

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Διερεύνηση της ενδοειδικής γενετικής ποικιλομορφίας στην ποικιλία Καλαμών της ελιάς με τη χρήση DNA μοριακών δεικτών (RAPD) και μορφολογικών χαρακτηριστικών**

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΑ ΝΙΚΟΛΑΟΥ**

Υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή  
Κυριάκου Μαρκόπουλου

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2002

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Θέμα	Σελίδα
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	1
ΜΕΡΟΣ Α. ΓΕΝΙΚΟ	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	5
1.1. ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	5
1.2. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	6
1.3. Η ΦΥΣΗ ΚΑΙ ΟΙ ΑΙΤΙΕΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕΝΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ.	10
1.4. Η ΕΠΙΤΑΠΕΖΙΑ ΕΛΙΑ 'ΚΑΛΑΜΩΝ' ΚΑΙ Η ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	11
<u>Olea europaea var. ceraticarpa</u>	11
1.5. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ	13
<u>Ταξινόμηση ποικιλιών.</u>	13
<u>Ταυτοποίηση ποικιλιών</u>	14
<u>ΤΕΧΝΙΚΗ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ</u>	15
1.6. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ (DNA) ΔΕΙΚΤΩΝ	18
1.6.1. Τεχνική ανάλυσης πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA με την χρήση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης. (Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP's).	18
1.6.2. Τεχνική ανάλυσης τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA με την χρήση PCR (Polymerase Chain Reaction-Randomly Amplified Polymorphic DNA's, PCR-RAPD).	19
1.6.3. Τεχνική ανάλυσης του πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP's).	22
1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	24

ΜΕΡΟΣ Β. ΕΙΔΙΚΟ	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	27
2.2. ΥΛΙΚΑ	31
2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ	33
2.3.1. Εκχύλιση DNA από φυτικό ιστό	33
2.3.2. ΑΝΑΛΥΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	35
2.3.2.1. Μεθοδολογία	
2.3.22. Τεχνική RAPDS' στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης	36
2.3.3. ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ DNA.	37
2.3.3.1. Μεθοδολογία	38
2.3.4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΙΤ	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
3.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟ ΙΣΤΟ	41
3.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	43
3.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΑΣΗ ΑΛΓΟΡΙΘΜΩΝ	49
3.3.1. Ο αλγόριθμος DICE ( NEI ET LI)	49
3.3.2. Ο αλγόριθμος JACCARD	50
3.3.3. Ο αλγόριθμος APOSTOL	51
3.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	52
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	55
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	62

**ΜΕΡΟΣ Α**

**(ΓΕΝΙΚΟ)**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από την αρχαιότητα ακόμα, η ελιά είχε ξεχωριστή σημασία και είχε συνδεθεί με την διατροφή, την θρησκεία, την υγεία και την τέχνη.

Στις μέρες μας, η ελιά είναι ένα από τα δέντρα του φυτικού βασιλείου που συναντάμε καθημερινά, ειδικά σε περιοχές όπως η Νότια Ελλάδα. Τα προϊόντα της (λάδι, ελιές κ.α.) καταναλώνονται από πολύ μεγάλο αριθμό ανθρώπων, κάνοντάς την έτσι να μην περνάει απαρατήρητη από τις καθημερινές διατροφικές μας συνήθειες. Η μεγάλη συνεισφορά της στην γεωργική εκμετάλλευση καθώς και η απασχόληση πολλών αγροτικών οικογενειών με την καλλιέργειά της, την καθιστούν ακόμα πιο ενδιαφέρουσα ως δέντρο.

Οι απορίες λοιπόν που δημιουργούνται από ένα φυτό που χρησιμοποιείται τόσο συχνά και από τόσο μεγάλο αριθμό ανθρώπων είναι εύλογες.

Ακούγοντας και έχοντας αντίστοιχές απορίες αποφάσισα μετά από παρότρυνση και των καθηγητών μου ότι το συγκεκριμένο δέντρο ήταν το καταλληλότερο για όποια περαιτέρω έρευνα. Με αυτό τον τρόπο η εργασία μου θα ήταν χρήσιμη και για όλους αυτούς τους ανθρώπους που έχουν ασχοληθεί με την καλλιέργεια της ή απλώς και με την κατανάλωση των προϊόντων της.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον καθηγητή του ΤΕΙ Καλαμάτας κ. Κ. Μαρκόπουλο που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με αυτό το ενδιαφέρον αντικείμενο αναθέτοντάς μου την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας, και για την καθοδήγηση και συμπαράστασή του κατά τη διεξαγωγή της μελέτης καθώς και την ερευνήτρια του Ινστιτούτου κ. Κ. Παπαδοπούλου της οποίας οι συμβουλές, οι υποδείξεις και η εν γένει βοήθειά της ήταν αποφασιστικής σημασίας για την επιτυχή έκβαση αυτής της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ το διευθυντή του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών, ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., κ. Γ. Ζερβάκη που μου επέτρεψε να εργαστώ στους χώρους του Ινστιτούτου και τη συνάδελφο Μαρία Τουρνά για την πολύτιμη βοήθεια της στους εργαστηριακούς χώρους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

### 1.1 ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Η ελιά, *Olea europaea* L. είναι χαρακτηριστικό δέντρο της Μεσογειακής λεκάνης. Η εξημέρωση και η καλλιέργειά της συνδέεται στενά με τις διατροφικές συνήθειες και τον πολιτισμό των λαών που αποίκισαν τις γύρω περιοχές από την εποχή του χαλκού. Οι βασικές χώρες παραγωγής ελαιολάδου και βρώσιμης ελιάς είναι η Ισπανία, Ιταλία, Ελλάδα, Τουρκία και Τυνησία. Σχετικά πρόσφατα έχει γίνει εξάπλωση της ελαιοκαλλιέργειας σε διάφορες χώρες του Νέου Κόσμου ( Καλιφόρνια, Μεξικό, Χιλή) καθώς επίσης στην Αυστραλία και την Ν. Αφρική.

Αν και η καλλιέργεια και η εκμετάλλευση του δέντρου της ελιάς είναι γνωστή από τους προϊστορικούς χρόνους εντούτοις οι διάφοροι ερευνητές δεν συμφωνούν για την καταγωγή και εξάπλωσή της. Σύμφωνα με όσα αναφέρονται στην ελαιοκομία του Β. Ποντίκη, ήταν γνωστή από το 4000 π.Χ και πατρίδα της είναι ( μάλλον) η Συρία. Στο ίδιο βιβλίο αναφέρεται ότι τόσο το Ελληνικό όνομα του είδους όσο και διάφορα αρχαιολογικά ευρήματα ενισχύουν την άποψη πολλών Ελλήνων ερευνητών ( Π. Αναγνωστόπουλος & άλλοι-) ότι μία από τις πιθανές περιοχές καταγωγής του είδους *Olea europaea* είναι και η Κρήτη.

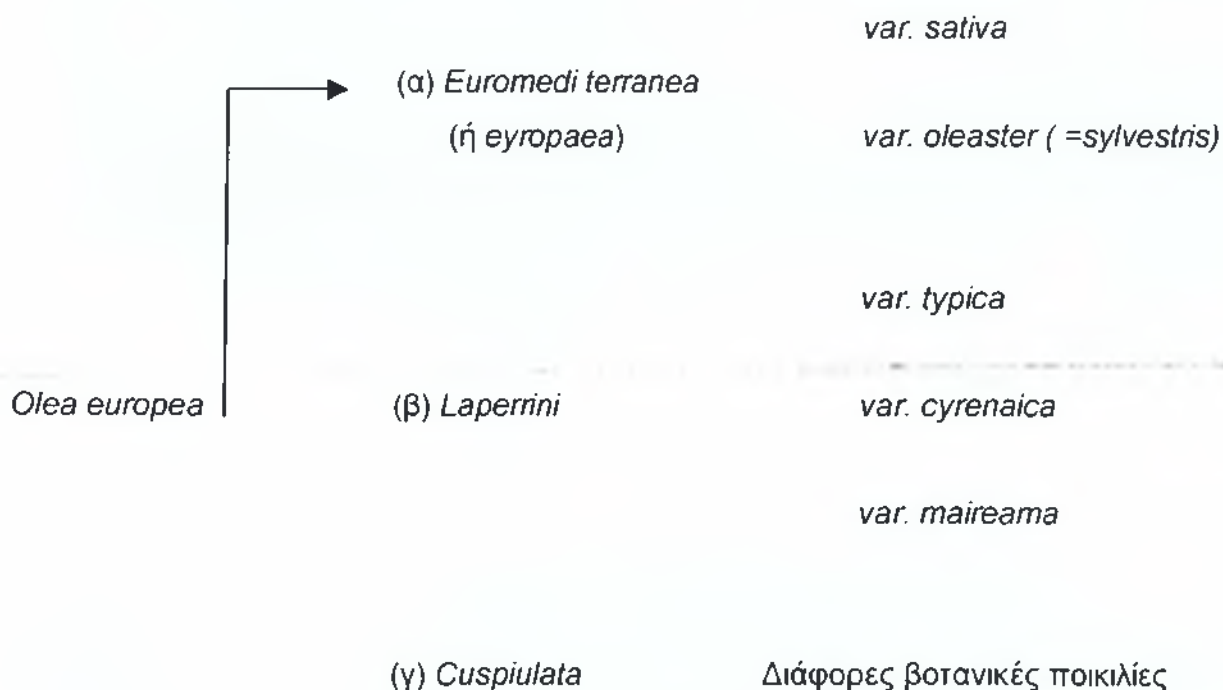
Τέλος κατά τον Ισραηλινό ερευνητή D. Zohary, όπως αναφέρεται στο βιβλίο "Evolution of Crop Plants" ( ed. SMART and Simmonds, 1998, pp 379-382) η καλλιέργεια της ελιάς πρέπει να ξεκίνησε από περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου ( Ιορδανία, Ισραήλ, Συρία), γύρω στα 3700 έως 3200 π.Χ και πολύ γρήγορα διαδόθηκε στις περιοχές του Αιγαίου και τις υπόλοιπες χώρες της Μεσογείου.

## 1.2 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Το γένος *Olea* μαζί με άλλα 25 γένη και πλέον ανήκουν στην οικογένεια *Oleaceae* της τάξης *Contortae*. Το γένος *Olea* περιλαμβάνει 30 διαφορετικά είδη με μεγάλη ποικιλομορφία και διασπαρμένα στις πέντε ηπείρους.

Σήμερα είναι αναγνωρισμένες εκατοντάδες καλλιεργούμενες ποικιλίες του είδους *Olea europaea* ορισμένες των οποίων αποτελούν τοπικούς κλώνους διαφορετικών περιοχών της Μεσογείου.

Κατά τους Cifferi και Breviglieri ( 1942) όπως αναφέρεται από τον Ποντίκη, το είδος *Olea europaea* έχει τρία υποείδη και κάθε υποείδος διάφορες βοτανικές ποικιλίες.



Η Μεσογειακή αγριλιά, *Olea europea subsp. euromediterranea var. oleaster* ή *sylvestris*, σήμερα αναγνωρίζεται ως πρόγονος της καλλιεργούμενης ελιάς, *O. europea subsp. euromediterranea var. sativa* (Zohary and Spiegel-Roy, 1975, Zohary and Hopt, 1993, p. 132). Αμφότεροι οι βοτανικοί τύποι της Ευρωπαϊκής ελιάς, *oleaster* και *sativa*, αποτελούν χαρακτηριστική βλάστηση του οικολογικού περιβάλλοντος και έχουν την ίδια χρωμοσωμική σύσταση ( $2n=2x=46$ ). Σχεδόν όλες οι καλλιεργούμενες ποικιλίες-κλώνοι της *O. europea var. sativa* ή *sylvestris* καθώς και τα σποριόφυτα της αγριελιάς (*O. europea var. oleaster*) εμφανίζουν έντονο φαινόμενο αυτοασυμβίβαστου, ενώ οι διασταυρώσεις μεταξύ τους είναι πλήρως συμβατές. Η κατάσταση αυτή θεωρητικά, ευνοεί την ετεροζυγωτία και την διεύρυνση της Μενδελικής παραλλακτικότητας στους φυσικούς πληθυσμούς της αγριελιάς οι οποίοι αναπαράγονται εγγενώς με σπόρους.

Αντίθετα η σταθερότητα των καλλιεργούμενων ποικιλιών-κλώνων εξασφαλίζεται μέσω της αγενούς αναπαραγωγής ( με βλαστικό πολλαπλασιασμό της κάθε ποικιλίας). Επομένως ενδοκλωνική παραλλακτικότητα σε μία καλλιεργούμενη ποικιλία δεν μπορεί να υπάρξει παρά μόνο μέσω μεταλλάξεων.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι νέα γενετική παραλλακτικότητα μπορεί να δημιουργηθεί μέσω φυσικών ή τεχνητών υβριδισμών μεταξύ των καλλιεργούμενων κλώνων ή μεταξύ άγριων σποριόφυτων αγριελιάς και κάποιας καλλιεργούμενης ποικιλίας-κλώνου.

Οι διάφοροι πληθυσμοί της άγριας Ευρωπαϊκής ελιάς παρουσιάζουν από την μια μεριά μεγάλες μορφολογικές ομοιότητες με τις καλλιεργούμενες ποικιλίες ενώ από την άλλη μεριά παραλλάσσουν οφθαλμοφανώς, ιδιαίτερα ως προς την μορφή, το μέγεθος φύλλων και καρπών, την σάρκα του μεσοκαρπίου, την περιεκτικότητα σε λάδι, την σχέση σάρκας προς πυρήνα κ.λπ. Γενικά, συγκριτικά με τις καλλιεργούμενες ποικιλίες, έχουν μικρότερους καρπούς, μικρότερη σχέση "σάρκας / πυρήνα", μικρότερη περιεκτικότητα σε λάδι, περισσότερο οξύληκτα φύλλα και σχετικά μεγαλύτερο χρόνο νεότητας ( μέχρι την είσοδό τους στην καρποφορία).

Σύμφωνα με όσα αναφέρονται από τον D. Zuhary, στο βιβλίο "Evolution of crop plants" παρότι υπάρχει στενή ταξινομική σχέση μεταξύ της καλλιεργούμενης ελιάς με άλλους μη Μεσογειακούς τύπους ελιάς εντούτοις οι τύποι αυτοί δεν φαίνεται να έπαιξαν κανένα ρόλο στην εξημέρωση. Όλοι ευδοκούν έξω από την ζώνη της



ελαιοκαλλιέργειας και είναι προσαρμοσμένοι σε τελείως διαφορετικά και απομονωμένα γεωγραφικά και οικολογικά περιβάλλοντα. Η απομόνωση αυτή δεν φαίνεται, για ορισμένους τουλάχιστον τύπους, να έχει οδηγήσει σε πλήρη γενετική απομόνωση. Έτσι πολλά άγρια, με Μεσογειακά είδη και υποείδη, μπορούν να παράγουν γόνιμα υβρίδια με τους Μεσογειακούς συγγενείς τους. Το γεγονός αυτό καθιστά δυνατή την εκμετάλλευση χρήσιμων γονιδίων σε πιθανά μελλοντικά προγράμματα βελτίωσης της καλλιέργειας για διάφορους σκοπούς, όπως π.χ διεύρυνση της προσαρμοστικότητας της καλλιέργειας σε μη Μεσογειακά περιβάλλοντα, αντοχή στην ξηρασία κ.λπ.

Εάν θέλαμε να ξεχωρίσουμε την εξέλιξη της καλλιεργούμενης ελιάς σε χρονικές περιόδους, θα μπορούσαμε να διακρίνουμε τις εξής:

**α)** Την περίοδο πριν την εξημέρωση. Σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα το είδος κατευθύνεται από τις δυνάμεις της φυσικής επιλογής.

**β)** Την περίοδο μετά την εξημέρωση. Εδώ κυρίαρχο ρόλο παίζουν οι επιλογές και τα κριτήρια που θέτει ο ανθρώπινος παράγοντας στην εκμετάλλευση του είδους.

Οι βασικότερες εξελικτικές συνέπειες υπό συνθήκες εξημέρωσης ήταν:

**(1)** Η μετάβαση από τον εγγενή τρόπο αναπαραγωγής του είδους (στους άγριους πληθυσμούς) στον αγενή (βλαστικό) πολλαπλασιασμό που χαρακτηρίζει την καλλιεργούμενη ελιά.

**(2)** Η επιλογή γενοτύπων-κλώνων με μεγαλύτερους καρπούς, σαρκώδες μεσοκάρπιο, μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λάδι και συχνά τύπων που εισέρχονται νωρίτερα σε παραγωγική ηλικία (με βραχύτερη χρονική περίοδο νεότητας).

Οι διαδικασίες δημιουργίας εκμεταλλεύσιμης γενετικής παραλλακτικότητας με αντίστοιχες επιπτώσεις στην διαμόρφωση των πολυάριθμων φαινοτύπων των σημερινών ποικιλιών θα πρέπει να ήταν οι εξής:

1. Οι φυσικές μεταλλάξεις.

2. Η Μενδελική παραλλακτικότητα που δημιουργείται από ενδοειδικές διασταυρώσεις μεταξύ διαφορετικών γενοτύπων.

3. Η ροή γονιδίων μεταξύ συγγενικών ειδών με τυχαίες διεϊδικές διασταυρώσεις.

4. Συνδυασμός των προηγούμενων διαδικασιών.

Μέχρι την εξημέρωση ( 4000 π.Χ περίπου), ο εγγενής τρόπος αναπαραγωγής σε συνδυασμό με το σύστημα της σταυρογονιμοποίησης εξασφάλιζε τον μηχανισμό δημιουργίας άπειρων γενοτύπων επάνω στους οποίους δρούσε η φυσική επιλογή, κατευθύνοντας τις συχνότητες γονιδίων και γενοτύπων σύμφωνα με τους νόμους της Γενετικής των πληθυσμών. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και σήμερα στην εξέλιξη του είδους υπό φυσικές συνθήκες.

Αντίθετα, μετά την εξημέρωση, υπό συνθήκες καλλιέργειας, ο άνθρωπος πολλαπλασιάζοντας αγενώς επιλεγμένους γενοτύπους δημιουργεί τις καλλιεργούμενες ποικιλίες-κλώνους. Σε αυτές σταθεροποιήθηκαν συγκεκριμένοι συνδυασμοί γονιδίων που αντιστοιχούν σε καθένα από τα αρχικά μητρικά φυτά της αντίστοιχης ποικιλίας. Επομένως στην σημερινή ελαιοκαλλιέργεια, η υπάρχουσα γενετική παραλλακτικότητα αφορά, σχεδόν κατά αποκλειστικότητα, τις γενετικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών. Οποιαδήποτε γενετική διαφορά εντός μιας ποικιλίας-κλώνου, θεωρητικά τουλάχιστον, μπορεί να αποδοθεί μόνο σε φυσική μετάλλαξη, η οποία στην συνέχεια θα μπορούσε να πολλαπλασιαστεί, τυχαία ή συνειδητά, από τους καλλιεργητές ή τους φυτωριούχους μέσω των αγενών τρόπων αναπαραγωγής της ελιάς.

Συμπερασματικά, η σημερινή ελαιοκαλλιέργεια στηρίζεται, σχεδόν στο σύνολό της, στις παραδοσιακές ποικιλίες-κλώνους, οι οποίες απομονώθηκαν κάποια χρονική στιγμή στην διαδρομή εξέλιξης της καλλιέργειας, πολύ πριν αναπτυχθεί ο επιστημονικός κλάδος της σύγχρονης βελτίωσης των φυτών. Το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας που έχει διεξαχθεί μέχρι σήμερα, αφορά την αξιολόγηση της συμπεριφοράς των ποικιλιών-κλώνων που προϋπήρχαν. Τα ελάχιστα ερευνητικά προγράμματα που έχουν διεξαχθεί με στόχο την γενετική βελτίωση της ελιάς, αφορούν την μελέτη των απογόνων κάποιων διασταυρώσεων με ελάχιστη τελική συνεισφορά στην δημιουργία νέων ποικιλιών. Όσο οι υπάρχουσες ποικιλίες θα ικανοποιούν τις ανάγκες και τις απαιτήσεις παραγωγών και καταναλωτών, η κατάσταση γύρω από τις προτεραιότητες των ερευνητικών προγραμμάτων στην ελιά δεν φαίνεται να μεταβάλλεται. Η προβολή όμως που γίνεται τα τελευταία χρόνια ως προς την υγιεινή της Μεσογειακής διατροφής, η οποία στηρίζεται στα προϊόντα της ελιάς ( λάδι και επιτραπέζιες ελιές), φαίνεται να δημιουργεί νέες προοπτικές στην ελαιοκαλλιέργεια και τους συνυφασμένους με αυτή στόχους της έρευνας.

Μια από τις προτεραιότητες οι οποία θα πρέπει να απασχολήσει άμεσα την έρευνα υπό το φως των σύγχρονων τεχνικών της Μοριακής Γενετικής, είναι η μελέτη της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας με ανάλυση των γενετικών υλικών σε μοριακό επίπεδο. Τα αποτελέσματα μιας τέτοιας προσέγγισης μπορούν να δώσουν χρήσιμα στοιχεία για την γενετική δομή του υπάρχοντος πολλαπλασιαστικού υλικού. Τα στοιχεία αυτά, συσχετιζόμενα με αντίστοιχα φαινοτυπικά αγρονομικά γνωρίσματα, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν προς την κατεύθυνση εξασφάλισης πλεονεκτικού, πιστοποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού.

### **1.3 Η ΦΥΣΗ ΚΑΙ ΟΙ ΑΙΤΙΕΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕΝΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ.**

Το είδος *O. europaea* είναι αρκετά πολυμορφικό, τόσο στα μορφολογικά γνωρίσματα του δέντρου όσο και σε εκείνα του καρπού. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές π.χ ως προς τον τύπο της βλάστησης, τα χαρακτηριστικά του φύλλου, τα γνωρίσματα του καρπού κ.λπ. Το μέγεθος και η φύση της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας μεταξύ των εξημερωμένων ποικιλιών και των διαφόρων τύπων αγριελιάς επίσης διαφέρει.

Ειδικότερα θα πρέπει να έχουμε υπόψη μας τα εξής:

α) Η φαινοτυπική παραλλακτικότητα εντός κάθε καλλιεργούμενης ποικιλίας, λόγω του αγενούς τρόπου πολλαπλασιασμού της, είναι κυρίως περιβαλλοντικής φύσης και μπορεί να οφείλεται στην διαφορετική έκφραση ενός συγκεκριμένου γενοτύπου, σε διάφορους μη γενετικούς παράγοντες μεταξύ των οποίων οι βασικότεροι είναι:

1. Ο "αυτόριζος" ή μη χαρακτήρας των δέντρων της ποικιλίας.
2. Το είδος και η συμπεριφορά του υποκειμένου.
3. Διάφοροι οικολογικοί παράγοντες ( εδαφολογικοί, κλιματικοί, κ.λπ.).
4. Η εφαρμοζόμενη καλλιεργητική τεχνική ( καλλιεργητικές φροντίδες, άρδευση, λίπανση, κλάδεμα, αραίωση καρπών, κ.λπ.).

Επομένως, η γενετική ενδοκλωνική παραλλακτικότητα, εάν υπάρχει, συγκρινόμενη με την παρατηρούμενη συνολική, αναμένεται πολύ μικρή και αντίστοιχη με την συχνότητα των μεταλλάξεων.

β) Η φαινοτυπική παραλλακτικότητα μεταξύ των διαφορετικών καλλιεργούμενων ποικιλιών μπορεί να οφείλεται :

1. Σε γενετικές διαφορές μεταξύ των αρχικών, προγονικών, μητρικών δέντρων από τα οποία προήλθαν οι ποικιλίες ( γενετική παραλλακτικότητα).

2. Σε μη γενετικούς παράγοντες όπως τα προηγούμενα ( περιβαλλοντική παραλλακτικότητα).

3. Σε αλληλεπίδραση γενοτύπου ( ποικιλίας) με το περιβάλλον.

γ) Η γενετική παραλλακτικότητα των διαφόρων πληθυσμών αγριελιάς, συγκρινόμενη με εκείνη των εξημερωμένων ποικιλιών, αναμένεται αφενός μεγαλύτερη λόγω του εγγενούς τρόπου αναπαραγωγής τους, αφετέρου διαφορετικής σύστασης από άποψη γενοτύπων.

Στην περίπτωση των φυσικών πληθυσμών θα επικρατούν οι γενότυποι ( συνδυασμοί γονιδίων), με προσαρμοστικότητα και πλεονέκτημα στην επιβίωση του είδους σε ποικίλες συνθήκες και περιβαλλοντικές αντιξοότητες. Αντίθετα στις εξημερωμένες ποικιλίες, ευνοούνται οι γενότυποι ( συνδυασμοί γονιδίων) με πλεονεκτήματα προσαρμογής στις σχετικά σταθερότερες συνθήκες ενός γεωργικού περιβάλλοντος εκμετάλλευσης του είδους.

## **1.4 Η ΕΠΙΤΑΠΕΖΙΑ ΕΛΙΑ 'ΚΑΛΑΜΩΝ ΚΑΙ Η ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ**

### **Olea europea var. ceraticarpa**

Καλλιεργείται κυρίως στην Μεσσηνία, Λακωνία, αλλά και στην Αχαΐα. Είναι γνωστή με τις ονομασίες Καλαματιανή, Αετονύχι, Χοντρολιά. Δέντρο μετρίου ως μεγάλου μεγέθους, ζωηρό. Έχει απαιτήσεις σε νερό και ευδοκμεί σε περιοχές με μεγάλη

ατμοσφαιρική υγρασία. Έχει αντοχή στις προσβολές του Δάκου. Ωριμάζει τον καρπό της Νοέμβριο με Δεκέμβριο. Τα φύλλα της είναι τα μεγαλύτερα από όλες τις ελληνικές ποικιλίες ελιάς. Ο καρπός της είναι μεγάλος, κυρτωμένος μονόπλευρα, με βάρος μέχρι 6 γραμμάρια. Το κουκούτσι του αποσπάται εύκολα. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι είναι 17 με 19%. Σχέση καρπού/πυρήνα 8,3:1. Είναι μια από τις μεγαλύτερες επιτραπέζιες ποικιλίες. Δίνει μαύρες ελιές, χαραχτές, ξιδάτες, ιδιαίτερα κατάλληλες για κονσερβοποίηση.

Μετά από μια πρώτη αναζήτηση της ελιάς "Καλαμών", σε περιοχές της Μεσσηνίας, βρέθηκαν μεγάλες διαφορές στα φαινοτυπικά τους γνωρίσματα. Επιλέχθηκαν και φωτογραφήθηκαν λοιπόν δέντρα, με διαφορές αρχικά στο σχήμα και το μέγεθος του κορμού(ΕΙΚΟΝΑ 1, Δ) και των φύλλων, καθώς και δέντρα με μεγάλη απόκλιση στο μέγεθος της παραγωγής τους (ΕΙΚΟΝΑ 1, Β). Ο κορμός τους άλλοτε εμφανιζόταν σκούρος με κοιλότητες(ΕΙΚΟΝΑ 1, Α) και άλλοτε ανοιχτόχρωμος και λείος(ΕΙΚΟΝΑ 1, Γ).

Το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε όμως, σε διαφορές που εμφανίζονταν στον καρπό, το ενδοκάρπιο, την δρύπη και το σπέρμα. Παρατηρήθηκε μεγάλη παραλλακτικότητα στο μέγεθος των καρπών(ΕΙΚΟΝΑ 2, Β), και στο χρώμα τους που άλλες φορές ήταν κοκκινωπό(ΕΙΚΟΝΑ 2, Γ) και άλλες σκούρο μαύρο(ΕΙΚΟΝΑ 2, Β). Στο σχήμα του, είχαμε καρπούς που έφεραν θηλή(ΕΙΚΟΝΑ 2, Α), και άλλους που ήταν ολοστρόγγυλοι(ΕΙΚΟΝΑ 2, Δ). Διαφορές εμφανίστηκαν και στο χρώμα και το σχήμα του σπέρματος (με θηλή:ΕΙΚΟΝΑ 2 ΣΤ, ή χωρίς, ανοιχτόχρωμοι:ΕΙΚΟΝΑ 2Α ή σκούροι:ΕΙΚΟΝΑ 2Ε).

Στο σημείο αυτό, δεν μπορούσαμε να γνωρίζουμε εάν τα δέντρα που επιλέχθηκαν ήταν όντως της ποικιλίας που εξετάζαμε. Βασιζόμασταν στους ισχυρισμούς των ελαιοκαλλιεργητών. Ούτε είχαμε την ικανότητα να αποδείξουμε με επιστημονικές μεθόδους κατά πόσο μπορεί να επηρεαστεί ο φαινότυπος ενός δέντρου, που αναπτύσσεται σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ κλίμα, έδαφος, βροχοπτώσεις, υψόμετρο, κ.α) σε σχέση με άλλα δέντρα της ίδιας ποικιλίας.

## 1.5 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ

Για την ταξινόμηση και την ταυτοποίηση των διαφόρων καλλιεργούμενων ποικιλιών ελιάς χρησιμοποιούνται διάφορα κριτήρια, τρόποι, μέθοδοι ή τεχνικές. Στο σημείο αυτό είναι ίσως σκόπιμο να διευκρινίσουμε τους όρους "ταξινόμηση" και "ταυτοποίηση".

Συγκεκριμένα, ο όρος ταξινόμηση αναφέρεται στην κατάταξη μιας ποικιλίας σε κάποια ομάδα ή κατηγορία ποικιλιών με βάση βοτανικά, μορφολογικά ή άλλα αγρονομικά κριτήρια ή γνωρίσματα. Ο όρος ταυτοποίηση αναφέρεται στην διαδικασία διάκρισης μιας ποικιλίας από οποιαδήποτε άλλη. Η διαδικασία αυτή μπορεί να χρησιμοποιεί οποιοδήποτε τρόπο, κριτήριο, μέθοδο ή τεχνική που επιτρέπει να ξεχωρίσουμε δύο οποιοσδήποτε ποικιλίες μεταξύ τους έστω και εάν ανήκουν στην ίδια ομάδα ταξινόμησης.

### Ταξινόμηση ποικιλιών.

Παραδοσιακά οι καλλιεργούμενες ποικιλίες ανάλογα με την χρήση του παραγόμενου ελαιοκάρπου, ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες :

- (1). Ποικιλίες ελαιοποιήσιμης ελιάς. Είναι συνήθως μικρόκαρπες έως μεσόκαρπες με μεγάλη περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι.
- (2). Ποικιλίες επιτραπέζιας ή βρώσιμης ελιάς. Είναι γενικά μεγαλόκαρπες ή μεσόκαρπες με σαρκώδες μεσοκάρπιο.

Κάποιες ποικιλίες της μιας ή της άλλης ομάδας σε ορισμένες περιπτώσεις ή περιοχές είναι μικτής χρήσης.

Άλλα βοτανικά, μορφολογικά, ή αγρονομικά κριτήρια ταξινόμησης και περιγραφής των ποικιλιών ελιάς είναι :

- Ο τύπος της βλάστησης ( ορθόκλαδη, πλαγιόκλαδη, ζυγηρή κ.λπ.).

- Βοτανικά ή άλλα γνωρίσματα του άνθους (αυτοασυμβίβαστο, αυτόστειρο, μέγεθος).
- Τα μορφολογικά γνωρίσματα του φύλλου ( σχήμα, μέγεθος, χρώμα κ.λπ.).
- Τα μορφολογικά και ποιοτικά γνωρίσματα του καρπού και του πυρήνα ( σχήμα, μέγεθος, χρώμα, σχέση σάρκας προς πυρήνα, "γλυφές" πυρήνα, περιεκτικότητα σε λάδι κ.λπ.).
- Οικολογικές απαιτήσεις και συμπεριφορά στην καλλιεργητική τεχνική ( αντοχή στο ψύχος, ξηρασία, πρωιμότητα, ειδική προσαρμοστικότητα, ειδικές απαιτήσεις καλλιεργητικής τεχνικής κ.λπ.).

### **Ταυτοποίηση ποικιλιών**

Η οποιαδήποτε διαδικασία ( κριτήριο, τρόπος, μέθοδος ή τεχνική) ταυτοποίησης μιας ποικιλίας για να είναι αξιόπιστη θα πρέπει να συγκεντρώνει τα εξής χαρακτηριστικά :

- α) Ακρίβεια και επαναληψιμότητα του αποτελέσματος ταυτοποίησης υπό οποιεσδήποτε συνθήκες καλλιέργειας ή γεωργικής εκμετάλλευσης μιας ποικιλίας.
- β) Ικανότητα διάκρισης φαινοτυπικών παραλλαγών μιας ποικιλίας με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο.
- γ) Ικανότητα ταυτοποίησης διαφορετικών φαινοτύπων με το ίδιο γενετικό υπόβαθρο.

Στην διαδικασία διάκρισης ή ταυτοποίησης των καλλιεργούμενων ποικιλιών ελιάς ή γενικότερα φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού, σήμερα έχουμε την δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε διάφορα κριτήρια ( δείκτες) που εντάσσονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες:

**1<sup>η</sup> Κατηγορία:** Περιλαμβάνει όλους τους συμβατικούς τρόπους και τα αντίστοιχα κριτήρια ( φαινοτυπικούς δείκτες) διάκρισης-ταυτοποίησης των ποικιλιών. Στην περίπτωση των καλλιεργούμενων ποικιλιών ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί για τον σκοπό αυτό διάφορα, μορφολογικά κυρίως, γνωρίσματα όπως :

- μέγεθος φύλλου

- σχήμα και βάρος καρπού
- σχήμα πυρήνα
- αριθμός και βάθος "γλυφών" του πυρήνα
- σχέση σάρκας / πυρήνα στον καρπό
- γενετική εμφάνιση και άλλα χαρακτηριστικά βλάστησης του δέντρου κ.λπ.

( Σαρακωμένος 1920, Κριμπάς 1922, Αναγνωστόπουλος 1939, Morettini & Armellini 1954, Elant 1956, κ.α όπως αναφέρει ο Ποντίκης 1999, σελ.99).

**2<sup>η</sup> Κατηγορία:** Περιλαμβάνει εργαστηριακές τεχνικές ηλεκτροφόρησης για ανάλυση πολυμορφικών ενζυμικών συστημάτων ( ισοενζύμων) τα οποία χρησιμοποιούνται ως βιοχημικοί δείκτες έκφρασης αντίστοιχων γονιδιακών τόπων.  
( Pontikis, Loukas and Kousounis 1980).

#### ΤΕΧΝΙΚΗ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο εφαρμογής σε ένα μεγάλο πλήθος βιολογικών επιστημών. Η αναλύση ισοενζύμων είναι ένας τύπος ηλεκτροφόρησης με σημαντική συνεισφορά στη συστηματική και εξελικτική βιολογία όπως επίσης και στη γεωργία. Τα ισοένζυμα είναι διαφορετικοί τύποι ενός ενζύμου, οι οποίοι καθορίζονται από δομικά γονίδια σε διαφορετικούς γονιδιακούς τόπους. Τα αλλοένζυμα είναι διαφορετικοί τύποι ενός ενζύμου, οι οποίοι καθορίζονται από διαφορετικά αλληλόμορφα σε έναν συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο.

Τα διαφορετικά ισοένζυμα ενός ιστού αναγνωρίζονται με την ανάλυση εκχυλισμάτων του ιστού σεε διάφορα είδη πηκτής και χρώση με ειδικές χρωστικές,εξειδικευμένες για διαφορετικά ένζυμα. Τα ισοένζυμα, ως πρωτεΐνες, αντανακλούν απευθείας τις τροποποιήσεις στην αλληλουχία του DNA ως αλλαγές στη συσταση των αμινοξέων, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές στο φορτίο ή και στη διαμόρφωση του ενζύμου με αποτέλεσμα αλλαγές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα του ενζύμου.

Τα αλλοένζυμα κληρονομούνται με απλό Μεντελικό τρόπο, εμφανίζουν συνεπικρατούσα έκφραση, και απουσία πλειοτροπικών και επιστατικών αλληλεπιδράσεων, χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την διαπίστωση των



αλληλομορφικών συχνοτήτων σε έναν πληθυσμό φυτών, σε ένα είδος κτλ. Από τα δεδομένα αυτά, είναι δυνατόν να ποσοτικοποιήσουμε τις ομοιότητες και διαφορές στα άτομα ενός πληθυσμού, ομάδων πληθυσμών, ειδών κτλ. Η ηλεκτροφόρηση επίσης επιτρέπει την εξακρίβωση του αριθμού των ισοενζύμων (και άρα και τον αριθμό των γονιδιακών τόπων) των συγκεκριμένων ενζύμων που περιλαμβάνονται στην κάθε μελέτη. Οι Hubby & Lewontin έδειξαν ότι η ανάλυση με ηλεκτροφόρηση μπορεί να αποκαλύψει γενετικό πολυμορφισμό και οδήγησε στην καθιέρωση των ισοενζύμων ως σημαντικούς γενετικούς δείκτες στην πληθυσμιακή βιολογία.

Παρά όμως τη μεγάλη και επιτυχή χρήση των ισοενζύμων ως γενετικοί δείκτες, ο μικρός αριθμός ενζύμων που αναλύονται κάθε φορά δεν είναι αντιπροσωπευτικό δείγμα των ολικών πρωτεϊνών ενός οργανισμού.

Η χρήση των ισοενζύμων στην Γενετική μας έδωσαν πληροφορίες που βοήθησαν να κατανοήσουμε πολύ περισσότερο την ποικιλομορφία που εμφανίζεται και κληρονομείται μεταξύ φυτικών πληθυσμών.

Οι αναλύσεις ισοενζύμων και αλλοενζύμων διασαφίνισαν: την κλωνική απόκλιση στα απομικτικά κύτταρα (Lyman & Ellstrand, 1984), την ροή γονιδίων δια μέσω γύρης (Smyth & Hamrick 1987, Kirkpatrick & Wilson 1988), βοηθητικούς τρόπους και συστήματα πολλαπλασιασμού (Brown & Allard 1970, Schoen 1982, Meagher 1986, Soltis & Soltis 1987), τις φυλογενετικές σχέσεις (Gottlieb & Weeden 1979, Crawford & Smith 1984), καθώς και αλληλεπιδράσεις φυτών και εντόμων (Sturgeon & Mitton 1986). Η μέθοδος αυτή έχει επίσης χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την μελέτη σχέσεων μεταξύ φαινοτύπου και περιβάλλοντος (Kahler et al. 1980), καθώς και της ποικιλομορφίας με την ενδημικότητα (Ledig & Conkle 1983, Karron 1987, Carulli & Fairbrithers 1988, Nickrent & Wiens 1989). Βάση αυτής της τεχνικής εξετάστηκε επίσης ο συσχετισμός της μορφολογίας ή της κυτολογίας με τον πολυμορφισμό σε πληθυσμούς άγριων και καλλιεργούμενων φυτών (Kesseli & Jain 1984, Bretting et al. 1987). Πολύ λιγότερες μελέτες έχουν γίνει πάνω στην κληρονομικότητα ομάδων ταξινόμησης (Harry 1983, Weeden & Wendel 1989).

Παρόλο που η τεχνική των Ισοενζύμων είναι χρήσιμη για την ταξινόμηση ποικιλιών φυτών (Weeden & Lamb 1985), ο αριθμός των προ εξέταση ποικιλιών περιορίζεται από τον αριθμό των δεικτών που μπορούν να δώσουν πληροφορίες. Οι

δείκτες αυτοί, δεν μπορούν να εκτιμήσουν με ακρίβεια όλες τις δυνατές ποικιλομορφίες που μπορεί να υπάρχουν σε κάθε γονιδίωμα.

Η τεχνική αυτή, έχει χρησιμοποιηθεί στον διαχωρισμό δύο ποικιλιών συκιάς της Τουρκίας ( Sarilop, Sarizeybek), με ανάλυση με 5 συστήματα Ισοενζύμων, σε συνδυασμό με τις τεχνικές RAPD και RFLP ( Cabrita et al. 2001).

Ισοένζυμα χρησιμοποιήθηκαν επίσης, για την αναγνώριση άλλων ποικιλιών συκιάς, για να προσδιορίσουν γενετικό συσχετισμό μεταξύ των γονοτύπων τους (Chessa et al. 1998, Elisiaro et al. 1998).

**3η Κατηγορία:** Περιλαμβάνει τεχνικές ηλεκτροφόρησης για ανάλυση τμημάτων πολυμορφικού DNA που σχετίζεται με διάφορους γονιδιακούς τόπους διασπαρμένους στο γονιδίωμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί-DNA δείκτες με μεγάλη διακριτική ικανότητα.

Στην τελευταία κατηγορία υπάγονται οι εξής τεχνικές-μέθοδοι ανάλυσης DNA :

- (1) Τεχνική ανάλυσης πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA με την χρήση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης. (Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP's).
- (2) Τεχνική ανάλυσης τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA με την χρήση PCR (Polymerase Chain Reaction-Randomly Amplified Polymorphic DNA's, PCR-RAPD).
- (3) Τεχνική ανάλυσης του πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP's).

Οι ανωτέρω τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην ταξινόμηση και ταυτοποίηση διαφόρων ποικιλιών ή γενετικών υλικών. Επίσης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για να διαπιστωθεί εάν η φαινοτυπική παραλλακτικότητα μιας ποικιλίας οφείλεται εξ'ολοκλήρου στο περιβάλλον ή εάν κατά ένα μέρος τουλάχιστον έχει ως αιτία διαφορές ως προς το γενετικό υπόβαθρο.

## **1.6            ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ (DNA) ΔΕΙΚΤΩΝ**

### **1.6.1            Τεχνική ανάλυσης πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA με την χρήση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης. (Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP's).**

Το 1985 η ανάπτυξη της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα στην ανάλυση του γονιδιώματος. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε για να αποδώσει τις αλλαγές βάσεων στις αλληλουχίες του DNA και την χειρίστηκαν ως εργαλείο στην διάγνωση γενετικών ασθενειών. Σύντομα όμως, επεκτάθηκε η εφαρμογή της στην γενετική μελέτη της ποικιλομορφίας διαφόρων οργανισμών.

Διαφορετικές μεθοδολογίες αναπτύχθηκαν με σκοπό την ανίχνευση των αλληλουχιών βάσεων ενός ενισχυμένου τμήματος διαφορετικών ατόμων με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Για παράδειγμα, με την χρήση της τεχνικής Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Διαμόρφωσης ( Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP), ή τον κατευθείαν προσδιορισμό αλληλουχιών.

Η τεχνική Πολυμορφισμού Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA μετά από πέψη ( RFLP), χρησιμοποιεί την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για να ενισχύσει συγκεκριμένα τμήματα των γονιδιωμάτων DNA διαφορετικών οργανισμών, με σκοπό να αποκαλύψει διαφορές στα ενισχυμένα αυτά τμήματα με την χρήση ενδονουκλεάσεων περιορισμού, υποδεικνύοντας στο τέλος τους διαφορετικούς γενότυπούς τους.

Αν ειδικά χρησιμοποιηθεί σε σωστές συνθήκες μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για την ποικιλομορφία των αλληλουχιών, χωρίς την χρήση ακριβού εξοπλισμού, και σε εργαστήρια που δεν έχουν μηχανήματα ραδιενέργειας ή αυτόματου προσδιορισμού αλληλουχιών.

Οι Metais et al. (2000), χρησιμοποίησαν την τεχνική αυτή, σε συνδιασμό με αυτή των RAPDs', για την περιγραφή και ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ τύπων φασολιού *Phaseolus vulgaris* L.

Έχει χρησιμοποιηθεί επίσης, για την ταυτοποίηση κλώνων και σποροφύτων ( Nybom & Schaal 1990, Watillon et al. 1991), αν και είναι πλέον γνωστό ότι η τεχνική αυτή είναι επίπονη και δύσκολη ειδικά για μελέτες με μεγάλο αριθμό δειγμάτων ( Williams et al. 1990).

### **1.6.2 Τεχνική ανάλυσης τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA με την χρήση PCR (Polymerase Chain Reaction-Randomly Amplified Polymorphic DNA's, PCR-RAPD).**

Προς τα τέλη του 1990, δύο ομάδες ερευνητών ( Wilson & Maclelland, Williams et al.), παρουσίασαν σχεδόν ταυτόχρονα νέες τεχνικές ανάλυσης DNA που βασιζόνταν στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ήταν ικανές να παράγουν διαγνωστικά αποτυπώματα από οποιοδήποτε δείγμα γονιδιακού DNA. Αυτές οι τεχνικές απέδιδαν αποτελέσματα γρήγορα και χωρίς την χρήση ραδιενέργειας.

Και οι δύο ερευνητικές ομάδες έδωσαν ονομασίες για να περιγράψουν ουσιαστικά παρόμοιες μεθοδολογίες, όπως, Arbitrary Primed PCR ( Τυχαία εκκίνηση της PCR) και Randomly Amplified Polymorphic DNAs' ( Τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA ).

Η τεχνική των RAPDs' έγινε διάσημη στους περισσότερους ερευνητές λόγω του απλού πρωτοκόλλου της. Η τυπική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρειάζεται δύο διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια που η σύνθεση των βάσεων τους να είναι καθορισμένη σύμφωνα με την αλληλουχία των τμημάτων που πρόκειται να ενισχυθούν (σχήμα). Τα RAPDs' διαφέρουν από αυτή στο γεγονός ότι χρειάζονται μόνο ενός τυχαία επιλεγμένου ολιγονουκλεοτιδίου. Κάτω από τις συνθήκες επανασύνδεσης που χρησιμοποιούνται, αυτό το μοναδικό ολιγονουκλεοτίδιο λειτουργεί ως εκκινήτης και για την πάνω και για την κάτω αλυσίδα του DNA ( forward and reverse primer).

Η αλληλουχία κάθε εκκινήτη RAPD, είναι συνήθως επιλεγμένη τυχαία. Υπάρχει επομένως, ένας ατελείωτος αριθμός από ολιγονουκλεοτίδια που μπορούν να επιλεγθούν σαν εκκινήτες RAPD. Κάποιοι από αυτούς μπορούν να υβριδιστούν σε εκατοντάδες θέσεις εντός του DNA στόχου. Δεν μπορούν όλοι όμως, να οδηγηθούν σε

παραγωγή τμήματος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού. Για να γίνει αυτό είναι απαραίτητο ο εκκινητής να ενσωματωθεί σε δύο απέναντι θέσεις και στις δυο μονόκλωνες αλυσίδες του DNA, μέσα σε

2 kb της κάθε μιας ( το κατά προσέγγιση μέγιστο μέγεθος από ένα τμήμα DNA).

Μόνο κάτω από αυτές τις προϋποθέσεις μπορεί να παραχθεί τυχαίο τμήμα DNA αφού έχει δημιουργηθεί πρώτα ενίσχυση του τμήματος αυτού. Η ικανότητα των RAPDs' να παράγουν τυχαία κομμάτια ενισχυμένου DNA χρησιμοποιώντας έναν μόνο εκκινητή, καθιστά εύκολη την παραγωγή τμημάτων DNA, έχοντας χρησιμοποιήσει συγκριτικά πολύ μικρό αριθμό εκκινητών σε σχέση με άλλες μεθόδους ( π.χ. PCR-RFLP). Τα τμήματα αυτά συνήθως παράγονται από διαφορετικές περιοχές του ίδιου γονιδιώματος. Άρα πολλές θέσεις των κλώνων του DNA μπορούν να εξεταστούν ταχύτατα.

Η σημαντικότητα της τεχνικής RAPD, γίνεται πιο κατανοητή, όταν χρησιμοποιείται για την σάρωση των γονιδιωμάτων του DNA, με σκοπό την εξέταση της ποικιλομορφίας των αλληλουχιών αυτών σε διαφορετικά άτομα. Η ποικιλομορφία των αλληλουχιών του γονιδιώματος διαφορετικών ατόμων, εκφράζεται από τα διαφορετικά προϊόντα της ενίσχυσης που εξετάζονται. Δηλαδή, από τα διαφορετικά αποτυπώματα που εμφανίζονται κατά την ανάλυση των προϊόντων ενίσχυσης, με πηκτή αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση.

Η τεχνική RAPD χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πλυθησμών με ανομοιόμορφους αλληλομόρφους, με παραγωγή μοριακών δεικτών συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος, χωρίς να χρειάζεται αναλυτική γενετική χαρτογράφηση. Γονότυποι π.χ. δέντρων που μοιράζονταν τους ίδιους γονείς, ή ακόμα και έναν κοινό γονέα, έχουν την τάση να ομαδοποιούνται. Οι δείκτες RAPD, όμως, έχουν την ικανότητα να ελέγχουν και να διαχωρίζουν γονοτύπους, ακόμα και αυτών που έχουν στενή συγγένεια. Συνήθως η γενετική ομοιομορφία που αποκομίζουμε με την τεχνική RAPD, συμφωνεί με τις ήδη γνωστές πληροφορίες για την καταγωγή του εξεταζόμενου φυτού π.χ. Nicese et al. 1998, κ.α. Η ανάλυση του πολυμορφισμού των ποικιλιών διαφόρων φυτών, παράγει έναν συγκεκριμένο τρόπο ανάλυσης που ονομάζεται δεντρόγραμμα και ταξινομεί τις ποικιλίες αυτές με την γνωστή καταγωγή όπως προβλέπεται από την χαρτογράφηση των γονιδίων τους, με ελάχιστες εξαιρέσεις ( Lemme et al. 1992).

Η τεχνολογία RAPD μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλέον σε καινούρια προγράμματα πολλαπλασιασμού και βελτίωσης, επιτρέποντας την αναγνώριση νέων ποικιλιών καθώς και την αξιολόγηση της γενετικής ομοιομορφίας μεταξύ γονοτύπων που θα βοηθούσε να επιλεχθούν οι καλύτεροι γονείς για να αποκομίσουμε νέους γενετικούς συνδιασμούς ( Nicese et al. 1998).

Παραδείγματα της πολλαπλής χρήσης της τεχνικής RAPD είναι η αναγνώριση ποικιλιών ( Yang & Quiros 1993), ο καθορισμός γενών ( Elisario et al. 1999), η εκτίμηση γενετικής συγγένειας ( Nicese et al. 1998), η εκτίμηση πλυθησμών με γενετική ποικιλομορφία (Harrish et al. 1997), και πολλά άλλα.

Μέχρι τώρα έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για ανίχνευση πολυμορφισμού στο καλαμπόκι ( Shattuck-Eidens et al. 1990), στο σιτάρι ( D'Ovidio et al. 1990), στο κριθάρι ( Weining & Langride 1991), στο κακάο ( Wilde et al. 1992), στο σταφύλι ( Gogorcena et al. 1993), και σε άλλους καρπούς.

Πιο συγκεκριμένα, οι Lemme et al. (1992), εφάρμοσαν την τεχνική RAPD για να αναλύσουν σχέσεις μεταξύ 10 ποικιλιών παπάγιας, χρησιμοποιώντας 11 εκκινητές 10-βάσεων.

Οι Koller et al. (1992), διαφοροποίησαν 11 ποικιλίες μήλων με την ίδια τεχνική.

Στην σουκιά, οι Khadari et al. (1994), χρησιμοποίησαν την τεχνική RAPD, διαλέγοντας 12 εκκινητές και 19 δείκτες RAPD. Η γενετική ποικιλομορφία που παρατηρήθηκε εδώ, δεν ήταν χωρισμένη σε ευδιάκριτες υποομάδες, ίσως επειδή δημιουργήθηκε ροή γενετικής πληροφορίας ανάμεσα στις ποικιλίες.

Οι Nicese et al. (1997), με χρήση 72 10μερών εκκινητών, χώρισαν σε δυο ομάδες 19 διαφορετικούς γονοτύπους καρυδιάς, των οποίων οι διαφορές τους είχαν σχέση με την καταγωγή τους.

Οι Wiesman et al. (1998), έκαναν γονιδιακό χαρακτηρισμό σε ποικιλίες ελιάς που καλλιεργούνται στο Ισραήλ και στην Δυτική Όχθη, χρησιμοποιώντας δείκτες RAPD.

Στην Τουρκία οι Cabrita et al. (2000), κατάφεραν με την χρήση 32 10μερών εκκινητών με ανάλυση RAPD, να διαχωρίσουν 11 δέντρα-κλώνους σουκιάς ποικιλίας Sarilor, σε δύο γκρουπ με γενετική ομοιότητα.

Οι Metais et al. (2000), διαχώρισαν τους γονοτύπους 24 τύπων φασολιού *Phaseolus vulgaris* L., μόνο με 7 εκκινητές. Οι αναλύσεις αυτής της έρευνας οδήγησαν στην ομαδοποίηση των φασολιών βάση γεωγραφικής τους καταγωγής.

Εξετάστηκε επίσης, γενετική συγγένεια μεταξύ 85 τύπων *Lansium domesticum* (τροπικό φρούτο Μαλαισίας), από τους Song et al. (2000), και χώρισε τα δείγματα σε τρεις ομάδες με ίδια γενετικά χαρακτηριστικά.

Πρέπει να τονίσουμε ότι αν και η τεχνική αυτή φαίνεται απλή, τα αποτελέσματα που παίρνουμε μπορούν να αναπαραχθούν μόνο με προσεχτική και λεπτομερή εργασία στο εργαστήριο, και ακολουθώντας πιστά τις διαδικασίες του πρωτοκόλλου!

Welsh J & McClelland (1990), WilliamsJGK et al. (1990), Stiles et al. (1993), Orozco-Castillo et al. (1994), Hemmat et al. (1994), Cai Guy & Moore (1994), Michelmores et al. (1991), Rieder & Rieder (1990), Erlich et al (1991).

### **1.6.3 Τεχνική ανάλυσης του πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP's).**

Η τεχνική AFLPs' που αναπτύχθηκε από την KEYGENE, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την εκτίμηση της γενετικής ποικιλομορφίας κατά την εξέταση της βιοποικιλότητας διαφόρων οργανισμών.

Ανάμεσα στις πιο συχνές εφαρμογές των δεικτών της AFLP, είναι η ταυτοποίηση ποικιλιών ( Kim et al. 1998), ο χαρακτηρισμός του βλαστικού τους πλάσματος ( Cervera et al. 1998), η εκτίμηση και ο προσδιορισμός της γενετικής ποικιλομορφίας ( Zhu et al. 1998), και οι βιοσυστηματικές μελέτες ( Kardolus et al. 1998).

Σε σύγκριση με την τεχνική της RFLP, η AFLP είναι γρηγορότερη, χρειάζεται λιγότερες διαδικασίες και δίνει περισσότερα αποτελέσματα. Και οι δύο τύποι δεικτών RAPD και AFLP θεωρητικά επιτρέπουν την ισότιμη εκτίμηση του γονιδιώματος του DNA, ανεξάρτητα από την θέση του μέσα στα χρωμοσώματα ή των ιδιομορφιών τους στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Όμως, η υψηλότερη αναλογία των δεικτών της AFLP τους κάνει ικανότερους να διαχωρίσουν γονοτύπους με στενότερη συγγένεια

μεταξύ τους, π.χ. διαφορετικά δέντρα μέσα στην ίδια ποικιλία, που έχουν απόκλιση μόνο κάποιες μικρές μεταλλάξεις και παρουσιάζουν ελάχιστες γενετικές διαφορές. Ένα ακόμα πλεονέκτημα της σε σχέση με τα RAPDs, είναι η πολύτιμη παραγωγικότητά της, ειδικά όταν θέλουμε να καθορίσουμε τις πληροφορίες που αποκομίζουμε από την σάρωση. Το ίδιο αναγκαία είναι όταν πρέπει να συγκρίνουμε αποτελέσματα μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων. Ωστόσο, χρησιμοποιείται λιγότερο αφού οι δείκτες της είναι περίπλοκοι, χρειάζεται περισσότερες γνώσεις των ερευνητών που την χρησιμοποιούν, και απαιτούνται κατάλληλες συνθήκες για την φθοριομέτρηση και την ραδιενεργό ανίχνευση.

Το 2000, σε έρευνα που έγινε στην Τουρκία από τους Cabrita et al., χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο τεχνικές σε συνδυασμό, για τον διαχωρισμό 12 δέντρων συκιάς ποικιλίας Sarilor και Sarizeybek. Στην αρχή η ανάλυση της RAPD, κατέταξε τα δέντρα σε δύο ομάδες με γενετική ομοιότητα. Στην συνέχεια, με την τεχνική της AFLP και με χρήση 8 συνδυασμένων εκκινήτων, βρέθηκε η γενετική συγγένεια που είχαν μεταξύ τους όλα τα δέντρα.

Η τεχνική AFLP βασίζεται στην ενίσχυση τμημάτων DNA διαφορετικού μήκους, αφού το μήκος αυτό μπορεί να διαφέρει κατά την ενίσχυση της ποικιλομορφίας οργανισμών.

Πολλές φορές το γονιδιακό DNA αρχικά υφίσταται πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού, προτού πραγματοποιηθεί η ενίσχυση των τμημάτων.

Τα ενισχυμένα αυτά τμήματα των οργανισμών μπορούν τελικά να αναλυθούν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με ηλεκτροφόρηση, η οποία επιτρέπει τον διαχωρισμό των τμημάτων, ακόμα και αυτών που διαφέρουν κατά μία βάση. (Zabeay (1993), Vow et al. (1995), Tanksley et al. (1989), Williams et al. (1990), Sommer & Tautz (1989)).



## 1.7

## ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως ήδη αναφέραμε, στην πρώτη παρατήρηση που έγινε σε διαφορετικά δέντρα, όλα ποικιλίας Καλαμών, βρέθηκαν διαφορές (σε μέγεθος, χρώμα, υφή, σχήμα κ.α.), του ενδοκαρπίου, της δρύπης, του σπέρματος και των φύλλων των δέντρων αυτών. Θεωρήθηκε λοιπόν δεδομένη, η ύπαρξη παραλλακτικότητας μεταξύ των δέντρων που εξετάστηκαν (ΕΙΚΟΝΕΣ 1 ΚΑΙ 2).

Τα προβλήματα και τα ερωτήματα που γεννήθηκαν μετά την πρώτη αυτή παρατήρηση ήταν πολλά. Με την εργασία που ακολούθησε καλούμασταν να απαντήσουμε στα ερωτήματα αυτά. Αρχικά ήταν απαραίτητο να βρεθεί το μέγεθος της παραλλακτικότητας μεταξύ των επιλεγμένων δειγμάτων καθώς και κατά πόσο αυτή η παραλλακτικότητα οφειλόταν σε γενετική ποικιλότητα των δέντρων.

Ένας άλλος προβληματισμός, ήταν το αν συνεισφέρουν στην γενετική παραλλακτικότητα και σε τι βαθμό, οι διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως π.χ μικροκλίμα και κλίμα περιοχής, έδαφος, υψόμετρο, καλλιεργητικές μέθοδοι. Κατά πόσο δηλαδή, αυτές οι διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης ενός δέντρου μπορούν να επηρεάσουν τον φαινότυπό του.

Έπρεπε επίσης να αποδειχτεί με επιστημονικό τρόπο η γενετική απόσταση (εάν υπήρχε) μεταξύ μητρικών δέντρων και δέντρων με ντόπια εμβόλια, καθώς και αυτών που είχαν εμβολιαστεί με υποκείμενα από φυτώρια άλλων περιοχών. Πολύ χρήσιμο θα ήταν να γνωρίζαμε και τις συγγένειες των δέντρων μεταξύ τους, καθώς και κατά πόσο θα μπορούσαν να διαχωριστούν δέντρα που μοιράζονταν τους ίδιους γονείς ή ακόμα και έναν κοινό γονέα.

Τέτοια ερωτήματα θα μπορούσαν να βρουν την απάντησή τους με την χρήση μοριακών τεχνικών, δηλαδή χαρακτήρων ελεγχόμενων από τον μηχανισμό κληρονομικότητας. Για την ακρίβεια, μόνο με τις μοριακές τεχνικές είναι δυνατόν να ξεχωρίσουμε χαρακτηριστικά που οφείλονται στην επίδραση του περιβάλλοντος από αυτά που οφείλονται αποκλειστικά στο γενότυπο του δέντρου. Μόνο με αυτές τις τεχνικές, ομαδοποιούνται τα δέντρα που μοιράζονται τους ίδιους γονείς και στην

συνέχεια διαχωρίζονται οι γονότυποι τους, ακόμα και αυτών με στενή συγγένεια και να καθοριστούν οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ δέντρων με σύγκριση των γονοτύπων τους.

**ΜΕΡΟΣ Β**

**( ΕΙΔΙΚΟ)**

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Στο κεφάλαιο που θα ακολουθήσει γίνεται μια αναφορά στα υλικά και τις μεθόδους που θα χρησιμοποιηθούν στην μοριακή τεχνική της RAPD ( κεφ 1.6.2) που επιλέχθηκε ως η καλύτερη για να απαντηθούν τα ερωτήματα που έχουν δημιουργηθεί, στην μέχρι τώρα μελέτη, όπως αναφέρονται στο Κεφ.1.7.

Πριν όμως, πρέπει να γίνει μια αναφορά στα δέντρα ποικιλίας "Καλαμών" που επιλέχθηκαν να εξεταστούν και βάση ποιών κριτηρίων συνέβη αυτό.

#### **2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ**

Μια από τις βασικότερες διαδικασίες της δειγματοληψίας είναι η επιλογή των δειγμάτων. Είναι πολύ σημαντικό τα δείγματα που θα επιλεγούν να είναι αντιπροσωπευτικά αλλά και τυχαία έτσι ώστε τα αποτελέσματα που θα προκύψουν να είναι έγκαιρα και αξιόπιστα.

Αρχικά καθορίστηκε η περιοχή από την οποία θα γινόταν η δειγματοληψία. Ήταν οι νομοί Μεσσηνίας και Λακωνίας, λόγω εύκολης πρόσβασης στις περιοχές αυτές, καθώς και λόγω του μεγάλου αριθμού ελαιώνων που καλύπτουν μεγάλες αγροτικές εκτάσεις.

Στην συνέχεια, τα χωριά του νομού αυτού χωρίστηκαν με κριτήριο το υψόμετρό τους, σε πεδινά, σε ορεινά και σε ημιορεινά. Συλλέχθηκε αντιπροσωπευτικό δείγμα και από τις τρεις κατηγορίες.

Οι ήδη επιλεγμένοι συστηματικοί ελαιώνες διαχωρίστηκαν σε : α) αρδευόμενους, όπως αυτούς που βρίσκονται στην Βελίκα και στην Πεταλιδόστρατα, β) ημιαρδευόμενους, παράδειγμα οι ελαιώνες που επιλέχθηκαν στο Αχλαδοχώρι, στην Έβα, αλλά και στην Καλαμάτα, και σε γ)ξηρικούς, όπως της Φοινικούντας, της Πύλου και της Σπάρτης.

Για να είναι όμως αντιπροσωπευτικό το σύνολο των δειγμάτων έπρεπε να επιλεγούν και δέντρα που δεν ανήκαν σε ελαιώνες, αλλά ήταν μεμονωμένα, όπως αυτά

που βρέθηκαν στο Τρίκορφο, στο Χαροκοπειό, στο Βασιλίτσι κ.α. καθώς και δέντρα που ανήκαν σε συστάδες όπως το δείγμα που συλλέχθηκε στην Φοινικούντα.

Το επόμενο βήμα ήταν να χωρίσουμε σε κατηγορίες τα δέντρα που βρίσκονταν μέσα στους ελαιώνες που είχαμε επιλέξει, με κριτήριο αρχικά την ηλικία τους. Ένα από τα πιο "γηραιά" δέντρα βρέθηκε στο Κακόρεμα, ενώ από τα πιο νεαρά που επιλέχθηκαν ήταν στην Γλυφάδα.

Άλλο κριτήριο διαχωρισμού των δέντρων, ήταν η προέλευση του υλικού που έφεραν ως εμβόλιο, ή αν ακόμα ήταν μητρικό δέντρο όπως αυτό του Ινστιτούτου Ελαίας και Οπωροκηπευτικών στην Καλαμάτα. Έπρεπε να μελετηθούν όλα τα διαφορετικά εμβόλια που εντοπίστηκαν, όπως αυτό από την Σκάλα Λακωνίας που βρέθηκε σε αγριελιά στην Βελίκα, εμβόλια από το Μεσολόγγι που ήταν σε αγριελιά της Ελληνοεκκλησίας, καθώς και εμβόλια από το Κ.Ε.Γ.Ε σε αγριελιά της Γλυφάδας, κ.α.

Πιο συνοπτικά, τα δέντρα που επιλέγονταν μέσα στους ελαιώνες αλλά και έξω από αυτούς, είχαν κυρίως τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- αιωνόβια και/ή μεγάλης ηλικίας (ΕΙΚΟΝΑ 1Δ)
- γνωστής καταγωγής
- αγριλιές με εμβόλια που προέρχονταν από φυτώρια διαφορετικών περιοχών
- δέντρα που ανήκουν σε συστηματικούς ελαιώνες, αρδευόμενους και ξηρικούς
- απομονωμένα, ξηρικά
- δέντρα προερχόμενα από σπόρο (ΕΙΚΟΝΑ 1Β)
- κλώνοι, που ενώ μεγάλωσαν στην ίδια περιοχή με ίδιες κλιματολογικές συνθήκες εμφάνιζαν μεγάλες αποκλίσεις στον φαινότυπό τους.

Από τα δέντρα που επιλέχθηκαν τελικά, προέκυψε και ο παρακάτω πίνακας:

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΕΝΤΡΩΝ.**

Α/Α	ΔΕΙΓΜΑ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΗΛΙΚΙΑ	ΤΥΠΟΣ ΕΛΑΙΩΝΑ Ή ΔΕΝΤΡΟΥ	ΟΝΟΜΑ ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΥΛΙΚΟΥ
1	H5	Πεταλιδόστρατα	>150	αρδευόμενο, μεμονωμένο	Λογιώτης	ντόπιο
2	ΚΛ1	Βελίκα		αρδευόμενο, συστηματικός	Γεωπονική σχ.	μητρικ. Καλαμ.
3	I11	Κακόρεμα	>1000	ξηρικό, μεμονωμ. μητρικό		εμβ.σε αγριλιά
4	I3	Πεταλίδι		ξηρικό, μεμονωμένο		
5	I6B	Αχλαδοχώρι	>25	συστηματικός, ημιαρδευόμενος	Τσικρικός	
6	B4T	Τρίκορφο	>200	ξηρικό, μεμονωμένο	Κουτέλας	εμβ.σε αγριλιά
7	B2T	Τρίκορφο	>100	ξηρικό, μεμονωμένο	Καναβός	εμβ.σε αγριλιά
8	B1	Ελληνοεκκλησιά	10	αρδευόμενος	Κωνσταντόπουλος	Δενδρύλια Νίκου
9	I22	Χαροκοπειό	80-100	ξηρικό, μεμονωμένο	Γιαλέλης	
10	E2	Βελίκα	2	συστηματικός,αρδευόμενος	Λυκοτραφήτης	Σκαλ. Λακωνίας
11	Θ5	Φοινικούντα	25-30	ξηρικό, συστάδα δέντρων		
12	I6B	Αχλαδοχώρι	>25	συστηματικός, ημιαρδευόμενος	Τσικρικός	
13	Θ4 χ. SDS	Πύλο	>100	ξηρικό		
14	Θ10	Βασιλίτσι	20	ξηρικό, μεμονωμένο		
15	Γ1	Τρίκορφο	>50	ξηρικό, μεμονωμένο	Νικολόπουλος	ντόπιο
16	B3T	Τρίκορφο	>100	ξηρικό, μεμονωμένο	Κοντούλης	εμβ.σε αγριλιά
17	B3	Ελληνοεκκλησιά	30+	ξηρικό	Γούλιας	μεσολόγγι
18	H3	Πεταλιδόστρατα	30	συστηματικός,αρδευόμενος	Λογιώτης	Δενδρ. Μεσσολ.
19	E11	Γλυφάδα	2		Αποστολόπουλος	Εμβ. απο Κ.Ε.Γ.Ε
20	E1	Βελίκα	30	συστηματικός,αρδευόμενος	Λυκοτριφήτης	μεσολόγγι
21	Θ4	Πύλο	>100	ξηρικό		
22	B2	Ελληνοεκκλησιά	10	αρδευόμενος	Κωνσταντόπουλος	εμβ.σε αγριλιά
23	I61	Αχλαδοχώρι	>25	συστηματικός, ημιαρδευόμενος	Τσικρικός	
24	I62	Αχλαδοχώρι	>25	συστηματικός, ημιαρδευόμενος	Τσικρικός	
25	I21	Κορώνη	>80	ξηρικό, μεμονωμένο	Δαριατάκος	
26	K3	Σπάρτη	μεγάλης	ξηρικό		
27	K2	Σπάρτη	μεγάλης	ξηρικό		
28	K1	Σπάρτη	μεγάλης	ξηρικό		
29	K4	Σπάρτη	μεγάλης	ξηρικό		
30	Δ2(2)	Αριστομένη	>25	ξηρικό, μεμονωμένο	Βασιλόπουλος	εμβ.σε αγριλιά
31	Δ2(1)	Αριστομένη	>25	ξηρικό, μεμονωμένο	Βασιλόπουλος	εμβ.σε αγριλιά

32	E1(1)	Καλαμάτα		συστηματικός, ημιαρδευόμενος	Γεωπονική σχ.	μητρικό Καλαμ.
33	E1(2)	Καλαμάτα		συστηματικός, ημιαρδευόμενος	Γεωπονική σχ.	μητρικό Καλαμ.
34	M1	Καλαμάτα	>1000	Ξηρικό, μεμονωμένο	Ινστιτούτο Ε.	μητρικό
35	M2	Καλαμάτα	>1000	Ξηρικό, μεμονωμένο	Ινστιτούτο Ε.	μητρικό
36	ΚΛ(1)	Καλαμάτα	>25	συστηματικός, ημιαρδευόμενος	Ινστιτούτο Ε.	μητρικό Καλαμ.
37	ΚΛ(2)	Καλαμάτα	>25	συστηματικός, ημιαρδευόμενος	Ινστιτούτο Ε.	μητρικό Καλαμ.
38	E2(1)	Καλαμάτα		συστηματικός, ημιαρδευόμενος	Γεωπονική σχ.	μητρικό Καλαμ.
39	E2(2)	Καλαμάτα		συστηματικός, ημιαρδευόμενος	Γεωπονική σχ.	μητρικό Καλαμ.
40	KP1	Καλαμάτα	>25	συστηματικός, ημιαρδευόμενος	Ινστιτούτο Ε.	μητρικό Καλαμ.
41	KP2	Καλαμάτα	>25	συστηματικός, ημιαρδευόμενος	Ινστιτούτο Ε.	μητρικό Καλαμ.

Στην συνέχεια από το κάθε δέντρο από αυτά, πάρθηκε δείγμα 20 με 30 νεαρών φύλλων, καθώς και 5 καρπών που τοποθετήθηκαν σε χάρτινο σακουλάκι, με πλήρη χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων του κάθε δέντρου, της καταγωγής των, καθώς και των συνθηκών καλλιέργειάς των.

Τα σακουλάκια με τα δείγματα συγκεντρώθηκαν σε ένα μεγάλο κουτί από φελιζόλ, που περιείχε παγοκύστες, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου και τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη, στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , μέχρι την επεξεργασία τους.

## 2.2      ΥΛΙΚΑ

1. Υγρό άζωτο ( liquid nitrogen).
2. Γουδί και γουδοχέρι αποστειρωμένα.
3. Μικρές σπάτουλες, μία ανά δείγμα, αποστειρωμένες.
4. Σωλήνες ( tubes), 40ml
5. Ρυθμιστικό διάλυμα Εκχύλισης DNA ( DNA Extraction Buffer).
  - α. 0,01M Tris-HCL, pH 8, αποστειρωμένο.
  - β. 0,5M NaCl, αποστειρωμένο.
  - γ. 0,05M EDTA ( disodium ethylene-diaminetetra-acetate), pH 8.
  - δ. β-μερκαπτοαιθανόλη (πιοτέ αποστείρωση).
6. 10% ( w/v), SDS ( sodium dodecyl sulphate).
7. Υδατόλουτρο στους 65°C.
8. 8M CH<sub>3</sub>COOK.
9. Φυγόκεντρος Heraeus Biofuge 28 RS.
10. Διηθητικό χαρτί, Miracloth και μικρό χωνί, ένα για κάθε δείγμα.
11. Ισοπροπανόλη.
12. Απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό ( dH<sub>2</sub>O).
13. Σωλήνες erpendorfs, αποστειρωμένοι, 1,5ml ανά δείγμα.
14. 10 mg/ml RNase.
15. Φαινόλη: Χλωροφόρμιο: Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1).
16. Φυγόκεντρος Biofuge pico, Heraeus Sepatech.
17. Χλωροφόρμιο ( CHCl<sub>3</sub>).
18. Αιθανόλη 100%.
19. Αιθανόλη 70%.
20. TE low :
  - a. 10mM Tris-HCl pH 8.
  - b. 1mM EDTA.



- |     |                              |                          |
|-----|------------------------------|--------------------------|
| 21. | Ρυθμιστικά διαλύματα TAE:    | TBE:                     |
|     | <u>50 x TAE pH 8. 500ml:</u> | <u>10 x TBE 1000ml :</u> |
|     | a. Tris-base 121gr           | Tris 108gr               |
|     | b. Acetic acid 28,55gr       | Boric Acid 55gr          |
|     | c. EDTA 30ml                 | EDTA 9,3 gr              |
22. Συσσκευές ηλεκτροφόρησης Biorad, Horizon 11,14 και Horizon 58.
23. Αγαρόζη για παρασκευή πηκτής ( χρήση στην συσκευή ηλεκτροφόρησης).<sup>1</sup>
24. Φασματοφωτόμετρο Hitachi, U-2001 Spectrophotometer.
25. Μηχάνημα MJ Research PTC200, PCR ( Polymerase Chain Reaction).
26. Ρυθμιστικό διάλυμα ( buffer), με Μαγνήσιο.<sup>2</sup>
27. Διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων αποτελούμενο από 200μM από την κάθε βάση ( dATP, dCTP, dGTP, TTP).
28. 35μl εκκινήτες ( primers) 04, 10, 12, 18, με αλληλουχίες:  
 04: 5'GGACTGGAGT-3  
 05: 5'TGCGCCCTTC-3  
 12: 5'CCTTGACGCA-3  
 18: 5'CCACAGCAGT-3
29. Ένζυμο πολυμεράσης ( Taq) 5 units/μl, GiBCO.
30. Διάλυμα φόρτωσης ( loading dye), χρωστική :
- |    |               |                                |
|----|---------------|--------------------------------|
| α. | 144gr γλυκίνη | 0,25% ( w/v) Bromophenol blue. |
| β. | 30,25g/l Tris | 0,25% ( w/v) cyanol.           |
| γ. | 10g/l SDS     | 40% ( w/v) Sucrose.            |
31. Ρύγχη ( tips) αποστειρωμένα και πιπέτες.
32. Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου, 5 mg/ml.
33. Συσσκευή U.V ( U.V transilluminator) Consort TFX-20M power 180w.

<sup>1</sup> Εκτός από πηκτή αγαρόζης έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε πειράματα, πηκτή πολυακρυλαμίδης σε περιεκτικότητα 4 ως 8%. Το βασικό της πλεονέκτημα είναι η μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα ειδικά σε θέσεις 50 με 200bp.

<sup>2</sup> Η συγκέντρωση Μαγνησίου στο ρυθμιστικό διάλυμα, μπορεί να ποικίλει από 2 ως 6. Η μέγιστη συγκέντρωση πρέπει να καθορίζεται για κάθε νέο είδος χρησιμοποιώντας επιλεγμένους εκκινήτες (Rieber & Rieber, 1990).

## 2.3            ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.3.1        Εκχύλιση DNA από φυτικό ιστό

1. Ζυγίζεται 1gr φυτικού ιστού από κάθε δείγμα ελιάς. Λειοτριβείται με υγρό άζωτο, μέσα σε αποστειρωμένο γουδί.<sup>3</sup>
2. Ο λειοτριβούμενος ιστός μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρησης ( tube) των 40ml, που περιέχει 10ml ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης DNA και αναμιγνύεται για 2 λεπτά.<sup>4</sup>
3. Προστίθεται 2ml SDS<sup>5</sup> 10% ( w / v) και το δείγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο για 1 ώρα στους 65°C.
4. Ποσότητα 2ml CH<sub>3</sub>COOK 8M προστίθεται στο δείγμα και ακολουθεί ήπια ανάδευση και τοποθέτηση του δείγματος στον πάγο για 20 λεπτά.<sup>6</sup>
5. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10000 στροφές για 15 λεπτά και το υπερκείμενο διηθείται ( μέσω Miracloth) και τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα.
6. Το δείγμα συμπληρώνεται με 10ml Ισοπροπανόλη ( 0,8 φορές τον όγκο δείγματος) και τοποθετείται στους -20oC για 2 ώρες.<sup>7</sup>
7. Γίνεται φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 15 λεπτά ( 4°C) και το υπερκείμενο απομακρύνεται, ενώ το ίζημα<sup>8</sup> στεγνώνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
8. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 0,5ml αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf.
9. Προστίθεται 10μl Rnase, συγκέντρωσης 10μM και το δείγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα.

<sup>3</sup> Μέχρι να προσθέσουμε το ρυθμιστικό διάλυμα είναι πολύ βασικό να μην αφήσουμε τον ιστό να ξεπαγώσει. Το υγρό άζωτο καταστρέφει την δομή των ιστών ενώ παράλληλα σταματά την δράση των ενζύμων.

<sup>4</sup> Το διάλυμα αυτό διατηρεί τα νουκλεϊκά οξέα σε φυσιολογικά pH.

<sup>5</sup> Απορρυπαντικό που καταστρέφει τα λιπίδια.

<sup>6</sup> Το Οξικό Κάλιο προκαλεί καθίζηση RNA και πρωτεϊνών.

<sup>7</sup> Η εισαγωγή Ισοπροπανόλης προκαλεί καθίζηση του DNA.

<sup>8</sup> Το ίζημα πρέπει να είναι καθαρό. Αν είναι άσπρο περιέχει πολυσακχαρίτες, ενώ αν είναι σκούρο περιέχει φαινολικά.

10. Ακολουθεί η διαδικασία εκχύλισης με φαινόλη<sup>9</sup>:
- Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφορμίου με τον όγκο του δείγματος (εδώ 500μl). Το δείγμα αναδεύεται και φυγοκεντρείται στις 10000 στροφές για 5 λεπτά.<sup>10</sup>
  - Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf ακολουθούμενο από δεύτερη διαδικασία εκχύλισης με φαινόλη. Το υπερκείμενο συλλέγεται εκ νέο.
  - Προσθέτεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10000 στροφές για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα erpendorf.
  - Προσθέτεται αιθανόλη 2,5 φορές τον όγκο του δείγματος και αφήνεται για τουλάχιστον 2 ώρες στους -20°C.
11. Στην συνέχεια γίνεται η διαδικασία για την απομάκρυνση αλάτων
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 11000 στροφές για 15 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται.
  - Στο δείγμα προστίθεται 0,5ml αιθανόλη 70% και φυγοκεντρείται εκ νέου στις 11000 στροφές για 15 λεπτά.
  - Το υπερκείμενο απομακρύνεται ενώ το ίζημα ( DNA), στεγνώνεται σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε γνωστό όγκο TE low.

<sup>9</sup> Η διαδικασία αυτή γίνεται για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που περιβάλλουν το DNA και η RNase.

<sup>10</sup> Η φαινόλη είναι πολύ τοξική και την προσθέτουμε στους σωλήνες erpendorf πάντα στην επαγωγό χρησιμοποιώντας γάντια.

**2.3.2****ΑΝΑΛΥΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ**

Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε σε δύο φάσεις του πειράματος:

1. Μετά την εκχύλιση DNA από τους ιστούς για έλεγχο ύπαρξης ικανοποιητικής ποιότητας και ποσότητας DNA για χρήση του στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (ΕΙΚΟΝΑ 3, Α και Β).
2. Μετά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, για την ανάλυση των τμημάτων DNA που ενισχύθηκαν κατά την εφαρμογή της τεχνικής RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNAs').

**2.3.2.1****Μεθοδολογία**

1. Αγαρόζη 0,8gr διαλύεται σε 100ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για διάλυση. Αφού κρυώσει, η πηκτή αγαρόζης δημιουργείται στην ειδική θήκη της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
2. Σε κάθε δείγμα DNA προστίθονται 5μl διαλύματος φορτώσεως δειγμάτων. Από το μίγμα αυτό, 15μl τοποθετούνται στα "πηγάδια" της πηκτής και ηλεκτροφορούνται σε σταθερή τάση 50 ή 80 Volts.
3. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται μέχρι το μέτωπο της χρωστικής να "καλύψει" τα 3/4 της πηκτής αγαρόζης.
4. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα EtBr<sup>11</sup> για 40 λεπτά, και ακολουθεί αποχρωματισμός σε αραιό διάλυμα Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, για περίπου 20 λεπτά.
5. Τέλος, η πηκτή αγαρόζης φωτογραφίζεται κάτω από υπεριώδες φως.

---

<sup>11</sup> Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην δυνατότητα του βρωμιούχου αιθυδίου να φθορίζει στο υπεριώδες φως. Το EtBr παρεμβάλλεται στην δίκλωνη έλικα του DNA και η ποσότητα του φθορισμού που εκπέμπεται από το EtBr είναι ανάλογη της ποσότητας του δείγματος του DNA.

### 2.3.2.2 Τεχνική RAPDS' στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

1. Τα παρακάτω αντιδραστήρια προστίθενται για την παρασκευή διαλύματος ( Master-Mix)<sup>12</sup>, που απαιτούνται για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδραση της πολυμεράσης, χρησιμοποιούμε ανά δείγμα:
  - a. 5μl αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό.
  - b. 2,5μl ρυθμιστικού διαλύματος (buffer)
  - c. 1μl διαλύματος δεοξυνουκλεοτιδίων (από stock 200μM κάθε νουκλεοτιδίου)
  - d. 1μl εκκινητή (primer, 5pmol)
  - e. 0,5μl ένζυμο πολυμεράσης Taq 5 units/μl
2. 15μl από τα αραιωμένα δείγματα DNA τοποθετούνται σε master plate (πίνακας , το οποίο περιέχει όλα τα δείγματά μας) και καταγράφουμε την σειρά τους, έτσι ώστε να ξαναχρησιμοποιηθούν όσες φορές χρειαστεί, χωρίς να μπερδευτούν τα δείγματα μεταξύ τους.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2:** Διάταξη δειγμάτων στο master plate

	1	2	3	4	5
A	H5	I22	B3	I21	KΛ(2)
B	KΛ1	E2	H3	K3	M1
C	I11	O5	E11	K2	I22
D	I3	I6	E1	K1	BLANK
E	I6B	KP2	Θ4	K4	
F	B4T	Θ10	B2	Δ2(2)	
G	B2T	Γ1	I61	Δ2(1)	
H	B1	B3T	I62	E1(1)	

<sup>12</sup> Όταν θέλουμε να αναλύσουμε πολλά δείγματα DNA ταυτόχρονα είναι λογικό να παρασκευάζουμε και να χρησιμοποιούμε Master-Mix. Εκτός του ότι έτσι κερδίζουμε χρόνο, μειώνεται και το ποσοστό της απόκλισης, αποτέλεσμα των μικρών ποσοτήτων που μεταφέρουμε με τις πιπέτες (Erlich et al. 1991).

3. Σε κάθε οπή ενός καινούριου plate, αναμιγνύονται 24μl του παραπάνω διαλύματος αντιδραστηρίων με 1μl DNA (10ng).
4. Τοποθετείται το plate στην ειδική θέση του PTC 200 MJ Research PCR. Αρχικά πραγματοποιείται αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 3,30 λεπτά. Το μηχάνημα για 45 κύκλους ακολουθεί τις παρακάτω κυκλικούς παραμέτρους<sup>13</sup>:
 

a.	1 cycle	95oC	3,30 min
b.	1 cycle	95oC	3 min
c.	46 cycles	95oC	30 sec
		38oC	60 sec
		72oC	1,40 sec
d.	1 cycle	72oC	10min
e.	for ever	4oC	99h.

### **2.3.3. ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ DNA.**

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για τον προσδιορισμό της ποσότητας καθώς και της ποιότητας DNA των δειγμάτων. Βάση των αποτελεσμάτων του φασματοφωτόμετρου, πραγματοποιούνται οι κατάλληλες αραιώσεις έτσι ώστε όλα τα δείγματα να έχουν συγκέντρωση 10ng DNA / 1μl. Τα δείγματα αυτά θα χρησιμοποιηθούν αργότερα στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

<sup>13</sup> Διαφορετικά μηχανήματα PCR, ακόμα και αν έχουν προγραμματιστεί με τις ίδιες παραμέτρους, σπάνια θα παράγουν απaráλακτα RAPDS' προφίλ. Μικρότερες διαφορές υπάρχουν ακόμα και όταν η αντίδραση της PCR γίνει δυο φορές σε διαφορετικές θέσεις του κυκλικού block (Rieder MS & Rieder M, 1990).

### 2.3.3.1                    Μεθοδολογία

Κυβελίδα με 1μl DNA ανά 1ml νερού, τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο και διαβάζονται οι ενδείξεις του οργάνου στα 260 και 280nm. <sup>14</sup> Με βάση τις τιμές του φασματοφωτομέτρου έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις έτσι ώστε να επιτύχουμε ίδια συγκέντρωση του DNA σε όλα τα δείγματα.

Έτσι προέκυψε ο παρακάτω πίνακας:

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 3

<b>ΔΕΙΓΜΑ</b>	<b>ΑΡΑΙΩΣΗ</b>	<b>260/280</b>	<b>260nm</b>	<b>280nm</b>
H5	x 265	1,51	0,053	0,035
ΚΛ1	x 190	1,46	0,038	0,026
I11	x 135	1,68	0,027	0,016
I3	x 150	1,66	0,03	0,018
I6B	x 65	1,62	0,013	0,008
B4T	x 90	1,8	0,018	0,01
B2T	x 275	1,89	0,055	0,029
B1	x 235	1,8	0,047	0,026
I22	x 90	1,5	0,018	0,012
E2	x 115	1,64	0,023	0,014
Θ5	x 130	1,52	0,026	0,017
I6	x 140	1,86	0,028	0,015
Θ4χ.SDS	x 220	1,76	0,044	0,025
Θ10	x 190	1,8	0,038	0,021
Γ1	x 135	1,68	0,027	0,016
B3T	x 105	1,9	0,021	0,011
B3	x 175	1,59	0,035	0,022
H3	x 140	1,86	0,028	0,015
E11	x 145	1,61	0,029	0,018

<sup>14</sup> Ο λόγος 260/280nm δείχνει πόσο καθαρά είναι τα δείγματα του DNA. Η τιμή του (λόγου) μεγαλύτερη από 1,8 πιστοποιεί την καλή ποιότητα του δείγματος. Η συγκέντρωση DNA δίνεται από την μέτρηση στα 260nm.

E1	x 155	1,72	0,031	0,018
Θ4	x 165	1,94	0,033	0,017
B2	x 140	2,15	0,028	0,013
I61	x 205	1,95	0,041	0,021
I62	x 190	2,11	0,038	0,018
I21	x 390	2,32	0,079	0,046
K3	x 335	1,97	0,067	0,034
K2	x 285	1,96	0,057	0,029
K1	x 325	1,91	0,065	0,034
K4	x 380	2	0,076	0,038
Δ2(2)	x 210	1,9	0,042	0,022
Δ2(1)	x 140	2	0,028	0,014
E1(1)	x 695	2,89	0,139	0,048
E1(2)	x 595	3,8	0,119	0,031
M1	x 585	3,07	0,117	0,039
M2	x 465	5,45	0,093	0,017
ΚΛ(1)	x 565	3,2	0,113	0,035
ΚΛ(2)	x 505	4,8	0,101	0,021
E2(1)	x 610	3,05	0,102	0,04
E2(2)	x 450	6	0,09	0,015
KP1	x 615	3,07	0,123	0,04
KP2	x 495	4,95	0,099	0,02

#### **2.3.4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΙΤ**

1. Ζυγίζεται 0,5gr φυτικού ιστού. Λειοτριβείται με υγρό άζωτο, μέσα σε αποστειρωμένο γουδί.
2. Ο λειοτριβούμενος ιστός μεταφέρεται σε σωλήνα errendorf, που περιέχει 300μl Cell Lysis Solytion και αναμιγνύεται για 2 λεπτά.
3. Το δείγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο για 1 ώρα στους 65°C.
4. Ποσότητα 1,5μl RNase A Solution, προστίθεται στο δείγμα και ακολουθεί ήπια ανάδευση και τοποθέτηση του δείγματος στο υδατόλουτρο, στους 37°C, για 1 ώρα.



5. Το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται 100μl Protein Precipitation Solution. Ακολουθεί ανάδευση για 2 λεπτά και τοποθέτηση του δείγματος στον πάγο για 20 λεπτά.
6. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές για 3 λεπτά<sup>15</sup> και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλο σωλήνα errendorf όπου και συμπληρώνεται με 300μl ισοπροπανόλη.
7. Μετά από ήπια ανάδευση, επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση, στις 16000 στροφές για 1 λεπτό.
8. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, ενώ το ίζημα στεγνώνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
9. Προστίθεται 300μl αιθανόλη 70% και το δείγμα ανακατεύεται.
10. Γίνεται φυγοκέντρηση στις 16000 στροφές για 1 λεπτό και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Το δείγμα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου, για 15 λεπτά.
11. Στην συνέχεια, προστίθεται 50μl DNA Hydration Solution και τοποθετείται στο υδατόλουτρο, για 1 ώρα στους 65°C<sup>16</sup>.
12. Διατήρηση του DNA, σε ψυγείο στους 4°C.<sup>17</sup> (ΕΙΚΟΝΑ 3, Γ).

<sup>15</sup> Μετά την φυγοκέντρηση, το προϊόν πρέπει να είναι πηκτό αλλιώς επαναλαμβάνεται το 5<sup>ο</sup> βήμα.

<sup>16</sup> Αν σε αυτό το σημείο, διακρίνονται υπολείμματα συσσωματωμάτων, το δείγμα φυγοκεντρείται ξανά για 5-10 λεπτά και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα errendorf.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟ ΙΣΤΟ

Στην προσπάθεια να αξιολογηθεί η γενετική ομοιομορφία μεταξύ γενοτύπων διαφόρων κλώνων, έχει επανειλημμένα χρησιμοποιηθεί η τεχνική RAPD. Έτσι και στην παρούσα εργασία, κλώνοι της *Olea europaea var. ceratocarpa* που παρουσίασαν διαφορές στους φαινοτύπους τους, συλλέχτηκαν για να εξεταστεί η ύπαρξη ή όχι, ποικιλομορφίας στις αλληλουχίες των γονιδιωμάτων του DNA τους, με τη βοήθεια της αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, όπως ήδη αναφέρθηκε στο κεφ. 2, 1.

Για να γίνει αυτό εφικτό, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από 35 δέντρα ελιάς, ποικιλίας Καλαμών, με εμφανείς διαφορές στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους. Αρχικά, τον φυτικό ιστό που συλλέχτηκε για επιπλέον εξέταση, τον αποτελούσαν ώριμα φύλλα. Δοκιμαστικά, χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα 5 από τα 35 δείγματα, για να γίνει έλεγχος εξαγωγής ολικού DNA σε ικανοποιητική ποιότητα και ποσότητα.

Από το κάθε δείγμα ζυγίστηκαν 2gr φυτικού ιστού και πραγματοποιήθηκε η διαδικασία εκχύλισης DNA καθώς και η ανάλυσή του σε πηκτή αγαρόζης, όπως ακριβώς αναφέρεται στην μεθοδολογία ( κεφ. 3,2 και 3,3).

Τα αποτελέσματα που αποκομίστηκαν από το προφίλ της πηκτής, προσδιόριζαν την ύπαρξη γονιδιωματικού DNA, όχι όμως ικανοποιητικής ποιότητας και ποσότητας, ώστε να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω, στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (ΕΙΚΟΝΑ 3, Α).

Έτσι έγιναν επιπλέον δοκιμές που αρχικά επικεντρώθηκαν σε αλλαγές του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε αρχικά. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στην διατήρηση του ιστού σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία, κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Επιπλέον, επαναπροσδιορίστηκε το 3<sup>ο</sup> βήμα της διαδικασίας όπου μετά την προσθήκη SDS στο κάθε δείγμα, αντί για τοποθέτησή τους 1 ώρα στο υδατόλουτρο στους 65°C, μειώθηκε στα 30 λεπτά.

Οι προσπάθειες αυτές αποδείχθηκαν ανεπιτυχείς, αφού το γονιδιωματικό (ολικό) DNA, εμφανίστηκε και πάλι υδρολυμένο, δηλαδή μη ικανοποιητικής ποιότητας.

Το ίδιο συνέβη και κατά την δοκιμή διαφοροποίησης του 6<sup>ου</sup> βήματος της διαδικασίας, όπου μετά την εισαγωγή ισοπροπανόλης, διατηρήθηκαν τα δείγματα στο ψυγείο στους -20°C, αντί των 2 ωρών για 30 λεπτά. Επιπλέον, δοκιμάστηκε η αύξηση στην συγκέντρωση RNase που προστίθεται στα δείγματα κατά το 9ο βήμα της διαδικασίας εκχύλισης. Για να αποκλειστεί η περίπτωση χρήσης λανθασμένων χημικών ή ρυθμιστικών ουσιών παρασκευάστηκαν νέο διάλυμα εκχύλισης και ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης της πηκτής.

Η ποσότητα και η ποιότητα του DNA ήταν όμως και πάλι ανεπαρκής για περαιτέρω χρήση του στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Για τον λόγο αυτό, θεωρήθηκε σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί διαφορετικός τρόπος απομόνωσης DNA. Αυτό συνέβη με την χρήση Kit, όπου οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι δοκιμασμένες από την κατασκευάστρια εταιρία, όπως αναφέρεται στην μεθοδολογία στο 2,3,5 κεφάλαιο. Με αυτό τον τρόπο, αποδείχτηκε ότι το πρόβλημα μάλλον επικεντρωνόταν στα ίδια τα δείγματα που είχαμε στην διάθεσή μας (ΕΙΚΟΝΑ 3,Γ).

Κρίθηκε απαραίτητη η επανάληψη της διαδικασίας δειγματοληψίας. Αυτή την φορά συλλέχτηκε πολύ νεαρός ιστός ( φύλλα) και ακολουθήθηκε η μέθοδος εκχύλισης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2,3,1.

Έγινε έτσι δυνατή η απόκτηση ολικού DNA ιδανικής ποιότητας και ποσότητας για περαιτέρω χρήση του στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Η μέτρησή του, έγινε όπως περιγράφεται στην παρακάτω παράγραφο.

Για να εξασφαλίσουμε την ποιότητα και την ποσότητα DNA που θέλουμε εκτός από την ανάλυσή του σε πηκτή αγαρόζης( κεφ.2,3,2), χρησιμοποιείται και το φασματοφωτόμετρο όπως αναλύεται στην παράγραφο 2,3,3. Ο λόγος της απορρόφησης για 260/280nm του φασματοφωτόμετρου δείχνει πόσο καθαρά είναι τα δείγματα του DNA. Τιμή αυτού του λόγου μεγαλύτερη από 1,8 πιστοποιεί την καλή ποιότητα του δείγματος. Η συγκέντρωση DNA δίνεται από την μέτρηση στα 260nm. Βάση αυτών των δεδομένων, μετά από ανάλυση των δειγμάτων αποκομίστηκε ο παρακάτω πίνακας.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, ο λόγος 260/280nm δείχνει πόσο καθαρά είναι τα δείγματα του DNA. Όταν η τιμή του είναι μεγαλύτερη από 1,8 πιστοποιείται η καλή ποιότητα του δείγματος.

Από τον πίνακα εξακριβώνεται ότι η ποιότητα των δειγμάτων είναι ικανοποιητική, αφού λίγα δείγματα έδωσαν τιμή κάτω του 1,8 και αυτά με πολύ μικρή απόκλιση από το νούμερο αυτό.

Η μέτρηση στα 260nm έδωσε την συγκέντρωση του DNA σε κάθε δείγμα, ώστε να γίνει η ανάλογη αραίωση.

### **3.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ**

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν 12 εκκινητές για να επιλεγθούν αυτοί που έδιναν ικανοποιητική ενίσχυση τμημάτων DNA μετά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και εμφάνιζαν ευδιάκριτες τις διαφορές στους γενοτύπους των εξεταζόμενων στελεχών. Για την επιλογή των κατάλληλων εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν 4 με 6 δείγματα DNA από διαφορετικούς κλώνους ελιάς Καλαμών (ΕΙΚΟΝΑ 4).

Για την εξέταση των εκκινητών 01 και 02, χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα E1, M, Κλ, E2, Κρ. Στην περίπτωση του εκκινητή 01, τα δείγματα έδωσαν ισχνή -μη ικανοποιητική ενίσχυση τμημάτων DNA κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης- ενώ κατά την δοκιμασία του εκκινητή 02, δεν ήταν εφικτή η ενίσχυση τμημάτων DNA.

Τα ίδια δείγματα στην ίδια ακριβώς σειρά, χρησιμοποιήθηκαν και για την εξέταση των εκκινητών 03 και 04 (ΕΙΚΟΝΑ 4, Α). Ο 03 εκκινητής έδωσε φτωχή ενίσχυση τμημάτων DNA, σε αντίθεση με τον εκκινητή 04 ο οποίος οδήγησε σε ικανοποιητική ενίσχυση με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και παρουσίασε ικανοποιητικό πολυμορφισμό ( παρουσιάζοντας διαφορές στον γενότυπο), οπότε θεωρήθηκε ιδανικός για να χρησιμοποιηθεί για όλα τα δείγματα.

Με την ίδια ακριβώς διαδικασία εξετάστηκαν και οι εκκινητές 05 και 06. Ο εκκινητής 05 εμφάνισε πολύ καλή ενίσχυση τμημάτων DNA, με ευδιάκριτες διαφορές

στον γενότυπο των στελεχών, ενώ αντίθετα ο 06 έδωσε πολύ μικρές διαφορές στα γονίδια των δειγμάτων.

Ακολούθησε η εξέταση των εκκινητών 10 και 12. Η φωτογραφία από το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης διέγραφε τον γενετικό πολυμορφισμό πολύ καλά, ειδικά στον εκκινητή 12, που επιλέχτηκε και ως ένας από τους καλύτερους για επιπλέον ανάλυση των υπόλοιπων δειγμάτων-στελεχών (ΕΙΚΟΝΑ 4. Β).

Στην συνέχεια, είχαν σειρά οι εκκινητές 14 και 18. Ο πρώτος εκκινητής δεν έδωσε καλό προϊόν μετά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, σε αντίθεση με τον 18 που εμφάνισε ιδανική ενίσχυση των τμημάτων του DNA των στελεχών.

Το ίδιο συνέβη και με τους εκκινητές 19 και 20. Το προφίλ που εμφάνισαν αυτοί, δεν έδειξε ικανοποιητική ενίσχυση τμημάτων DNA, για επιπλέον χρήση τους στα υπόλοιπα δείγματα.

Αν και αρκετοί από αυτούς τους εκκινητές εμφανίστηκαν ικανοί για να χρησιμοποιηθούν για όλα τα δείγματα του πειράματος, έπρεπε να ακολουθηθεί το χρονοδιάγραμμα που ήταν προκαθορισμένο. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκαν μόνο οι τέσσερις καλύτεροι, που εμφάνισαν την μεγαλύτερη ενίσχυση τμημάτων DNA και έδωσαν τον μεγαλύτερο γενετικό πολυμορφισμό των αρχικών δειγμάτων. Επιλέχθηκαν λοιπόν για επιπλέον χρήση οι εκκινητές 04, 05, 12 και 18.

Αφού επιλέχθηκαν οι εκκινητές ακολουθήσαμε την μεθοδολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, όπως αναλύεται στο κεφ. 2,3,4. Έγινε επίσης και η ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης ( κεφ. 2,3,2 (2)), και τα προϊόντα τους φωτογραφήθηκαν κάτω από υπεριώδες φως.

Αποκομίστηκαν 4 φωτογραφίες, που κατέγραφαν το προφίλ των ενισχυμένων τμημάτων DNA των δειγμάτων για κάθε ένα εκκινητή (ΕΙΚΟΝΑ 5). Οι φωτογραφίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για επιπλέον ανάλυση ως εξής:

Τα δεδομένα μεταφέρθηκαν σε πίνακα, χρησιμοποιώντας όμως τα στοιχεία 0 για τις θέσεις εκείνες του κάθε δείγματος που δεν εμφανιζόταν ενίσχυση τμήματος DNA και 1 για τις θέσεις όπου υπήρχε προϊόν ενίσχυσης. Προέκυψε έτσι ένας πίνακας για κάθε εκκινητή:

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4:** ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ 12

1250	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
1200	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
1050	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
1000	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
950	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
900	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
680	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
430	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
380	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
180	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
130	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
110	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	<b>H5</b>	<b>KA1</b>	<b>KA2</b>	<b>II1</b>	<b>I3</b>	<b>I6B</b>	<b>B4T</b>	<b>B2T</b>	<b>B1</b>	<b>I22</b>	<b>I22</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5: ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ 04**

2500	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
1350	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1250	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
1000	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
950	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
780	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
720	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
650	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0
600	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
580	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1
550	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
520	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
400	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
280	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
220	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
180	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
100	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
	<b>H5</b>	<b>KA1</b>	<b>KA2</b>	<b>I11</b>	<b>I3</b>	<b>I6B</b>	<b>B4T</b>	<b>B2T</b>	<b>B1</b>	<b>I22</b>	<b>I22</b>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6: ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ 05**

2800	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
2100	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
1550	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
1500	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1400	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1200	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
1050	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
850	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
500	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
400	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
310	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
260	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
250	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
200	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	<b>H5</b>	<b>KA1</b>	<b>KA2</b>	<b>I11</b>	<b>I3</b>	<b>I6B</b>	<b>B4T</b>	<b>B2T</b>	<b>B1</b>	<b>I22</b>	<b>I22</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>



**ΠΙΝΑΚΑΣ 7: ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ 18**

2000	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
1150	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
1100	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
850	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
750	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
700	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
600	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
450	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
420	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
400	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
380	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
220	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
210	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	H5	ΚΑ1	ΚΑ2	Π11	Ι3	Ι6Β	Β4Τ	Β2Τ	Β1	Ι22	Ι22
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Για τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του προγράμματος για Η/Υ RAPDist, όπως παρουσιάζεται παρακάτω.

Η ανάλυση των φωτογραφιών σε πίνακα με στοιχεία 0-1, αντιγράφηκε σε αρχείο το οποίο περάστηκε στο πρόγραμμα.

Σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί αλγόριθμοι, όπως έχουν προταθεί από τους: Dice ( Nei et Li), Jaccard και τον Apostol.

Γίνεται σύγκριση όλων των δειγμάτων μεταξύ τους, με νούμερα που αποδίδουν τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των φυτών. Στην σύγκριση π.χ δύο διαφορετικών δειγμάτων, όσο πιο κοντά είναι το αποτέλεσμα στο 0, τόσο μικρότερη είναι η διαφορά στον γενότυπό τους. Αν τώρα, το αποτέλεσμα βγει 0, αυτό σημαίνει ότι τα δείγματα αυτά έχουν ακριβώς τον ίδιο γενότυπο. Χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικούς αλγόριθμους για την σύγκριση, τα αποτελέσματα είναι πιο αξιόπιστα.

### 3.3            ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΑΣΗ ΑΛΓΟΡΙΘΜΩΝ

#### 3.3.1        Ο αλγόριθμος κατά DICE ( NEI ET LI)

Η σχέση που χρησιμοποιείται για να γίνουν οι υπολογισμοί, βάση αυτού του αλγορίθμου, κατά Dice, είναι:

$$2 * n_{11} / [( 2 * n_{11}) + n_{01} + n_{10}]$$

όπου

$n_{11}$  = αριθμός θέσεων όπου  $x = 1 + y = 1$

$n_{01}$  = αριθμός θέσεων όπου  $x = 0$  and  $y = 1$

$n_{10}$  = αριθμός θέσεων όπου  $x = 1$  and  $y = 0$

Βάση λοιπόν του αλγορίθμου κατά Dice, πήραμε τα εξής αποτελέσματα, όπως φαίνεται και από τον παρακάτω πίνακα:

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8:** ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΝ ΚΑΤΑ DICE.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>H5</b>	0,195876	0,148515		0	0,209877	0,465116	0,164835	0,128713	0,148148	0,136842	0,136842
<b>KΛ1</b>		0,098039	0,195876	0,365854	0,425287	0,326087	0,137255	0,174312	0,291667	0,291667	
<b>KΛ2</b>			0,148515	0,302326	0,384615	0,270833	0,132075	0,168142		0,26	0,26
<b>I 11</b>				0,209877	0,465116	0,164835	0,128713	0,148148	0,136842	0,136842	
<b>I 3</b>					0,549296	0,289474	0,325581	0,333333		0,275	0,275
<b>I 6 B</b>						0,407407	0,450549	0,469388	0,411765	0,411765	
<b>B 4 T</b>							0,229167	0,203883		0,2	0,2
<b>B 2 T</b>								0,079646		0,22	0,22
<b>B 1</b>										0,214953	0,214953
<b>I 22</b>											0
<b>I 22</b>											0

Το πρώτο δείγμα, στέλεχος H5, έδωσε αποτέλεσμα 0 στην σύγκρισή του με το δείγμα 4, που αντιστοιχεί στο στέλεχος I11. Το ίδιο συνέβη και με τα δείγματα 10 και 11

που όμως αντιστοιχούν στο ίδιο στέλεχος, το I22, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ουσιαστικά για να ελέγχουμε την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Το δεύτερο δείγμα, το ΚΛ1, εμφάνισε πολύ μικρή γενετική απόσταση από το τρίτο δείγμα, το ΚΛ2, με αποτέλεσμα 0,098 περίπου. Το ίδιο συνέβη και με τα δείγματα 8 και 9, που αντιστοιχούν στα στελέχη Β2Τ και Β1, όπου έδωσαν γενετική απόσταση 0,079, που είναι μεν μικρή αλλά όχι ανύπαρκτη. Αυτό σημαίνει και για τους δύο συνδυασμούς, ότι διαφέρουν στον γενότυπό τους, αλλά ωστόσο οι διαφορές είναι πολύ μικρές.

Πολύ διαφορετικά δέντρα βάση αυτής της μέτρησης εμφανίστηκαν τα δείγματα 5 και 6, που αντιστοιχούν στα στελέχη Ι3 και Ι6Β, με γενετική απόσταση 0,55 περίπου.

### **3.3.2 Ο αλγόριθμος κατά JACCARD**

Με τον ίδιο τρόπο χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος κατά Jaccard, ο οποίος δίνεται με την σχέση:

$n_{11} / n - n_{00}$ , όπου:

$n_{11}$  = αριθμός θέσεων όπου  $x = 1 + y = 1$

$n$  = αριθμός ενισχυμένων θέσεων (78)

$n_{00} = x = 0$  and  $y = 0$

#### **ΠΙΝΑΚΑΣ 9: ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΝ ΚΑΤΑ JACCARD**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>H5</b>	0										
<b>ΚΛ1</b>	0,327586	0									
<b>ΚΛ2</b>	0,258621	0,178571	0								
<b>I 11</b>	0	0,327586	0,258621	0							
<b>I 3</b>	0,346939	0,535714	0,464286	0,346939	0						
<b>I 6 B</b>	0,634921	0,596774	0,555556	0,634921	0,709091	0					
<b>B 4 T</b>	0,283019	0,491803	0,42623	0,283019	0,44898	0,578947	0				
<b>B 2 T</b>	0,22807	0,241379	0,233333	0,22807	0,491228	0,621212	0,372881	0			
<b>B 1</b>	0,258065	0,296875	0,287879	0,258065	0,5	0,638889	0,33871	0,147541	0		
<b>I 22</b>	0,240741	0,451613	0,412698	0,240741	0,431373	0,583333	0,333333	0,360656	0,353846	0	
<b>I 22</b>	0,240741	0,451613	0,412698	0,240741	0,431373	0,583333	0,333333	0,360656	0,353846	0	0

Και εδώ τα δείγματα Η5 με το Ι11, καθώς και το Ι22 της δέκατης θέσης με το Ι22 της ενδέκατης θέσης εμφάνισαν γενετική απόσταση 0.

Πολύ μικρές διαφορές στους γενοτύπους τους και με γενετικές αποστάσεις που κυμαίνονταν από 0,147 ως 0,241 περίπου εμφάνισαν οι εξής συνδυασμοί: Το Η5 με το Β2Τ, το Η5 με το Ι22, το ΚΛ1 με το ΚΛ2, το Ι11 με το Β2Τ, και το Β2Τ με το Β1.

Τις μεγαλύτερες διαφορές στους γενοτύπους τους και με γενετικές αποστάσεις που κυμαίνονταν από 0,62 ως 0,71 περίπου, είχαν οι παρακάτω συνδυασμοί φυτών: Το Η5 με το Ι6Β, το Ι11 με το Ι6Β, το Ι3 με το Ι6Β, το Β2Τ με το Ι6Β και το Β1 με το Ι6Β.

### 3.3.3 Ο αλγόριθμος APOSTOL

Ο τρίτος αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε δίνεται με την σχέση:

$n_{11} + n_{00} / n$ , όπου:

$n_{11}$  = αριθμός θέσεων όπου  $x = 1 + y = 1$

$n_{00}$  = αριθμός θέσεων όπου  $x = 0$  and  $y = 0$

$n$  = αριθμός ενισχυμένων θέσεων (78)

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 10: ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΝ ΚΑΤΑ ΑΡΟΣΤΟΛ.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Η5</b>	0										
<b>ΚΛ1</b>	0,24359	0									
<b>ΚΛ2</b>	0,192308	0,128205	0								
<b>Ι11</b>	0	0,24359	0,192308	0							
<b>Ι3</b>	0,217949	0,384615	0,333333	0,217949	0						
<b>Ι6 Β</b>	0,51282	0,474359	0,448718	0,51282	0,5	0					
<b>Β4 Τ</b>	0,192308	0,384615	0,333333	0,192308	0,282051	0,423077	0				
<b>Β2 Τ</b>	0,166667	0,179487	0,179487	0,166667	0,358974	0,525641	0,282051	0			
<b>Β1</b>	0,205128	0,24359	0,24359	0,205128	0,397436	0,589744	0,269231	0,115385	0		
<b>Ι22</b>	0,166667	0,358974	0,333333	0,166667	0,282051	0,448718	0,230769	0,282051	0,294872	0	
<b>Ι22</b>	0,166667	0,358974	0,333333	0,166667	0,282051	0,448718	0,230769	0,282051	0,294872	0	0

Οι συνδυασμοί των δειγμάτων Η5 με Ι11 και τα δύο του Ι22 εμφανίστηκαν και πάλι να αποτελούνται από τους ίδιους γενότυπους.

Κατά τα άλλα, μηδενική γενετική απόσταση δεν εμφανίστηκε σε κανέναν άλλο συνδυασμό. Μικρές αλλά υπαρκτές διαφορές στους γενότυπους με γενετικές αποστάσεις από 0,128 ως 0,179 περίπου εμφάνισαν τα δείγματα:

Το Η5 και με το Β2Τ και με το Ι22 αντίστοιχα. Το ΚΛ1 και με το Β2Τ και με το ΚΛ2, καθώς και το Β2Τ και με το ΚΛ2 και με το Ι11. Αντίθετα πολύ διαφορετικό εμφανίστηκε το δείγμα Ι6Β κυρίως στις συγκρίσεις του με το Η5, το Ι11, το Β2Τ και το Β1.

### **3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Μετά την λήψη των αποτελεσμάτων με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους διεξαγωγής, για να θεωρηθούν αυτά τα αποτελέσματα έγκυρα έπρεπε να γίνει σύγκριση μεταξύ τους.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, αν οι συνδυασμοί των δειγμάτων που εμφανίζονται να έχουν τον ίδιο γενότυπο, επαληθεύονται και με τους υπόλοιπους τρόπους που χρησιμοποιήθηκαν, τότε τα αποτελέσματα μπορούν να θεωρηθούν έγκυρα.

Αφού έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων βγήκαν τα εξής συμπεράσματα:

Τα δείγματα 10 και 11, που εμφανίστηκαν ίδια ως προς τις αλληλουχίες των γονιδιωμάτων των DNA τους, με όλους τους τρόπους διεξαγωγής των αποτελεσμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτό το αποτέλεσμα είναι αποδεκτό αφού τα δύο δείγματα αντιστοιχούν στο ίδιο δέντρο. Χρησιμοποιήθηκαν ουσιαστικά ως δοκιμαστικά της σωστής λειτουργίας όλων των μεθοδολογιών, αφού γνωρίζοντας εξ αρχής ότι ανήκουν στο ίδιο στέλεχος, έπρεπε οπωσδήποτε να δώσουν τα ίδια αποτελέσματα.

Το ίδιο συνέβη και με τα δείγματα Η<sub>5</sub> και Ι<sub>11</sub>, εμφάνισαν και με τους αλγόριθμους και με την παρατήρηση των φωτογραφιών που περιείχαν το προφίλ τους, μηδενική γενετική απόσταση. Αυτό σημαίνει ότι οι γενότυποι των DNA τους είναι ίδιοι. Το

αποτέλεσμα αυτό θεωρήθηκε πιθανό, αφού το δείγμα I11 αντιστοιχεί σε δέντρο που βρέθηκε στο Κακόρεμα, χιλίων και πάνω ετών, μητρικό, και τεραστίων διαστάσεων. Το H5 βρέθηκε στην Πεταλιδόστρατα, είναι περίπου 150 ετών και ήταν αγριελιά που πάνω της είχε τοποθετηθεί εμβόλιο της περιοχής.

Γνωρίζοντας ότι από μητρικά δέντρα, όπως είναι το I11, παίρνονταν κομμάτια για να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια πάνω σε αγριελιές και με δεδομένο ότι οι δύο περιοχές που βρίσκονται τα δέντρα είναι πολύ κοντά, θεωρήθηκε αποδεκτό αυτό το αποτέλεσμα.

Κατά την ανάλυση των φωτογραφιών με το μάτι, και συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας τον εκκινητή 05, εμφανίστηκαν και κάποιοι άλλοι συνδυασμοί, όπου δεν παρουσίαζαν ποικιλομορφία στις αλληλουχίες των γονοδιωμάτων των DNA τους όπως π.χ τα δείγματα 1 και 5. Στην επαλήθευση όμως με την χρήση αλγορίθμων, αυτός ο συνδυασμός εμφάνισε μικρές αλλά υπαρκτές διαφορές.

Άλλα δείγματα εμφάνισαν πολύ μικρή γενετική απόσταση με την χρήση όλων των τρόπων διεξαγωγής αποτελεσμάτων. Τέτοια ήταν τα ΚΛ1 και ΚΛ2. Αυτή η περίπτωση θεωρήθηκε αποδεκτή, αφού και τα δύο δείγματα συλλέχτηκαν από διαφορετικά δέντρα του Ινστιτούτου Ελαίας της Καλαμάτας, είχαν όμως την ίδια ηλικία και εμβόλια από το ίδιο μητρικό φυτό.

Το ίδιο ακριβώς συνέβη και με τα δείγματα Β2Τ και Β1. Το πρώτο δείγμα αντιστοιχεί σε δέντρο που βρίσκεται στο Τρίκορφο, εκατό ετών και είναι ξηρικό μεμονωμένο. Το άλλο δείγμα συλλέχτηκε από δέντρο που βρίσκεται στην Ελληνοεκκλησιά, είναι πολύ νεαρό, δέκα ετών, και ήταν δενδρύλλιο ελαιοκαλλιεργητή που συνέλεγε εμβόλια από μητρικά δέντρα της Μεσσηνίας. Είναι λογικό λοιπόν τα δύο δέντρα να έχουν κάποια σχέση, εξού και οι μικρές διαφορές στους γενοτύπους τους.

Το δέντρο που εμφάνισε τις μέγιστες γενετικές αποστάσεις γενικότερα, από όλα τα υπόλοιπα δέντρα ήταν το Ι6Β. Και αυτό το αποτέλεσμα θεωρήθηκε αποδεκτό, αφού βρίσκεται στο Αχλαδοχώρι, είναι 25 ετών, αλλά κυρίως ήταν από τα ελάχιστα που βρίσκονταν σε ελαιώνα και ήταν αρδευόμενα.

Μικρές γενετικές αποστάσεις γενικά, εμφάνισαν τα δείγματα H5, Β2Τ, I11, και Β1. Και τα τέσσερα αυτά δέντρα, τα χωρίζουν μικρές αποστάσεις, να μεν είναι διαφορετικής ηλικίας, αλλά είναι όλα μεμονωμένα και αρδευόμενα. Είναι λοιπόν πιθανό να είχαν όλα εμβόλια ίδιου δέντρου, ή κάποια άλλη σχέση μεταξύ τους.

Σαν γενικότερο συμπέρασμα, πρέπει να αναφερθεί ότι οι γενετικές αποστάσεις που χώριζαν τα δέντρα μεταξύ τους, δεν ήταν μεγάλες, και άρα υπήρξε μικρή ποικιλομορφία στις αλληλουχίες των γονιδιωμάτων, των DNA, όλων των δέντρων. Ούτε αυτό όμως θεωρήθηκε παράλογο αν σκεφτούμε ότι όλα τα δέντρα βρίσκονται στην ίδια περιοχή, έχουν εμβόλια από τα ίδια περίπου μητρικά φυτά οι περιβαλλοντικές συνθήκες που τα επηρεάζουν είναι παρόμοιες και έχουν μικρές αποκλίσεις στις συνθήκες άρδευσης και εδάφους.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Apostol, B. L., et al., 1993.** Estimation of the number of full sibling families at an oriposition site using RAPD-PCR markers application to the mosquito *Aedes aegyptii*. *Theor. Appl. Genet.* 86:991-1000.
- **Apostol, B. L., W. C. Black, B. R. Miller, and P. Reiter, 1996.** Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* 76:325-334.
- **Bretting, P., M. Goodman, and C. Stuber, 1987.** Karyological and isozyme variation in West Indian and allied American mainland races of maize. *Amer. J. Bot.* 74:1601-1613.
- **Brown, A., and R. Allard, 1970.** Estimation of the mating system in open-pollinated maize population using isozyme polymorphisms. *Genetics* 66: 133-145.
- **Cabrita, L. F., U. Aksoy, S. Hepaksoy and J. M. Leitao, 2001.** Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica L.*) clones. *Scientia Horticulturae.* 87:261-273.
- **Cai Guy, and Moore, 1994.**
- **Carulli, J., and D. Fairbrothers, 1988.** Allozyme variation in three eastern United States species of *Aeschynomene* (Fabaceae), including the rare *A. virginica*. *Syst. Bot.* 13:559-566.
- **Cervera, M. T., J. A. Cabezas, S. J. Sancha, F. Martinez de Toda, and J. M. Martinez-Zaparter, 1998.** Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera L.* genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theoret. Appl. Genet.* 97:51-59.
- **Chessa, I., G. Nieddu, and P. Serra, 1998.** Fig germplasm characterization using isozyme analysis. In: Aksoy, U., Ferguson, L., Hepaksoy, S. (Eds.), *Proceedings of the first International Symposium on Fig ISHS.* Acta. Hort. 480:143-148.



- **Crawford, D., and E. Smith, 1984.** Allozyme divergence and intraspecific variation in *Coreopsis grandiflora* (Compositae). *Syst. Bot.* 9: 219-225.
- **D'Ovidio, R., O. A. Tanzarella, and E. Porceddu, 1990.** Rapid and efficient detection of genetic polymorphism in wheat through amplification by polymerase chain reaction. *Plant Mol. Biol.* 15:169-171.
- **Dice, L. R., 1945.** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297-302.
- **Dowling et al., 1990.**
- **Elant, 1956.**
- **Elisiario, P. J., M. C. Neto, L. F. Cabrita, and J. M. Leitao, 1998.** Isozyme and RAPDs characterization of a collection of fig tree (*Ficus carica* L.) traditional varieties. In: Aksoy, U., Ferguson, L., Hepaksoy, S. (Eds.), Proceedings of the first International Symposium on Fig ISHS. *Acta. Hort.* 480:143-148.
- **Elisiario, P., E. Justo, and J. Leitao, 1999.** Identification of mandarin hybrids by isozyme and RAPD analysis. *Sci. Hort.* 81:287-299.
- **Erlich et al., 1991.**
- **Gogorcena, Y., S. Arulsekhar, A. M. Dandekar, and D. E. Parfitt, 1993.** Molecular markers for grape characterization. *Vitis.* 32:183-185.
- **Gottlieb, L., and N. Weeden, 1979.** Gene eduplication and phylogeny in *Clarkia*. *Evolution* 33:1024-1039.
- **Harrison, R. E., J. J. Luby, G. R. Furnier, and J. F. Hancock, 1997.** Morphological and molecular variation among population of octoploid *Fragaria virginiana* and *F. chiloensis* (Rocaceae) from North America. *Am. J. Bot.* 84:612-620.
- **Harry, D., 1983.** Identification of a locus modifying the electrophoretic mobility of malate dehydrogenase isozymes in incence-cedar (*Calocedrus decurrens*), and its implications for population studies. *Biochem. Genet.* 21:417-434.
- **Hemmat et al., 1994.**
- **Henrion et al., 1994.**
- **Hoelzel and Green.**

- **Hubby and Lewontin.**
- **Jaccard, P., 1901.** Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. Bull. Soc. Vandoise Sei-Nat. 37:547-579.
- **Jaccard, P., 1908.** Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44:223-270.
- **Kahler, A., R. Allard, M. Krzakowa, C. Wehrhahn, and E. Nevo, 1980.** Association between isozyme phenotypes and environment in the slender wild oat (*Avena barbata*) in Israel. Theor. Appl. Genet. 56:31-47.
- **Kardolus, J. P., H. J. van Eck, R. G. van den Berg, 1998.** The potential of AFLPs biosystematics.a first application in *Solanum* taxonomy (Solanaceae). Pl. syst. E 20:87-103.
- **Karron, J., 1987.** A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. Evol. Ecol. 1:47-58.
- **Kazazian, 1989.**
- **Kesseli, R., and S. Jain, 1984.** New variation and biosystematic patterns detected by allozyme and morphological comparison in *Limnanthes sect. Reflexae* (Limnathaceae). Pl. Syst. Evol. 147:133-165.
- **Khadari, B., P. Lashermes, and F. Kjellberg, 1995.** RAPD fingerprints for identification and genetic characterization of fig (*Ficus Carica* L.) genotypes. J. Genet. Breed. 49:77-86.
- **Kim, J. H., H. Joung, H. W. Kim, and Y. P. Lin, 1998.** Estimation of genetic variation and relationship in potato ( *Solanum tuberosum* L.) cultivars using AFLP markers. Am. J. Potato Res. 75:107-112.
- **Kirkpatrick, K., and H. Wilson, 1988.** Interspecific gene flow in *Curcubita*: *C. texana* vs. *C. pepo*. Amer. J. Bot. 75:519-527.
- **Kocher et al., 1989.**
- **Koller, B., A. Lehmann, J. M. McDermott and C. Gesser, 1993.** Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 85:901-904.

- **Ledig, F., and M. T. Conkle, 1983.** Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey Pine (*Pinus torreyana* Parry ex (arr.) Evolution 37:79-85.
- **Lemme, G., S. Sondur, M. B. Morshidi, and R. Manshardt, 1992.** Randomly amplified polymorphic DNA for evaluating the relationships among papaya cultivars Genet. (1993) 85:697-701.
- **Lyman, J., and N. Ellstrand, 1984.** Clonal diversity in *Taraxacum officinale* (*Compositae*) : an apomict. Heredity 53:1-10.
- **Meagher, T., 1986.** Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. L. Identification of most-likely male parents. Am. Nat. 128: 199-215.
- **Metais, I., C. Aubry, B. Hamon, R. Jalouzot, and D. Peltier, 2000.** Description and analysis of genetic diversity between commercial beam lines (*Phaseolus vulgaris* L.) Theor. Appl. Genet. 101:1207-1214.
- **Michelmore et al., 1991.**
- **Morettini and Armellini, 1954.**
- **Nei, and Li, 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in the terms of restriction endonucleases Proc. Natl. Acad. Sci. Ust. 76:5269-5273.
- **Nei, M., 1972.** Genetic distance between population Amer. Naturalist. 106:283-293.
- **Nei, M., 1978.** Estimation of the average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89:583-590.
- **Nicese, F. P., J. I. Hormaza and G. H. McGranahan, 1998.** Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. Euphytica. 101:199-206.
- **Nickrent, D., and D. Wiens, 1989.** Genetic diversity in the rare California shrub *Dedeckera eurekaensis* (Polygonaceae). Syst. Bot. 14:245-253.
- **Nybom, H., and B.A. Schaal, 1990.** DNA "fingerprints" applied to paternity analysis in apples (*Malus x domestica*). Theor. App. Genet. 79:763-768.
- **Orozco-Castillo et al., 1994.**
- **Rieder, and Rieder, 1990.**

- **Saiki et al, 1988.**
- **Schoen, D., 1982.** The breeding system of *Gilia achillefolia* : variation in floral characteristics and outcrossing rate. *Evolution* 36:352-360.
- **Shattuck-Eidens, D. M., R. N. Bell, S. L. Neuhausen, and T. Helentjaris, 1990.** DNA sequence variation within maize and melon: Observation from polymerase chain reaction amplifications and direct sequencing. *Genetics*. 126:207-217.
- **Smyth, C., and J. Hamrick, 1987.** Realized gene flow via pollen in artificial populations of musk thistle, *Carduus nutans* L. *Evolution* 41:613-619.
- **Soltis, D., and P. Soltis, 1987.** Breeding system of the fern *Dryopteris expansa*: evidence for mixed mating. *Amet. J. bot.* 74:504-509.
- **Sommer, and Tautz, 1989.**
- **Song, B. K., M. M. Clyde, R. Wickneswari, and M. N. Normal, 2000.** Genetic Relatedness among *Lansium domesticum* Accessions Using RAPD Markers. *Annalis of Botany*. 86:299-307.
- **Stiles et al., 1993.**
- **Sturgeon, K., and J. Mitton, 1986.** Allozyme and morphological differentiation of mountain pine beetles *Dendroctonus ponderosae* Hopkins (Coleoptera : Scolytidae) associated with host tree. *Evolution* 40:290-302.
- **Tanksley et al., 1989.**
- **Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau, 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- **Watillon, B., P. Druart, P. Dujardin, R. Kettmann, P. Boxus, and A. Burny, 1991.** Use of random cDNA probes to detect restriction fragment length polymorphisms among apple clones. *Sci. Hortic.* 46:235-243.
- **Weeden, N. F., and R. C. Lamb, 1985.** Identification of apple cultivars by isoenzyme phenotypes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 110:509-515.
- **Weeden, N., and J. Wendel, 1989.** Genetics of plant isozymes. In D. Soltis and P. Soltis (eds.), *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press, Portland.

- **Weining, S., and P. Langridge, 1991.** Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.* 82:209-216.
- **Welsh, J., and M. McClelland, 1990.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
- **Wiesman, Z., N. Avidan, S. Lavee and B. Quebedeaux, 1998.** Molecular characterization of Common Olive Varieties in Israel and the West Bank Bank Using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:837-841.
- **Wilde, J., R. Waugh, and W. Powell, 1992.** Genetic fingerprinting of Theobroma clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 83:871-877.
- **Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. I. Livak, J. A. Rafalski, and S.V. Tingey, 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- **Wilson and Maclelland, 1990.**
- **Yang, X., and C. Quiros, 1993.** identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 86:205-212.
- **Zabeay, 1993.**
- **Zhang and Hewitt, 1997.**
- **Zhu, J., M. D. Gale, S. Quarrie, M. T. Jackson, and G. J. Bryan, 1998.** AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theoret. Appl. Genet.* 96:602-611.
- **Zohary, D., 1998.** *Evolution of Crop Plants.* ed. Smart and Simmonds, pp 379-382.
- **Zohary, D., and M. Hopf, 1988.** *Domestication of plants in the old world: the origin and cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley.* Oxford University Press, New York.
- **Zohary, M., and P. Spiegel-Roy, 1975.** Beginnings of fruit growing in the old world. *Science* 187:319-327.

- Αναγνωστόπουλος, 1939.
- Κριμπάς, 1922.
- Ποντίκης, Β., 19... Ελαιοκομία
- Σαρακωμένος, 1920.
- Χατζόπουλος, 2001. Βιοτεχνολογία Φυτών, σελ. 325-340.

# **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

## **ΕΙΚΟΝΕΣ**



A



B



Γ

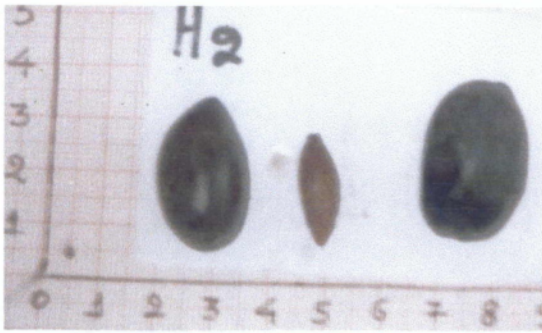


Δ

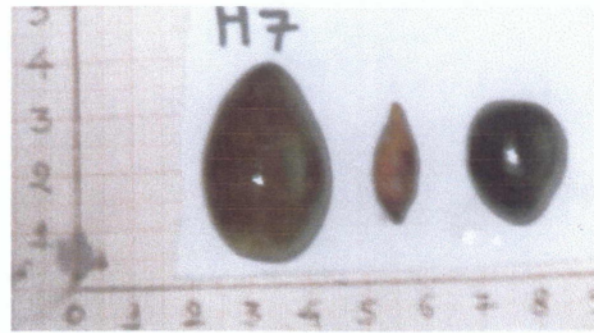
### ΕΙΚΟΝΑ 1:

Δέντρα ελιάς ποικιλίας Καλαμών με διαφορές στο σχήμα και το μέγεθος του κορμού (π.χ. Δ: δέντρο πολύ μεγάλης ηλικίας και όγκου) ή την ηλικία (π.χ Β: δενρύλιο ενός χρόνου). Ο κορμός τους άλλοτε εμφανιζόταν σκούρος με κοιλότητες ( π.χ.Α), και άλλοτε ανοιχτόχρωμος και λείος (π.χ. Γ).

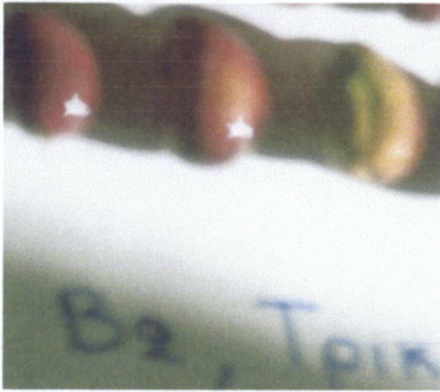




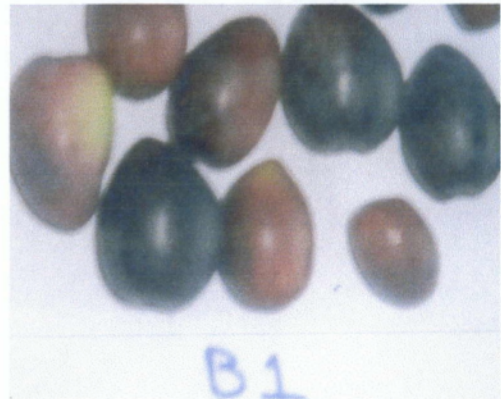
A



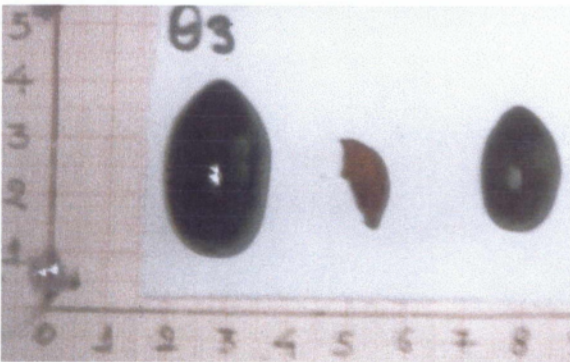
B



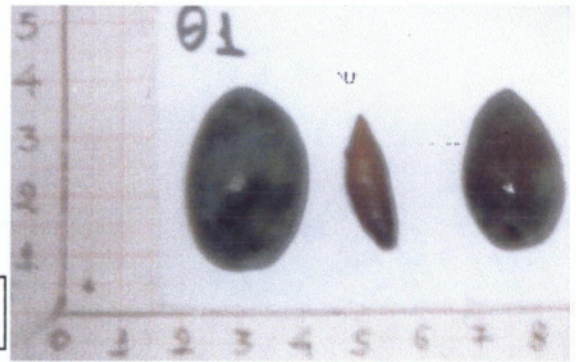
Γ



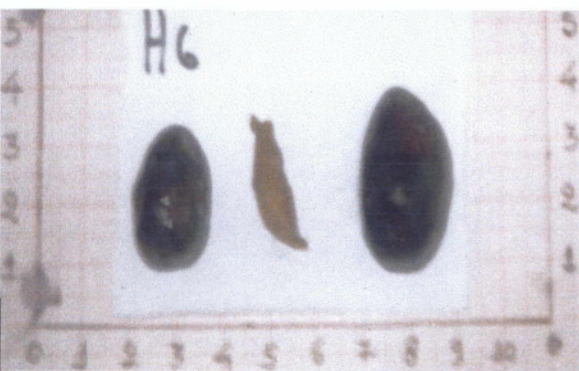
Δ



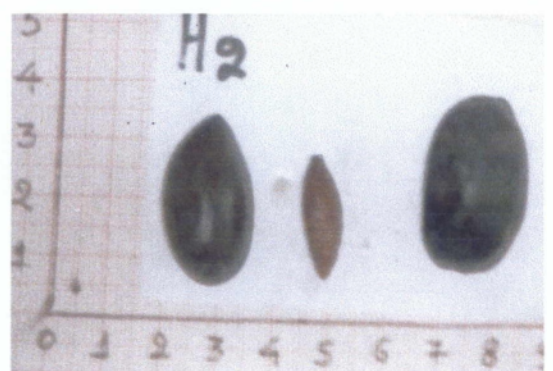
E



ΣΤ



Z

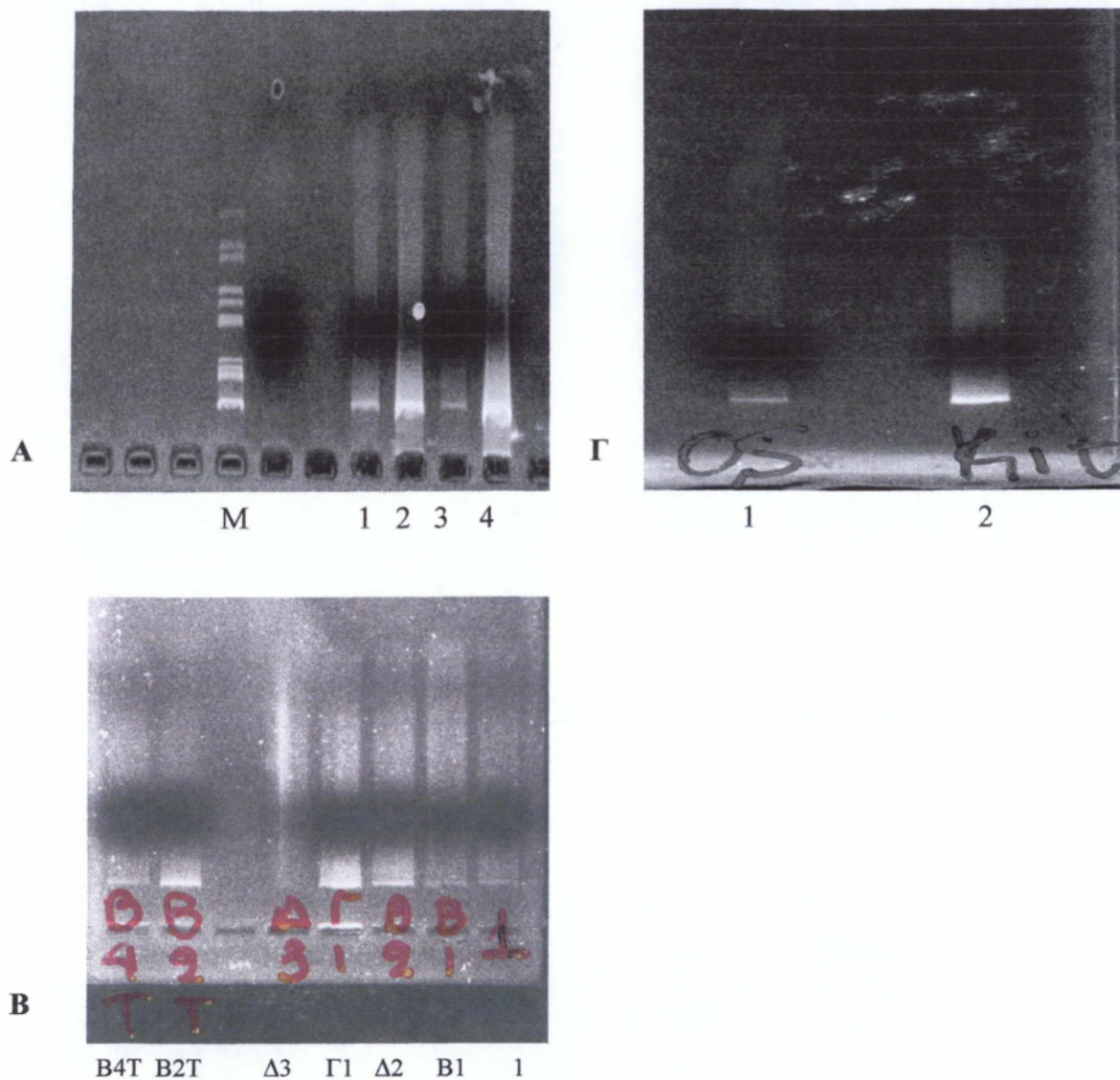


H



### **EIKONA 2:**

Διαφορές που εμφανίστηκαν στον καρπό, το ενδοκάρπιο, την δρύπη και το σπέρμα. Παρατηρήθηκε μεγάλη παραλλακτικότητα στο μέγεθος των καρπών (π.χ. Β) και στο χρώμα τους που άλλες φορές ήταν κοκκινωπό (π.χ. Γ) και άλλες σκούρο μαύρο (π.χ. Η). Ως προς το σχήμα υπήρχαν καρποί που έφεραν θηλή ( π.χ. Α) και άλλοι που ήταν ολοστρόγγυλοι (π.χ. Δ). Διαφορές εμφανίστηκαν και στο χρώμα και το σχήμα του σπέρματος, με θηλή (π.χ. ΣΤ, Ζ) ή χωρίς(π.χ.Θ), ανοιχτόχρωμοι (π.χ. Α) ή σκούροι (π.χ. Ε).

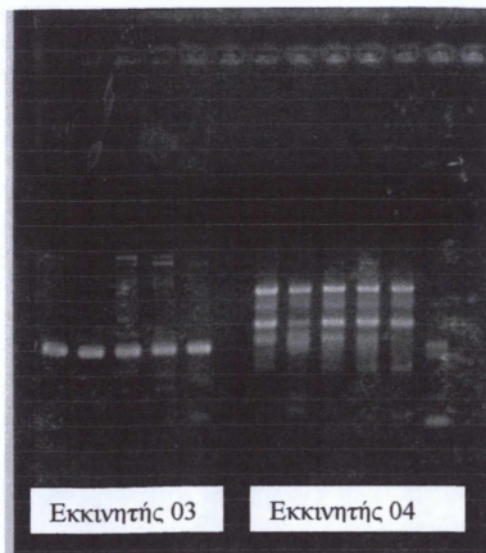


### ΕΙΚΟΝΑ 3:

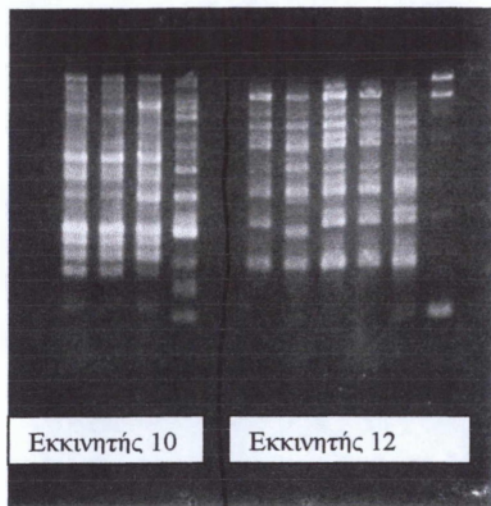
**A:** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης, μετά την εκχύλιση DNA από φύλλα, 4 διαφορετικών δέντρων ελιάς (1-4), μαζί με δείκτη (M, μοριακών μεγεθών, λ Hind III), για έλεγχο ύπαρξης ικανοποιητικής ποιότητας και ποσότητας DNA, για χρήση του στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

**B:** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης, των δειγμάτων B4T, B2T, Δ3, Γ1, Δ2, B1, και 1.

**Γ:** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης, DNA από φυτικό ιστο έχοντας χρησιμοποιήσει για λειοτρίβηση 0,5gr φυτικού ιστού (1), και την διαδικασία KIT (2).



**A**



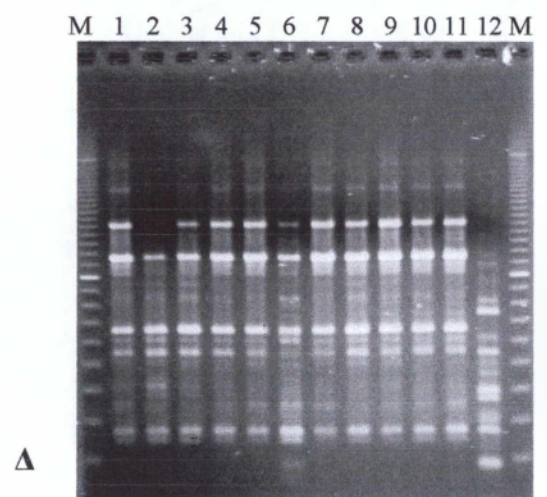
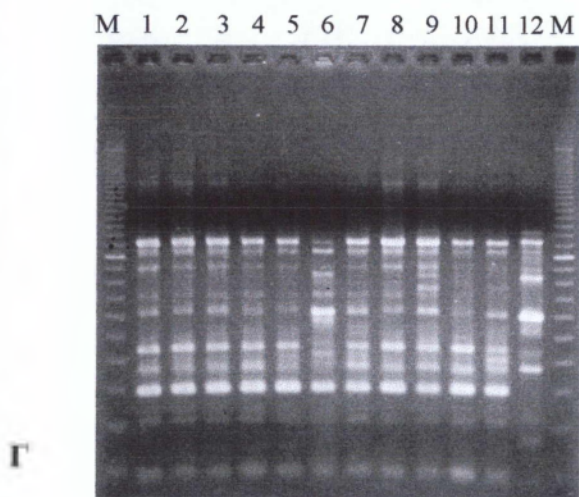
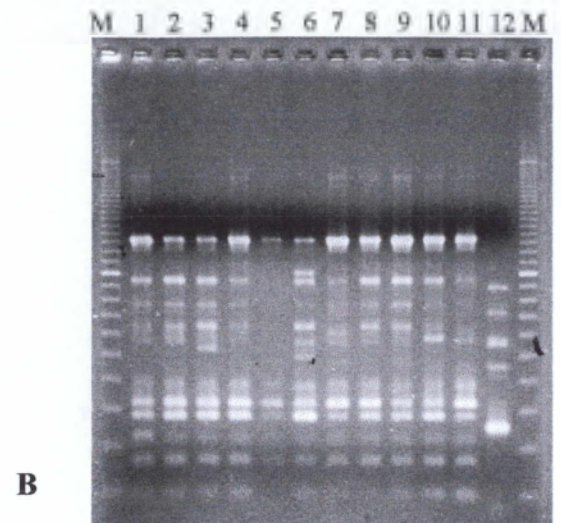
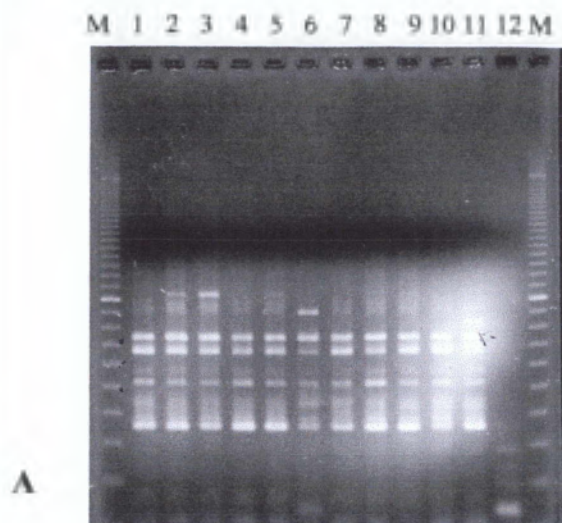
**B**

**EIKONA 4:**

Ανάλυση σε πηκτική αгарόζης των προϊόντων πολυμερισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης κατά την επιλογή κατάλληλων εκκινητών για την ικανοποιητική ενίσχυση τμημάτων DNA με ευδιάκριτες διαφορές στους γενοτύπους των εξεταζόμενων δειγμάτων δένδρων ελιάς.

A: Εκκινητές 03 και 04.

B: Εκκινητές 10 και 12.



**EIKONA 5:**

Καταγραφή του προφίλ των ενισχυμένων τμημάτων DNA των δειγμάτων για κάθε έναν από τους επιλεγμένους εκκινητές.

M: Δείκτης μοριακών μεγεθών, 100bp- ladder

1:H5, 2:ΚΛ1, 3:ΚΛ2, 4:I11, 5:I3, 6:I6B, 7:B4T, 8:B2T, 9:B1, 10:I22, 11:I22,

12:Blank.

A: Εκκινητής 12

B: Εκκινητής 4

Γ: Εκκινητής 18

Δ: Εκκινητής 5