάτων DNA γιατί ασκεί στα

μόρια του DNA μία δύναμη που τα ωθεί σε κίνηση, η ταχύτητα της οποίας εξαρτάται από το μέγεθος του ίδιου του μορίου και από το μέγεθος των πόρων της πηκτής (Brown, 1994).

Για την παρασκευή πηκτής υπολογίζονται:

- i. Το μέγεθος των τμημάτων των πυρηνικών οξέων που πρόκειται να διαχωρισθούν. Τα γραμμικά μόρια των πυρηνικών οξέων κινούνται μέσα στην πηκτή σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Θεωρείται ότι η θέση που καταλαμβάνουν εντός της πηκτής είναι παράλληλη προς την κίνηση του ρεύματος (end-on position) (Σκούρας, 1993).
- ii. Τη συγκέντρωση της αгарόζης. Η κίνηση ενός μορίου πυρηνικού οξέος (δεδομένου του μεγέθους μέσα σε μία πηκτή αгарόζης) εξαρτάται από την ποσότητα της αгарόζης που περιέχει η πηκτή (Σκούρας, 1993).
- iii. Τη διαμόρφωση του DNA. Τα μόρια του DNA που πρόκειται να αναλυθούν σε πηκτή αгарόζης παρουσιάζονται με τρεις μορφές. Τα κυκλικά, τα κυκλικά που παρουσιάζουν εγκοπές και τα γραμμικά μόρια. Μόρια DNA με το ίδιο μοριακό βάρος αλλά διαφορετικού σχηματισμού που κινούνται σε γνωστής συγκέντρωσης πηκτή αгарόζης, παρουσιάζουν διαφορετικές κινητικότητες (θέσεις εντός της πηκτής). Η κινητικότητα των διαφορετικών σχηματισμών DNA επηρεάζεται από α) την ένταση του ρεύματος, β) την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και γ) το βαθμό υπερελίκωσης (Σκούρας, 1993).
- iv. Το ηλεκτρικό πεδίο. Όσο χαμηλότερη η τάση η οποία εφαρμόζεται σε μια ηλεκτροφόρηση αгарόζης τόσο καλύτερος ο διαχωρισμός των διάφορων τμημάτων (διαφορετικών μεγεθών) των πυρηνικών οξέων. Η καλύτερη ανάλυση των πυρηνικών οξέων σε ηλεκτροφορήσεις αгарόζης επιτυγχάνεται με εφαρμογή 5v/cm (Σκούρας, 1993).
- v. Τη σύσταση των βάσεων και τη θερμοκρασία. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA δεν επηρεάζεται σημαντικά από την ακολουθία των βάσεων του και από τη θερμοκρασία. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των τμημάτων DNA διάφορων μεγεθών δεν επηρεάζεται μέσα σε ένα εύρος θερμοκρασίας ηλεκτροφόρησης 4-30°C (Σκούρας, 1993).

1.8 Σκοπός του πειράματος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή είχε ως στόχο την μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ γονοτύπων καστανιάς που ευδοκιμούν στα χωριά Καστάνιτσα, Πλάτανος, Άγιος Πέτρος, Καστρί και Δολιανά στην περιοχή της Αρκαδίας με τη χρήση των μοριακών δεικτών ISSR.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό και δειγματοληψία

Για την περάτωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δένδρα κασταριάς των περιοχών Καστάνιτσα, Πλάτανος, Άγιος Πέτρος, Καστρί και Δολιανά.

Στην κάθε περιοχή επιλέχθηκαν 2 έως 4 κτήματα, από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν 3 δένδρα αποτελώντας και τις 3 επαναλήψεις του πειράματος. Η δειγματοληψία των καρπών αφορούσε πλήρως ώριμους καρπούς που συγκομίστηκαν ξεχωριστά ανά δένδρο, κτήμα και περιοχή.

Όσον αφορά την δειγματοληψία για την πραγματοποίηση των μοριακών αναλύσεων, συγκομίστηκαν από τους νεαρούς βλαστούς φύλλα τα οποία τοποθετήθηκαν σε silica gel και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο δενδροκομίας.

Πίνακας 2.1: Δείγματα καστανιάς.

Αριθμός	Ονομασία	Αριθμός	Ονομασία	Αριθμός	Ονομασία
1	Καστάνιτσα κ1α	19	Πλάτανος κ4α	38	Καστρί κ2β
2	Καστάνιτσα κ1β	20	Πλάτανος κ4β	37	Καστρί κ2α
3	Καστάνιτσα κ1γ	21	Πλάτανος κ4γ	39	Καστρί κ2γ
4	Καστάνιτσα κ2α	22	Άγιος Πέτρος κ1α	40	Καστρί κ3α
5	Καστάνιτσα κ2β	23	Άγιος Πέτρος κ1β	41	Καστρί κ3β
6	Καστάνιτσα κ2γ	24	Άγιος Πέτρος κ1γ	42	Καστρί κ3γ
7	Καστάνιτσα κ3α	25	Άγιος Πέτρος κ2α	43	Δολιανά κ1α
8	Καστάνιτσα κ3β	26	Άγιος Πέτρος κ2β	44	Δολιανά κ1β
9	Καστάνιτσα κ3γ	27	Άγιος Πέτρος κ2γ	45	Δολιανά κ1γ
10	Πλάτανος κ1α	28	Άγιος Πέτρος κ3α	46	Δολιανά κ2α
11	Πλάτανος κ1β	29	Άγιος Πέτρος κ3β	47	Δολιανά κ2β
12	Πλάτανος κ1γ	30	Άγιος Πέτρος κ3γ	48	Δολιανά κ2γ
13	Πλάτανος κ2α	31	Άγιος Πέτρος κ4α	49	Δολιανά κ3α
14	Πλάτανος κ2β	32	Άγιος Πέτρος κ4β	50	Δολιανά κ3β
15	Πλάτανος κ2γ	33	Άγιος Πέτρος κ4γ	51	Δολιανά κ3γ
16	Πλάτανος κ3α	34	Καστρί κ1α	52	Δολιανά κ4α
17	Πλάτανος κ3β	35	Καστρί κ1β	53	Δολιανά κ4β
18	Πλάτανος κ3γ	36	Καστρί κ1γ	54	Δολιανά κ5γ

2.2 Εκκινητές

Στα πλαίσια της μοριακής ανάλυσης επιλέχθηκαν 5 εκκινητές ISSR. Τα ονόματα αυτών των εκκινητών και οι αλληλουχίες τους παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.2**.

Πίνακας 2.2: ISSR εκκινητές και οι αλληλουχίες τους.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5'->3'
UBC807	(AG) ₈ T
UBC810	(GA) ₈ T
UBC814	(CT) ₈ A
UBC818	(CA) ₈ G
UBC844	(CT) ₈ C

2.3 Συσκευές

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

2.4 Διαδικασία απομόνωσης DNA

Οι φυτικοί ιστοί περιέχουν, εκτός από DNA, διάφορες προσμίξεις (RNA, χρωστικές, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες κ.ά.) οι οποίες πρέπει να απομακρυνθούν, ώστε να απομονωθεί καθαρό DNA. Από αυτές οι πολυσακχαρίτες και οι ταννίνες αποτελούν ένα κύριο πρόβλημα κατά την εκχύλιση των φυτικών ιστών, καθώς είναι δύσκολο να διαχωρισθούν από το DNA. Η απομάκρυνση των ενώσεων αυτών κρίνεται απαραίτητη ώστε να απομονωθεί καθαρό DNA, το οποίο θα είναι κατάλληλο για αντιδράσεις PCR (Σκούρας, 1993; Δεσποτάκη, 2010). Στο πείραμα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης η απομόνωση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NucleoSpin Plant II kit. Πιο συγκεκριμένα η διαδικασία που ακολουθήθηκε αφορούσε τα εξής στάδια :

- Άνοιγμα υδατόλουτρου μετά την κατάλληλη πλήρωσή του με απεσταγμένο νερό και ρύθμισή του της 65°C.
- Τα γουδιά και τα γουδοχέρια τοποθετούνται στην κατάψυξη της -20°C.
- Το διάλυμα PW1 ελέγχεται για πιθανά κατακρημνίσματα απορρυπαντικών στοιχείων. Αν εντοπιστούν κατακρημνίσματα γίνεται σύντομη επώαση του διαλύματος της 30-40°C έως την επαναδιαλυτοποίησή της.
- Όταν το υδατόλουτρο φτάσει της 65°C γίνεται προθέρμανση του διαλύματος PE.
- Γίνεται ζύγιση δειγμάτων και ακολουθεί η λειοτρίβησή της στα γουδιά με τη χρήση υγρού αζώτου. Το βάρος των δειγμάτων κυμαίνεται από 20mg έως 100mg ανάλογα με την υδατική κατάσταση των ιστών¹.
- Το κάθε φυτικό δείγμα μετά τη λειοτρίβηση ζυγίζεται ξανά και μεταφέρεται σε eppendorf το οποίο αναγράφει κωδικοποιημένα τα στοιχεία του.
- Προστίθενται 400μl διαλύματος PL1 και γίνεται διεξοδική ανάδευση με τη χρήση vortex.
- Το μίγμα επωάζεται για 10min της 65°C.
- Σε σωλήνα (tube) χωρίς καπάκι τοποθετείται ένα φίλτρο με βιολετί δακτύλιο και φορτώνεται το υγρό από το eppendorf με προσοχή ώστε να μην μεταφερθεί ίζημα στο φίλτρο.
- Γίνεται φυγοκέντρηση για 2min της 11.000g.

¹ Οι ιστοί που παρέμειναν περισσότερο χρόνο σε silica gel κατά την μεταφορά τους από τον τόπο συλλογής στο εργαστήριο, είχαν ξηραθεί περισσότερο οπότε απαιτείτο μικρότερη ποσότητα φυτικού υλικού.

- Το φίλτρο απορρίπτεται.
- Προστίθενται 450μl διαλύματος PC και γίνεται ανάδευση με τη χρήση μικροπιπέττας.
- Σε νέο tube χωρίς καπάκι τοποθετείται ένα φίλτρο με πράσινο δακτύλιο και φορτώνονται έως 700μl από το υγρό μίγμα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1min της 11.000g.
- Το υγρό απορρίπτεται.
- Στον δακτύλιο προστίθενται 400μl διαλύματος PW1.
- Γίνεται φυγοκέντρηση για 1min της 11.000g.
- Το υγρό απορρίπτεται.
- Προστίθενται στον δακτύλιο 700μl διαλύματος PW2.
- Γίνεται φυγοκέντρηση για 1min της 11.000g.
- Το εκκρέον υγρό απορρίπτεται.
- Προστίθενται 200μl διαλύματος PW2 στον δακτύλιο.
- Γίνεται φυγοκέντρηση για 2min της 11.000g.
- Το φίλτρο τοποθετείται σε erpendrof και προστίθενται 50μl διαλύματος PE.
- Γίνεται επώαση για 5min της 65°C στο υδατόλουτρο.
- Γίνεται φυγοκέντρηση για 1min της 11.000g.
- Προστίθενται 50μl διαλύματος PE στο φίλτρο.
- Γίνεται επώαση στο υδατόλουτρο για 5min της 65°C.
- Γίνεται φυγοκέντρηση για 1min της 11.000g.
- Το φίλτρο απορρίπτεται.
- Τα erpendrof περιέχουν το DNA και τοποθετούνται της -20°C.

Με τη χρήση του NucleoSpin Plant II kit, απομονώθηκε καθαρό DNA σε συντομότερο χρονικό διάστημα από άλλες κλασικές μεθόδους.

Η διαδικασία η οποία περιγράφηκε συνοψίζεται στα εξής έξι στάδια:

- i. Ομογενοποίησης δείγματος.
- ii. Κυτταρόλυση.
- iii. Καθαρισμός με φιλτράρισμα των ακατέργαστων προϊόντων λύσης.
- iv. Προσαρμογή συνθηκών και δέσμευση DNA.
- v. Ενυδάτωση και ξήρανση της μεμβράνης πυριτίου στην οποία έχει δεσμευτεί το DNA με ταυτόχρονη δράση για την καθαρότητά του.

vi. Έκλυση του DNA.

2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Οι μετρήσεις για την καθαρότητα και τη συγκέντρωση του DNA έγιναν με τη χρήση φασματοφωτόμετρου. Η φασματοφωτομετρική μέθοδος βασίζεται στην απορρόφηση του υπεριώδους φωτός από τα πυρινηκά οξέα (Σκούρας, 1993). Για να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού Unicam Helios γ.

Η καθαρότητα εκτιμήθηκε από τον λόγο απορρόφησης του οργάνου A_{260}/A_{280} ενώ η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε βάσει της απορρόφησης A_{260} (Σκούρας, 1993). Οι αραιώσεις στα δείγματα έγιναν βασιζόμενες στις μετρήσεις του φασματοφωτόμετρου έτσι ώστε όλα τα δείγματα να έχουν τελική συγκέντρωση 15ng/μl, με σκοπό να διευκολυνθούν οι εργασίες κατά την προετοιμασία της PCR.

2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιήθηκαν βάσει του κάτωθι πίνακα.

Πίνακας 2.3: Όγκοι των επιμέρους συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία μίγματος για PCR.

Συστατικά	C_{stock}	C_{work}	V_{work}
Buffer	10X	1X	2μl
dNTPs	10mM	1mM	0,5μl
MgCl ₂	25mM	4mM	3,2μl
Taq	xU	1U	0.2μl
Primer	10μM	0.5μM	1μl
DNA	15ng/μl	30ng/μl	2μl
ddH ₂ O	-	-	11,1μl
Τελικός όγκος	-	-	20μl

Το νερό το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την πλήρωση του όγκου των αντιδράσεων είναι δις απεσταγμένο και απιονισμένο.


Η προετοιμασία του μίγματος για τις αντιδράσεις της PCR ξεκινά με την παρασκευή του Master Mix. Το Master Mix είναι ένα μίγμα το οποίο φέρει όλα τα

συστατικά που απαιτούνται για την αντίδραση πλην του DNA και ο όγκος της εξαρτάται από τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να ενισχυθούν με την PCR. Με αυτόν τον τρόπο η προετοιμασία για την μέθοδο της PCR γίνεται πιο γρήγορα, πιο εύκολα και με μικρότερα σφάλματα.

Κατά την προετοιμασία του Master Mix οι αναλογίες υπολογίζονται βάσει του αριθμού των δειγμάτων προς ενίσχυση συν ένα ακόμα. Ο επιπλέον όγκος χρησιμοποιείται ως τυφλό δείγμα, το οποίο ονομάζεται μάρτυρας και χρησιμεύει για τον έλεγχο μολύνσεων των αντιδραστηρίων. Κατά την προετοιμασία του Master Mix – η οποία λαμβάνει χώρα σε πάγο- προστίθενται τα συστατικά με την ακόλουθη σειρά: 1.ddH₂O, 2. Buffer, 3. MgCl₂, 4.dNTPs, 5.Primer και 6.Taq. Ακολουθεί διεξοδική ανάδευση και μία γρήγορη φυγοκέντρωση, το μίγμα μοιράζεται στα tubes που είναι κατάλληλα για τον θερμοκυκλοποιητή και τα οποία αναγράφουν κωδικοποιημένα τα στοιχεία του κάθε δείγματος. Τέλος προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα DNA κάθε δείγματος στο αντίστοιχο PCR tube.

Το πρόγραμμα το οποίο ρυθμίστηκε στο θερμοκυκλοποιητή για την ενίσχυση του DNA της καστανιάς είναι το ακόλουθο:

Πίνακας 2.4: Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή.

Temperature	Time		Total Passes
94°C	5:00min		1
94°C	0:30min		35
43°C	1:00min		35
72°C	2:00min	2	35
72°C	5:00min		1
10°C	∞		1

Στους 94°C για 5 λεπτά, πραγματοποιείται η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA ενώ ακολουθούν 35 κύκλοι αντίδρασης που χωρίζονται σε επιμέρους στάδια. Αρχικά, γίνεται η θέρμανση στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, ακολούθως μειώνεται η θερμοκρασία στους 43°C για 1 λεπτό ώστε να υβριδιστεί ο εκκινητής και στο τέλος η θερμοκρασία ανέρχεται στους 72°C για 2 λεπτά ώστε να επιμηκυνθεί ο εκκινητής και να είναι δυνατή η σύνθεση νέων κλώνων.

Μετά το πέρας των 35 κύκλων, η θερμοκρασία παραμένει στους 72°C για 5 λεπτά έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η τελική επιμήκυνση των νέων κλώνων. Με την ολοκλήρωση και αυτής της διαδικασίας η θερμοκρασία κατέρχεται στους 10°C στην οποία μπορούν να διατηρηθούν τα παραγόμενα προϊόντα της PCR έως ότου καταψυχθούν ή να χρησιμοποιηθούν άμεσα για ηλεκτροφόρηση.

2.7 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν:

- Κωνική φιάλη με ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες.
- Σκόνη αγαρόζης.
- Διάλυμα TAE 1X.
- Ογκομετρικός κύλινδρος.

Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης:

- Ζυγίζονται 3.75gr σκόνη αγαρόζης σε ζυγό ακριβείας και τοποθετούνται στη κωνική φιάλη.
- Σε ογκομετρικό κύλινδρο υπολογίζονται 150ml διαλύματος TAE 1X.
- Τα 150ml TAE 1X προστίθενται στην κωνική φιάλη.
- Γίνεται ελαφριά ανάδευση.
- Η κωνική φιάλη τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων.
- Μόλις ξεκινήσει ο βρασμός του μίγματος η κωνική φιάλη απομακρύνεται από το φούρνο μικροκυμάτων.
- Αναδεύεται ελαφρώς το μίγμα.
- Αν δεν έχει επιτευχθεί η πλήρης διάλυση της σκόνης αγαρόζης τοποθετείται ξανά η κωνική φιάλη στο φούρνο μικροκυμάτων και επαναλαμβάνονται τα τελευταία βήματα μέχρι την πλήρη διάλυση της σκόνης.
- Η κωνική φιάλη με το διαυγές μίγμα αγαρόζης τοποθετείται σε πάγκο του εργαστηρίου για να κρυώσει ελαφρώς.
- Όταν η θερμοκρασία του είναι ανεκτή στο ανθρώπινο χέρι, προστίθενται 7,5ml χρωστικής gel red.
- Ακολουθεί ελαφρά ανάδευση έως ότου το μίγμα αποκτήσει ένα ομοιόμορφο χρώμα.

- Το μίγμα μεταφέρεται στη συναρμολογημένη θήκη ηλεκτροφόρησης και με το ακρορρύγχιο μίας πιπέτας απομακρύνονται τυχόν φυσαλίδες που έχουν σχηματιστεί.
- Στην άκρη της θήκης ηλεκτροφόρησης τοποθετείται η κτένα για τη δημιουργία πηγαδιών.
- Η πηκτή αφήνεται να κρυώσει και με την μείωση της θερμοκρασίας να πήξει.
- Αφαιρούνται τα πλαστικά τοιχώματα της θήκης.
- Η θήκη τοποθετείται εντός της συσκευής ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει TAE 1X, με προσανατολισμό των πηγαδιών στον αρνητικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
- Αφαιρείται προσεκτικά η χτένα έτσι ώστε να μην σπάσουν τα πηγαδάκια.
- Τα πηγαδάκια πρέπει να καλύπτονται πλήρως από το διάλυμα, αν αυτό δεν συμβαίνει προστίθεται επιπλέον TAE 1X.

2.8 Φόρτωση δειγμάτων, ηλεκτροφόρηση και φωτογράφιση

- Σε ένα κομμάτι parafilm τοποθετούνται 3,5μl χρωστικής φορτώματος για κάθε δείγμα και 2μl για το ladder 100bp (ακολουθίες DNA γνωστού μοριακού βάρους).
- Λαμβάνονται 10μl από κάθε δείγμα και αναμειγνύονται με τη χρωστική φορτώματος.
- Το μίγμα δειγματος-χρωστικής μεταφέρονται σε πηγάδι στην πηκτή αγαρόζης με προσοχή ώστε να μην υπερχειλίσει το πηγάδι κατά τη φόρτωσή του.
- Φορτώνονται τα δείγματα, ο μάρτυρας και το ladder (3μl).
- Κλείνεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης και ελέγχεται η καλή ένωση των ηλεκτροδίων με το τροφοδοτικό ρεύματος.
- Η τάση ρυθμίζεται σταθερή στα 80V/cm.
- Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί μιάμιση με δύο ώρες.
- Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, απενεργοποιείται το τροφοδοτικό ρεύματος και ανοίγεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Η θήκη ηλεκτροφόρησης μεταφέρεται στο θάλαμο με τις συσκευές φωτογράφισης.

- Τοποθετείται η πηκτή αγαρόζης με προσοχή να μην σπάσει, πάνω στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.
- Τοποθετείται πάνω στην UV-τράπεζα το ειδικό κάλυμμα.
- Ανοίγεται το φως UV της τράπεζας και γίνεται η φωτογράφιση με τη κάμερα Canon A630.
- Οι αναλύσεις βασίζονται σε αυτές τις φωτογραφίες με τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR.

2.9 Αριθμητική ανάλυση δεδομένων

Με βάση τις φωτογραφίες γίνεται καταγραφή των ενισχυμένων ζωνών DNA στις πηκτές αγαρόζης για κάθε εκκινητή, οδηγώντας έτσι στη κατασκευή μίας μήτρας. Στη μήτρα αυτή, η παρουσία ενισχυμένου τμήματος DNA δηλώνεται με τον αριθμό 1 ενώ η απουσία του με το 0.

Η ανάλυση δεδομένων έγινε σύμφωνα με το στατιστικό πακέτο NTSYS pc 2.2i (Rohlf, 1998). Για τον προσδιορισμό της συγγένειας μεταξύ των δειγμάτων επιλέχθηκε ο συντελεστής ομοιότητας Jaccard, όπως αυτός ορίζεται και περιγράφεται από τους Sneath and Sokal (1973).

Ο συντελεστής Jaccard υπολογίζεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

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

Συγκρίνοντας δύο δείγματα μπορεί να ισχύει μία από τις τέσσερις ακόλουθες περιπτώσεις. Τα δύο δείγματα είναι δυνατόν να εκφράζουν την ταυτόχρονη παρουσία των δύο ενισχυμένων ζωνών που ορίζεται ως (a). Τα δύο δείγματα είναι πιθανό να εκφράζουν την ταυτόχρονη απουσία των ενισχυμένων ζωνών που ορίζεται ως (d). το τελευταίο ζεύγος περιπτώσεων περιλαμβάνει το ένα από τα δύο δείγματα να έχει την ενισχυμένη ζώνη ενώ το άλλο όχι, για να περιγραφεί αυτή η κατάσταση χρησιμοποιούνται οι δείκτες (c) και (b), έναν για κάθε περίπτωση. Το (n) συμβολίζει το άθροισμα των a+b+c+d.

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει σχηματικά όλες τις δυνατές περιπτώσεις (a, b, c, d) για 2 ενισχυμένες ζώνες DNA σε δύο δείγματα i και j.

Πίνακας 2.5: Περιπτώσεις παρουσίας ή απουσίας 2 ενισχυμένων ζωνών.

		j	
i		+	-
	+	a	b
	-	c	d

Η κατασκευή φυλογενετικών δένδρων έγινε με τη βοήθεια πινάκων αποστάσεων, πρόκειται για την παλαιότερη και απλούστερη μέθοδο. Ένα πλεονέκτημα των προσεγγίσεων που βασίζονται στους πίνακες αποστάσεων είναι ότι παράγουν εξίσου καλά αποτελέσματα τόσο με μορφολογικά όσο και με μοριακά δεδομένα, καθώς και με το συνδυασμό των δύο. Σε αυτόν τον τρόπο προσέγγισης λαμβάνονται υπόψη όλα τα διαθέσιμα δεδομένα. Ένα μειονέκτημα της μεθόδου UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) είναι ότι προϋποθέτει σταθερό ρυθμό εξέλιξης σε όλες τις γενεαλογικές γραμμές, κάτι που όμως δεν ισχύει πάντα. Η μέθοδος συνένωσης γειτόνων (N.J.) (Neighbor Joining) είναι πιο πολύπλοκη αλλά μπορεί να εφαρμοστεί και σε περιπτώσεις που ο ρυθμός εξέλιξης δεν είναι σταθερός στις διαφορετικές γενεαλογικές γραμμές. Η μέθοδος UPGMA χρησιμοποιείται για ομαδοποιήσεις που ξεκινούν από κοντινά δείγματα και συνεχίζει στα υπόλοιπα σε αντίθεση με την μέθοδο N.J. η οποία δίνει αντιπροσωπευτικά δενδρογράμματα ως προς την πραγματική ομαδοποίηση των δειγμάτων (Durbin et al., 2004).

Με βάση τον συντελεστή Jaccard και τα αποτελέσματά του, κατασκευάστηκε μία μήτρα ομοιότητας (πίνακας γενετικών αποστάσεων) από την οποία αντλήθηκαν στοιχεία ανάλυσης συστάδων (cluster analysis) με τη μέθοδο N.J., τη μέθοδο UPGMA και την Ανάλυση των κύριων Συντεταγμένων (PCA) (Principal Coordinate Analysis) (Sneath and Sokal, 1973).

Η Ανάλυση των Κύριων Συντεταγμένων (PCA) είναι μία μέθοδος πολυμεταβλητής ανάλυσης δεδομένων (Multivariate Data Analysis). Με την αξιοποίηση αυτής της μεθόδου υπάρχει η δυνατότητα απεικόνισης της σχέσης μεταξύ των δειγμάτων σε ένα ή περισσότερους άξονες (Beer et al., 1993). Σε αυτή την περίπτωση, ο κάθε άξονας περιγράφει ένα μέρος του ποσοστού της παραλλακτικότητας. Το ποσοστό της παραλλακτικότητας το οποίο περιγράφεται από τον κάθε άξονα, αυξάνεται όσο πιο συγγενικά είναι τα δείγματα, δηλαδή όσο

λιγότερο διαφέρουν τα δεδομένα. Είναι δυνατόν, με μικρό αριθμό αξόνων να προσδιοριστεί ένα μεγάλο ποσοστό παραλλακτικότητας. Κάθε νέος άξονας που προστίθεται σε αυτόν τον τρόπο ανάλυσης, αυξάνει το ποσοστό της παραλλακτικότητας που περιγράφεται. Με κάθε νέο άξονα παρέχονται νέες πληροφορίες για το γενετικό υλικό που μελετάται και το οποίο προσδιορίζεται πληρέστερα (Morrison, 1990; Wickens, 1995).

Τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος, όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των καρπών, επεξεργάστηκαν με ανάλυση διασποράς (ANOVA) ως μονοπαραγοντικό πείραμα. Οι σημαντικές διαφορές, όσον αφορά τις μετρούμενες μεταβλητές μεταξύ των επεμβάσεων, προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του TUKEY HSD, σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα StatGraphics Centurion XVI.I.

2.10 Μετρήσεις χαρακτηριστικών των καρπών

Οι μετρήσεις των χαρακτηριστικών των καρπών της καστανιάς αφορούσαν τα εξής:

- Μήκος καρπού
- Πλάτος καρπού
- Ύψος καρπού
- Βάρος καρπού με φλοιό
- Βάρος καρπού χωρίς φλοιό

Για τον προσδιορισμό του βάρους των καρπών χρησιμοποιήθηκε βαθμονομημένος ζυγός (Kern 470, Kern and Sohn, GmbH). Ενώ για τις μετρήσεις των διαστάσεων του καρπού παχύμετρο ακριβείας δεύτερου δεκαδικού mm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ενισχυμένες ζώνες DNA

Τα δείγματα έδωσαν επαρκείς ποσότητες DNA με την μέθοδο απομόνωσης του NucleoSpin Plant II kit οι οποίες επαρκούσαν για τις απαιτούμενες αντιδράσεις της PCR. Η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα επαρκούσε και για συμπληρωματικές αντιδράσεις σε περίπτωση που αυτό κρινόταν κατάλληλο. Μετά από δοκιμαστικές αντιδράσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA η ποσότητα των 15ng/μl κρίθηκε ότι δίνει τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα στις αντιδράσεις της PCR.

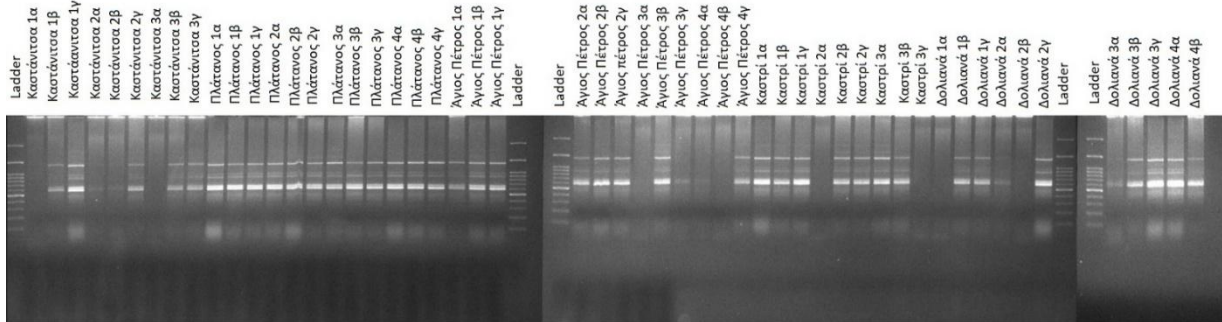
Για να επιτευχθεί ο καλύτερος διαχωρισμός των προϊόντων των αντιδράσεων PCR έγιναν αρκετοί συνδυασμοί με διαφορετικές συγκεντρώσεις της αгарόζης στην πηκτή ηλεκτροφόρησης και της εφαρμοζόμενης ταχύτητας ηλεκτροφόρησης. Τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα τα έδωσε ο συνδυασμός 2.5% (w/v) πηκτής αгарόζης με τάση 80 Volt για 1h και 45min.

Χρησιμοποιήθηκαν 5 εκκινητές ISSR για την ανάλυση και τον υπολογισμό της γενετικής ομοιότητας των δειγμάτων. Οι εκκινητές έδωσαν ένα σύνολο 48 ζωνών εκ των οποίων οι 36 ήταν πολυμορφικές (75%). Ο αριθμός των ενισχυμένων ζωνών κυμάνθηκαν από 7 έως 12 με τις πολυμορφικές ζώνες να κυμαίνονται από 6 έως 9 (Πίνακας 3.1).

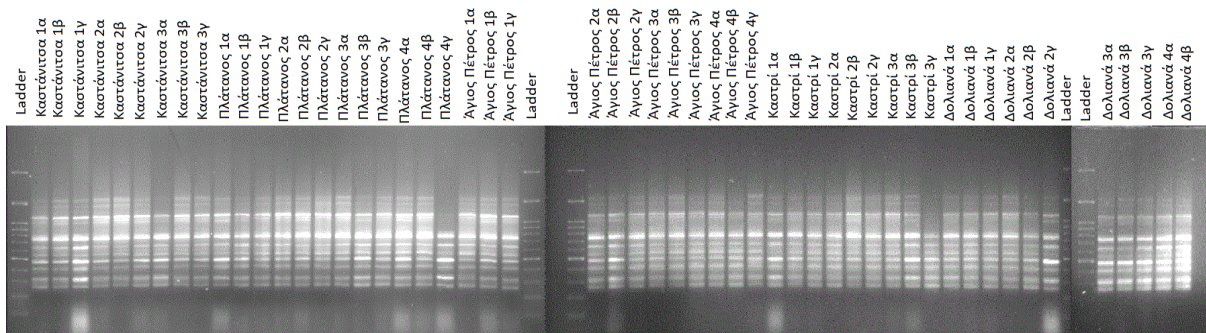
Πίνακας 3.1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα και ο αριθμός των ζωνών του.

ISSR Primers	Αλληλουχία εκκινητών 5' - >3'	Σύνολο ζωνών	Πολυμορφικές ζώνες	Ποσοστό πολυμορφισμού
UBC807	(AG) ₈ T	12	9	75%
UBC810	(GA) ₈ T	12	5	41,67%
UBC814	(CT) ₈ A	7	7	100%
UBC818	(CA) ₈ G	8	6	75%
UBC844	(CT) ₈ C	9	9	100%

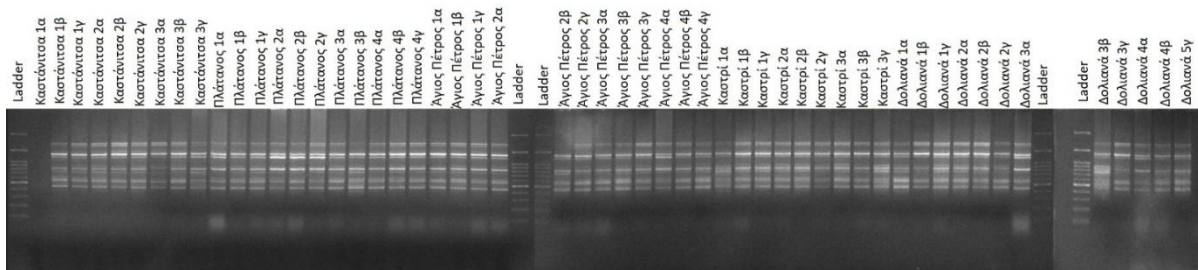
Οι εκκινητές με τις περισσότερες ενισχυμένες ζώνες ήταν οι UBC807 και UBC810 με 12 ζώνες ο καθένας. Το μεγαλύτερο ποσοστό πολυμορφισμού το έδωσαν οι εκκινητές UBC814 και UBC844 (Πίνακας 3.1).



Εικόνα 3.1: Πηκτή αгарόζης των 54 δειγμάτων καστανιάς μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή UBC 814.



Εικόνα 3.2: Πηκτή αгарόζης των 54 δειγμάτων καστανιάς μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή UBC818.



Εικόνα 3.3: Πηκτή αгарόζης των 54 δειγμάτων καστανιάς μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή UBC844.

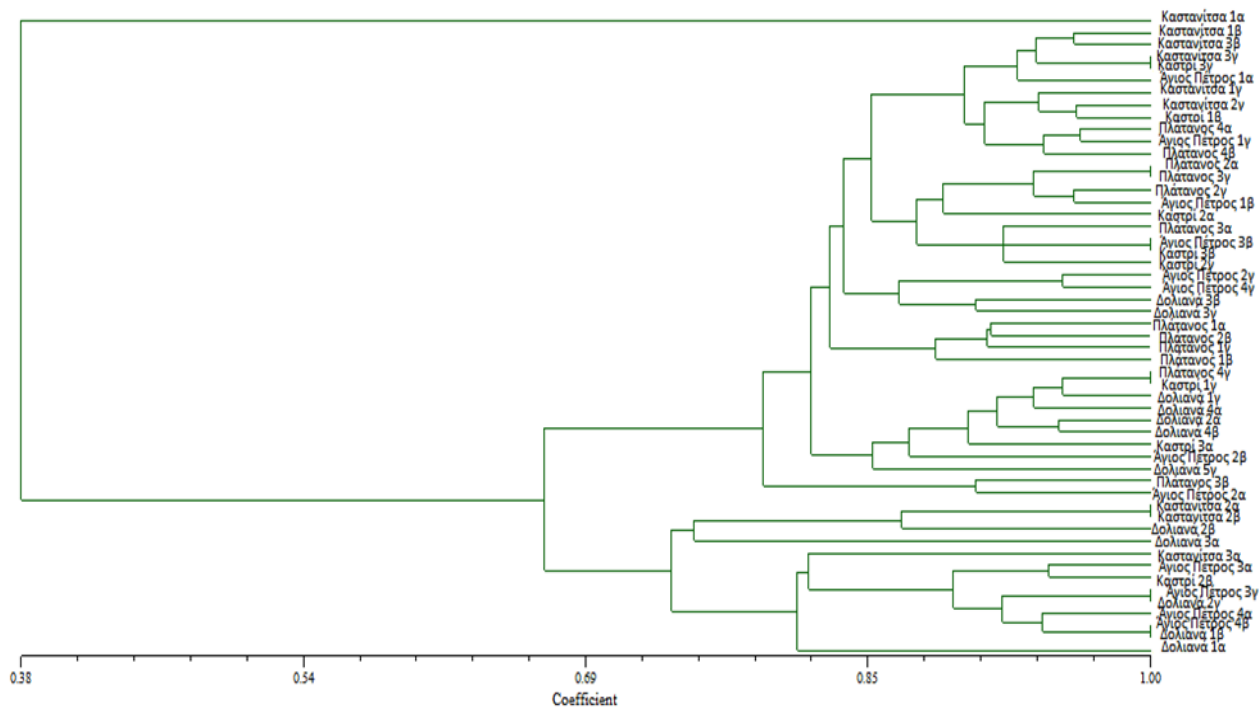
3.2 Κατασκευή δενδρογράμματος

Για την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού NTSYS pc 2.2i, από τον οποίο προέκυψαν τα δεδομένα του συντελεστή ομοιότητας Jaccard και τέλος κατασκευάστηκε η μήτρα ομοιότητας. Ο Πίνακας 3.2 που περιέχει τις γενετικές αποστάσεις των δειγμάτων που μελετήθηκαν, αναλύθηκε με τις μεθόδους UPGMA και N.J. καθώς και με την μέθοδο PCORDA. Μέσα από αυτές τις αναλύσεις προέκυψαν τα δενδρογράμματα της **Εικόνας 3.4** και της **Εικόνας 3.5**.

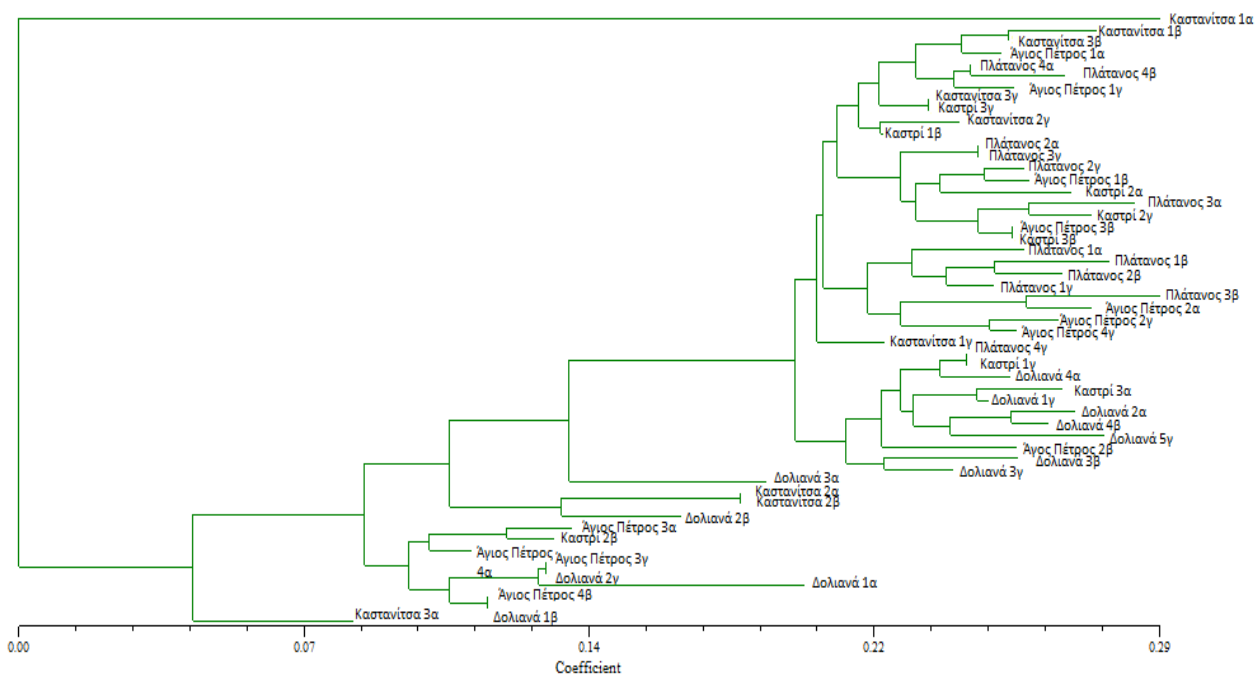
Τα δενδρογράμματα που προέκυψαν με τις μεθόδους UPGMA και N.J. αναπαριστούν δένδρο χωρίς ρίζα. Η ρίζα σε ένα δένδρο αναπαριστά το κοινό πρόγονο των ειδών που περιλαμβάνει. Επιπροσθέτως, η ρίζα ενός δένδρου δηλώνει την εξελικτική κατεύθυνση και τα εξελικτικά μονοπάτια μέσω των οποίων ένα ή περισσότερα είδη προήλθαν από κάποιο άλλο. Ο προσδιορισμός της ρίζας είναι δευτερεύων στόχος και μπορεί να πραγματοποιηθεί προσθέτοντας μία ομάδα ή ένα είδος το οποίο είναι γνωστό και το οποίο απέχει πολύ από το εξεταζόμενο είδος. Το σημείο στο οποίο το δένδρο έχει την άκρη του απομακρυσμένου είδους και ενώνεται με τους υπολοίπους κλάδους αποτελεί το ιδανικό υποψήφιο σημείο για ρίζα (Durbin et al., 2004). Στην παρούσα μελέτη τα δείγματα που εξετάστηκαν ανήκουν στο ίδιο είδος, αυτό της *Castanea sativa* οπότε αυτή η διαδικασία δεν κρίθηκε απαραίτητη.

Στα δενδρογράμματα (**Εικόνα 3.4 και Εικόνα 3.5**) παρουσιάζονται οι πιθανές εξελικτικές σχέσεις συγγένειας των ποικιλιών και των γονοτύπων καθώς παρουσιάζονται δένδρα χωρίς ρίζα. Τα δείγματα σύμφωνα με το δενδρογράμμα UPGMA διακρίνονται σε 2 κύριες ομάδες. Το ανώτερο τμήμα του δενδρογράμματος καταλαμβάνεται από δείγματα τα οποία προέρχονται από τα χωριά Πλάτανος και Καστάνιτσα τα οποία βρίσκονται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους. Τα υπόλοιπα 2/3 του δενδρογράμματος καλύπτονται από δείγματα τα οποία προέρχονται από τα χωριά Άγιος Πέτρος, Δολιανά και Καστρί. Τα χωριά αυτά βρίσκονται σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους και αποτελούν την κύρια καλλιεργητική έκταση της καστανιάς στην περιοχή της Αρκαδίας. Παρόλα αυτά εντός των 2/3 που αντιπροσωπεύουν τα δείγματα καστανιάς τα οποία προέρχονται από αυτά τα χωριά, υπάρχει μία μικρή ομάδα των υπόλοιπων δειγμάτων τα οποία προέρχονται από το χωριό Πλάτανος. Τα

δείγματα ακολουθούν την ίδια κατανομή και στο δενδρόγραμμα το οποίο προέκυψε σύμφωνα με τη μέθοδο N.J. (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.4: Δενδρόγραμμα για τους ISSR εκκινήτες με τη μέθοδο UPGMA.



Εικόνα 3.5: Δενδρόγραμμα για τους ISSR εκκινήτες με τη μέθοδο N.J.

3.3 Αποτελέσματα λοιπών μετρήσεων

Στους πίνακες 3.3 και 3.4 παρουσιάζονται οι μετρήσεις που αφορούν τα χαρακτηριστικά των καρπών για τα έτη 2015 και 2016 αντίστοιχα. Από τα αποτελέσματα είναι φανερή η παραλλακτικότητα μεταξύ των καρπών μεταξύ τόσο των περιοχών όσο και των κτημάτων αναφοράς.

Πίνακας 3.3: Μετρήσεις μακροσκοπικών χαρακτηριστικών των καστώνων για το έτος 2015.

Περιοχή	Κτήμα	Μήκος	Πλάτος	Ύψος	Φλούδα Βάρος με σπόδα	Βάρος χωρίς σπόδα
1	1	38,80 abc	23,31a	32,39ab	18,43ab	15,12a
1	2	40,85abcd	24,80abcd	33,08ab	21,39abc	18,27ab
1	3	41,63abcd	25,13abcde	33,06ab	22,04abc	18,59ab
2	1	42,48cd	29,09fgh	33,05ab	24,34cd	20,26abc
2	2	42,98d	28,78fgh	32,59ab	24,52cd	20,46abc
2	3	41,97bcd	27,97defg	33,36ab	23,25abcd	20,00abc
2	4	43,75d	28,37efgh	33,21ab	25,58cd	21,03bc
3	1	37,80a	23,50ab	31,94ab	17,77a	16,34ab
3	2	38,31ab	23,76abc	31,35a	17,78a	15,17a
3	3	41,89abcd	25,72abcdef	33,15ab	22,73abc	19,38abc
3	4	41,64abcd	26,81bcdefg	33,50ab	23,14abcd	20,10abc
4	1	42,33bcd	26,12abcdef	33,42ab	23,58abcd	18,91ab
4	2	41,38abcd	27,77defg	32,70ab	23,38abcd	18,67ab
4	3	41,91abcd	24,81abcd	33,77ab	22,64abc	18,96ab
5	1	41,86abcd	30,08gh	32,01ab	24,68cd	21,35bc
5	2	43,10d	26,54abcdef	34,11b	24,01bcd	19,59abc
5	3	44,91d	31,46h	33,40ab	28,98d	24,72c
5	4	41,58abcd	27,17cdefg	32,77ab	22,39abc	18,95ab

Πίνακας 3.4: Μετρήσεις μακροσκοπικών χαρακτηριστικών των καστών για το έτος 2016.

Περιοχή	Κτήμα	Μήκος	Πλάτος	Υψος	Βύρος με φλούδα	
					ωλαήδα	χωρίς
		mm			gr	
1	1	38,65abc	23,56abc	31,74ab	18,21abc	15,60a
1	2	39,38abcd	23,54abc	31,91b	18,52abcd	33,29b
1	3	38,73abc	23,95bcd	32,29b	18,62abcd	16,14a
2	1	42,69cde	28,15e	34,99ab	24,51def	19,88a
2	2	42,47cde	26,73de	32,74ab	22,10cdef	19,52a
2	3	44,36e	26,85de	33,39b	25,30f	21,97a
2	4	42,21cde	26,72de	38,48b	23,65def	20,54a
3	1	35,83a	20,85a	30,41a	14,30a	12,54a
3	2	36,68ab	21,63ab	30,19a	15,27ab	13,28a
3	3	39,79abcd	24,09bcd	32,50ab	18,84abcd	15,98a
3	4	39,09abc	24,19bcd	31,23ab	19,22abcde	16,62a
4	1	41,22cde	24,75cd	32,02ab	20,44bcdef	17,85a
4	2	40,12abcde	24,86cd	31,93ab	19,72bcde	17,14a
4	3	40,457bcde	24,41bcd	32,22ab	19,86bcde	17,36a
5	1	42,28cde	28,58e	32,63ab	23,03cdef	19,41a
5	2	43,60de	28,84e	33,21ab	24,53ef	20,49a

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Συζήτηση

Μεταξύ των φυτών υπάρχουν πάντοτε αρκετές διαφορές που είναι πολύ πιο έντονες μεταξύ των ειδών χωρίς όμως αυτό να αποκλείει την ύπαρξη διαφορών ανάμεσα σε φυτά του ίδιου είδους ή ακόμη και της ίδιας ποικιλίας. Ακόμα και αν τα φυτά παρουσιάζουν ένα μεγάλο βαθμό συγγένειας, υπάρχει πάντοτε ένας βαθμός παραλλακτικότητάς τους σε κάποιο ή κάποια χαρακτηριστικό/ά (Φανουράκης, 2002).

Η παραλλακτικότητα ενός υπό μελέτη φυτού οφείλεται είτε στην περιβαλλοντική επίδραση που δέχεται είτε στην γενετική του σύσταση. Η περιβαλλοντική παραλλακτικότητα μπορεί να παρατηρηθεί και να υπολογιστεί σε φυτά τα οποία χαρακτηρίζονται από γενετική ομοιομορφία. Οι διαφορές οι οποίες οφείλονται σε περιβαλλοντικά αίτια δεν μεταβιβάζονται σε απογόνους. Αν η παραλλακτικότητα των φυτών όμως οφείλεται στη γενετική τους σύσταση, γίνεται λόγος για γενετική παραλλακτικότητα. Η γενετική παραλλακτικότητα είναι δυνατόν να είναι εύκολα παρατηρήσιμη όπως το χρώμα του φλοιού ή μπορεί και παρουσιάζεται μέσα από πιο πολύπλοκα χαρακτηριστικά όπως η πρωιμότητα της παραγωγής. Η γενετική παραλλακτικότητα μεταβιβάζεται σε απογόνους ενώ η έντασή της εκδηλώνεται ανάλογα με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Φανουράκης, 2002).

Η χρήση μοριακών δεικτών είναι μία αξιόπιστη μέθοδος διερεύνησης της πιθανής γενετικής παραλλακτικότητας τόσο μεταξύ ποικιλιών όσο και σε ενδοποικιλιακό επίπεδο. Η χρήση των μοριακών δεικτών έχει βελτιώσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα των επιστημόνων οι οποίοι προσπαθούν να περιγράψουν, να ταξινομήσουν και να ταυτοποιήσουν διάφορες ποικιλίες και είδη.

Οι μοριακές τεχνικές και αναλύσεις μπορούν να ανιχνεύσουν τις διαφορές των φυτών σε επίπεδο DNA και πλεονεκτούν έναντι αντίστοιχων τεχνικών που εφαρμόζονται σε επίπεδο πρωτεϊνών καθώς είναι σε θέση να εντοπίσουν διαφορές στην αλληλουχία του DNA είτε αυτή μεταφράζεται είτε όχι (Φανουράκης, 2002). Με την τεχνική αυτή είναι δυνατόν ένας ερευνητής να γνωρίζει εάν οι διαφορές που παρατηρούνται σε άτομα του ίδιου είδους ή και της ίδιας ποικιλίας οφείλονται

αποκλειστικά σε κάποια γονοτυπική διαφορά. Είναι δυνατό μέσω του γενετικού ελέγχου να εξετάζεται η βιολογική διαφοροποίηση των ειδών και των ποικιλιών ευκολότερα και με μεγαλύτερη ακρίβεια.

Οι Solar et al. (2001) συνέλεξαν δείγματα καστανιάς από τρεις περιοχές της Σλοβενίας, 19 από την περιοχή A (ανατολικά), 17 από την B (κεντρικά) και 10 από την C (νοτιοδυτικά, προς τη Μεσόγειο). Στις περιοχές A και B οι κλιματικές συνθήκες είναι χαρακτηριστικά ηπειρωτικές ενώ η περιοχή C χαρακτηρίζεται από ένα πιο μεσογειακό κλίμα. Οι 46 γονότυποι οι οποίοι συλλέχθηκαν από αυτές τις περιοχές αναλύθηκαν με τη χρήση RPD εκκινητών και έδωσαν 97 πολυμορφικές ζώνες σε σύνολο 117 ενισχυμένων ζωνών (82,9%). Η συνδυασμένη ανάλυση μορφολογικών χαρακτηριστικών και γενετικών με τη χρήση RAPD εκκινητών έδειξε ότι η γενετική παραλλακτικότητα είναι μικρότερη μεταξύ των μεσογειακών γονοτύπων σε σχέση με τους ηπειρωτικούς γονότυπους. Επιπλέον, η γενετική ομοιομορφία είναι μεγαλύτερη μεταξύ των γονοτύπων του μεσογειακού τμήματος της περιοχής C από ότι είναι μεταξύ των δειγμάτων του ηπειρωτικού πληθυσμού. Επιπροσθέτως, σύμφωνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των καστανών, οι γονότυποι της Μεσογείου είναι πιο ποιοτικοί σε σχέση με τους ηπειρωτικούς (Solar et al., 2001).

Το 2014 οι Coutinho et al. χρησιμοποίησαν 17 μοριακούς δείκτες τύπου ISSR για να ερευνήσουν την γενετική ομοιομορφία/παραλλακτικότητα των γενών *Quercus*, *Castanea* και *Fagus*. Το γένος *Fagus* παρουσιάζεται να έχει διαφοροποιηθεί αρκετά νωρίς από τα άλλα δύο γένη. Σύμφωνα με το UPGMA δένδρογραμμα των 26 ειδών της οικογένειας Fagaceae (τα οποία αντιπροσωπεύουν αυτά τα γένη και συλλέχθηκαν από διαφορετικούς Βοτανικούς Κήπους) παρουσιάζεται μικρή γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των ειδών *Castanea creanta* και *Castanea sativa*, τα οποία φαίνεται να απέχουν αρκετά από το είδος *Castanea molissima* (Coutinho et al., 2014).

Το 2001 οι Goulao et al. μελέτησαν τις σχέσεις ποικιλιών της ευρωπαϊκής καστανιάς. Μέσα από την έρευνά τους τόνισαν τα πλεονεκτήματα των μοριακών δεικτών έναντι των μορφολογικών δεδομένων για την διάκριση ακόμη και συνωνυμιών μεταξύ ποικιλιών. Τόσο η ανάλυση με χρήση μοριακών δεικτών όσο και η μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ποικιλιών έδειξαν ότι οι θεωρητικά ομώνυμες ποικιλίες Martainhal 1' και 'Martainhal 2' έχουν ελάχιστες γενετικές ομοιότητες για να θεωρούνται ίδια ποικιλία, όπως το ίδιο ισχύει και για τις

ποικιλίες 'Longal 5' και 'Longal 6'. Σύμφωνα με τους ερευνητές, οι RAPD και ISSR εκκινητές είναι σε θέση να χρησιμοποιηθούν για την διάκριση ποικιλιών εντός τους είδους της καστανιάς.

Οι Marinoni et al. (2013) ανέλυσαν 68 δείγματα καστανιάς τα οποία προήλθαν από διαφορετικά σημεία της περιοχής Piedmont από τα οποία προέκυψαν δεδομένα που δηλώνουν μεγάλη φαινοτυπική και γενετική παραλλακτικότητα. Η ανάλυση με ISSR μοριακούς δείκτες αποδείχθηκε αξιόπιστη και κατάλληλη τεχνική για τη δημιουργία DNA προφίλ ποικιλιών της καστανιάς. Επίσης, ως τεχνική θεωρήθηκε εύχρηστη στα πλαίσια ανίχνευσης συνωνυμιών και ομωνυμιών των υπό μελέτη ποικιλιών.

Σύμφωνα με τους Casasoli et al. (2001) η εξέλιξη της καστανιάς στην Ευρώπη (και όχι μόνο) είναι αποτέλεσμα ενός πολύπλοκου μίγματος παραγόντων φυσικής (από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες) και τεχνητής (από τον άνθρωπο) επιλογής. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η γενετική παραλλακτικότητα της ευρωπαϊκής καστανιάς επηρεάζεται από τη γεωγραφική κατανομή της και εξαρτάται άμεσα από τα ιστορικά συμβάντα, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και διακυμάνσεις όπως και από τους χειρισμούς που έχει δεχθεί.

4.2 Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης η χρήση μοριακών δεικτών τύπου ISSR κρίθηκε κατάλληλη για την μελέτη των γονοτύπων της καστανιάς τα οποία συλλέχθηκαν από πέντε χωριά της Αρκαδίας. Τα χωριά αυτά είναι η Καστάνιτσα, ο Πλάτανος, το Καστρί, ο Άγιος Πέτρος και τα Δολιανά εκ των οποίων τα τρία τελευταία χωριά ανήκουν στο κύριο καλλιεργητικό κέντρο καστανιάς στην περιοχή της Αρκαδίας. Καρποί οι οποίοι συλλέχθηκαν από τα χωριά αυτά αναλύθηκαν και τόσο ως προς τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά τους, τη σύστασή τους σε μακροστοιχεία και μικροστοιχεία όσο και ως προς την υδατική τους κατάσταση.

Οι καρποί οι οποίοι συλλέχθηκαν για δειγματοληψία τα έτη 2015 και 2016 παρουσίασαν αρκετές διαφοροποιήσεις στα εξωτερικά-μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Το 2016 οι καρποί παρουσιάζονται να έχουν κατά μέσο όρο μεγαλύτερο μέγεθος, όπως αυτό προκύπτει από τις μετρήσεις του μήκους, του πλάτους και του ύψους τους. Παρόλα αυτά, το βάρος τους τόσο με τη φλούδα όσο και χωρίς αυτή φαίνεται να είναι αρκετά μικρότερο σε σχέση με τους καρπούς του 2015. Το 2015 το ελάχιστο βάρος κάστανου με φλούδα που καταγράφηκε είναι 9,34γρ. και αντίστοιχα χωρίς φλούδα 6,98γρ., ενώ οι μέγιστες είναι 40,44γρ. και 34,09γρ. αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες ελάχιστες μετρήσεις του 2016 είναι 8,9γρ. και 6,35γρ. και 35,13γρ. και 10,68γρ. αντίστοιχα οι μέγιστες.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των καρπών της καστανιάς εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούσαν την εκάστοτε καλλιεργητική περίοδο. Αυξημένη και συχνή βροχόπτωση μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μεγαλύτερου μεγέθους καρπού, όπως επίσης και στην αυξημένη υδατική κατάστασή του.

Σύμφωνα με τις αναλύσεις που έγιναν και όπως αυτό παρουσιάζεται από τα δενδρογράμματα UPGMA και N.J., τα δείγματα εμφανίζουν τάση ομαδοποίησης βάση της γεωγραφικής προέλευσής τους. Συγκεκριμένα, τα δείγματα τα οποία προέρχονται από τα χωριά Καστρί, Άγιος Πέτρος και Δολιανά ομαδοποιούνται μαζί και τα δείγματα τα οποία προέρχονται από τα χωριά Πλάτανο και Καστάνιτσα ομαδοποιούνται επίσης μαζί. Οι αλληλεπικαλύψεις, οι οποίες παρατηρούνται μεταξύ των δειγμάτων των δύο αυτών κύριων ομάδων είναι αναμενόμενες καθώς και τα 5

χωριά ανήκουν στην ίδια ευρύτερη περιοχή της ορεινής Αρκαδίας και είναι πολύ πιθανή η ανταλλαγή δενδροκομικού υλικού μεταξύ των ντόπιων παραγωγών. Η διαφοροποίηση των δειγμάτων όπως αυτή παρουσιάζεται στα δενδρογράμματα δεν είναι μεγάλη, κάτι που υποδεικνύει την γενετική ομοιότητα των δειγμάτων τα οποία πιθανόν απαρτίζουν ένα τοπικό γονότυπο καστανιάς. Δε γίνεται λόγος για κάποια ξεχωριστή ποικιλία γιατί αυτό θα πρέπει να επιβεβαιωθεί μέσα από σύγκριση αυτού του γενετικού υλικού με άλλους χαρακτηρισμένους γονότυπους και ποικιλίες. Ο χαρακτηρισμός του συγκεκριμένου γενετικού υλικού ως νέα ποικιλία θα πρέπει να μελετηθεί και να πραγματοποιηθεί μέσα από τη συλλογική προσπάθεια των παραγωγών και της επιστημονικής κοινότητας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

- Bebeli PJ, Kaltsikes PJ (1993). New developments in varietal identification. Seed Science and Technology, AJG van Gastel, MA Pagnotta and E Porceddu, ICCARDA, pages 161-172.
- Beer SC, Goffreda J, Philips TD, Murphy JP, Sorrells ME (1993). Assessment of genetic variation in *Avena sterillis* using morphological traits isoxymes and RFLPs. Crop Science 33/:1386-1393.
- Bretting PK, Widrlechner MP (1995). Genetic markers and plant genetic resource management. Plant Breeding Reviews, pages 11-86.
- Brown TA (1994). DNA sequencing the basics. Oxford university press, Chapters 1, 2, 3 and 4.
- Calliste CA, Trouillas P, Allais DP, Duroux JL (2005). *Castanea sativa* Mill. leaves as new sources of natural antioxidant: An electronic spin resonance study. J. Agric. Food Chem. 53:282-288.
- Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M, Villani F (2001). A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. Theor. Appl. Genet., 102:1190-1199.
- Coutinho JP, Carvalho A, Lima-Brito J (2014). Genetic diversity assessment and estimation of phylogenetic relationships among 26 Fagaceae species using ISSRs. Biochemical Systematics and Ecology 54:247-256.
- Durbin R, Eddy S, Krogh A, Mitchison G (2004). Biological sequence analysis, probabilistic models of proteins and nucleic acid. Cambridge university press, pages 160-191.
- Goulao L, Valdivieso T, Santana C, Oliveira CM (2001). Comparison between phonetic characterisation using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.). Genetic Resources and Crop. Evolution, 48:329-338.
- Griffin HG, Griffin AM (1994). PCR technology current innovations. CRC press, Chapters 2, 21 and 22, pages 194-200 and 221-224.
- Gustavo CA, Gresshoff PM (1997). DNA markers, protocols, applications and overviews. Wiley – Liss Inc., Chapters 1, 3, 4 and 5.

- Lande R (1991). Marker-assisted selection in relation to traditional methods of plant breeding. In plant breeding in the 1990s. edited by H Stalker and J Murphy, CAB International, Wallingford, U.K., pages 437-451.
- Marinoni DT, Akkak A, Beltramo C, Guarado P, Boccacci P, Bounous G, Ferrara AM, Ebone A, Vioto E, Botta R (2013). Genetic and morphological characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) germplasm in Piedmont (north-western Italy). *Tree Genetics & Genomes*, 9:1017-1030.
- Morrison DF (1990). Multivariate statistical methods. 3rd edition, McGraw-Hill Inc., pages 312-351.
- Patterson HD, Weathercup STC (1984). Statistical criteria for distinctness between varieties of herbage crops, pages 59-68.
- Rohlf M (1998). NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2i. Department of Ecology and Evolution. State university of New York, Setauket, NY.
- Sneath PHA, Sokal RR (1993). Numerical taxonomy. WH Freeman and Company, San Francisco.
- Solar A, Podjavorsek A, Osterc G, Stampar F (2001). Evaluation and comparison of domestic chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations in Slovenia. *For. Snow Landsc. Res.*, 76, 3: 455-459.
- Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. Pages 257-264.
- Vazquez G, Fontenla E, Snatos J, Freire MS, Gonzalez-Alvarez J, Antorrena G (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 28:279-285.
- Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Wilkowsi JA (2007). Recombinant DNA (Genes and Genomes – A Short Course), 3rd Edition, Chapter 4, New York.
- Wickens TD (1995). The geometry of multivariate statistics. Lawrence Erlbaum Associates Inc., pages 127-143.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994). Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176-183.

- Zivkovic J, Zekovic Z, Mujic I, Tumbas V, Cvetkovic D, Spasojevic I (2009). Antioxidant properties of phenolics in *Castanea sativa* Mill. extracts. Food Technol. Biotechnol. 47 (4):421-427.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Δεσποτάκη Ε (2010). Μελέτη της ενδοποικιλιακής γενετικής παραλλακτικότητας των ελληνικών ποικιλιών ελιάς «Καλαμών» και «Κορωνέικη» με τη χρήση μοριακών δεικτών. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γ.Π.Α.
- Θεριός Ι, Δημάση-Θεριού Κ (2013). Ειδική Δενδροκομία, Φυλλοβόλα Οπωροφόρα Δένδρα. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, σελίδες 703-720.
- Πελεκάνος Μ, Russel PJ (2002-2013). iGenetics, μία μεντελική προσέγγιση. Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., Κεφάλαια 1, 4, 6, 10, 11 και 16, σελίδες 1163-1164.
- Σκαράκης ΓΝ (2005). Κλασσική και μοριακή βελτίωση φυτών. Σημειώσεις στα πλαίσια μεταπτυχιακών σπουδών, Γ.Π.Α.
- Σκούρας Ζ (1993). Μόρια και γονίδια μία πρακτική προσέγγιση. Εκδόσεις art of text, Κεφάλαια 3 και 5.
- Φανουράκης Ν (2002). Γενετική βελτίωση φυτών, βασικές αρχές. Εκδόσεις Ίων – Στέλλα Παρίκου, Κεφάλαια 2, 6 και 11.
- Χατζόπουλος Π (2001). Βιοτεχνολογία φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο και Χατζόπουλος Π., σελίδες 13-19, 39-47, 325-332 και 337-347.

Διαδίκτυο

- www.faostat.com

ΠΑΡΑΤΗΡΜΑ Α

UBC844

30	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
29	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
25	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
22	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
14	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
12	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

54	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
53	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
52	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
51	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
50	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
49	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
48	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
46	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
45	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
44	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
43	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
42	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
41	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

54	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
53	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
52	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
51	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
50	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
49	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
47	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
46	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
45	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
44	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
43	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
42	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
41	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ΠΑΡΑΤΗΡΜΑ Β

Παρασκευή διαλυμάτων

Καυστικό Νάτριο NaOH 4M (Pellets)

Για τη παρασκευή διαλύματος NaOH 4M τελικού όγκου 100ml προστίθενται 16gr NaOH (pellets) σε απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αναδεύεται με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Μετά την πλήρη διάλυση των pellets συμπληρώνεται απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 100ml.

EDTA 0.5M (pH 8.0) (Ethylene Diaminate Tetraacetic Acid)

Για τη παρασκευή διαλύματος EDTA 0.5M τελικού όγκου 100ml, προστίθενται 18,61gr EDTA σε περίπου 75ml απεσταγμένου νερού. Ακόμη προστίθενται 1,7-2gr NaOH (pellets). Το διάλυμα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα και με τη βοήθεια του pH-meter το pH ρυθμίζεται στο 8.0 με τη χρήση NaOH pellets, επιπλέον της αρχικής ποσότητας των 1,7-2gr.

TAE50X (Trizima Base)

Για τη παρασκευή διαλύματος TAE τελικού όγκου 500ml προστίθενται 121gr TAE (trizima base) σε περίπου 200ml απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα και μετά τη διάλυση του TAE προστίθενται 50ml EDTA. Εν συνεχεία, προστίθενται 28,55ml Glacial Acetic Acid. Αφού γίνει καλή ανάδευση, προστίθεται απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 500ml. Το διάλυμα αναδεύεται ξανά.

TAE1X

Το TAE1X χρησιμοποιείται για την παρασκευή της πηκτής αгарόζης αλλά και για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης. Για την παρασκευή 1lt διαλύματος TAE1X, προστίθενται 20ml TAE50X σε 880ml απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα αναδεύεται για την ομογενοποίηση του και είναι έτοιμο προς χρήση,

GIAA

Για τη παρασκευή του διαλύματος GIAA τελικού όγκο 250ml προστίθενται 10ml ισοαμυλικής αλκοόλης (προστατεύει το DNA) και 240ml χλωροφόρμιο (αναλογία 24:1). Το χλωροφόρμιο απομακρύνει διάφορες ανεπιθύμητες ουσίες.