

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΔΠΜΣ: Αγροχημεία & Βιολογικές Καλλιέργειες
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

**Συμβολή στη Μοριακή Ταξινόμηση Μορφολογικών “Ποικιλιών”
του Μαστιχόδενδρου της Χίου *Pistacia lentiscus* var. *Chia***



Κυριακίδη Παναγιώτα (Α.Μ 188)

Επιβλέπων:
Αναπληρωτής Καθηγητής
Ευστάθιος Χατζηλουκάς

Ιωάννινα 2012



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΔΠΜΣ: Αγροχημεία & Βιολογικές Καλλιέργειες
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

**Συμβολή στη Μοριακή Ταξινόμηση Μορφολογικών “Ποικιλιών”
του Μαστιχόδενδρου της Χίου *Pistacia lentiscus* var. *Chia***

Κυριακίδη Παναγιώτα (Α.Μ 188)

Επιβλέπων:
Αναπληρωτής Καθηγητής
Ευστάθιος Χατζηλουκάς

Ιωάννινα 2012



Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπων αναπληρωτή καθηγητή κ.Ευστάθιο Χατζηλουκά για τη υπομονετική του καθοδήγηση και για τις εύστοχες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, καθώς και για τις τελικές διορθώσεις που επέφερε στο κείμενο, διασφαλίζοντας έτσι την επιστημονική ολοκλήρωση του θέματος.

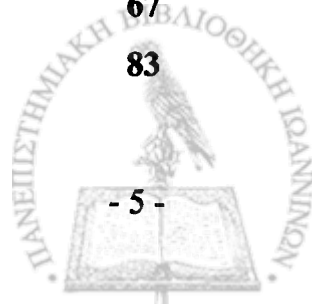
Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον γεωπόνο της Ένωσης Μαστιχοπαραγωγών Χίου, κ. Ηλία Σμυρνιούδη, για τις πληροφορίες που μου παρείχε και την συλλογή του φυτικού υλικού. Ευχαριστώ ακόμη, τους αναπληρωτές καθηγητές κ.Θεολόγο Μιχαηλίδη και κα. Αμαλία-Σοφία Αφένδρα, για τις διορθώσεις στο κείμενο της πτυχιακής μου εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρα Τίνα Πάσχου-Ζέκα για την βοήθεια που μου παρείχε, την επίδειξη των αρχικών πρωτοκόλλων και για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε, καθώς και όλους τους συναδέλφους και τις συναδέλφισσες για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Τέλος, ιδιαίτερα ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου και την αδερφή μου Καλλιρρόη που είναι πάντα δίπλα μου και στηρίζουν τις επιλογές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Πίνακας Συντομογραφιών	7
2. Περίληψη	9
3. Abstract	10
4. Εισαγωγή	11
4.1 Η μαστίχα από την αρχαιότητα έως σήμερα	11
4.2 Ο μαστιχοφόρος σχίνος	13
4.2.α Βοτανικοί και μορφολογικοί χαρακτήρες	13
4.2.β Συστηματική κατάταξη – Ετυμολογία	16
4.2.γ Έδαφος και κλίμα Μαστιχοχωρίων	22
4.2.δ Καλλιέργεια των μαστιχόδενδρων	23
4.3 Παραγωγική διαδικασία της μαστίχας	25
4.4 Ιδιότητες και χρήσεις της μαστίχας	32
4.5 Εξέλιξη και Μοριακή Ταξινόμηση	41
5. Σκοπός της εργασίας	49
6. Υλικά και μέθοδοι	51
6.1 Υλικά και όργανα	51
6.2 Φυτικοί οργανισμοί, βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια	52
6.3 Εκχύλιση γονιδιωματικού DNA από φυτικούς ιστούς	52
6.4 Αντιδράσεις PCR	54
6.5 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήγμα αγαρόζης	55
6.6 Απομόνωση ζωνών DNA από πήγμα αγαρόζης	56
6.7 Κλωνοποίηση αλληλουχιών DNA σε πλασμιδιακό φορέα	58
6.8 Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E.coli</i> DH5α με μόρια DNA	59
6.9 Επιλογή ανασυνδυασμένων αποικιών και διαλογή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων	62
6.10 Επιβεβαίωση της παρουσίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στις επιλεγθείσες αποικίες	63
6.11 Ταυτοποίηση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενθέσεων και Βιοπληροφορική ανάλυση	65
7. Πειραματικά αποτελέσματα	67
8. Συζήτηση – Συμπεράσματα	83



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

9. Βιβλιογραφία

89

97

113



Πίνακας συντομογραφιών

Amp	Ampicillin	Αμπικιλίνη
bp	Base pairs	Ζεύγη βάσεων
dH ₂ O	Distilled water	Απιονισμένο νερό
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate	Τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο
EDTA	Ethylenedianminetetra acetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετροξικό οξύ
ITS	Internal Transcribed Spacers	Εσωτερικά Μεταγραφόμενες Περιοχές
GLB	Gel Loading Buffer	Διάλυμα φόρτωσης
Km	Kanamycin	Καναμυκίνη
L.A.	Luria-Bertani (agar medium)	Στερεό θρεπτικό μέσο των Λούρια και Μπερτάνι
L.B.	Luria-Bertani (liquide medium)	Υγρό θρεπτικό μέσο των Λούρια και Μπερτάνι
OD	Optical Density	Οπτική πυκνότητα
ORF	Open Reading Frame	Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PVP	Polyvinyl pyrrolidone	Πολυ-βυνιλ-πυρρολιδόνη
rDNA	Ribosomal DNA	Ριβοσωμικό DNA
rRNA	Ribosomal RNA	Ριβοσωμικό RNA
rpm	Revolutions per minute	Περιστροφές ανά λεπτό
RNA	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
RNase A	Ribonuclease A	Ριβονουκλεάση A
RT	Room temperature	Θερμοκρασία δωματίου
TAE	Tris-acetate	Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης
Tet	Tetracyclin	Τετρακυκλίνη
Tm	Melting point	Σημείο τήξης μορίου DNA
Tris	Tris (hydromethylaminomethane)	Τρις (υδροξυμεθυλ) αμινομεθανικό
UV	Ultraviolet	Υπεριώδης ακτινοβολία

Περίληψη

Το μαστιχόδενδρο της Χίου *P.lentiscus* var. *Chia*, ανήκει στην οικογένεια *Anacardiaceae* και καλλιεργείται αποκλειστικά στο νότιο μέρος της Χίου. Είναι φυτό δίοικο και τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά άτομα του μαστιχόδενδρου εμφανίζουν μορφολογικές και γενετικές διαφορές. Το αρσενικό δένδρο παράγει ένα ρητινώδες προϊόν, ευρέως γνωστό ως μαστίχα, το οποίο είναι γνωστό για τις θεραπευτικές του ιδιότητες από την αρχαιότητα. Η μορφολογική ποικιλομορφία που παρατηρείται μεταξύ των αρσενικών ατόμων συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης διαφορετικών γονοτύπων που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή διαφορετικής ποιότητας και ποσότητας μαστίχας. Οι πέντε διαφορετικοί γονότυποι του αρσενικού μαστιχόδενδρου που μελετώνται στην παρούσα εργασία είναι οι εξής: Μαυρόσκοινος, Βότομος, Μαρουλίτης, Σιδερακικός και Φαρδύφυλλος. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων των αρσενικών ατόμων του μαστιχόδενδρου. Για τη μελέτη των μεταξύ τους φυλογενετικών σχέσεων χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο μοριακής ταξινόμησης η αναζήτηση μεταλλάξεων στις ITS περιοχές του ριβοσωμικού DNA (rDNA). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη των ITS περιοχών έδειξαν ότι υπάρχει γενετική ποικιλομορφία τόσο μεταξύ διαφορετικών «ποικιλιών» του *P.lentiscus* var. *Chia* όσο και μεταξύ διαφορετικών ατόμων της ίδιας «ποικιλίας». Μια ομάδα ατόμων του μαστιχόδενδρου παρουσιάζει υψηλή φυλογενετική συγγένεια με το *Pistacia lentiscus*, ενώ μια άλλη ομάδα με το *P. saportae*, το οποίο είναι υβρίδιο του *P. lentiscus* (μητρικό) και του *P.terebinthus* (πατρικό).

Abstract

The mastic tree, *P.lentiscus* var. *Chia*, belongs to the Anacardiaceae family and is only cultivated on the southern part of the Greek island of Chios. It is an evergreen shrub, characterized by its dioecious reproductive system. The male and female trees are morphologically and genetically different. The male tree produces a special resin, known as mastic, which was used from ancient times as a medicine. A variety of morphological characteristics suggests the existence of different genotypes that also differ in quantity and quality of the resin production. The five major genotypes of the male tree are: Votomos, Siderakikos, Maroulitis, Mavroskinos and Fardyfyllos and have distinct phenotypes that can be easily identified. In the present study the genetic diversity between the different genotypes among the male mastic trees, was studied using the ITS regions as a molecular marker. The phylogeny between the different clones of the mastic tree, was assessed through cloning and sequencing of their Internal Transcribed Spacers, located between their ribosomal genes (rDNA). The molecular results of this study suggested the existence of genetic diversity not only among the five genotypes, but within the different individuals as well. One group of male mastic trees appeared to be closely related with *Pistacia lentiscus*, while another group was closely related with *P. saportae*. *P. saportae*, from earlier studies, was shown to be a hybrid with *P. lentiscus* (maternal) and *P.terebinthus* (paternal) as the parental taxa.



4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

4.1 Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΡΧΑΙΟΤΗΤΑ ΕΩΣ ΣΗΜΕΡΑ

Η ιστορία της μαστίχας είναι πολύ παλαιά και μπορεί να αναχθεί στα αρχαία χρόνια. Οι πρώτες πληροφορίες για τα μαστιχόδενδρα προέρχονται από τον Ηρόδοτο (5^{ος} αιώνας π.Χ), ο οποίος αναφέρει ότι στην αρχαία Ελλάδα, μασούσαν ένα ρητινώδες υγρό που έρρεε από το φλοιό του μαστιχόδενδρου. Επίσης οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν ένα είδος κόμμεως στις ταριχεύσεις. Πολλοί αρχαίοι συγγραφείς όπως ο Πλίνιος, ο Θεόφραστος, ο Διοσκουρίδης, ο Γαληνός, ο Ιπποκράτης αναφέρουν την μαστίχα, την οποία αποκαλούσαν «σχινική ρητίνη», για τις θεραπευτικές της ιδιότητες. Σε αναφορές του ο Διοσκουρίδης υποστηρίζει ότι η ρητίνη αυτή «όταν πίνεται είναι ωφέλιμη για την πηκτικότητα του αίματος και το χρόνιο βήχα. Ακόμα είναι ωφέλιμη για το στομάχι και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό των δοντιών και ως αλοιφή για το πρόσωπο, στο οποίο προσδίδει λάμψη». Παρόμοιες αναφορές για τις ευεργετικές δράσεις της μαστίχας γίνονται και από τον Γαληνό, ο οποίος εκτός των παραπάνω αναφέρεται επίσης στη θερμαντική και στυπτική δράση της.

Από τον 10^ο αιώνα και μετέπειτα η μαστίχα γίνεται διάσημη από τους περιηγητές που επισκέπτονταν την Χίο και το όνομά της άρχισε να συσχετίζεται άμεσα με την ιστορία της Χίου. Κατά την περίοδο του Βυζαντίου, η Χίος ήταν «έδρα του Ναυτικού Θέματος του Αιγαίου Πελάγους», αλλά και ένα από τα σημαντικότερα οικονομικά κέντρα της αυτοκρατορίας. Το εμπόριο της μαστίχας ήταν μονοπώλιο του αυτοκράτορα, μέχρι την άλωση της Κωνσταντινούπολης από τους σταυροφόρους (1204), όταν λίγα χρόνια αργότερα ο Μιχαήλ Παλαιολόγος αναγκάστηκε να παραχωρήσει εμπορικά προνόμια στους Γενοβέζους.

Κατά την διάρκεια της κυριαρχίας των Γενοואτών (1346-1566) ιδρύθηκε η περίφημη Μαόνα (είδος Μετοχικής -Ναυλωτικής -Μονοπωλιακής Επιχείρησης) η οποία είχε την ευθύνη της μαστίχας με μόνη υποχρέωση να δαπανά για την άμυνα του τόπου. Η Μαόνα οργάνωσε το εμπόριο της μαστίχας με σύστημα και επέβαλε νόμους με ποινές για τους κλέφτες και τους κλεφταποδόχους. Κανένας δεν επιτρεπόταν να πουλάει μαστίχα εκτός από την ίδια. Υπήρχαν μάλιστα και ειδικοί υπάλληλοι που δουλεία τους ήταν να ερευνούν τα πλοία για τυχόν λαθραία μαστίχα.

Επί Τουρκοκρατίας οι μαστιχοπαραγωγοί είχαν πολλά προνόμια. Τα μαστιχοχώρια ήταν αυτοδιοικούμενα, υπό τον έλεγχο του «Σακίζ-εμινί» (φοροεισπράκτορα της μαστίχας) ο οποίος είχε ως συμβούλους τους «Σακίζ-βεκιλερί». Αυτοί εκλέγονταν από τους δημογέροντες των 21 Μαστιχοχωρίων οι οποίοι αποτελούσαν την βουλή που ονομαζόταν «Κοινό των Μαστιχοχώρων». Άλλα προνόμια των μαστιχοχωρίων ήταν να μη γίνεται παιδομάζωμα, το δικαίωμα να ασκούν ελεύθερα τη θρησκεία τους και να ηγούν οι καμπάνες των εκκλησιών.

Στην καταστροφή της Χίου το 1822 οι Τούρκοι δεν πείραξαν τα μαστιχοχώρια, αλλά όταν ο Κανάρης πυρπόλησε την τουρκική ναυαρχίδα και σκοτώθηκε ο Καρα-Αλής τότε κατέστρεψαν τα πάντα παρά την αντίθετη διαταγή. Αποτέλεσμα αυτού ήταν η κατακόρυφη πτώση της παραγωγής μαστίχας για μια δεκαετία.

Μετά την ίδρυση του ανεξάρτητου ελληνικού κράτους, το 1830, η Χίος παρέμεινε υπό τουρκική κατοχή για άλλα 80 χρόνια μέχρι τους βαλκανικούς πολέμους. Μετά την απελευθέρωσή της στις 11 Νοεμβρίου 1912 και από το 1890 η παραγωγή μαστίχας αυξάνει συνεχώς. Από το 1910 έως το 1920 η παραγωγή μειώθηκε εξαιτίας του βαλκανικού και του παγκόσμιου πολέμου, περίοδο κατά την οποία πολλοί παραγωγοί στράφηκαν σε άλλες καλλιέργειες.

Η δυσμενής αυτή κατάσταση επέσυρε τελικά την προσοχή της πολιτείας η οποία δημοσίευσε το 1938 το **Νόμο 1390** σύμφωνα με τον οποίο ιδρύθηκαν οι **20 Συνεταιρισμοί Μαστιχοπαραγωγών**, μέλη των οποίων ήταν υποχρεωτικά όλοι οι μαστιχοπαραγωγοί. Σύμφωνα με τον ίδιο Νόμο συστήθηκε και η **Ένωση των 20 Συνεταιρισμών** με την επωνυμία «**Ένωσις Μαστιχοπαραγωγών Χίου**» ως υποχρεωτικός συνεταιρισμός. Η λειτουργία της EMX άρχισε το 1939 με πρόεδρο τον γιατρό Γ. Σταγκούλη, ενώ το 1957 λειτούργησε το πρώτο εργοστάσιο παραγωγής τσίκλας, εξοπλισμένο με μηχανήματα που κάλυπταν όλα τα παραγωγικά στάδια.

Έτος σταθμός στην ιστορία της μαστίχας ήταν το 1997, οπότε και αναγνωρίστηκαν από την Ευρωπαϊκή Ένωση η μαστίχα Χίου, το μαστιχέλαιο Χίου και η τσίκλα Χίου ΕΛΜΑ ως προϊόντα προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (Π.Ο.Π).



4.2 Ο ΜΑΣΤΙΧΟΦΟΡΟΣ ΣΧΙΝΟΣ

Ο μαστιχοφόρος σχίνος (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*) ή Χιακή σχίνος ή μαστιχόδενδρο και στο χιώτικο ιδίωμα σκινάρι ή πιζάρι, ανήκει στο γένος πιστακιά (*Pistacia*) της οικογένειας *Anacardiaceae* και είναι παραλλαγή του είδους *Pistacia lentiscus*. Το μαστιχόδενδρο απαντάται αποκλειστικά στο νησί της Χίου (εικόνα 1), και σύμφωνα με τον Kazimierz Browicz [P1. Syst. Evol. 155, 189-195 (1987)] πρόκειται για μία ιδιάζουσα δενδρώδη εκδοχή του *Pistacia lentiscus* αναφερόμενη ως var. *Chia* (DEsF. ex POIRET). Η ηλικία απολιθωμένων φύλλων που βρέθηκαν στη Χίο είναι 6 εκατ. χρόνων περίπου και υποδηλώνουν την παρουσία του φυτού ως εγχώριο είδος. Αυτός είναι ο περίφημος θάμνος που δίνει στη Χίο το μοναδικό στον κόσμο προϊόν, τη μαστίχα.



Εικόνα 1: Το μαστιχόδενδρο της Χίου, *Pistacia lentiscus* var. *Chia*.

4.2.α Βοτανικοί και μορφολογικοί χαρακτήρες

Το μαστιχόδενδρο είναι αειθαλής θάμνος και έχει ύψος 2-3 μέτρα (μερικές φορές φτάνει και τα 5 μέτρα). Είναι φυτό δίοικο, που σημαίνει ότι τα αρσενικά και τα θηλυκά άνθη απαντώνται σε διαφορετικά άτομα, με μορφή μικρών και πυκνών ταξιανθιών. Οι ταξιανθίες (μασχαλαιές ή επάκριες) εμφανίζονται από τα μέσα Μαρτίου περίπου και η άνθηση συμπληρώνεται μέσα στον Απρίλιο. Τα αρσενικά άτομα είναι αυτά που δίνουν καλύτερη μαστίχα τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά και είναι αυτά που καλλιεργούνται κυρίως. Για το λόγο αυτό οι παραγωγοί τα αποκαλούν «καρπόσκινα». Όλα τα όργανα του δένδρου (φύλλα, βλαστός, ρίζες, άνθη, καρποί) διατρέχονται από ρητινοφόρους αγωγούς.

Τα φύλλα του μαστιχόδενδρου (εικόνα 2) είναι σύνθετα με 3-4 ζεύγη φυλλαρίων, άλλοτε πτερωτά σε ζεύγη και άλλοτε όχι. Ανήκουν στον νανοφυλλικό τύπο ο οποίος είναι χαρακτηριστική προσαρμογή στις μεσογειακές συνθήκες. Τα φυλλάρια είναι επιμήκη και σκληρά με λεία την πάνω επιφάνεια εξαιτίας της εφυμενίδας. Το χρώμα τους είναι σκούρο πράσινο. Τα φύλλα των αρσενικών ατόμων είναι μεγαλύτερα, πλατύτερα και πιο σκούρα σε σχέση με εκείνα των θηλυκών. Οι επιδερμίδες των δύο πλευρών του φυλλαρίου (πάνω και κάτω) αποτελούνται από μικρά επιδερμικά κύτταρα στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους. Στην κάτω επιδερμίδα η επικοινωνία με τον περιβάλλοντα αέρα εξασφαλίζεται με άφθονα και σχετικά μεγάλα στόματα. Η εφυμενίδα που καλύπτει την κάτω επιδερμίδα δημιουργεί ένα κυματοειδές ανάγλυφο, ενώ η εφυμενίδα της πάνω επιδερμίδας είναι πιο λεία. Η κυματοειδής αυτή εμφάνιση της εφυμενίδας παρατηρήθηκε και σε άλλα γένη της οικογένειας *Anacardiaceae* καθώς και σε άλλες ξηροφυτικές οικογένειες.

Στα φύλλα του δένδρου οι ρητινοφόροι αγωγοί εντοπίζονται στο κατώτερο τμήμα του μεσόφυλλου. Έτσι προστατεύεται η ρητίνη από το φως και την υπερθέρμανση. Το σπογγώδες παρέγχυμα στην περιοχή είναι αρκετά αραιό για καλύτερο αερισμό. Υπάρχουν επίσης και πολλά και μεγάλα στόματα που κατανέμονται ομοιόμορφα στην κάτω επιδερμίδα του φύλλου και εξασφαλίζουν την ανταλλαγή αερίων. Τα μεγάλα στόματα είναι κοινό χαρακτηριστικό όλης της οικογένειας των *Anacardiaceae*. Η ιδιαίτερη αυτή κατασκευή των φύλλων δίνει στο φυτό την δυνατότητα να αντεπεξέρχεται στις μεγάλες ξηρασίες και στις υψηλές θερμοκρασίες του καλοκαιριού αλλά και στις παγωνιές του χειμώνα.



Εικόνα 2: Φύλλα και άνθη του μαστιχόδενδρου

Ο βλαστός του μαστιχόδενδρου δεν είναι ευθύς, έχει χρώμα ανοιχτό σταχτί στα νεαρά άτομα και σταχτόμαυρο στα ηλικιωμένα. Ο φλοιός είναι σχετικά μαλακός και στα νεαρά άτομα είναι λείος χρώματος ροδινο-πράσινου. Στους μονοετείς βλαστούς η επιδερμίδα καλύπτεται από πολυάριθμες συμπαγείς μη αδενικές τρίχες. Ο ρόλος τους είναι να προστατεύουν τους τρυφερούς ιστούς από την εισβολή διαφόρων εντόμων. Από το δεύτερο έτος και μετά αρχίζουν να αναπτύσσονται επιπλέον προστατευτικοί ιστοί (περίδερμα) και ο βλαστός εμφανίζεται ρυτιδωμένος. Τα εξωτερικά του στρώματα δεν αποσπώνται εύκολα και το ξύλωμα είναι ρητινώδες και αρκετά σκληρό. Οι παλαιότεροι και οι απονεκρωμένοι βλαστοί εποίκούνται από ένα είδος χρυσοκίτρινης λειχήνας την *Xanthoria parietina*.

Στο βλαστό οι ρητινοφόροι αγωγοί βρίσκονται κατά μήκος του φλοιώματος των ηθμαγγειωδών δεσμίδων. Εσωτερικά οριοθετούνται από επιθηλιακά κύτταρα, ενώ στην εξωτερική πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων βρίσκονται μία ή περισσότερες σειρές άλλων κυττάρων, που ονομάζονται κύτταρα θήκης. Εξωτερικά οι ρητινοφόροι αγωγοί περιβάλλονται από τόξα σκληροεγχυματικών ινών που αποτελούνται από 3-4 σειρές κυττάρων.

Οι ρίζες του μαστιχοφόρου σχίνου φτάνουν τα 20 μέτρα σε μήκος ενώ το βάθος που εισχωρούν είναι πολύ μικρό (επιπολαιόριζο). Το εκτεταμένο ριζικό του σύστημα είναι μία ξηροφυτική προσαρμογή για την εκμετάλλευση των λιγωστών και σύντομων βροχοπτώσεων. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι ρίζες δε φτάνουν σε μεγάλο βάθος, αυτό έχει ως μειονέκτημα να είναι προσπελάσιμες από διάφορους ζωϊκούς οργανισμούς. Ο κίνδυνος είναι ακόμα μεγαλύτερος στις νεαρές (πρωτογενείς) ρίζες που δεν έχουν αναπτύξει ακόμα προστατευτικούς ιστούς (περίδερμα).

Στη ρίζα οι ρητινοφόροι αγωγοί απαντώνται κατά μήκος του φλοιώματος. Όπως στο βλαστό έτσι και στη ρίζα υπάρχουν πολυάριθμα κύτταρα που περιέχουν άφθονα κοκκία ή χυμοτόπια με ταννίνες που βρίσκονται κοντά και γύρω από τους ρητινοφόρους αγωγούς.

Το μαστιχόδενδρο αναπτύσσεται με αργούς ρυθμούς και η πλήρης ανάπτυξη επέρχεται στα 40-50 χρόνια. Η παραγωγή μαστίχας αρχίζει από τον πέμπτο ή έκτο χρόνο ενώ το μέγιστο της απόδοσης εμφανίζεται από το δωδέκατο έως το δέκατο πέμπτο έτος της ηλικίας του. Το δένδρο ζει πάνω από εκατό χρόνια αλλά από το εβδομηκοστό έτος περίπου αρχίζει η παρακμή του. Υπάρχουν αναφορές για μαστιχόδενδρα 200 ετών.



4.2.β Συστηματική κατάταξη – Ετυμολογία

Η πρώτη προσπάθεια συστηματικής ταξινόμησης του μαστιχόδενδρου έγινε από το Linne, ο οποίος αναγνώρισε τρία είδη στο γένος *Pistacia*: *P. terebintus* L., *P. vera* L., *P. lentiscus* L. Το όνομα «Chia» αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Desfontaine (1804) στο έργο του «Tableau de l' Ecole de Botanique du Museum d' Histoire Naturelle». Αργότερα ο Poiret (1809) αναφέρει το μαστιχόδενδρο της Χίου ως ποικιλία της *P. lentiscus* (με δείκτη το ελληνικό γράμμα γ) και κάνει μια σύντομη περιγραφή «*P. lentiscus, foliis latioribus, Lentiscus ex Chio. TOURNEF., Itin. vol. I. page 295*». Ο De Candolle (1825), το προσδιορίζει με το όνομα *P. lentiscus* var. *Chia* και το δείγμα του φυλάσσεται σε ερμάριο της Γενεύης. Σε μελέτες στο Παρίσι (1856) ο Ορφανίδης ονόμασε το δείγμα του «*P. lentiscus* var. *Mastichophora*», ενώ ήδη από τις αρχές του 19^{ου} αιώνα σε αρκετές δημοσιεύσεις αναφερόταν ως «*Chia*», χωρίς αυτό να είναι πάντα σε συμφωνία με τον Διεθνή Κώδικα Βοτανικής Ονοματολογίας.

Ο Moeller (1882) στο διδακτικό του βιβλίο Βοτανικής περιγράφει ανατομικά τους ρητινοφόρους αγωγούς του *P. lentiscus* και αναφέρει μάλιστα ότι οι «εκκριτικοί χώροι» δημιουργούνται σχιζογενώς (με διάνοιξη χώρου μεταξύ των κυττάρων). Σε ανάλογο σύγγραμμα ο Wiesner (1914) περιγράφει τους ρητινοφόρους αγωγούς και αναφέρεται στο μαστιχόδενδρο ως *P. lentiscus* var. *Chia* D.C.

Στο βιβλίο *Flora Aegaea* ο Rechinger (1943) περιγράφει ότι στο νησί της Χίου καλλιεργείται ένα δεινόμορφος είδος πιστακιάς, η *Pistacia chia* Desf., η οποία παράγει μια ειδική ρητίνη, γνωστή ως «μαστίχα». Ωστόσο η συστηματική κατάταξη αυτού του είδους δεν είχε αποσαφηνιστεί. Τα τελευταία χρόνια οι Meikle (1954), Yaltirik (1967), Zohary (1971), και Browicz (1987) από μελέτες που έκαναν υποστηρίζουν ότι το μαστιχόδενδρο της Χίου είναι ποικιλία της *P. lentiscus*.

Σήμερα μετά από πολλές μελέτες και με τα σύγχρονα εργαλεία μοριακής ταξινόμησης γνωρίζουμε ότι η *P. lentiscus* var. *Chia* είναι ποικιλία της *P. lentiscus*, η οποία ανήκει στην οικογένεια Anacardiaceae και η συστηματική της κατάταξη περιγράφεται στο Σχήμα 1.



Βασίλειο → Φυτά (Plants)

Υποβασίλειο → Τραχεόφυτα (Tracheophyta)

Φύλλο → Σπερματόφυτα (Spermatophyta)

Υποφύλλο → Μανολιόφυτα (Magnoliophyta)

Κλάση → Δικοτυλήδονα (Dicotyledons-Magnoliopsida)

Υποκλάση → Rosidae

Τάξη → Sapindales

Οικογένεια → Anacardiaceae

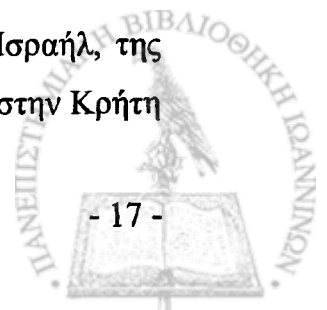
Γένος → Πιστακιά (*Pistacia*)

Είδος → *P. lentiscus*

Σχήμα 1: Οι ταξινομικές ομάδες όπου ανήκει η *P. lentiscus*.

Η οικογένεια Anacardiaceae περιλαμβάνει 4 γένη, όλα μικρά δένδρα ή θάμνοι: 1) *Rhus* (με 4 είδη), 2) *Cotinus* (με ένα είδος), 3) *Schinus* (με 2 είδη) και 4) *Pistacia* (με 6 είδη). Τα είδη του γένους *Pistacia* είναι όλα δίοικα δένδρα ή θάμνοι με ρητινώδη φλοιό. Το μαστιχόδενδρο *P. lentiscus* διαφέρει από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας ως προς τη μειωμένη κατασκευή των ανθών, το φτερωτό στυλ και την ασυνήθιστη μορφολογία της γύρης (Pell 2004). Συγγενικά είδη του *P. lentiscus* είναι τα παρακάτω:

- ***Pistacia terebinthus***: Μικρό φυλλοβόλο δένδρο ή θάμνος, ύψους 2-5 μέτρων. Συναντάται σε όλες τις παραμεσόγειες περιοχές μέχρι την Πορτογαλία. Έχει φύλλα σύνθετα λογχοειδή με 7-13 φυλλάρια. Τα άνθη οργανώνονται σε σύνθετους βότρεις και η ρητίνη που παράγει χρησιμοποιείται για φαρμακευτικούς σκοπούς. Στην Ελλάδα το συναντούμε σε πολλά μέρη και στη Χίο η καλλιεργούμενη μορφή του είναι γνωστή ως «τσικουδιά».
- ***Pistacia atlantica***: Παρόμοια με το *P. terebinthus* με περιορισμένη εξάπλωση στην ΒΑ Ελλάδα, ευρωπαϊκή Τουρκία και Κριμαία. Είναι φυλλοβόλο δένδρο ύψους έως 20 μέτρα και έχει σύνθετα φύλλα.
- ***Pistacia palaestina***: Απαντάται στις παραμεσόγειες περιοχές του Ισραήλ, της Συρίας και της Παλαιστίνης. Στην Ελλάδα αυτοφύεται στη Χίο και στην Κρήτη



Είναι δένδρο ύψους 10-20 μέτρων και έχει σύνθετα φύλλα με λογχοειδή φυλλάρια.

- ***Pistacia vera***: Είναι πολύ διαδεδομένο είδος φυσιτικής καθώς τα σπέρματά του είναι βρώσιμα και καλλιεργείται σε διάφορες περιοχές της Βόρειας Ευρώπης, της Μικράς Ασίας και της Συρίας. Στην Ελλάδα καλλιεργούνται διάφορες ποικιλίες της με πιο γνωστή την «Αιγίνης». Είναι δένδρο φυλλοβόλο, δίοικο με ύψος που φτάνει τα 5-8 μέτρα.
- ***Pistacia chinensis***: Είναι δένδρο φυλλοβόλο, ύψους έως 20 μέτρων το οποίο δεν είναι ιδιαιτέρως γνωστό. Έχει μεγάλους βραχίονες και χονδρό κορμό, ενώ τα φύλλα του είναι σύνθετα (5-7 φυλλάρια). Απαντάται στην κεντρική Κίνα ως καλλωπιστικό.
- ***Pistacia mexicana***: Είναι δένδρο αειθαλές και τα φύλλα του είναι μακριά πτεροειδή, ενώ τα φυλλάριά του (10-30) είναι λεία και φέρουν τελικό φυλλάριο. Απαντάται στην Γουατεμάλα, στο Μεξικό και στο Τέξας, αλλά το φυσικό του ενδιαίτημα κινδυνεύει να εξαφανιστεί.

Το είδος *P. lentiscus* είναι μικρό αειθαλές δένδρο ή θάμνος, γνωστό και ως «σχίνος». Ευδοκίμει στις ξηρές και ανοιχτές περιοχές της Μεσογείου μέχρι την Πορτογαλία και χρησιμοποιείται κυρίως ως καλλωπιστικό. Προέρχεται από την κεντρική Ασία η οποία είναι η γενέτειρα των διαφόρων ειδών του γένους που στη συνέχεια εξαπλώθηκαν γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου. Τα είδη αυτά αποτελούν βασικά στοιχεία της μεσογειακής χλωρίδας, πολλά από αυτά παράγουν ρητίνη σε κάποιο βαθμό και είναι εκμεταλλεύσιμα εμπορικά από τους εκάστοτε λαούς. Παραλλαγή του *P. lentiscus* είναι το μαστιχόδενδρο της Χίου, γνωστό ως *P. lentiscus* var. *Chia* που παράγει τη μοναδική στον κόσμο μαστίχα (Βασιλακάκης Μ., Θεριός Ι., Μαθήματα Ειδικής Δενδροκομίας, Θεσ/νίκη 1984).

Ο Browicz το 1985 σε μελέτες του πάνω στο μαστιχόδενδρο παρατήρησε ότι στις περιοχές των μαστιχοχωριών της Χίου, όπου καλλιεργείται, υπάρχουν διαφορές μεταξύ των φυτών από περιοχή σε περιοχή. Οι διαφορές αυτές έχουν να κάνουν με την μορφολογία και τον αριθμό των φυλλαρίων. Παρατήρησε φυτά με πλατειά φυλλάρια και άλλα με στενότερα, ενώ ο αριθμός τους σε ένα σύνθετο φύλλο δεν ήταν σταθερός. Ο Browicz λοιπόν ήταν ο πρώτος που εισήγαγε τον συστηματικό



όρο «κλώνος», ο οποίος περιγράφει τις διαφορετικές μορφές μαστιχόδενδρων, με βάση παρόμοια γνωρίσματα όπως: το σχήμα των φύλλων και του βλαστού, τις μηχανικές ιδιότητες του φλοιού και την ποιότητα της εκκρινόμενης ρητίνης. Ακόμα και οι ίδιοι οι καλλιεργητές γνώριζαν ότι μεταξύ των φυτών υπάρχουν διαφορές στο σχήμα και στο χρώμα των φύλλων. Ίσως οι κλώνοι αυτοί να δημιουργήθηκαν από παλιά και να διατηρήθηκαν έως σήμερα μετά από μακροχρόνια επιλογή για την ποσότητα και ποιότητα της μαστίχας που παράγουν από τους εκάστοτε μαστιχοπαραγωγούς. Οι κυριότεροι από αυτούς αναφέρονται παρακάτω και αποτελούν διαφορετικούς γονοτύπους των αρσενικών φυτών.

➤ **Μαυρόσκοινος ή Λαγκαδιώτης**

Κυριαρχεί στο μεγαλύτερο μέρος των φυτειών. Τα φύλλα του είναι μαυροπράσινα, λεπτά, σχεδόν άμισχα και προσφύονται εναλλάξ στον κεντρικό μίσχο. Παράγει



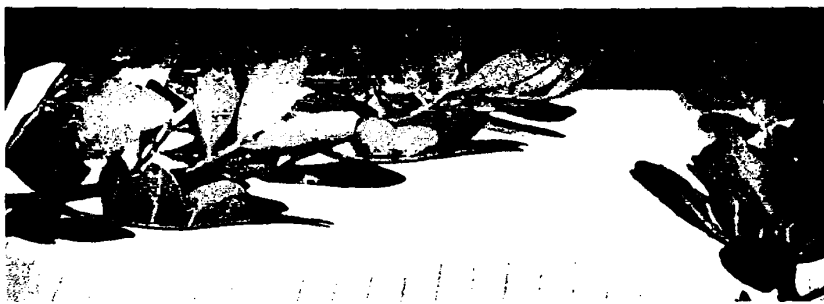
Εικόνα 3 : Μαυρόσκοινος

πρώτης ποιότητας ρητίνη, άφθονη και διαυγή, αρχίζει την παραγωγή από νεαρή ηλικία αλλά η εκροή της ρητίνης δεν είναι ομοιόμορφη σε όλα τα στάδια. Ο κορμός στα ηλικιωμένα άτομα παρουσιάζει σημάδια κόπωσης και είναι περισσότερο ευπρόσβλητος από τον μύκητα *Polyporus* (εικόνα 3)

➤ **Βότομος**

Δένδρο ζωηρότερο του Μαυρόσκοινου, με μεγαλύτερη όμως ανάπτυξη από αυτόν. Τα φύλλα του είναι πιο ανοιχτόχρωμα, παχειά και πεπλατυσμένα με αποστρογγυλεμένες απολήξεις. Ο φλοιός είναι περισσότερο χυμώδης και καταπονείται λιγότερο από τα αλλεπάλληλα κεντήματα. Η απόδοσή του είναι η μεγαλύτερη όλων των κλώνων και η εκροή της ρητίνης διατηρείται σταθερή καθ' όλη

η διάρκεια της συλλογής. Το μοναδικό μειονέκτημα είναι ότι η διαύγεια της ρητίνης είναι κατά τι μειωμένη (εικόνα 4)



Εικόνα 4 : Βότομος

➤ **Βιγλιώτης ή Μαρουλίτης ή Μαρουλόσκοινος ή Καλλιμασιώτης**

Παρόμοιος με τον Βότομο, διακρίνεται όμως από αυτόν για τη χλωρωτική του εμφάνιση και τα παχιά, σαρκώδη φύλλα με τις αποστρογγυλεμένες άκρες.



Εικόνα 5 : Μαρουλίτης

απόδοσή του σε ρητίνη είναι ικανοποιητική, όμως το ειδικό βάρος της είναι χαμηλό εξαιτίας της έγκλεισης μικροφουσαλίδων αέρα (εικόνα 5).

➤ **Στενόφυλλος ή Σιδερακικός**

Ο Στενόφυλλος μοιάζει με τον Μαυρόσκοινο, έχει μαυροπράσινα φύλλα, τα οποία είναι λεπτά, οξύληκτα και ασύμμετρα (εικόνα 6).



Εικόνα 6 : Σιδερακικός

➤ Φαρδύφυλλος ή Πλατύφυλλος

Ο Φαρδύφυλλος μοιάζει με το Μαρουλίτη. Έχει αρκετά πεπλατυσμένα φύλλα και καλή ανάπτυξη.



Εικόνα 7 : Φαρδύφυλλος

Η ρητίνη που παράγει είναι αρκετή αλλά είναι χαμηλής ποιότητας (εικόνα 7).

➤ Κρεμεντινός

Παρόμοιος με τον Μαυρόσκοινο, αλλά λίγο πιο ζωηρός. Η ρητίνη που εκρέει έχει κίτρινο χρώμα και η ποσότητά της είναι ικανοποιητική. Ένα μειονέκτημά της είναι ότι δεν πήζει εύκολα και αυτό εξηγεί τη σπανιότητα του κλώνου. Το όνομά του οφείλεται στην «κρεμεντίνη» με την οποία μοιάζει η ρητίνη του.

➤ Λιβανός

Ο κλώνος αυτός συναντάται σπάνια και σποραδικά σε ορισμένες κοινότητες. Η ρητίνη του είναι κατώτερης ποιότητας και μοιάζει με το λιβάνι, εξ' ου και το όνομά του.

Η ύπαρξη των παραπάνω κλώνων και ο διαχωρισμός τους με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, ισχυροποιεί το επιχείρημα ότι το μαστιχόδενδρο της Χίου δεν αποτελεί μία και μόνο ποικιλία του *Pistacia lentiscus* αλλά έναν πληθυσμό ποικιλιών.

Ετυμολογία

Το όνομα του γένους *Pistacia*, σύμφωνα με το βοτανικό – ετυμολογικό λεξικό του Wittstein (1856), προέρχεται από το *πίσσα* (=πυκνόρρευστος, κολλώδης χυμός) + *ακέομαι* (= θεραπεύω, επανορθώνω). Ορισμένοι ερευνητές (Hehn 1894) πιστεύουν ότι το όνομα είναι μάλλον περσικής προέλευσης και μάλιστα από το *pista*, *pistan* = δάσος πιστακιάς. Ωστόσο η άποψη αυτή δεν έχει αποδειχθεί, γιατί τότε το όνομα του γένους θα ήταν *Pistania* και όχι *Pistacia*. Εξ άλλου το μαστιχόδενδρο είναι καθαρά

μεσογειακό φυτό οπότε είναι απίθανο να φέρει περσικό όνομα, όταν χιλιάδες φυτά έχουν καθαρά ελληνικά ονόματα. Αγγλ. pistachio, αραβ. fustaq, αρμεν. festoul, αλβαν. festek, γερμ. pistazie, γαλλ. pistachier, κουρδ. fystiq, σκάβ. pistiku.

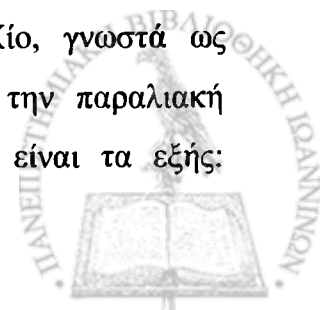
Τα ονόματα των άλλων γενών και ειδών της οικογένειας Anacardiaceae προκύπτουν επίσης από παρόμοιες με την *Pistacia* ιδιότητες. Π.χ 1.*Rhus* από το ρέω, 2.*Schinus* από το σχίζω, 3.*Terebinthus* από το τηρώ (=τραυματίζω). Το όνομα του είδους *lentiscus* προέρχεται από το λατινικό *lentus* (κολλώδης), από το ρήμα *lentescere* (=κολλώ). Αντίστοιχα το όνομα της οικογένειας Anacardiaceae προέρχεται από την πρόθεση ανά + καρδιά επειδή οι καρποί μέσα στο σαρκώδες περικάρπιο έχουν το σχήμα καρδιάς.

Η ρητίνη του μαστιχόδενδρου επικράτησε με το όνομα *μαστίχη* σε όλο τον κόσμο από το ρήμα *μαστάζω* = μασώ, και αυτό από το *μάσταξ* (ο) = στόμα.

4.2.γ Έδαφος και κλίμα Μαστιχοχωρίων

Η καλλιέργεια του μαστιχόδενδρου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το νησί της Χίου από αρχαιοτάτων χρόνων, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Εντύπωση δε προκαλεί το γεγονός ότι προσπάθειες που έγιναν σε άλλες περιοχές της ηπειρωτικής ή νησιωτικής Ελλάδας, αλλά και σε γειτονικές ακτές, για καλλιέργεια του δένδρου δεν ευδοκίμησαν. Κατά καιρούς έχουν αναφερθεί ορισμένες αποτυχημένες προσπάθειες (Heldreich 1862) για μεταφορά της καλλιέργειας στην Αττική και σε νησιά του Αιγαίου (Αμοργός, Αντίπαρος) (Ρόδος, Λέσβος Pernot 1981) ωστόσο οι πληροφορίες ήταν ελλιπείς και οι προσπάθειες εγκαταλείφθηκαν. Μόνο στη Λεμεσό της Κύπρου (Holmboe 1941), σε κάποιον ιδιωτικό κήπο εντοπίστηκε ποικιλία της *Pistacia lentiscus*. Ωστόσο νεότεροι ερευνητές (Charman 1949) υποστηρίζουν ότι τα φυτά αυτά χρησιμοποιούνταν ως καύσιμη ύλη και καμία αναφορά δε γίνεται για παραγωγή μαστίχας. Ακόμα και στο ίδιο το νησί η καλλιέργεια είναι δυνατή μόνο στο νότιο τμήμα, που είναι ιδιαίτερα ξηρό και θερμό. Οι αιτίες για αυτή τη «μοναδικότητα» φαίνεται να είναι τα ιδιαίτερα εδαφολογικά και κλιματολογικά χαρακτηριστικά, αλλά και η μακροχρόνια παράδοση που περνά από γενιά σε γενιά.

Τα μαστιχόδενδρα καλλιεργούνται σε 24 χωριά στη νότια Χίο, γνωστά ως Μαστιχοχώρια ή Μαστιχώχωρα. Τα χωριά αυτά αρχίζουν από την παραλιακή ανατολική πλευρά και καταλήγουν στη δυτική και ονομαστικά είναι τα εξής:



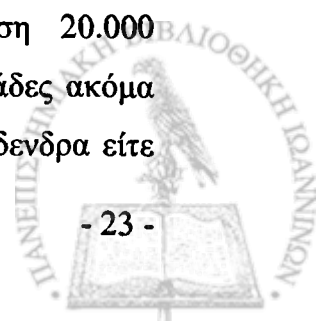
1. Καλλιμασιά, 2. Καταρράκτης, 3. Νένητα, 4. Φλάτσια, 5. Βουνό, 6. Κοινή, 7. Παγίδα, 8. Έξω Διδύμα, 9. Μέσα Διδύμα, 10. Μυρμήγκι, 11. Θολό ποτάμι, 12. Άγιος Γεώργιος Συκούσης, 13. Πατρικά, 14. Καλαμωτή, 15. Αρμόλια, 16. Πυργί, 17. Ολύμποι, 18. Μεστά, 19. Ελάτα, 20. Βέσσα, 21. Λιθί, 22. Βαβίλοι, 23. Νεοχώρι και 24. Θυμιανά.

Το έδαφος των Μαστιχοχωριών είναι λοφώδες, σχετικά πετρώδες, ασβεστολιθικό με ποσοστό ασβεστίου που ποικίλλει από 20-50%. Οι κυριότεροι γεωλογικοί σχηματισμοί του νησιού έχουν ηφαιστιογενή και ασβεστολιθική προέλευση, ενώ το ανατολικό παράλιο τμήμα αποτελείται από ιζήματα τριτογενούς εποχής που σχηματίστηκαν από θαλάσσιες, λιμναίες και χερσαίες αποθέσεις. Τα μαστιχόδενδρα ευδοκιμούν σε ασβεστολιθικά και πετρώδη εδάφη, καθώς οι εδαφικές απαιτήσεις τους δεν είναι μεγάλες. Εδάφη με υψηλή υγρασία είναι απαγορευτικά για την ανάπτυξη των μαστιχόδενδρων καθώς δυσχεραίνεται ο αερισμός των ριζών τους και κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε μαρασμό. Ως επιπολαιόριζο εκμεταλλεύεται πλήρως με το εκτεταμένο επιφανειακό ριζικό του σύστημα τις μικρής διάρκειας βροχές. Ωστόσο σε περιόδους μεγάλης ξηρασίας έχει παρατηρηθεί μείωση στην παραγωγή της μαστίχας.

Το κλίμα στο νησί της Χίου είναι εύκρατο, με ήπιους χειμώνες και όχι πολύ ζεστά καλοκαίρια. Οι θερμοκρασίες το χειμώνα σπάνια φτάνουν τους 2-3 °C κάτω από το μηδέν και το καλοκαίρι συνήθως δεν ξεπερνούν τους 43-44 °C. Δεν παρατηρούνται ακραίες κλιματολογικές συνθήκες, το φθινόπωρο είναι μάλλον υγρό, πράγμα που μαζί με την ιδιαιτερότητα του εδάφους συντελεί στην ανάπτυξη και καλλιέργεια των μαστιχόδενδρων. Οι μεγαλύτεροι θυμούνται χαρακτηριστικά τον Ιανουάριο του 1850, όπου η θερμοκρασία έπεσε απότομα στους -5 °C, με αποτέλεσμα να καταστραφούν μεγάλες εκτάσεις μαστιχόδενδρων. Το γεγονός αυτό έμεινε στην ιστορία και είναι γνωστό ως η χρονιά της «καύτρας».

4.2.δ Καλλιέργεια των μαστιχόδενδρων

Οι καλλιέργειες των μαστιχόδενδρων καλύπτουν συνολικά έκταση 20.000 στρεμμάτων περίπου και απαντώνται σε μικρές επίπεδες περιοχές, κοιλάδες ακόμα και κατά μήκος των δρόμων. Υπολογίζονται περίπου 2.000.000 μαστιχόδενδρα είτε



ως μονοκαλλιέργεια ή σε συγκαλλιέργεια με άλλα δένδρα όπως ελιές και αμυγδαλιές. Κάθε φυτεία αποτελείται από μερικές δεκάδες δένδρα, τοποθετημένα σε σειρές, έτσι ώστε να υπάρχει απόσταση μεταξύ των κορμών για να εξασφαλίζονται κατάλληλες συνθήκες αερισμού και ηλιοφάνειας (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Καλλιέργειες μαστιχόδενδρων

Η ηλικία της κάθε φυτείας, ανάλογα με το ύψος των δένδρων ποικίλλει. Τα μεγαλύτερα σε ηλικία μαστιχόδενδρα έχουν ύψος 4-5 m, ο βλαστός τους διακλαδίζεται (με παρέμβαση του καλλιεργητή) σε 2-4 πλάγιους οι οποίοι διακλαδίζονται παραπέρα και δημιουργούν μία πυκνή κόμη.

Ο πολλαπλασιασμός του σχίνου γίνεται με μοσχεύματα (τμήματα βλαστών) που φέρουν εμφανείς οφθαλμούς. Για καλλιέργεια επιλέγονται μόνο τα αρσενικά δένδρα (καρπόσκινα) που δίνουν καλύτερη μαστίχα σε σχέση με τα θηλυκά. Κατά τους μήνες Φεβρουάριο και Μάρτιο φυτεύονται μεγάλα κλαδιά (που έχουν επισημανθεί από την προηγούμενη χρονιά) σε βάθος 40-50 cm και λίγο πλαγιαστά. Τα μοσχεύματα τοποθετούνται σε σειρές και απέχουν μεταξύ τους 3-4 m έτσι ώστε να διευκολύνεται το όργωμα και το σκάψιμο.

Για να είναι παραγωγικό το μόσχευμα πρέπει ο λάκκος που θα ανοιχθεί να έχει βάθος 70-80 cm και καλό είναι να έχει δημιουργηθεί ένα χρόνο νωρίτερα. Τον πρώτο καιρό το μόσχευμα πρέπει να ποτίζεται και να λιπαίνεται τους ξηρούς μήνες του καλοκαιριού. Από το τρίτο έτος της ηλικίας του αρχίζει το κλάδεμα και κάθε χρόνο είναι απαραίτητος ο καθαρισμός του. Κάθε 5-6 χρόνια πραγματοποιείται συστηματικό κλάδεμα για να αποκτήσει το δένδρο το κατάλληλο σχήμα που θα του εξασφαλίζει αερισμό, καλύτερη εκμετάλλευση ηλιακής ακτινοβολίας και θα διευκολύνει τις καλλιεργητικές φροντίδες.



Ένα από τα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας μαστιχόδενδρων είναι οι ελάχιστες εδαφικές απαιτήσεις που έχουν, ωστόσο οι παραγωγοί φροντίζουν οι καλλιέργειες να λιπαίνονται κατάλληλα για να εξασφαλίσουν μεγαλύτερη και καλύτερη παραγωγή. Η λίπανση γίνεται κάθε χρόνο τον Ιανουάριο ή Φεβρουάριο και τα λιπάσματα του χρησιμοποιούνται κυρίως είναι θειϊκή αμμωνία και νιτρικό κάλιο. Εναλλακτικά κατά τον Οκτώβριο σπέρνουν στη φυτεία σπόρους ψυχανθών (συνήθως κουκιά), τους οποίους όταν ανθήσουν τους οργάνουν και διακόπτουν την καλλιέργειά τους. Με τον τρόπο αυτό, που είναι γνωστός ως «χλωρή λίπανση» εξασφαλίζεται άζωτο για τα μαστιχόδενδρα.

Ο σχίνος δεν εμφανίζει πολλές ασθένειες. Η κυριότερη είναι η «ίσκα» που προκαλείται από ένα είδος μύκητα του γένους *Polyporus*. Ένα άλλο είδος μύκητα, ο *Eutyra armeniaca* προκαλεί ολική ξήρανση των μαστιχόδενδρων και επιφέρει αποπληξία. Για να αντιμετωπιστεί απαιτείται εκρίζωση και κάψιμο των δένδρων καθώς και απολύμανση του λάκκου. Άλλη ασθένεια που προσβάλλει τα μαστιχόδενδρα είναι η ψώρα. Στα φυτά εγκαθίστανται διάφορα «κοκκοειδή» της ψείρας (*Coccidae*), τα οποία στο σημείο που προσβάλλουν δημιουργούν κιτρινωπές κηλίδες και παραμορφώνουν τα φύλλα και τους βλαστούς. Άλλες ασθένειες μικρότερης κλίμακας είναι η προσβολή των φύλλων από την κάμπια της λιπαρίδας *Liparis dispar* και η δημιουργία κύστεων στο βλαστό και στα φύλλα από ένα είδος αφίδας της *Aploneura lentisci*. Πρόσφατα προσδιορίστηκαν το ημίπτερο *Agonoscena cistiputon* και το παράσιτο κολεόπτερο *Sinoxylon sexdentatum*, τα οποία παρασιτούν στα φύλλα και απομυζούν τον κυτταρικό χυμό. Γίνονται μελέτες για την αντιμετώπισή τους με τα κατάλληλα εντομοκτόνα.

4.3 ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ

Η διαδικασία παραγωγής της μαστίχας λαμβάνει χώρα τους μήνες Ιούνιο, Ιούλιο, Αύγουστο, Σεπτέμβριο και Οκτώβριο (ολόκληρο ή μισό). Η όλη διαδικασία συμπεριλαμβάνει τα εξής στάδια:

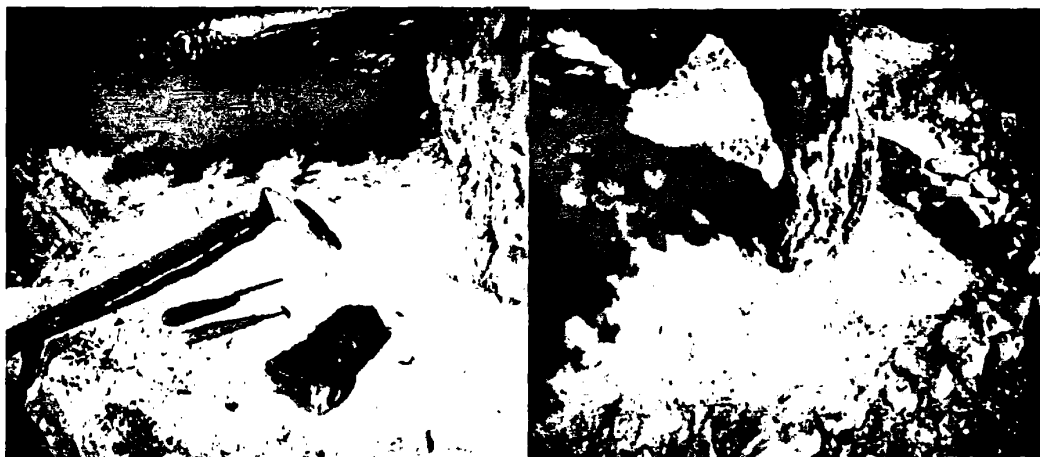
1. εργασίες πριν από το κέντημα ή κέντος
2. πρώτο κέντημα ή ρήνισμα
3. πήξιμο της μαστίχας
4. πρώτο μάζεμα ή πρώτο χέρι

5. δεύτερο κέντημα ή κεντιά
6. πήξιμο της μαστίχας
7. δεύτερο μάζεμα ή μάζεμα της κεντιάς

Για τη συλλογή της μαστίχας έχει θεσπιστεί σχετικός νόμος (Νόμος 4381) που απαγορεύει το κέντημα και τη συλλογή της μαστίχας πριν της 15 Ιουλίου και μετά της 15 Οκτωβρίου κάθε έτους.

1. Εργασίες πριν από το κέντημα ή κέντος

Πριν αρχίσει το «πλήγωμα» του σχίνου, που ονομάζεται κέντημα ή κέντος, γίνεται ισοπέδωση και καθαρισμός του εδάφους, γύρω από τον κορμό, πάνω στο οποίο θα πέσει η μαστίχα. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται «τραπέζια» στο έδαφος. Οι εργασίες αυτές αρχίζουν μέσα στον Ιούνιο. Αρχικά, με τη βοήθεια ενός εργαλείου που ονομάζεται «άμια» ή «μυστρί», καθαρίζεται το έδαφος κάτω από το δένδρο και ισοπεδώνεται (εικόνα 9).



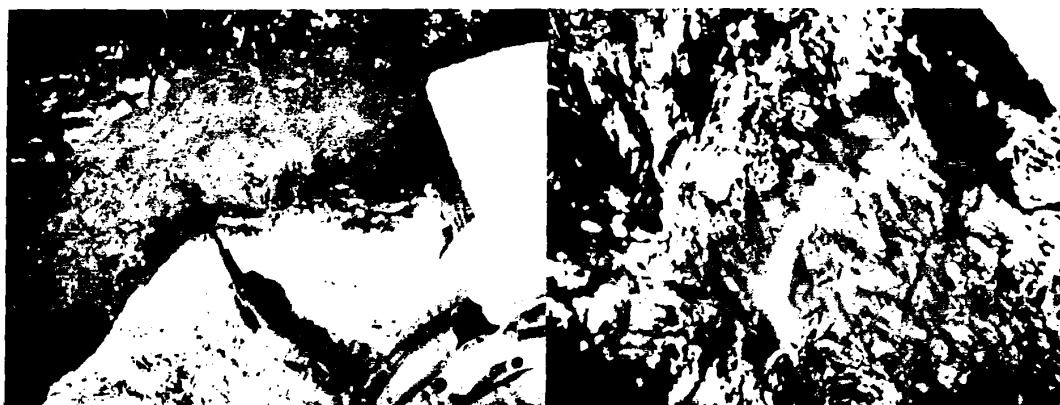
Εικόνα 9: Καθαρισμός και προετοιμασία του εδάφους γύρω από τον κορμό του μαστιχόδενδρου, με τα ειδικά εργαλεία.

Στη συνέχεια, ο χώρος σκουπίζεται με σκούπες από αστιφίδες (*Poterium Spinosum*) ή αχινοπόδια (*Cenista Acanthoclada*). Ακολουθεί το ασπροχωμάτισμα, διαδικασία κατά την οποία το έδαφος καλύπτεται με άσπρο χώμα καλά κοσκινισμένο. Το χώμα αυτό είναι ανθρακικό ασβέστιο, το οποίο βοηθάει τη μαστίχα να στεγνώσει ευκολότερα και γρηγορότερα, όπως να αποκτά κάποια στιλπνότητα και καθιστά ευκολότερη τη συλλογή της από το έδαφος. Οι παραπάνω εργασίες γίνονται μέχρι της 15 Ιουλίου.



2. Πρώτο κέντημα ή ρήνισμα

Στις 15 Ιουλίου περίπου αρχίζει το πρώτο κέντημα, ή ρήνισμα, ή πλήγωμα, το δένδρου κατά το οποίο με ένα ειδικό εργαλείο, το «κεντητήρι» πραγματοποιούνται τομές στον κορμό και στα κύρια και χοντρά κλαδιά του δένδρου. Οι τομές αυτές έχουν μήκος 10-15 χιλιοστά και βάθος 4-5 χιλιοστά περίπου (εικόνα 10). Ο αριθμός των τομών είναι ανάλογος με την ηλικία και το μέγεθος του δένδρου. Αρχίζει από 10 20 και φτάνει πάνω από 100 καθ'όλη την περίοδο του κέντους.



Εικόνα 10: Κέντημα του κορμού του μαστιχόδενδρου με ειδικό εργαλείο.

Το πρώτο κέντημα διαρκεί 5-6 εβδομάδες, από 2 φορές εβδομαδιαία (10-12 κεντήματα). Οι κεντιές πρέπει να γίνονται αραιά, όχι βαθιά (πάντα στο φλοιό του δένδρου) και να είναι πάντα κάθετες στον κορμό, γιατί επουλώνονται ευκολότερα.

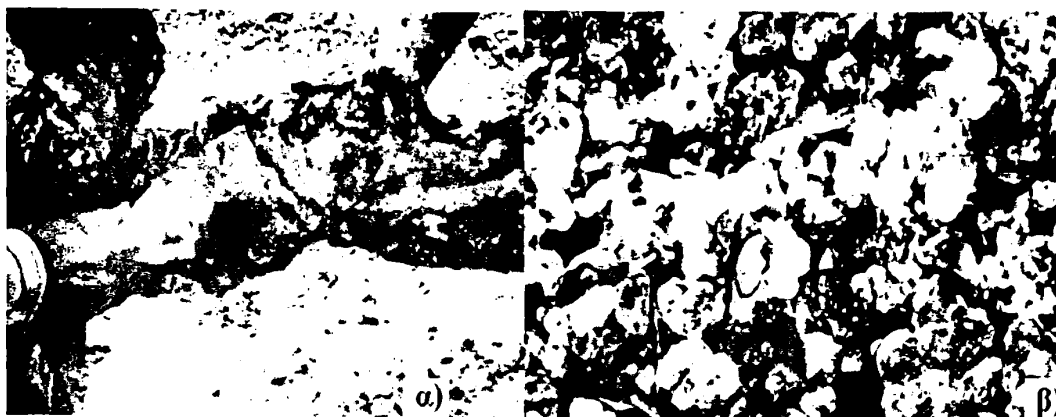
3. Πήξιμο της μαστίχας

Μετά το πρώτο κέντημα πρέπει να περάσουν 10-15 έως 20 μέρες, ανάλογα με τις καιρικές συνθήκες, για να πήξει η μαστίχα. Ο βοριάς και η χαμηλή θερμοκρασία επιταχύνουν τη διαδικασία πήξιματος.

4. Πρώτο μάζεμα ή πρώτο χέρι

Μόλις πήξει η μαστίχα αρχίζει η συλλογή της, το πρώτο μάζεμα ή πρώτο χέρι, όπου με ένα ειδικό εργαλείο, το «τιμητήρι» ή «καμοτήρι», οι παραγωγοί μαζεύουν τα μεγάλα κομμάτια που βρίσκονται στο έδαφος. Με το ίδιο εργαλείο αποκολλούν και τη μαστίχα που κρέμεται από τον κορμό και τα κλαδιά του δένδρου (φλισκάρια ή δάκρυα). Το υπόλοιπο προϊόν (ψιλό ή κυλιστό) που βρίσκεται στο έδαφος το

σκουπίζουν και το βάζουν σε τσουβάλια μαζί με το χώμα και τα φύλλα, για να γίνει το ξεκαθάρισμα στο σπίτι (εικόνα 11).



Εικόνα 11: α) Συλλογή της μαστίχας από το μαστιχόδενδρο με το «τιμητήρι»,
β) Κρύσταλλοι μαστίχας μαζί με άλλα υπολοίματα του εδάφους

Η συλλογή της μαστίχας παλιότερα γινόταν σε ειδικά, μικρά και ρηχά πανεράκια φτιαγμένα από καλάμι. Το εσωτερικό τοίχωμά τους ήταν επικαλυμμένο με μείγμα χώματος και κοπριάς, ώστε να μην κολλάει το προϊόν και να μη χάνεται η ψιλή μαστίχα από τις χαραμάδες. Εφόσον ολοκληρωθεί η διαδικασία της συλλογής, η μαστίχα μεταφέρεται στα σπίτια και αποθηκεύεται σε χώρους δροσερούς και ξηρούς.

5. Δεύτερο κέντημα ή κεντιά

Το δεύτερο κέντημα πραγματοποιείται και αυτό 2 φορές την εβδομάδα, διαρκεί 5-6 εβδομάδες και το δένδρο «πληγώνεται» 10-12 φορές.

6. Πήξιμο της μαστίχας

Μετά και το δεύτερο κέντημα, η μαστίχα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αφήνεται 10-20 μέρες για να πήξει (ξηρανθεί).

7. Δεύτερο μάζεμα ή μάζεμα της κεντιάς

Το δεύτερο μάζεμα γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως και το πρώτο, με μόνη διαφορά ότι αυτή τη φορά ο παραγωγός φροντίζει να μαζέψει προσεκτικά κάθε ίχνος μαστίχας από τον κορμό και τα κλαδιά του δένδρου.



Σύμφωνα με το Νόμο 4381, η προθεσμία συλλογής της μαστίχας τελειώνει στις 15 κάθε Οκτώβρη, αλλά πολλές φορές για διάφορους λόγους (καιρικές συνθήκες, μεγάλη ζήτηση) και με απόφαση του νομάρχη μπορεί η ημερομηνία να επεκταθεί κατά 15 μέρες ακόμη.

Ο μέσος όρος απόδοσης ανά δένδρο ποικίλλει πολύ, τόσο μεταξύ των ατόμων του ίδιου κλώνου, όσο και μεταξύ των διαφορετικών κλώνων. Σε γενικές γραμμές, σύμφωνα με τους παραγωγούς, είναι 80-200g ανά δένδρο. Σε νεαρή ηλικία η αρχική απόδοση είναι 7-13g, ενώ αργότερα φθάνει τα 130-200g περίπου και σε σπάνιες περιπτώσεις τα 650g. Η μεγαλύτερη απόδοση του μαστιχόδενδρου παρατηρείται στην ηλικία των 12-15 ετών. Στην ηλικία αυτή πρέπει να γίνονται τα κεντήματα και μάλιστα στα πρώτα χρόνια ζωής του δένδρου τα κεντήματα πρέπει να γίνονται με φειδώ καθώς υπάρχει κίνδυνος να προκληθεί εξάντληση και πρόωρη γήρανση του μαστιχόδενδρου.

Εναλλακτικές μέθοδοι συλλογής

Ακόμα και σήμερα οι μαστιχοπαραγωγοί ακολουθούν τις ίδιες μεθόδους συλλογής της μαστίχας, αν και έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες για τη συλλογή του προϊόντος με εναλλακτικές μεθόδους μικρότερου κόστους. Ορισμένες από αυτές τις μεθόδους είναι οι παρακάτω:

- ✓ **Συλλογή ρητίνης σε υγρή μορφή:** κατά τη μέθοδο αυτή οι τομές στο μαστιχόδενδρο επαλείφονται με μια ιστοερεθιστική ουσία, το Ethrepon. Η ουσία αυτή προάγει την έκκριση της ρητίνης, η οποία έχει μεγαλύτερο ποσοστό μαστιχελαιίου. Ωστόσο τα αποτελέσματα από την εφαρμογή αυτής της μεθόδου δεν έχουν αξιολογηθεί ακόμα ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα
- ✓ **Χρήση της πάστας θειϊκού οξέως:** με τη μέθοδο αυτή δε γίνεται κέντημα αλλά εφαρμογή πάστας θειϊκού οξέως-καολίνης σε αναλογία 60%-40% αντίστοιχα, στο φλοιό του μαστιχόδενδρου. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερης ρητίνης, με λιγότερα εργατικά, αλλά στο σημείο εφαρμογής δε μπορεί να γίνει επούλωση του τραύματος με αποτέλεσμα τον μαρασμό του δένδρου.

- ✓ **Χρήση πλαστικών φύλλων:** κατά τη μέθοδο αυτή έγινε προσπάθεια συλλογής της ρητίνης σε πλαστικά φύλλα (νάυλον) ή παρόμοια υλικά. Δυστυχώς όμως η ρητίνη δε στέγνωνε καλά και έχανε το κρυσταλλικό της χρώμα.
- ✓ **Εφαρμογή διαχυτήρων θειώδους νατρίου:** η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την τοποθέτηση πάνω στον κορμό και στα κλαδιά του μαστιχόδενδρου, πλαστικών που περιέχουν θειώδες νάτριο. Το δένδρο ερεθίζεται και παράγει ρητίνη η οποία συλλέγεται στους σάκους που φέρουν την παραπάνω ουσία. Τα αποτελέσματα ωστόσο δεν ήταν ενθαρρυντικά γιατί η ποσότητα και η ποιότητα της ρητίνης ήταν υποβαθμισμένες.

Κατεργασία και ταξινόμηση της μαστίχας

Αφού ολοκληρωθεί το μάζεμα της μαστίχας ακολουθεί η κατεργασία και η ταξινόμηση της μαστίχας από τους μαστιχοπαραγωγούς. Κατά τη διαδικασία αυτή ο παραγωγός κοσκινίζει αρχικά τη μαστίχα (πρώτο κοσκίνισμα ή ταχτάρισμα) ώστε να ξεχωρίσει το προϊόν από τα φύλλα, το χώμα, κλπ. Έπειτα πλένει τη μαστίχα καλά σε κρύο νερό με άφθονο σαπούνι ποτάσας. Αφού την ξεπλύνει καλά την απλώνει σε μέρος δροσερό και ξηρό για να στεγνώσει. Στη συνέχεια οι γυναίκες με ένα μικρό μαχαιράκι απομακρύνουν από την μαστίχα κάθε ξένη ύλη που είναι κολλημένη πάνω της. Η εργασία αυτή, γνωστή ως «τσιμπημα», είναι αρκετά επίπονη και επίμονη και συχνά συνδυάζεται με επισκέψεις σε σπίτια και κουβέντα.

Μετά τον καθαρισμό της η μαστίχα, ανάλογα με το μέγεθός της, ταξινομείται με διάφορα κόσκινα στις εξής κατηγορίες:

- ❖ **Πήττα ή πητταριά ή πηττάρι:** δημιουργείται από τη ένωση πολλών σταγόνων μαστίχας. Κάθε κομμάτι έχει σχήμα σχεδόν στρογγυλό με επιφάνεια 3-7 τετραγωνικά εκατοστά. Ονομάζεται και «αφρός της μαστίχης» καθώς είναι πολύ καλή ποιότητα.
- ❖ **Χονδρή ή φλισκάρη ή δακτυλιδόπετρα:** δεν πέφτει στο έδαφος αλλά οι παραγωγοί την μαζεύουν από τον κορμό και τα κλαδιά του δένδρου. Είναι πιο διαυγής από την πήττα και μικρότερη σε μέγεθος.
- ❖ **Ψιλή ή μικρό δάκρυ ή κυλιστό:** είναι πολύ μικρά κομμάτια που όταν πέσουν από την τομή κυλούν και γίνονται στρογγυλά.



Ακόμη υπάρχουν και τα υποπροϊόντα της μαστίχας όπως:

- ❖ **Σκόνη:** είναι σκόνη και υπολείμματα από την κατεργασία της μαστίχας.
- ❖ **Καζανομάστιχο ή αναπινάδα ή νεροπινάδα ή βωλαρίδα:** είναι μαστίχα κατώτερης ποιότητας που είτε «ήπιε νερό» ή «πήρε χώμα» ή δεν έπηξε καλά («χλωρή») και μειώθηκε η εμπορική της αξία. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον αρωματισμό του ρακιού στα καζάνια, απ' όπου πήρε και το όνομά της.

Ύστερα από την κατεργασία και ταξινόμηση της μαστίχας, οι μαστιχοπαραγωγοί την παραδίδουν στον τοπικό συνεταιρισμό, όπου γίνεται έλεγχος για τη σωστή ταξινόμηση του προϊόντος, και από εκεί μεταφέρεται στην Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (EMX). Εκεί πραγματοποιείται και δεύτερη κατεργασία, γνωστή ως «εμπορική κατεργασία» της μαστίχας. Αφού πλυθεί πολλές φορές, την αφήνουν να στεγνώσει καλά και καθαρίζεται ξανά από εξειδικευμένες κοπέλες (δεύτερο τσίμπημα) με μικρά σουγιαδάκια. Η καθαρή πλέον μαστίχα διακρίνεται σε «χονδρή» και «ψιλή» και η κάθε κατηγορία υποδιαιρείται σε τέσσερις τύπους. Το τελικό προϊόν τυποποιείται και προωθείται στην αγορά.

Εμπόριο και εξαγωγές της μαστίχας

Η Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου έχει έντονη εμπορική δραστηριότητα, με κύριο προϊόν τη φυσική μαστίχα, της οποίας εξάγεται περισσότερο από 60% της συνολικής παραγωγής. Σημαντικές είναι επίσης και οι εξαγωγές τσίχλας και μαστιχελαιίου. Συγκεκριμένα οι εξαγωγές τσίχλας ανέρχονται στο 45%, ενώ το μαστιχέλαιο εξάγεται σε ποσοστό 20%.

Οι κυριότερες χώρες εξαγωγής της μαστίχας σήμερα δοσμένες σε γεωγραφικούς άξονες είναι οι εξής:

Ευρώπη: Αγγλία, Γερμανία, Αυστρία, Ισπανία, Γαλλία, Ιταλία, Βουλγαρία, Ελβετία, Ουγγαρία, Φιλανδία, Ολλανδία, Κύπρος

Μ. Ανατολή: Αίγυπτος, Συρία, Σ.Αραβία, Ιορδανία, Λίβανος, ΗΑΕ

Αμερική: Καναδάς, ΗΠΑ, Βραζιλία

Αφρική: Μαυριτανία, Λιβύη, Μάλι, Μαρόκο, Ν.Αφρική

Αυστραλία: Αυστραλία

Ασία: Τουρκία, Κουβέιτ, Ισραήλ, Πακιστάν, Κορέα, Ιαπωνία, Μπαγκλαντές



4.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ

Η μαστίχα είναι μια ρητινώδης, υγρή ουσία που εξέρχεται από τον κορμό και τα κλαδιά του μαστιχόδενδρου μετά από αλληπάλληλα «κεντήματα» που γίνονται σε αυτό από τους μαστιχοπαραγωγούς. Στη φυσική της κατάσταση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αμέσως μετά από την έκκρισή της, απαντάται με τη μορφή παχύρευστου, εξαιρετικά κολλώδους και διαυγούς ρευστού. Εάν παραμείνει στο δένδρο ή μετά την πτώση της στο έδαφος και με τις θερμοκρασίες που επικρατούν κατά την περίοδο συλλογής (Ιούνιος-Σεπτέμβριος), στερεοποιείται σε 15-25 μέρες με τη μορφή σταγόνων ή συσσωματωμάτων ακανόνιστου σχήματος (εικόνα 12). Η στερεοποίηση οφείλεται στην μερική εξάτμιση του αιθέριου ελαίου που περιέχει και στον πολυμερισμό των συστατικών της ρητίνης. Παράλληλα μειώνεται η κολλώδης ιδιότητά της, πράγμα που επιτρέπει την ευχερέστερη συλλογή της. Η πυκνότητα της μαστίχας είναι 1,06 και ο βαθμός οξύτητας 50-75.



Εικόνα 12: Καθαρισμένοι κρύσταλλοι μαστίχας

Αρχικά το χρώμα της μαστίχας είναι υποκίτρινο ή ωχρό πράσινο, επειδή περιέχει ίχνη χλωροφύλλης, όμως με την πάροδο του χρόνου το χρώμα αυτό αλλάζει και σε 12- 18 μήνες γίνεται κιτρινωπή, πιθανότατα λόγω της οξείδωσης. Εξωτερικά δημιουργείται μία σκληρότερη κρούστα, η οποία προστατεύει τα εσωτερικά τοιχώματα από την περαιτέρω οξείδωση. Η γεύση του εκκρίματος στην αρχή είναι υπόπικρη, αλλά αργότερα η πικράδα εξαφανίζεται. Η σκληρότητα της ρητίνης εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού της, ο οποίος με τη σειρά του εξαρτάται από τους εξής παράγοντες: 1) θερμοκρασία περιβάλλοντος, 2) χρόνος έκθεσης, 3) μέγεθος «δακρύων». Όταν η ροή είναι συνεχής το δάκρυ είναι μεγάλο και παραμένει σχετικά μαλακό λόγω προστασίας της εσωτερικής μάζας από τους παράγοντες πολυμερισμού.

Αντίθετα όταν η ροή δεν είναι συνεχής το δάκρυ είναι μικρό και πιο σκληρό εξαιτίας του ευκολότερου πολυμερισμού.

Η μαστίχα είναι προϊόν με ισχυρή κολλητική ικανότητα. Είναι διαλυτή στην βενζίνη, στον αιθέρα, στην αιθυλική αλκοόλη, στην ακετόνη, στο χλωροφόρμιο, στο τερεβινθέλαιο, στην ξυλόλη και σε άλλους οργανικούς διαλύτες. Το σημείο τήξης είναι από 96 °C. Με την θέρμανση ή την καύση της αναδύεται ένα ευχάριστο άρωμα, για αυτό χρησιμοποιείται ως προσθετικό στο θυμίαμα.

Χημική σύσταση

Οι ρητίνες γενικότερα, είναι ένα άμορφο μίγμα από πτητικές και μη-πτητικές ενώσεις που εκρίνονται από τα φυτά. Τα μίγματα αυτά συνήθως είναι αδιάλυτα στο νερό και συνίστανται κυρίως από διτερπένια με τη μορφή των ρητινικών οξέων. Από τις πιο γνωστές ρητίνες στον ελληνικό χώρο είναι αυτή του πεύκου και η ρητίνη από το φυτό λάδανο (*Cistus creticus*). Σε πολλά γένη της οικογένειας Anacardiaceae το εκρινόμενο υλικό από τους ρητινοφόρους αγωγούς αποτελείται από τερπένια, πολυσακχαρίτες και μικρά σταγονίδια λιπιδίων.

Όταν η μαστίχα βρίσκεται σε υγρή κατάσταση, τη στιγμή της εκροής από το δένδρο, περιέχει 17-20 % μαστιχέλαιο ενώ 3 ημέρες μετά τη συλλογή της το μαστιχέλαιο είναι περίπου 14%. Η παραμονή της μαστίχας για μεγάλα χρονικά διαστήματα συνεπάγεται σημαντική μείωση του μαστιχελαίου. Για την καλύτερη διατήρησή της και την κατακράτηση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα του μαστιχελαίου, θα πρέπει να αποθηκεύεται σε ψυχρούς χώρους.

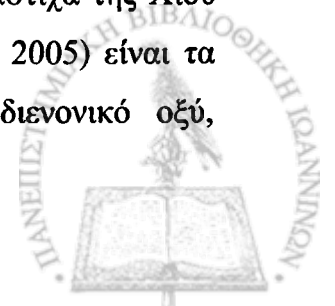
Τα αιθέρια έλαια και οι ρητίνες περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία τερπενίων. Είναι δύσκολο να γίνει διάκριση ανάμεσα στα αιθέρια έλαια και στις ρητίνες, καθώς τα πρώτα περιέχουν πτητικά τερπένια μικρού μοριακού βάρους, ενώ οι ρητίνες είναι μίγμα πτητικών και μη-πτητικών τερπενίων. Εκτός βέβαια από τα τερπένια είναι δυνατόν να εκρίνονται και άλλες ουσίες.

Στη ρητίνη της *Pistacia lentiscus* προσδιορίστηκαν τέσσερα νεοφανή τριτερπενοειδή στο ουδέτερο κλάσμα. Σε αναλύσεις που έγιναν στο όξινο κλάσμα της ρητίνης του μαστιχόδενδρου της Χίου προσδιορίστηκαν πειραματικά δέκα τριτερπενικά οξέα με τη μορφή των μεθυλικών τους εστέρων. Η χημική ανάλυση της ρητίνης του μαστιχόδενδρου παραδίδεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

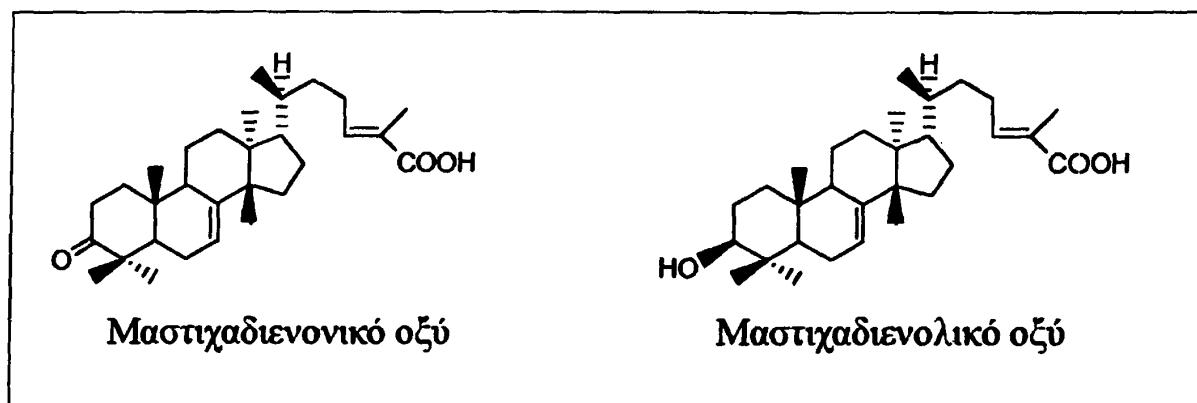
ΟΝΟΜΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟΥ	ΠΟΣΟΣΤΟ
Αιθέριο Έλαιο (Μαστιγέλαιο) (C ₁₀ H ₁₆)	2%
α-Μαστιχινικό οξύ (C ₂₃ H ₃₆ O ₄) β- Μαστιχινικό οξύ (C ₂₃ H ₃₆ O ₄)	4%
Μαστιχολλικόν οξύ Κρυσταλλικό (C ₂₃ H ₃₆ O ₄)	0,5%
α-Μαστιονικόν οξύ (C ₃₂ H ₄₈ O ₄)	20%
β-Μαστιονικόν οξύ (C ₃₂ H ₄₈ O ₄)	18%
α-Μαστιχορεζίνη (Μαστιχορητίνη) (C ₃₅ H ₅₆ O ₄)	30%
β-Μαστιχορεζίνη (Μαστιχορητίνη) (C ₃₅ H ₅₆ O ₄)	20%
Πικρές Ουσίες και Ακαθαρσίες	5,5%
ΣΥΝΟΛΟ	100%
Τέφρα	0,21-0,14
Υγρασία	0,97-1,46
Σημείο Τήξης	50-56
Δείκτης Σαπωνοποίησης	73-79
Αριθμός Κετσόρφερ	23-23-10

Πίνακας 1: Χημική ανάλυση της μαστίχας Χίου (*Pistacia lentiscus*).

Τα τερπένια που βρίσκονται στη χιώτικη μαστίχα είναι υδρογονάνθρακες φυτικής προέλευσης με ανθρακικό σκελετό ισοπρενίου $H_2C=C(CH_3)-CH=CH_2$ (2-μεθυλοβουταδιένιο1,3) ανοικτής αλύσου ή κυκλικό (μόνο- ή δικυκλικό). Η ταξινόμησή τους γίνεται με κριτήριο τον αριθμό ατόμων άνθρακα που περιέχουν στο μόριό τους. Ορισμένα από τα τερπένια που έχουν ανιχνευθεί στη μαστίχα της Χίου (Parageorgiou *et. al*, 1997; Daifas *et. al*, 2004; Koutsoudaki *et. al*, 2005) είναι τα εξής: μαστιχαδιενονικό οξύ, μαστιχαδιενολικό οξύ, ισο-μαστιχαδιενονικό οξύ,



ολεανονικό οξύ, τιρουκαλλόλη, β-αμυρόνη, β-αμυρίνη, ολεανονική αλδεΐδη, γερμανικόλη, λουπεόλη, διπτεροκαπρόλη, μορονικό οξύ, ολεανολικό οξύ, 3-επιισομαστιχαδιενολικό οξύ, κα. Η στεreoχημική διάταξη του μαστιχαδιενονικού και του μαστιχαδιενολικού οξέος περιγράφεται στο σχήμα 2.



Σχήμα 2: Στεreoχημική διάταξη μαστιχαδιενονικού και μαστιχαδιενολικού οξέος.

Παρομοίως και στο αιθέριο έλαιο έχουν απομονωθεί διάφορα τερπένια (Magiatis *et al.*, 1999) ορισμένα από τα οποία είναι τα εξής: α-θουτζένιο, α-πινένιο, φενχένιο, καμφένιο, εξανάλη, β-πινένιο, σαμπινένιο, βερμπενένιο, μυρκένιο, λεμονένιο, δ-3-καρένιο, α-φελλανδρένιο, α-τερπινένιο, 1,4κινεόλη, γ-τερπινένιο, εποξειδίο του οκιμενίου, εννεανάλη, καμφορά, περιλλένιο, οξικός λιναλυλεστέρας, β-καρυοφυλλένιο, κα. Στον πίνακα 2 αναφέρονται ορισμένα από τα συστατικά του μαστιχέλαιου.

ΟΝΟΜΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟΥ	ΠΟΣΟΣΤΟ
α-πινένιο	77,10%
Καμφένιο	1,04%
β-πινένιο	2,46%
Μυρκένιο	12,27%
Λιμονένιο	0,95%
γ-τερπινένιο	0,08%
π-κυμένιο	0,13%
Τερπινολένιο	0,05%
6-μεθυλ-5-επτεν-2-ονη	0,01%

ο-κρεζόλ-μεθυλ-αιθέρας	0,44%
Περιλλέν	0,34%
Καρυοφυλλένιο	1,47%

Πίνακας 2: Ορισμένα από τα συστατικά του μαστιχελαίου

Η μεγάλη ποικιλία των τερπενίων και των άλλων χημικών ενώσεων που βρίσκονται στη ρητίνη της μαστίχας προϋποθέτει έναν τεράστιο αριθμό ενζύμων για τη βιοσύνθεσή τους, με αποτέλεσμα το μαστιχόδενδρο να αποτελεί ένα μοναδικό παράδειγμα στο φυτικό βασίλειο. Η βιοσύνθεση όλων αυτών των μορίων απαιτεί μεγάλα ποσά ηλιακής ενέργειας, τα οποία εξασφαλίζει η εγκατάσταση του φυτού στο μεσογειακό και μόνο οικοσύστημα. Η μοναδικότητα στον μεγάλο αριθμό συστατικών της μαστίχας, των οποίων η πλήρης ταυτοποίηση θα απαιτήσει αρκετό χρόνο και προσπάθεια ακόμα, αποδίδεται στον πολύπλοκο μηχανισμό της έκκρισης.

Προϊόντα της μαστίχας

Η μαστίχα χρησιμοποιείται ως βασικό συστατικό για την παρασκευή διαφόρων προϊόντων, μερικά από τα οποία αναφέρονται παρακάτω:

✓ Τσίγλα

Η τσίγλα ΕΛΜΑ (ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΑΣΤΙΧΑ) παράγεται σήμερα σε σύγχρονα εργοστάσια και περιέχει φυσική ρητίνη, ζάχαρη και μαλακτικές ουσίες. Είναι μοναδική στον κόσμο καθώς παρασκευάζεται με φυσικές πρώτες ύλες. Πρωτοπόρος στην δημιουργία της τσίγλας ΕΛΜΑ το 1950 ήταν ο Ευάγγελος Μενδωνίδης, ιδρυτικό μέλος της Ένωσης Μαστιχοπαραγωγών.



Εικόνα 13: Η τσίγλα ΕΛΜΑ classic, στην εμπορική της μορφή.



Αργότερα στις 16 Ιανουαρίου του 1959, δώρισε την εφεύρεσή του και το σήμα ΕΛΜΑ στην ΕΜΧ και από τότε η τσίχλα συνεχίζεται να παράγεται μέχρι σήμερα. Στο εμπόριο μπορεί κανείς να την βρει σε τρεις τύπους: την κανονική (εικόνα 13), χωρίς ζάχαρη και την Dental. Επίσης υπάρχει και η τσίχλα SMILE, στην οποία δε χρησιμοποιείται μαστίχα αλλά gum base (ΕΝΑ Χίου 2003).

✓ Μαστιχέλαιο

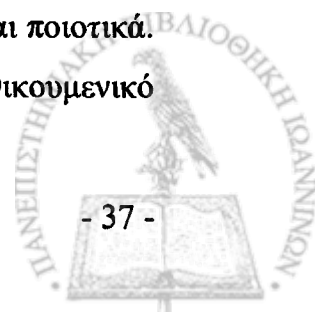
Το μαστίχελαιο αποτελεί αιθέριο έλαιο και παράγεται μετά από απόσταξη της μαστίχας. Είναι υψηλής ποιότητας προϊόν και χρησιμοποιείται από φαρμακευτικές εταιρίες καθώς και από εταιρίες καλλυντικών και αρωμάτων. Ανάλογα με την ποιότητα της μαστίχας η απόδοση σε μαστιχέλαιο κυμαίνεται από 1 έως 3%. Το αιθέριο αυτό έλαιο ήταν γνωστό από την αρχαιότητα για τις θεραπευτικές και καλλυντικές δράσεις του. Μαστιχέλαιο μπορεί επίσης να απομονωθεί και από κλαδιά και φύλλα του μαστιχόδενδρου.

✓ Μοσχολίβανο

Το μοσχολίβανο παρασκευάζεται από μαστίχα, κολοφώνιο μαστίχας και διογκωτικά τρίμματα. Επίσης, εμπλουτίζεται και με φυσικά αρώματα. Χρησιμοποιείται κυρίως από την ορθόδοξη εκκλησία ως θυμίαμα στους ναούς. Όταν καίγεται αναδίδει αρωματικούς ατμούς, πολύ ανώτερους από τα γνωστά λιβάνια. Ακόμα και μωαμεθανικοί λαοί, όπως αυτοί της Ασίας, Αραβίας και της Αφρικής το χρησιμοποιούν στις τελετές τους.

✓ Άγιο Μύρο

Οι παλαιότερες πληροφορίες για τη σύσταση του αγίου Μύρου ανάγονται στον 8^ο αιώνα. Ο κατάλογος των υλικών παρασκευής περιλαμβάνει 12 είδη και φυλάσσεται στη βιβλιοθήκη του Βατικανού. Μεταγενέστερος κατάλογος (Ευχολόγιο Γκόαρ) περιλαμβάνει εκτός του ελαίου 32 συστατικά μεταξύ των οποίων και μαστίχα. Από τον 14^ο αιώνα μόνο ο Πατριάρχης Κωνσταντινουπόλεως παρασκεύαζε και καθαγίαζε το άγιο Μύρο, το οποίο διένειμε στη συνέχεια στις άλλες Ορθόδοξες Εκκλησίες. Αυτό συμβόλιζε την ενότητα των Ορθόδοξων Εκκλησιών. Τα διάφορα υλικά για την παρασκευή του αγίου Μύρου ποικίλουν στις διάφορες εποχές ποσοτικά και ποιοτικά. Από τον 19^ο αιώνα έγιναν συστηματικές προσπάθειες από το Οικουμενικό



Πατριαρχείο για την κωδικοποίηση των διαφόρων συστατικών του. Η επιλογή της μαστίχας, ως κύριο συστατικό του αγίου Μύρου, πιθανότατα οφείλεται στο ότι περιέχει άριστης ποιότητας έλαιο (μαστιχέλαιο) και ποικίλες αρωματικές ουσίες.

✓ Κολοφώνιο

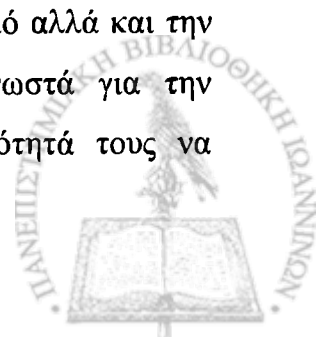
Το κολοφώνιο είναι η ρητινώδης ουσία που απομένει μετά την απομάκρυνση του αιθέριου ελαίου από την μαστίχα. Το όνομά του προέρχεται από την πόλη Κολοφών της Μικράς Ασίας όπου από τα κωνοφόρα δένδρα παραγόταν ρητίνη γνωστή ως «κολοφωνία πίσσα». Χρησιμοποιείται για την παρασκευή χειρουργικών νημάτων, συνθετικού καουτσούκ, ελαστικών πλαστικών, τεχνητών δερμάτων, βερνικιών, χρωμάτων, κλπ.

Χρήσεις της μαστίχας

❖ Ιατρική – Φαρμακευτική

Από την αρχαιότητα οι άνθρωποι χρησιμοποιούσαν την μαστίχα, εξαιτίας των πολλαπλών θεραπευτικών ιδιοτήτων της. Στα νεότερα χρόνια η μαστίχα χρησιμοποιείται από διάφορες φαρμακοβιομηχανίες, οι οποίες εκμεταλλεύονται τις ευεργετικές της δράσεις. Διάλυμα σκόνης της μαστίχας σε βενζόλιο (ΜΑΣΤΙΣΟΛ) δημιουργεί αντισηπτική κόλλα, με την οποία στερεώνουν τον επίδεσμο σε εγχειρητικό τραύμα (Σαββίδης, 2000). Επίσης, χρησιμοποιείται στην Παρασκευή αλοιφών κατά των εγκαυμάτων και των πληγών, λόγω των επουλωτικών της ιδιοτήτων. Από την αρχαιότητα είναι γνωστές οι θεραπευτικές ιδιότητες της φυσικής ρητίνης στα στομαχικά και κοιλιακά άλγη. Θεραπεύει το πεπτικό έλκος που οφείλεται στο ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) και προστατεύει το ήπαρ μετά από πρόκληση υπατοτοξικότητας και την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Χρησιμοποιείται επίσης στις παιδικές διάρροιες που εκδηλώνονται κατά την οδοντοφυΐα, έχει αποχρεμπτικές, αντιθρομβωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.

Τα μονοτερπένια που περιέχει η μαστίχα φαίνεται ότι έχουν αντινεοπλασματική δράση *in vitro* και έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν το σχηματισμό αλλά και την εξέλιξη του καρκίνου (Crowell *et. al*, 1999). Επίσης είναι γνωστά για την αντιμικροβιακή τους δράση (Inouye *et. al*, 2001) και την ικανότητά τους να



δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες (Choi *et. al*, 2000). Η μεγαλύτερη τάξη τερπενίων είναι τα τριτερπένια και έχει βρεθεί ότι έχουν αντινεοπλασματικές ιδιότητες (Tanaka *et. al*, 2001; Akihisa *et. al*, 2001) αλλά και αφροδισιακή δράση, κυρίως τα τριτερπένια του *Panax ginseng* (Blumenthal *et. al*, 2001; Shin *et. al*, 2002).

Οι πολυφαινόλες που περιέχει η μαστίχα έχουν επωφελείς δράσεις για την υγεία του ανθρώπου. Συγκεκριμένα είναι γνωστές για την καρδιοπροστατευτική τους δράση, την αντικαρκινική τους δράση κυρίως στον εντερικό σωλήνα, την αντιφλεγμονώδη δράση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* καθώς επίσης και για την αντιοξειδωτική τους δράση. Μελέτες έχουν δείξει ακόμη, ότι οι φαινολυκές ενώσεις είναι αποτελεσματικές στην καταπολέμηση της παχυσαρκίας (Πατσάλη Π. 2008).

Στο ελεανολικό οξύ της μαστίχας αποδίδουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση (Σαββίδης, 2000). Έτσι η μαστίχα δρα επουλωτικά λύοντας τις φλεγμονές συγκεκριμένων οργάνων αρχίζοντας από περιοδοντίτιδες, οισοφαγίτιδες, γαστρίτιδες, δωδεκαδακτυλικό έλκος μέχρι τις κολίτιδες και τις αιμορροΐδες.

Οι ταννίνες που περιέχονται στη μαστίχα συμβάλλουν στη μείωση των επιπέδων σακχάρου και χοληστερόλης στο αίμα καθώς αυξάνονται τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και μειώνονται τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης (Andrikopoulos *et. al*, 2003; Triantafyllou *et.al*, 2007).

Έρευνες που έχουν γίνει αποκαλύπτουν την αντιμικροβιακή δράση του μαστιχελαίου ενάντια σε βακτήρια και παθογόνους μικροοργανισμούς. Συγκεκριμένα όταν σε υποστρώματα ανάπτυξης προστέθηκε μαστιχέλαιο, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον ρυθμό αύξησης των μικροοργανισμών (Tassou *et. al*, 2006).

Η περιλλύλ-αλκοόλη (POH), συστατικό του μαστιχελαίου (σε ποσοστό περίπου 0,84%) παρουσιάζει τα τελευταία χρόνια μεγάλο κλινικό ενδιαφέρον. Από μελέτες που έχουν γίνει (Belanger *et. al*, 1998; Crowell *et. al*, 1999) φαίνεται να ασκεί χημειοπροστατευτική και χημειοθεραπευτική δράση σε ποικιλία μοντέλων καρκίνου τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε κυτταρικές καλλιέργειες. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι παρεμποδίζει την διαδικασία της αγγειογένεσης (Loutraki *et. al*, 2004) και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση διαφόρων καρκινικών κυττάρων (Loutraki *et. al*, 2006; Πατσάλη Π. 2008).

Εκτός από τις παραπάνω δράσεις η μαστίχα έχει ακόμη αγχολυτικές, διεγερτικές, αντηλιακές, αντιγηραντικές, λευκαντικές και αρωματικές ιδιότητες.

Στην οδοντιατρική η μαστίχα χρησιμοποιείται ως συστατικό του σφραγίσματος των δοντιών και των εκμαγείων οδοντοστοιχειών (Σαββίδης, 2000). Το μάσημά της συμβάλλει στην αντισηψία του στόματος και στην ενδυνάμωση των ούλων. Επίσης προκαλεί εφύγρανση της στοματικής κοιλότητας, λόγω του παραγόμενου σιέλου, με συνέπεια τον καθαρισμό και αρωματισμό.

Στην ορθοδοντική βοηθάει στην βελτίωση των ατελειών της οδοντοστοιχίας, ενώ η μάσηση της σκληρής φυσικής μαστίχας δραστηριοποιεί τους περιοδοντικούς ιστούς με αποτέλεσμα την ορθότερη ανάπτυξη του οστεϊκού συστήματος της μασητικής συσκευής (Σαββίδης, 2000). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης ορθοδοντικών προβλημάτων.

Η συστηματική μάσηση μαστίχας περιορίζει επίσης το σχηματισμό μικροβιακών πλακών κυρίως με μηχανικό τρόπο. Έτσι προλαμβάνεται η τερηδόνα και οι περιοδοντικές παθήσεις. Ερευνητές παρατήρησαν ότι μασώντας μαστίχα μειώνεται ο κίνδυνος εμφάνισης πλάκας καθώς δρα ανασταλτικά στην δράση των μικροβίων που την προκαλούν (Aksoy *et. al*, 2006). Οι ιδιότητες αυτές την καθιστούν απαραίτητο συστατικό οδοντόκρεμας για την στοματική καθαριότητα, αντισηψία και υγιεινή.

❖ Βιομηχανία

Η ρητίνη του μαστιχόδενδρου είναι μερικώς διαλυτή στην αλκοόλη και πλήρως διαλυτή στον αιθέρα και άλλους οργανικούς διαλύτες. Η ιδιότητά της αυτή την καθιστά χρήσιμο συστατικό διαφόρων βιομηχανικών προϊόντων. Στην αρωματοποιία χρησιμοποιείται στην παρασκευή αρωμάτων, κρεμών προσώπου, βερνικιών νυχιών. Στην υφαντουργία χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής χρωμάτων και για το κολλάρισμα των υφασμάτων, κυρίως των μεταξωτών.

Στη βυρσοδεψία βρίσκει πολλές εφαρμογές στην παραγωγή ελαστικών και πλαστικών, χρωμάτων, κόλλας και κολλοειδών ουσιών, αλλά και ως σταθεροποιητής χρωμάτων στη λιθογραφία. Επίσης χρησιμοποιείται στην παραγωγή βερνικιών ανώτερης ποιότητας (κατασκευή αεροσκαφών, μουσικών οργάνων, επίπλων, κα.) αλλά και στην παρασκευή «ισπανικού κεριού» (βουλοκέρι).



❖ Μαγειρική – Ζαχαροπλαστική

Η μαστίχα χρησιμοποιείται ως πρόσθετη ύλη στην Παρασκευή αρτοσκευασμάτων, γλυκισμάτων και ποτών. Ιδιαίτερη θέση κατέχει το γλυκό μαστίχα («υποβρύχιο») που σερβίρεται βυθισμένο σε ποτήρι με νερό. Επίσης χρησιμεύει στο λουστράρισμα της σοκολάτας, στα μπισκότα, στα παγωτά, κα.

Στην μαγειρική αποτελεί ιδιαίτερο μπαχαρικό, που προσδίδει διακριτικό άρωμα στο κρέας και το τυρί. Πολλές μεσογειακές χώρες έχουν εντάξει τη μαστίχα στις κουζίνες τους είτε ως σκόνη ή σε μικρά τεμάχια. Επίσης αποτελεί σημαντικό διαιτητικό συμπλήρωμα, κυρίως σε περιπτώσεις έλλειψης ιχνοστοιχείων.

Τα πιο γνωστά μονοτερπένια της μαστίχας όπως είναι η γερανιόλη, το λεμονένιο, η μενθόλη και το α-πινένιο, χρησιμοποιούνται ως βελτιωτικά γεύσης και χρώματος. Ενώ οι διάφορες ενώσεις που περιέχει την καθιστούν πολύ καλό συντηρητικό για τα τρόφιμα, καθώς αναστέλλεται η ανάπτυξη διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών (κολοβακτηρίδια, σαλμονέλα, σταφυλόκοκκο) (Tassou *et.al*, 1996).

Στην ποτοποιία χρησιμοποιείται για την παρασκευή ούζου, ηδύποτων και στον αραβικό κόσμο (κυρίως στο Ιράκ) για την παραγωγή του «αράκ» (είδος ρακής). Με την προσθήκη της μαστίχας το ποτό αποκτά το ιδιαίτερο άρωμά της ενώ περιορίζεται η βλαπτική δράση της αλκοόλης στο στομάχι. Ιδιαίτερος γνωστό είναι και το λικέρ μαστίχα που παράγεται στη Χίο και πίνεται είτε πριν το φαγητό για όρεξη είτε μετά το φαγητό για καλύτερη χώνεψη.

4.5 ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η πιο ολοκληρωμένη μελέτη όσον αφορά τη συστηματική κατάταξη του γένους *Pistacia*, έγινε από τον Zohary (1972), ο οποίος με βάση τη μορφολογία των καρπών, των ανθών και τα χαρακτηριστικά των φύλλων, διαχώρισε 11 είδη “πιστακιάς” σε 4 ομάδες. Οι ομάδες ήταν οι εξής:

- 1) *Lentiscella Zoh.*: περιείχε τα είδη *P.mexicana* HBK, *P.texana* Swingle
- 2) *Eu-Lentiscus Zoh.*: περιείχε τα είδη *P.lentiscus* L., *P.weinmannifolia* Poisson, *P.saportae* Burnat
- 3) *Butmela Zoh.*: περιείχε το είδος *P.atlantica* Desf.



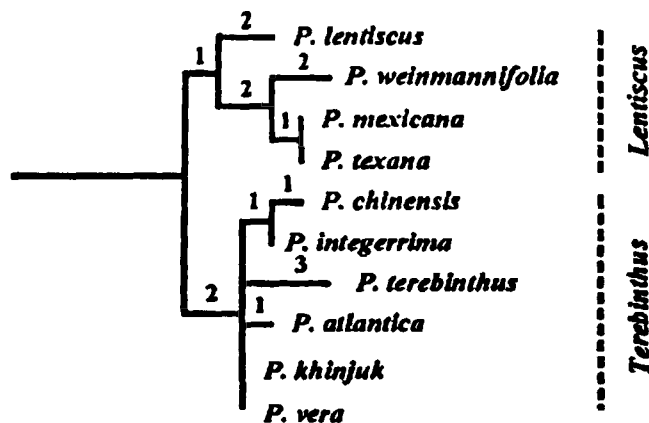
4) *Eu-Terebinthus* Zoh.: περιείχε τα είδη *P.vera* L., *P.palaestina* Boiss, *P.chinensis* Bge, *P.khinjuk* Stocks, *P.terebinthus*

Τα παραπάνω είδη απαντώνται σε διαφορετικές περιοχές λιγότερο ή περισσότερο απομονωμένες. Στην περιοχή του Μεξικού, στη λεκάνη της Μεσογείου, στην περιοχή Ιραν-Ισραήλ-Συρία-Παλαιστίνη, στην ευρωπαϊκή Τουρκία και Κριμμαία, στην ΒΑ Αφρική και στην περιοχή Κίνας-Ιαπωνίας. Οι δύο πρώτες ομάδες περιλαμβάνουν αιθαλείς θάμνους ή δένδρα. Κατά τον Zohary το είδος *P.integerrima* Stewart είναι ποικιλία του *P.chinensis*. Επίσης σύμφωνα με στοιχεία από απολιθώματα, ο Zohary υποστηρίζει ότι η *P.lentiscus* εμφανίστηκε πριν από περίπου 40.000.000 χρόνια και το γένος *Pistacia* πιθανότατα πάνω από 80.000.000 χρόνια πριν. Από ότι φαίνεται τα είδη του γένους *Pistacia* εξελίχθηκαν με σχετικά αργούς ρυθμούς. Ωστόσο τα είδη αυτά έχουν μεγάλο κύκλο ζωής, χρειάζονται τουλάχιστον 10 χρόνια για να ανθήσουν πρώτη φορά και η διάρκεια ζωής τους μπορεί να φτάσει και τα 400 χρόνια σε ορισμένες περιπτώσεις. Ο μέσος όρος αντικατάστασης ενός σπορίου στη φύση είναι περίπου 50-200 χρόνια, επομένως δεν είναι τυχαίο ότι ο ρυθμός εξέλιξης των ειδών αυτών είναι σχετικά αργός σε σχέση με άλλα φυτά.

Ένα επιπλέον είδος το *Pistacia aethiopica* Kokwaro, που αναφέρθηκε από τους Kokwaro και Gillett (1980), με βάση τη μορφολογία των φύλλων και το μέγεθος του δένδρου, θεωρήθηκε από τους συγγραφείς ότι είναι συνώνυμο με δείγματα που αναφέρονται ως *P.lentiscus* L.var. *emarginata* Engl. Ωστόσο βασιζόμενοι στις περιγραφές τους το είδος αυτό θα μπορούσε να είναι ποικιλία της *P.atlantica*, υπόθεση την οποία υποστηρίζουν και άλλοι ερευνητές (AL-Saghir, 2010).

Μετέπειτα μελέτες (Parfitt and Badendes, 1997) που έγιναν με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά (μέγεθος δένδρου, μορφολογία φύλλων, καρπών, ανθών), γεωγραφική κατανομή και τεχνικές μοριακής ταξινόμησης (χλωροπλαστικό DNA, cpDNA) υποστηρίζουν ότι τα είδη του γένους *Pistacia* διανέμονται σε δύο μονοφυλετικές ομάδες: 1) την "*Lentiscus*" που περιέχει τα είδη *P.lentiscus*, *P.weinmannifolia*, *P.mexicana*, *P.texana* και 2) την "*Terebinthus*" που περιέχει τα υπόλοιπα έξι είδη (Εικόνα 14).





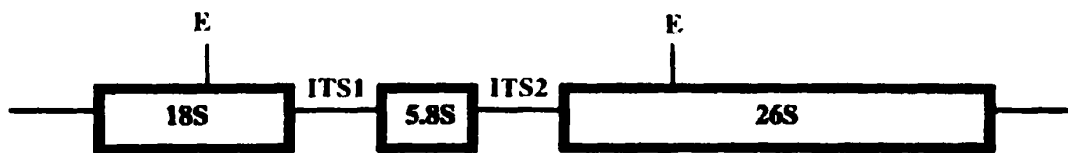
Εικόνα 14: Φυλογενετικό δένδρο που αναπαριστά τις σχέσεις μεταξύ των ειδών του γένους *Pistacia*, από αναλύσεις του χλωροπλαστικού DNA. Οι αριθμοί υποδηλώνουν τον αριθμό μεταλλάξεων/κλάδο (Parfitt and Badendes, 1997).

Τα είδη της ομάδας *Lentiscus* είναι αιθαλή με ζυγό αριθμό πτεροειδών φυλλαρίων, ενώ τα είδη της ομάδας *Terebinthus* είναι φυλλοβόλα και ο αριθμός των πτεροειδών φυλλαρίων τους είναι μονός καθώς φέρουν τελικό φυλλάριο. Επίσης το μέγεθος των σπόρων της πρώτης ομάδας είναι μικρότερο σε σχέση με εκείνο της δεύτερης ομάδας. Από τις μελέτες αυτές υποστηρίζεται ότι τα είδη *P.khinjuk* και *P.vera* είναι πρωτόγονα είδη του γένους *Pistacia*, υπόθεση που είχε γίνει και από τον Zohary. Και τα δύο αυτά είδη έχουν μεγάλους και εδώδιμους καρπούς και έχουν παρόμοια τριαδική κατανομή πτεροειδών φυλλαρίων.

Πιθανότατα η εξέλιξη προς ένα μικρότερο σπόρο με σκληρό ενδοκάρπιο έχει να κάνει με την αλλαγή στη στρατηγική αναπαραγωγής από την διανομή του σπέρματος από τους σκίουρους του εδάφους στη διασπορά του από τα πουλιά. Για το λόγω αυτό το σπέρμα θα πρέπει να είναι μικρό ώστε να περνάει μέσα από το έντερο των πουλιών. Τα υπόλοιπα είδη που εξελίχθηκαν λίγο αργότερα έχουν μικρότερα φύλλα με περισσότερα φυλλάρια και μικρότερα πιο σκληρά σπόρια, παρόλο που πιθανότατα εξελίχθηκαν ανεξάρτητα. Τα μικρότερα φύλλα, που είναι πιο αποδοτικά στην απομάκρυνση του νερού μπορεί να είναι εξελικτική προσαρμογή των φυτών που ζουν σε περιοχές με υψηλές βροχοπτώσεις.

Οι Yi *et.al*, το 2008 μελέτησαν τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των ειδών του γένους *Pistacia* χρησιμοποιώντας ως μοριακά εργαλεία ταξινόμησης τις περιοχές ITS. Οι περιοχές αυτές γνωστές ως Εσωτερικά Μεταγραφόμενες Περιοχές (**Internal Transcribed Regions, ITS**) αποτελούνται από δύο μη κωδικεύουσες περιοχές που

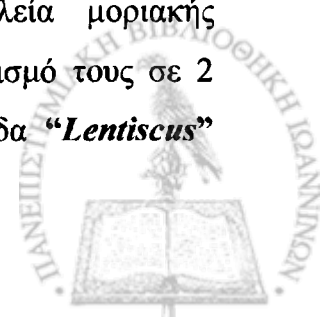
εδράζονται μεταξύ των εξελικτικά συντηρημένων και επαναλαμβανόμενων περιοχών του ριβοσωμικού DNA (rDNA) (Εικόνα 15). Οι επαναλαμβανόμενες περιοχές του rDNA έχουν συντηρηθεί εξελικτικά και κωδικεύουν τα 18S, 5,8S και 26S rRNA που αποτελούν τμήματα των υπομονάδων του ριβοσώματος. Σε αντίθεση με τις αυστηρά συντηρημένες περιοχές των ριβοσωμικών γονιδίων οι περιοχές ITS υφίστανται μεταλλάξεις που ενδεχομένως καθίστανται πλέον μοναδικές και κατά συνέπεια χαρακτηριστικές για κάθε είδος. Η μελέτη λοιπόν αυτών των περιοχών μπορεί να βοηθήσει στην ανίχνευση των φυλογενετικών σχέσεων τόσο μεταξύ ειδών του ίδιου γένους όσο και μεταξύ πληθυσμών (White *et al.* 1990; Alvarez and Wendel, 2003).



Εικόνα 15: Σχηματικό διάγραμμα του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA, στο οποίο αναπαρίστανται οι περιοχές ITS. Υπάρχουν δύο περιοριστικές θέσεις *EcoRI* (σημειωμένες ως E) βρισκόμενες εκτός των περιοχών ITS (White *et al.* 1990, τροποποιημένο).

Η ενίσχυση της περιοχής ITS του rDNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ακολουθούμενη από κλωνοποίηση και ταυτοποίηση της αλληλουχίας του DNA προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με την κλωνοποίηση και την ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κωδικών περιοχών των rRNA γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος αυτή: 1) απαιτεί μικρή ποσότητα χρωμοσωμικού DNA, (0.1 έως 10 ng) για την ενίσχυση της περιοχής ITS, 2) επιτρέπει να αναλυθούν και οι δυο αλυσίδες της περιοχής κατά την ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, οπότε μειώνονται τα λάθη και 3) είναι συμβατή με την αυτόματη ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA (White *et al.* 1990).

Μελέτες που έγιναν (Yi *et.al.*, 2008) για την ανίχνευση των σχέσεων μεταξύ των ειδών του γένους *Pistacia* χρησιμοποιώντας σύγχρονα εργαλεία μοριακής ταξινόμησης (περιοχές ITS) έδειξαν να συμφωνούν με τον διαχωρισμό τους σε 2 ομάδες (εικόνα 16). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η μία ομάδα "*Lentiscus*"



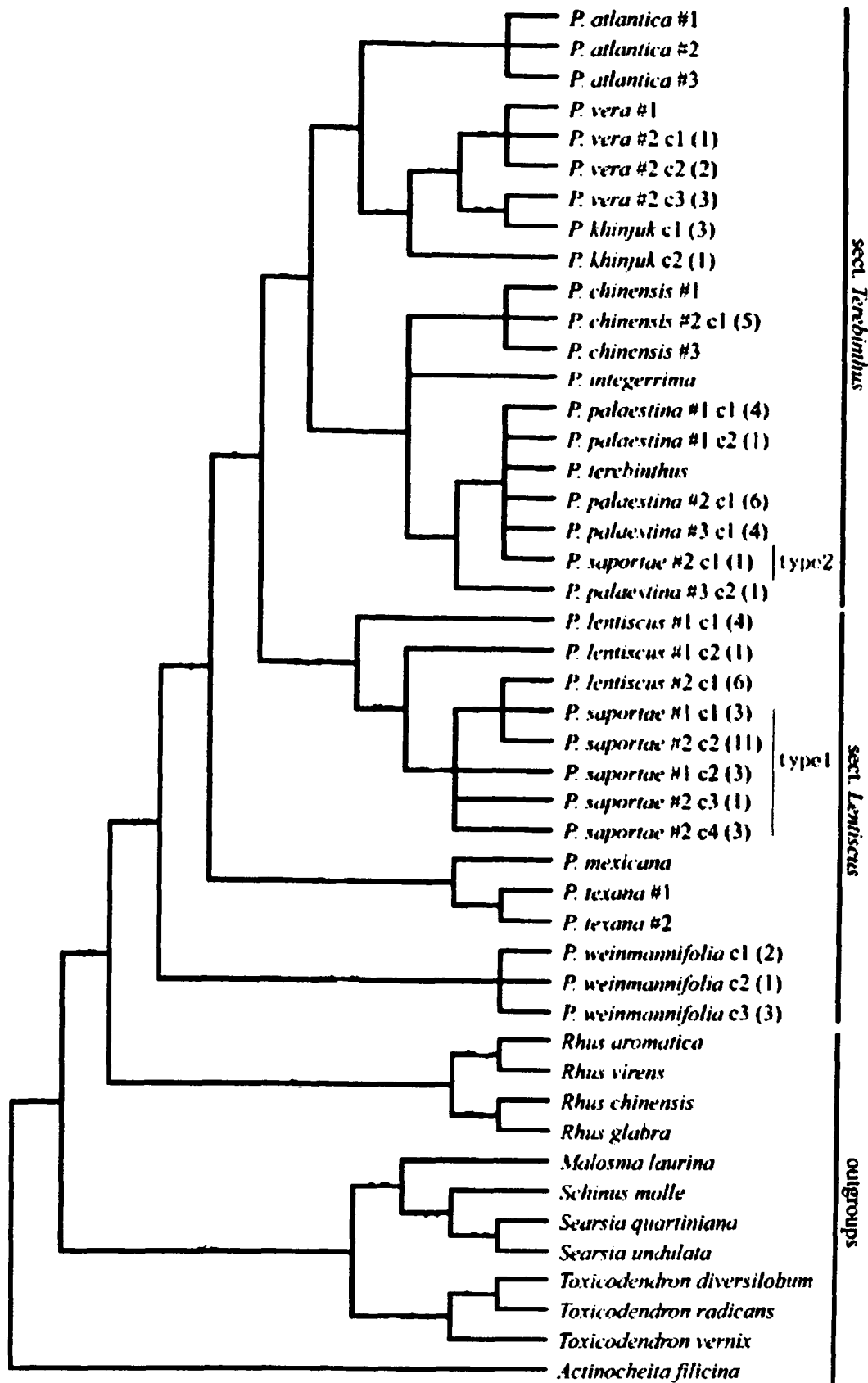
περιέχει αειθαλή δένδρα και χωρίζεται σε δύο υποομάδες. Η μία υποομάδα περιλαμβάνει τα είδη *P.lentiscus*, *P.lentiscus* var. *Chia* (που αποτελεί ποικιλία της προηγούμενης και διαφέρει από αυτή μορφολογικά και μοριακά) και *P.saportae*. Ενώ η δεύτερη υποομάδα αποτελείται από τα είδη *P.texana* *P.mexicana*.

Το είδος *P.weinmannifolia* αποτελεί μία μονοφυλετική ομάδα από μόνο του και θεωρείται ότι είναι το πιο αρχαίο, συγγενικό του προγονικού είδους από το οποίο εξελίχθηκαν ανεξάρτητα τα υπόλοιπα είδη του γένους *Pistacia* (Yi *et.al*, 2008). Μορφολογικά η *P.weinmannifolia* εμφανίζει περισσότερες ομοιότητες με την *P.mexicana* παρά με την *P.lentiscus* (AL-Saghir, 2010).

Οι αναλύσεις των ITS (Yi *et al.*, 2008) περιοχών έδειξαν ότι το είδος *P.saportae* είναι πιθανότατα υβρίδιο του *P.lentiscus* (μητρικό) και του *P.terebinthus* (πατρικό) άποψη με την οποία συμφωνούν και άλλοι ερευνητές (Zohary, 1952, Kafkas *et.al*, 2009; AL-Saghir, 2010).

Η δεύτερη ομάδα "***Terebinthus***" περιλαμβάνει φυλλοβόλα είδη και χωρίζεται σε δύο υπο-ομάδες (σύμφωνα με τα δεδομένα των ITS και του cpDNA): η μία περιέχει τα είδη *P.atlantica*, *P.vera*, *P.khinjuk* και η άλλη περιλαμβάνει τα είδη *P.chinensis*, *P.integerrima* *P.palaestina* και *P.terebinthus*.

Τα είδη *P.terebinthus* και *P.palaestina*. μοιάζουν πολύ μεταξύ τους όσον αφορά στη μορφολογία των φύλλων τους. Σύμφωνα με αυτό το χαρακτηριστικό αρκετοι ερευνητές υπέθεσαν ότι το είδος *P.palaestina* μάλλον είναι υποείδος του *P.terebinthus*, υπόθεση που υποστηρίζεται από, τις μελέτες των Katsiotis *et. al.*, 2003; Golan-Goldhirsh *et. al*, 2004; Kafkas, 2006 (δεδομένα AFLP, RAPD). Τα είδη αυτά παρουσιάζουν σημαντικές οικολογικές, γενετικές και μορφολογικές ομοιότητες και είναι δύσκολο να διακριθούν. Τα φύλλα και των δύο είναι ακανόνιστα πτεροειδή ή πτεροειδή και μεμβρανώδη, και τα φυλλάριά τους (6-11) ωσειδή με μυτερή κορυφή και τελικό φυλλάριο που είναι συνήθως μικρότερο από τα πλευρικά (AL-Saghir, 2010).



Εικόνα 16: Το φυλογενετικό δένδρο που αναπαριστά τις σχέσεις μεταξύ των ειδών του γένους *Pistacia*, από αναλύσεις των περιοχών ITS. # = αύξων αριθμός, c= ο αριθμός του κλώνου, οι αριθμοί στις παρενθέσεις = συνολικός αριθμός συγκεκριμένων κλωνικών αλληλουχιών (Yi *et.al*, 2008).

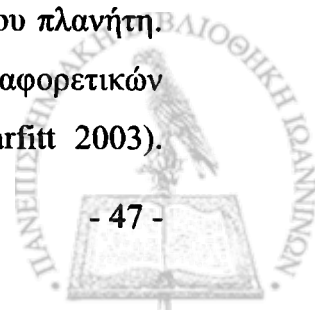


Επίσης μεγάλη φυλογενετική συγγένεια φαίνεται να υπάρχει ανάμεσα στα είδη *P.vera* και *P.khinjuk*. Μοριακά δεδομένα που προέρχονται από αναλύσεις των ITS περιοχών (Yi *et al.*, 2008) καθώς και του χλωροπλαστικού DNA (Parfitt and Badendes, 1997), υποστηρίζουν αυτή την άποψη. Το είδος *P.vera* είναι από τα πιο αρχαία καλλιεργούμενα είδη *Pistacia*, έχει σκληρά ακανόνιστα πτεροειδή φύλλα αποτελούμενα από 3-5 ωοειδή φυλλάρια (AL-Saghir, 2010), και πιθανότατα από αυτό προέκυψε το είδος *P.khinjuk*.

Ένα ακόμα ζευγάρι ειδών *Pistacia* με σημαντικές ομοιότητες είναι αυτό των *P.texana* και *P.mexicana*. Με βάση μοριακά δεδομένα (cpDNA, ITS) τα δύο αυτά είδη είναι δύσκολο να διαχωριστούν και μάλλον πρόκειται για αδερφές ταξινομικές ομάδες. Οι Yi *et al.*, 2008 υποστηρίζουν ότι με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά μάλλον πρόκειται για δύο διαφορετικά, ωστόσο υψηλής συγγένειας είδη. Σε σχέση με την *P.mexicana* η *P.texana* έχει μικρότερα και λιγότερα φύλλα, τα οποία κατανέμονται πάνω σε άξονα και τα φυλλάριά τους έχουν επίπεδο μίσχο και τελικό φυλλάριο. Επίσης η *P.texana* είναι δένδρο αειθαλές και οι διακλαδώσεις του αρχίζουν από τη βάση, ενώ η *P.mexicana* είναι δένδρο ημι-φυλλοβόλο (ρίχνει τα φύλλα την άνοιξη) και ο κορμός του δε φέρει διακλαδώσεις. Επειδή από τα μέχρι τώρα δεδομένα είναι δύσκολο να γίνει ξεκάθαρος διαχωρισμός των σχέσεων μεταξύ των δύο αυτών ειδών χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

Ο Zohary (1952) σε μελέτες του υποστηρίζει ότι το είδος *P.integerrima* είναι ποικιλία του *P.chinensis*. Ωστόσο η άποψη αυτή δεν γίνεται αποδεκτή από τους Parfitt και Badenes (1997) οι οποίοι με βάση τα δεδομένα τους από αναλύσεις του χλωροπλαστικού DNA θεωρούν ότι πρόκειται για δύο διαφορετικά είδη. Με τους τελευταίους συμφωνούν και οι Yi *et al.*, (2008), ενώ ο AL-Saghir (2010) παρατηρώντας τα δύο είδη μορφολογικά συμφωνεί με τον Zohary. Το είδος *P.chinensis* εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια, τα φύλλα του είναι μεγάλα και μακριά, με μακριά και λογχοειδή φυλλάρια όμοια με εκείνα του *P.integerrima*. Επίσης σύμφωνα με τον AL-Saghir η γεωγραφική κατανομή των δύο αυτών ειδών συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι το *P.integerrima* αποτελεί υποείδος και όχι ποικιλία του *P.chinensis*.

Η μεγάλη ετερογένεια σε μορφολογικό, περιβαλλοντικό, γεωγραφικό και γενετικό επίπεδο, που παρατηρείται μεταξύ των ειδών του γένους *Pistacia* παίζει σημαντικό ρόλο στην ευρεία κατανομή των ειδών σε διάφορα γεωγραφικά πλάτη του πλανήτη. Στη φύση είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί υβριδισμός μεταξύ δύο διαφορετικών ειδών (π.χ *P.saportae*) και να προκύψουν νέοι γόνιμοι απόγονοι (Parfitt 2003).



Υβριδισμοί όμως μπορούν να γίνουν και τεχνητά από τους καλλιεργητές, με στόχο να βελτιώσουν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των καλλιεργειών και να αυξήσουν την παραγωγή. Συνεπώς σε ορισμένες περιπτώσεις η διάκριση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών του γένους *Pistacia* αποτελεί μια επίπονη διαδικασία, η οποία απαιτεί μια πληθώρα δεδομένων. Ακόμα και σε φυτά του ίδιου είδους παρατηρούνται διαφορές σε μορφολογικό και γενετικό επίπεδο, οι οποίες μπορεί να είναι αποτέλεσμα προσαρμογής των φυτών στα εκάστοτε περιβάλλοντα.

Συγκεκριμένα η *P.lentiscus* λόγω της ποικιλίας γονοτύπων και φαινοτύπων που εμφανίζει αποτελεί χαρακτηριστικό φυτό της Μακκίας βλάστησης της Μεσογείου. Έχει αναπτύξει μηχανισμούς που την προστατεύουν από την ξηρασία, τα φυτοφάγα ζώα και έχει την ικανότητα να αναγεννάται γρήγορα μετά από πυρκαγιά (Barazani *et.al*, 2003).

Επίσης μελέτες που έγιναν στο Ισραήλ και στην Κύπρο (Nahum *et.al*, 2008) σε είδη της *P.lentiscus* όσον αφορά την επιβίωσή της στα περιβάλλοντα αυτά έδειξαν ότι υπάρχουν αρκετές μορφολογικές και οικοφυσιολογικές διαφορές σε φυτά του ίδιου είδους. Οι διαφορές αυτές φαίνεται ότι οφείλονται είτε σε φαινοτυπική ποικιλομορφία (ένας γονότυπος που εκφράζεται με διαφορετικό τρόπο) είτε σε γονοτυπική ποικιλομορφία (οικότυποι – διαφορετικοί γονότυποι). Συνεπώς η περιβαλλοντική ετερογένεια και η φυσική επιλογή μπορεί να οδηγήσει σε γονοτυπική και φαινοτυπική ετερογένεια σε πληθυσμούς του ίδιου είδους.



5. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας που εμφανίζεται μεταξύ διαφορετικών «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου της Χίου, *P.lentiscus* var. *Chia*. Μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών δένδρων υπάρχουν σημαντικές γονοτυπικές διαφορές οι οποίες εκφράζονται ως φαινοτυπικές παραλλαγές. Για να επιτευχθεί ο μερικός γονοτυπικός χαρακτηρισμός ομάδας «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου, χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο μοριακής ταξινόμησης η αναζήτηση μεταλλάξεων στις ITS περιοχές. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι περιοχές αυτές εδράζονται μεταξύ των υψηλά συντηρημένων και επαναλαμβανόμενων περιοχών του ριβοσωμικού DNA (rDNA) και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών.



6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1. ΥΛΙΚΑ – ΟΡΓΑΝΑ

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν:

Αυτόματες πιπέτες: Gilson P2 (0.2-2 μ l), P20 (2-20 μ l), P200 (20-200 μ l), P1000 (200-1000 μ l)

Φυγόκεντροι: Biofuge Stratos Aeraus, Costar, Universal 16A, Hettich ZENTRIFUGEN MICRO 12-24, Thermo ELECTRON CORPORATION IEC MICROMAX RF Refrigerated Microcentrifuge

Ζυγοί: KERN

Ανακινούμενος επωαστήρας: EDMUND BÜHLER TH30

Θερμοαποξηραντής: Thermo Savant ISS110 Speedvac System

Υπερκαταψύκτης (-80 °C): Thermo Forma model 994

Καταψύκτης (-20 °C): Whirlpool Easytronic

Ψυγειοκαταψύκτης (4 °C, -20 °C): Bosch

Συσκευή ανάδευσης: Maxi Rocket UNITWIST RTDuoSystem

Αυτόκαυστο: ASTELL SCIENTIFIC AMB 430

Συσκευές ηλεκτροφόρησης DNA τροφοδοτικά: Cansort E844, Roth Karlsruhe HU6, HU10, HU13

Dry bath incubator: Kisker MD-02N, Kisker CH100

Υδατόλουτρο: BIOLINE SCIENTIFIC WB5020

Πεχάμετρο: inoLab pH Level 2 WTW

Συσκευή ακτινοβολίας UV: VILBER LOURMAT

Εστία νηματικής ροής: BIOAIR INSTRUMENTS ELECTRONIC AYTOSPEED CONTROL m/sec

Αναδευτήρας (Vortex): VELP SCIENTIFICA

Φωτόμετρα: U-1500 Spectrophotometer HITACHI, Quawell DNA/Protein Analyzer

Ηλεκτροδιατρητής (electroporator): BIORAD GenePulser Xcell

Φωτογραφική μηχανή: Kodak EDAS 290

Επωαστήρες: Memmert, Incucell MMM Medcenter

Θερμοκυκλοποιητές: eppendorf Mastercycler gradient, MJ Research MiniCycler New

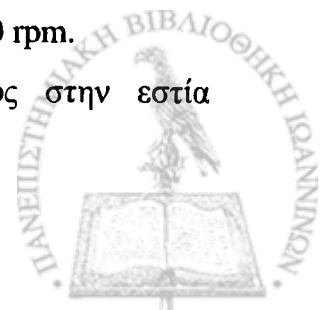
6.2. ΦΥΤΙΚΟΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ, ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

Οι φυτικοί οργανισμοί που μελετήθηκαν ήταν οι «ποικιλίες» του *Pistacia lentiscus* var *Chia*: Βότομος, Μαρουλίτης, Μαυρόσχιнос, Στενόφυλλος και Φαρδύφυλλος. Χρησιμοποιήθηκαν ακόμα κύτταρα *E.coli DH5a* και το πλασμίδιο pBluescript.

6.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν τροποποίηση του πρωτοκόλλου Doyle J.J and Doyle J.L 1990 από τους Χατζηλουκά Ε. και Πήλιου Κ. (2006) (αδημοσίευτο):

1. Προθέρμανση σε υδατόλουτρο στους 65 °C, 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης CTAB στο οποίο προστέθηκε 0,15 g PVP για κάθε δείγμα.
2. Λειοτρίβηση 1 g κατεψυγμένων φύλλων με υγρό άζωτο μετά από προσθήκη στο γουδί 0,15 g PVP, μέχρι να γίνουν σκόνη.
3. Μεταφορά της σκόνης προσεκτικά στο προθερμασμένο διάλυμα εκχύλισης CTAB και ήπια ανάδευση.
4. Προσθήκη 25 μl Proteinase K [C= 20mg/ml] και 20 μl β-μερκαπταιθανόλη (στον απαγωγό) σε κάθε δείγμα.
5. Επώαση στους 65 °C για μία ώρα, με περιστασιακή ήπια ανάδευση.
6. Εκχύλιση απευθείας με χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1 v/v) σε ίσο όγκο και τα τοποθέτηση για 15 min στον αναδευτήρα για ήπια και σταθερή ανάδευση.
7. Φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου για διαχωρισμό των φάσεων.
8. Απομάκρυνση της υδατικής φάσης με πιπέτα με φαρδύ στόμιο (κομμένο) και μεταφορά σε καθαρό σωλήνα φυγοκέντρησης. Προσθήκη 2/3 του όγκου κρύα ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση προκειμένου να κατακρημνιστούν τα νουκλεϊκά οξέα (προτιμάται η επώαση overnight στους -20 °C).
9. Φυγοκέντρηση στις 8250 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
10. Προσεκτική απόρριψη του υπερκείμενου.
11. Προσθήκη 10 ml διαλύματος έκπλυσης (wash buffer) και ανάδευση για την απομάκρυνση υδατοδιαλυτών προσμείξεων.
12. Φυγοκέντρηση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου στις 8250 rpm.
13. Απόρριψη του υπερκείμενου και ξήρανση του δείγματος στην εστία νηματικής ροής σε θερμοκρασία δωματίου.



14. Προσθήκη στο ίζημα 400 μl TE και τοποθέτηση του falcon σε υδατόλουτρο στους 65 °C για επαναδιαλυτοποίηση. Διαχωρισμός σε 2 erpendorf του διαλύματος, προσθήκη επιπλέον 100 μl TE στο falcon και διαχωρισμός εκ νέου στα erpendorf.
 15. Προσθήκη 1,25 μl RNaseA [0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$] και επώαση για 1 ώρα στους 37 °C.
 16. Προσθήκη οξικού αμμωνίου 7,5 M (pH 7,7) σε τελική συγκέντρωση 2,5 M και προσθήκη 2,5 όγκων απόλυτης αιθανόλης (κρύα). Απαλή ανακίνηση για κατακρήμνιση του DNA.
 17. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 8500 rpm στους 4 °C.
 18. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και 2 πλύσεις με 1 ml αιθανόλη 70% (κρύα). Φυγοκέντρηση για 15 min σε 10000 rpm στους 4 °C.
 19. Ξήρανση του ιζήματος στον αέρα εν κενώ (speed-vac) και επαναδιαλυτοποίηση σε 100 μl TE στους 65 °C για περίπου 15min.
- Τα δείγματα διατηρούνται στους -20 °C.

Υλικά και διαλύματα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης CTAB [διατηρείται σε $\theta > 15^{\circ}\text{C}$, διότι άλλως κατακρημνίζεται]
 - 4% w/v CTAB (Cetyl-trimethyl ammonium bromide),
 - 1,4 M NaCl,
 - 20 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) pH 8,
 - 100 mM Tris-HCl pH 8,
 - 0,2% 2-mercaptoethanol (η οποία προστίθεται λίγο πριν τη χρήση)
- PVP [πολυβινυλική πυρολιδόνη (polyvinylpyrrolidone), αδιάλυτη]
- Proteinase K [20 mg/ml]
- Β-μερκαπταιθανόλη (προστίθεται στον απαγωγό)
- Χλωροφόρμιο- Ισοαμυλική αλκοόλη (24: 1, v/v)
- Ισοπροπανόλη (η οποία χρησιμοποιείται κατευθείαν από το ψυγείο)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (Wash buffer)
 - 76% (v/v) ethanol,
 - 10 mM οξικό αμμώνιο (ammonium acetate) σκόνη
- Ρυθμιστικό διάλυμα TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8)

- RNase A [1 µg/ml]
- 7,5 M οξικό αμμώνιο (ammonium acetate) (pH 7,7)
- Απόλυτη αιθανόλη (-20 °C)
- Αιθανόλη 70% (-20 °C)

6.4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ PCR

Η ενίσχυση του γονιδιωµατικού DNA πραγµατοποιήθηκε σε διάφορους θερμοκυκλοποιητές (MiniCycler MJ Research New, Mastercycler gradient) σε 25 µl τελικό όγκο αντίδρασης µε τη µέθοδο Hot Start αρχικά και σε επόμενα δείγµατα χωρίς Hot Start.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Σύσταση της αντίδρασης PCR

Συστατικά αντίδρασης	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3 (αρνητικός μάρτυρας)
DNA	25-125 ng	25-125 ng	-
Μίγμα Εκκινητών	5 µl	5 µl	5 µl
Βασικό διάλυμα αντίδρασης	8 µl	8 µl	8 µl
dH ₂ O ster	add to 25 µl	add to 25 µl	add to 25 µl
Τελικός όγκος	25 µl	25 µl	25 µl

Στην περίπτωση που ακολουθήθηκε Hot Start τα δείγµατα τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή ο οποίος βρισκόταν ήδη σε θερμοκρασία 80 °C. Στην θερμοκρασία αυτή προστέθηκαν 8 µl του βασικού διαλύµατος αντίδρασης σε κάθε φιαλίδιο και αναδεύσαµε απαλά µε την πιπέτα. Στην περίπτωση που δεν ακολουθήθηκε Hot Start τα δείγµατα τοποθετήθηκαν απευθείας στον θερμοκυκλοποιητή.

Προφίλ ενίσχυσης θερμοκυκλοποιητή:

1. Αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 94 °C για 7 min
2. 94 °C για 3 min (αποδιάταξη)
3. 94 °C για 30 sec



4. 63 °C για 1 min (αναδιάταξη)

5. 72 °C για 2 min (επιμήκυνση)

το βήμα 3 επαναλαμβάνεται για 30 κύκλους

6. Τελικό στάδιο επιμήκυνσης 72 °C για 10 min

7. 4 °C χωρίς χρονικό περιορισμό

8.

Διαλύματα:

Βασικό διάλυμα αντίδρασης για κάθε δείγμα:

3 X 5 μl 5X HF Phusion buffer + 10% = 16,5 μl

3 X 2 μl dNTPs (2,5 mM each) + 10% = 6,6 μl

3 X 0,75 μl DMSO + 10% = 2,47 μl

3 X 0,25 μl Phusion *Taq* DNA polymerase = 0,82 μl

Μίγμα Εκκινητών:

3 X 2,5 μl 18S + 10% = 8,25 μl

3 X 2,5 μl 26S + 10% = 8,25 μl

Επιλογή εκκινητών: ...

Εκκινητής	Μοριακό βάρος	T _m (thermo-dynamic)	Συγκέντρωση (1 ml)	Τελική Συγκέντρωση
18S: 5'- GTG AAC CTG CGG AAG GAT C -3'	5878 g/mol	51.7 °C	18,0 pmol/μl	0,5 μM
26S: 5'- GTA ATC CCG CCT GAC CTG -3'	5436 g/mol	50,0 °C	62,5 pmol/μl	0,5 μM

6.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΠΗΓΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πήγμα αγαρόζης 1% τόσο για μεγαλομοριακά DNA όσο και για το ενισχυμένο με PCR DNA σε διάλυμα TAE.

- Ζύγιση της κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης για την επιθυμητή τελική συγκέντρωση σε κωνική φιάλη και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE για την εκάστοτε φόρμα υποδοχής του πήγματος.
- Θέρμανση του διαλύματος μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει διαυγές.



- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου για τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml (w/v), εφόσον το διάλυμα έχει κρυώσει.
- Συναρμολόγηση της φόρμας υποδοχής κατάλληλα ώστε να δημιουργηθεί ορθογώνιο πήγμα όταν κρυώσει, μαζί με ειδικά χτένια που θα δημιουργήσουν οπές στις οποίες θα τοποθετηθεί το DNA.
- Προσθήκη διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE μέχρι να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του πήγματος.
- Προσθήκη στα δείγματα DNA διαλύματος φόρτωσης (gel loading buffer, GLB) σε αναλογία 5:1.
- Εισαγωγή κάθε δείγματος σε διαφορετικό φρεάτιο με αυτόματη πιπέτα με προσοχή. Εισαγωγή επίσης και των μαρτύρων.
- Σύνδεση της συσκευής στη μονάδα τάσης όπου εφαρμόζονται 5 V/cm.
- Όταν τα δείγματα διήνυσαν την επιθυμητή απόσταση σταμάτησε η παροχή ρεύματος, αφαιρέθηκε το πήγμα από τη συσκευή και τοποθετήθηκε πάνω σε πλάκα με λάμπες υπεριώδους ακτινοβολίας όπου και φωτογραφήθηκε με ειδική φωτογραφική μηχανή. Το ειδικό πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Kodak 1D v. 3.6.0.

Διαλύματα:

TAE (Tris – acetate): Tris 40mM, EDTA 1 mM, pH 8.0 με οξικό οξύ

Βρωμιούχο αιθίδιο: EtBr 3 mg/ml (w/v)

Διάλυμα φόρτωσης GLB: 0,25 % (w/v) κυανού βρωμοφαινόλης, 0,25 % (w/v) κυανολικό ξυλένιο, 30% (v/v) γλυκερόλη.

6.6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΖΩΝΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΓΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο με έτοιμα αντιδραστήρια Geneclean®KIT BIO 101 Systems, για την απομόνωση των ζωνών DNA από το πήγμα αγαρόζης (gel extraction).

Προετοιμασία

- Ζύγιση των erpendorf που θα χρησιμοποιηθούν
- Ρύθμιση του υδατόλουτρου στους 55 °C

1. Αποκοπή της ζώνης από το πήγμα με αποστειρωμένο νυστέρι κάτω από λάμπα UV.



2. Τοποθέτηση του πηγματος σε erpendorf πολυπροπυλαινίου (ποτέ σε γυάλινο) και υπολογισμός του βάρους του σε mg και στη συνέχεια του όγκου του (κατά προσέγγιση $100 \text{ mg} = 100 \text{ }\mu\text{l}$).
3. Προσθήκη 3 όγκων διαλύματος NaI ($C_{\text{TEA NaI}} > 4 \text{ M}$).
4. Επώαση στους 55°C για 1 min μέχρι να λιώσει το πήκτωμα.
5. Ήπια ανάδευση.
6. Επώαση μέχρι το πήγμα να διαλυθεί τελείως ($\sim 5 \text{ min}$).
7. Υπολογισμός του όγκου του Glassmilk

Final volume	Max amount of DNA	Glassmilk
< 500 μl	< 5 μg	5 μl
500 – 1000 μl	< 7,5 μg	10 μl
1 μl	< 12,5 μg	20 μl
3 μl	< 50 μg	100 μl

8. Ισχυρή ανάδευση του δοχείου του Glassmilk για 1 λεπτό (όταν χρειάστηκε επαναδιαλυτοποιήσαμε το Glassmilk σε TE).
9. Προσθήκη του υπολογισμένου όγκου Glassmilk στο διάλυμα DNA/NaI.
10. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ανάδευση ανά 1 – 2 λεπτά.
11. Φυγοκέντρηση για 5 sec σε $14.000 \times g$ και απόχυση του υπερκείμενου. (Το ίζημα έχει τα σφαιρίδια με το DNA δεσμευμένο εκεί).
12. Προσθήκη 500 μl προετοιμασμένου διαλύματος New Wash και επαναδιαλυτοποίηση απαλά με την πιπέτα.
13. Φυγοκέντρηση για 5 sec σε $14.000 \times g$ και απόρριψη του υπερκείμενου.
14. Επανάληψη των βημάτων 13 και 14.
15. Απομάκρυνση του υπερκείμενου, φυγοκέντρηση ξανά για 30 sec σε $14.000 \times g$ και απομάκρυνση με την πιπέτα όλων των υπολειμμάτων υπερκείμενου.
16. Προσθήκη ίσου όγκου TE ή νερού με τον όγκο του Glassmilk που είχε προστεθεί στο βήμα 9. Επαναδιαλυτοποίηση με την πιπέτα προσεκτικά.
17. Φυγοκέντρηση στα $14.000 \times g$ για 30 sec και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf.

18. Προσθήκη επιπλέον 10 μl TE και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος.
19. Φυγοκέντρηση σε 14.000 x g για 30 sec και μεταφορά του υπερκείμενου στο erpendorf του βήματος 17.

Διαλύματα:

[6,0 M] NaI

New Wash: H₂O/ Ethanol/ NaCl/ Tris/ EDTA.

6.7. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ

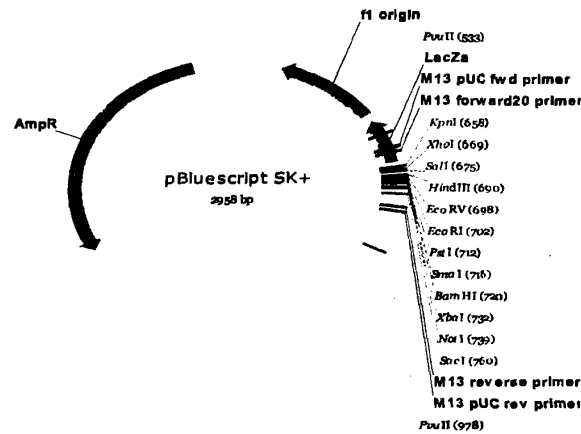
Αντίδραση δεσμοποίησης (ligation) της ένθεσης με τον φορέα κλωνοποίησης pBluescriptSmaI*:

Η αντίδραση δεσμοποίησης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA λιγάση (TakaRa), η οποία μπορεί να συνδέει μόρια DNA με προεξέχοντα ή αμβλεία άκρα που είναι συμβατά μεταξύ τους (ενδομοριακά ή διαμοριακά). Για να είναι επιτυχής η αντίδραση θα πρέπει να υπολογιστεί η συγκέντρωση των μορίων DNA τόσο της ένθεσης όσο και του φορέα. Η ευνοϊκότερη αναλογία άκρων φορέα: ένθεσης κυμαίνεται από 1:3 έως 1:5. Για να επιτευχθεί μια τέτοια αναλογία φωτομετρήθηκαν τα δείγματα και υπολογίστηκε πόσα μl ένθεσης και φορέα θα προστεθούν ώστε να είναι επιτυχής η αντίδραση. Επομένως σε τελικό όγκο 20 μl προστέθηκαν: x μl DNA ένθεσης, y μl DNA φορέα, 2 μl T4 DNA ligase Buffer 10X, 1 μl T4 DNA ligase και z μl νερό (έως τα 20 μl).

Ακολούθησε επώαση στους 16 °C overnight.

* Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε ως φορέας κλωνοποίησης είναι το pBluescript το οποίο είχε προηγουμένως υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο SmaI ώστε να γίνει γραμμικό με αμβλεία άκρα (pBluescriptSmaI) (εικόνα 6.1).





Εικόνα 6.1: Γενετικός και περιοριστικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pBluescript SK+.

Κατακρήμνιση με αιθανόλη και οξικό αμμώνιο

Μετά το πέρας της αντίδρασης δεσμοποίησης εφαρμόστηκε το παρακάτω πρωτόκολλο ώστε να γίνει απομάκρυνση του ενζύμου.

1. Στο erpendorf της ligation προσθήκη οξικού αμμωνίου 7,5M ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 2,5M
2. Προσθήκη 3 όγκων απόλυτης αιθανόλης (-20 °C)
3. Επώαση για μία ώρα στους -80 °C
4. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 30 min στους 4 °C και απόρριψη του υπερκείμενου
5. Προσθήκη 1ml αιθανόλης 70% (-20 °C)
6. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 min στους 4 °C
7. Επανάληψη των βημάτων 5 και 6
8. Απόρριψη του υπερκείμενου
9. Ξήρανση του ιζήματος στον αέρα εν κενώ (speed-vac)
10. Επαναδιαλυτοποίηση σε 10 μl TE στους 65 °C για περίπου 15min.

6.8 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E.coli* DH5a ΜΕ ΜΟΡΙΑ DNA

Για να ελεγχθεί εάν η αντίδραση δεσμοποίησης ήταν επιτυχής πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός επιλεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a με το προϊόν της αντίδρασης.

Παρασκευή επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων

Ημέρα 1^η: Διασπορά βακτηριακών κυττάρων *E.coli* DH5a σε στερεό υπόστρωμα LBA, έτσι ώστε να εμφανιστούν μονές αποικίες. Επώαση στους 37 °C overnight.

Ημέρα 2^η: Διαλογή μίας μονής αποικίας από το τρυβλίο και «επιμόλυνση» 10 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB. Επώαση με ανάδευση στους 37 °C overnight.

Ημέρα 3^η: Από την υγρή καλλιέργεια της προηγούμενης μέρας προστέθηκαν 2 ml σε 200 ml LB σε κωνική φιάλη. Επώαση με ανάδευση στους 37 °C με πάωμα, εωσότου η οπτική της πυκνότητα ανέλθει σε $OD_{600} = 0,35-0,40$. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Τοποθέτηση της βακτηριακής καλλιέργειας στον πάγο για περίπου 25 min, με ήπια ανάδευση, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι κρυνώνει ομοιόμορφα.
- Διαμοιρασμός της καλλιέργειας σε 4 ψυγμένους σε πάγο φυγοκεντρικούς σωλήνες των 50 ml.
- Φυγοκέντρηση για 15 min στις 5000 rpm στους 4 °C
- Προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου και ήπια επαναδιαλυτοποίηση σε 40 ml κρύο υπερκάθαρο H₂O
- Φυγοκέντρηση για 15 min στις 5000 rpm στους 4 °C
- Προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου και ήπια επαναδιαλυτοποίηση σε 20 ml κρύο υπερκάθαρο H₂O
- Συγχώνευση της ποσότητας από δύο φυγοκεντρικούς σωλήνες σε έναν ώστε να υπάρχουν 40 ml δείγματος σε κάθε φυγοκεντρικό σωλήνα
- Φυγοκέντρηση για 15 min στις 5000 rpm στους 4 °C
- Προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου και προσθήκη 8 ml κρύας αποστειρωμένης γλυκερόλης 10% στον κάθε ένα φυγοκεντρικό σωλήνα
- Προσεκτική επαναδιαλυτοποίηση και συγχώνευση του περιεχομένου δύο φυγοκεντρικών σωλήνων σε έναν, ώστε να υπάρχουν τελικά 16 ml δείγματος σε κάθε σωλήνα
- Φυγοκέντρηση για 20 min στις 5000 rpm στους 4 °C
- Προσεκτική απόρριψη του υπερκείμενου με σιφώνι και με τη βοήθεια ψυγμένης αποστειρωμένης πιπέτας παστέρ απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερης ποσότητας.



- Προσθήκη 0,2 ml κρύας αποστειρωμένης γλυκερόλης 10% και ήπια επαναδιαλυτοποίηση.
- Διαμοιρασμός του αιωρήματος των κυττάρων σε ίσους όγκους των 20 μl σε ψυγμένα αποστειρωμένα erpendorf και ρίψη σε υγρό άζωτο
- Τα επιδεκτικά πλέον κύτταρα αποθηκεύονται για μελλοντική χρήση σε κουτί στους -80 °C

** Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα και βρίσκονταν στους 4 °C. Επίσης όλες οι διαδικασίες έγιναν στον πάγο υπό ασηπτικές συνθήκες.

Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)

Προετοιμασία:

- ✓ Καθαρισμός των κυβετών πολύ καλά, πλύσεις με αιθανόλη και αφού στεγνώσουν τοποθετούνται σε θάλαμο με UV ακτινοβολία για περίπου 5 min
- ✓ Τοποθέτηση του θρεπτικού «ανάρρωσης» (S.O.C medium) από τους -20 °C όπου φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου

- I. Τοποθέτηση στον πάγο των επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a, καθώς και το μίγμα δεσμοποίησης
- II. Προσθήκη 3 μl μίγματος στα κύτταρα και προσεκτική ανάδευση με την πιπέτα
- III. Όλο το παραπάνω τοποθετήθηκε σε κυβέττα στον πάγο και εισήχθει σε ένα ειδικό όργανο που ονομάζεται ηλεκτροδιατρητής (electroporator)
- IV. Έκθεση των κυττάρων σε ηλεκτρικές εκκενώσεις της τάξης των 2,5 V και κατόπιν τοποθέτηση στην κυβέττα του θρεπτικού S.O.C (1 ml). Μεταφορά του διαλύματος σε νέο erpendorf
- V. Επώαση με ανάδευση στους 37 °C για μία ώρα
- VI. Σε τρυβλία με LBA, αμπικιλίνη και X-gal επίστρωση κατάλληλης ποσότητας (100 - 300 μl) από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* DH5a
- VII. Επώαση στους 37 °C overnight.

Διαλύματα:

S.O.C medium: σε 100 ml SOB medium προσθήκη 2 ml γλυκόζη 1M (αποστειρωμένη με φιλτράρισμα)

SOB medium: 0,2ml NaCl 5M, 2g Tryptone, 0,5g Yeast Extract, 0,25ml KCl 1M ; διαλυτοποίηση σε 90ml H₂O και προσαρμογή του pH στο 7 σε τελικό όγκο 100ml. Αποστείρωση στο αυτόκαυστο και προσθήκη 1ml αποστειρωμένου MgCl₂ 1M και 1ml αποστειρωμένου MgSO₄ 1M.

LBA: 2g NaCl, 2g Tryptone, 1g Yeast Extract, 4g Agar 200 ml H₂O (αποστειρωμένο)

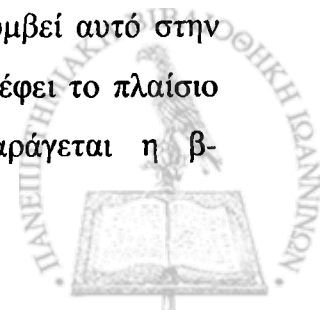
LB: 2g NaCl, 2g Tryptone, 1g Yeast Extract, 200 ml H₂O (αποστειρωμένο)

6.9 ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΛΟΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

Η επιλογή των κυττάρων που έχουν προσλάβει τον φορέα κλωνοποίησης pBluescript (ανασυνδυνασμένο ή μη) έγινε με τη βοήθεια του αντιβιοτικού αμικικιλίνη. Ο φορέας φέρει μεταξύ άλλων και το γονίδιο *bla* το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη. Επομένως τα κύτταρα που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο θα αναπτυχθούν στα τρυβλία που περιέχουν αμικικιλίνη.

Η διάκριση μεταξύ αποικιών που έχουν προσλάβει το ανασυνδυνασμένο με την ένθεση πλασμίδιο έναντι αυτών που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο επανακυκλοποιημένο γίνεται μέσω της δράσης του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήσαμε μεταξύ άλλων φέρει τη ρυθμιστική περιοχή (υποκινητής, χειριστές) του οπερονίου της λακτόζης και ένα τμήμα του γονιδίου *lacZ* που κωδικεύει τα πρώτα 146 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου της β-γαλακτοσιδάσης. Επιπλέον στο τμήμα του *lacZ* υπάρχει μια θέση πολυκλωνοποίησης (πολυσυνδέτης) η οποία φέρει θέσεις αναγνώρισης διαφόρων περιοριστικών ενζύμων. Ανάμεσα σε αυτές τις θέσεις βρίσκεται και η αλληλουχία που αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο *SmaI*.

Ο φορέας που χρησιμοποιήσαμε είχε υποστεί προηγουμένως πέψη με το ένζυμο *SmaI* έτσι ώστε να γίνει γραμμικός και να μπορέσει να δεχθεί την ένθεση. Στην περίπτωση που η αντίδραση δεσμοποίησης είναι επιτυχής περιμένουμε τα ανασυνδυνασμένα κύτταρα να αναπτύξουν λευκές αποικίες. Όταν συμβεί αυτό στην περιοχή του πολυσυνδέτη έχει εισαχθεί η ένθεση, η οποία καταστρέφει το πλαίσιο ανάγνωσης του *lacZ*, αδρανοποιείται το γονίδιο και δεν παράγεται η β-



γαλακτοσιδάση. Εφόσον δεν παράγεται η β-γαλακτοσιδάση τα ανασυνδυασμένα αυτά κύτταρα δε μπορούν να υδρολύσουν το X-gal που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο. Στην αντίθετη περίπτωση, όπου τα κύτταρα έχουν προσλάβει το φορέα χωρίς την ένθεση, το γονίδιο *lacZ* είναι λειτουργικό, παράγεται β-γαλακτοσιδάση και υδρολύεται το X-gal, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται κυανές αποικίες.

Στα τρυβλία που περιείχαν τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* DH5a αναπτύχθηκαν τόσο κυανές όσο και λευκές αποικίες. Αναλογικά οι κυανές αποικίες ήταν περισσότερες σε αριθμό από τις λευκές. Από τις αποικίες αυτές επιλέχθηκαν τρεις λευκές και μία κυανή και «επιμολύνθηκαν» 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB, στο οποίο είχαν προστεθεί επίσης 10 μl αμπικιλίνης [25 mg/ml]. Οι υγρές αυτές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν για επώαση με ανάδευση στους 37 °C overnight.

6.10 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΣΤΙΣ ΕΠΙΛΕΧΘΕΙΣΕΣ ΑΠΟΙΚΙΕΣ

Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στις αποικίες που επιλέχθηκαν, απομονώθηκε από τις υγρές καλλιέργειες το πλασμιδιακό DNA. Το πρωτόκολλο εκχύλισης πλασμιδιακού DNA σε μικροκλίμακα (plasmid miniprep) που χρησιμοποιήθηκε ήταν το παρακάτω:

Εκχύλιση πλασμιδιακού DNA σε μικροκλίμακα (plasmid miniprep)

Προετοιμασία:

- ✓ Ξεπάγωμα λυσοζύμης [50mg/ml]
- ✓ Νερό να βράζει στους 100 °C

1. Σε νέο erpendorf προσθήκη 1500 μl από τις υγρές καλλιέργειες
2. Φυγοκέντρωση στις 15000 rpm για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του υπερκείμενου
3. Στο ίδιο erpendorf προσθήκη επιπλέον 1000 μl από τις ίδιες υγρές καλλιέργειες
4. Φυγοκέντρωση στις 15000 rpm για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και απόχυση του υπερκείμενου
5. Προσθήκη 200 μl STET buffer και προσεκτική επαναδιαλυτοποίηση με την πιπέτα

6. Προσθήκη 4 μl λυσοζύμης [50mg/ml] και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου
7. Τοποθέτηση των erpendorf σε σφουγγαράκι και ρίψη σε νερό που βράζει (στους 100 °C) για 45 sec
8. Φυγοκέντρηση στις 15000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου
9. Απομάκρυνση του ιζήματος με οδοντογλυφίδα και προσθήκη 8 μl διαλύματος CTAB (5%)
10. Φυγοκέντρηση στις 15000 rpm για 5min σε θερμοκρασία δωματίου και απόχυση του υπερκείμενου
11. Προσθήκη 300 μl NaCl (1,2M) και ισχυρή επαναδιαλυτοποίηση σε Vortex
12. Προσθήκη 750 μl κρύας απόλυτης αιθανόλης (-20 °C)
13. Φυγοκέντρηση στις 15000 rpm για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του υπερκείμενου
14. Προσθήκη 1 ml κρύας αιθανόλης 70% (-20 °C)
15. Φυγοκέντρηση στις 15000 rpm για 5min σε θερμοκρασία δωματίου και απόχυση του υπερκείμενου
16. Επανάληψη των βημάτων 14 και 15
17. Ξήρανση του ιζήματος στον αέρα εν κενώ (speed-vac)
18. Επαναδιαλυτοποίηση σε 20 μl TE στους 60 °C για περίπου 15min

Στη συνέχεια ακολούθησαν πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Eco*RI ώστε να απομονωθεί η ένθεση από το πλασμίδιο.

Για μια αντίδραση πέψης σε νέα erpendorf προστέθηκαν:

- 5 μl πλασμιδιακού DNA
- 1 μl K buffer 10X
- 1 μl RNase
- 0,5 μl *Bam*HI
- 0,5 μl *Eco*RI
- 2 μl αποστειρωμένου νερού

Επώαση στους 30 °C για 2 ώρες και ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1%.



Εφόσον διαπιστώθηκε ότι υπάρχει ένθεση στις επιλεγθείσες αποικίες, προχωρήσαμε στην παρασκευή «καθαρών» αποικιών έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι χρησιμοποιήθηκαν μονές αποικίες.

Από τις υγρές καλλιέργειες που διαπιστώθηκε ότι περιείχαν την ένθεση, με τη βοήθεια κρίκου, «μολύνθηκαν» νέα τρυβλία με LBA + Amp + X-Gal (διαδικασία striking) και ακολούθησε επώαση στους 37 °C overnight. Την επόμενη μέρα, από τα τρυβλία αυτά επιλέχθηκαν μονές αποικίες και «μολύνθηκε» υγρό θρεπτικό υπόστρωμα με Amp. Ακολούθησε επώαση με ανάδευση στους 37 °C overnight. Από τις υγρές αυτές καλλιέργειες απομονώθηκαν τελικά, με τη βοήθεια πακέτου εκχύλισης πλασμιδιακού DNA (NucleoSpin Plasmid Macherey-Nagel Kit), οι ανασυνδυασμένοι φορείς. Κατόπιν, ακολούθησαν πέψεις με *Bam*HI και *Eco*RI έτσι ώστε να απομονωθεί η ένθεση από τον φορέα και στο τέλος τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για να εξασφαλιστεί η παρουσία της ένθεσης.

Οι μονές αποικίες που περιείχαν ενθέσεις μετά από προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αποστειρωμένης γλυκερόλης 100% φυλάσσονται σε ειδικά φιαλίδια (cryovials) ως stock στους -80 °C για μελλοντική χρήση.

6.11 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΕΝΘΕΣΕΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που απομονώθηκαν από τις ανασυνδυασμένες μονές αποικίες στάλθηκαν στην Αθήνα στην εταιρία Labsupplies και από εκεί σε εργαστήριο του εξωτερικού (VBC-BIOTECH Service GmbH Brehmstrasse 14a A-1110 Wien) όπου έγινε ανάγνωση των νουκλεοτιδίων (sequencing).

Στη συνέχεια, μετά από κατάλληλη επεξεργασία των αρχείων που περιείχαν τις αναγνωσμένες πλέον αλληλουχίες και με τη βοήθεια του εργαλείου BLAST nucleotide(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) βρέθηκε η ομολογία των αλληλουχιών μας με άλλες συγγενικές που υπήρχαν στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων του NCBI.

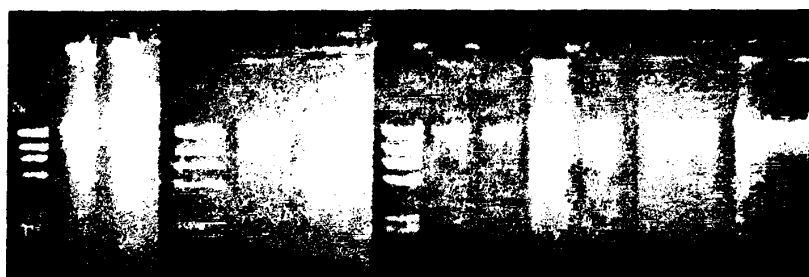
Τελικά, από την ηλεκτρονική σελίδα του EBI και με τη χρήση του εργαλείου ClustalW2(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές στοιχίσεις (multiple sequence alignment) των αλληλουχιών των δειγμάτων μας με αλληλουχίες της Ηλεκτρονικής Γενετικής Βιβλιοθήκης του NCBI. Για την

7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι φυτικοί οργανισμοί που μελετήθηκαν ήταν άτομα των «ποικιλιών» του *Pistacia lentiscus var Chia*: Βότομος (άτομα Βο6, Βο7, Βο8 & Βο9), Μαρουλίτης (άτομο Μr5), Μαυρόσχιнос (άτομα Μx3 & Μx5), Στενόφυλλος (άτομο S4) και Φαρδύφυλλος (άτομα F4 & F5).

Αρχικά πραγματοποιήσαμε εκχύλιση του γονιδιωματικού DNA από φύλλα των φυτικών οργανισμών ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Doyle J.J and Doyle J.L 1990 τροποποιημένο από τους Χατζηλουκά Ε. και Πήλιου Κ. (2006) (αδημοσίευτο). Τα δείγματα που προέκυψαν ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης 1% και τα αποτελέσματα φαίνονται στις εικόνες 7.1α και 7.1β.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13.



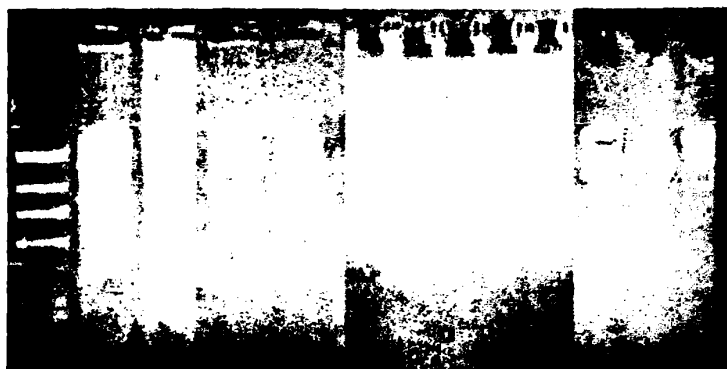
Εικόνα 7.1α: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1 % (w/v) του γονιδιωματικού DNA των ποικιλιών S4, F5, F4, Βο6 & Βο7 του *Pistacia lentiscus var Chia*

Διαδρομές:

1. 7 μ l λ DNA/*Hind*III
2. 5 μ l DNA S4-1 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
3. 5 μ l DNA S4-2 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
4. 7 μ l λ DNA/*Hind*III
5. 5 μ l DNA F5-1 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
6. 5 μ l DNA F5-2 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
7. 10 μ l λ DNA/*Hind*III
8. 5 μ l DNA F4-1 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
9. 5 μ l DNA F4-2 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
10. 5 μ l DNA Βο6-1 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X

11. 5 μ l DNA Bo6-2 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
12. 5 μ l DNA Bo7-1 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
13. 5 μ l DNA Bo7-2 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13.

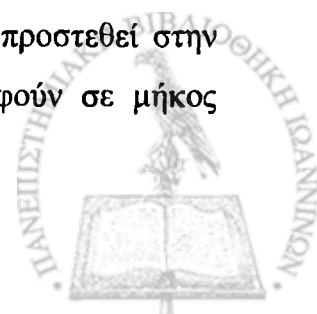


Εικόνα 7.1β: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης 1 % (w/v) του γονιδιωματικού DNA των ποικιλιών Bo8, Bo9, Mr5, Mx5 & Mx3 του *Pistacia lentiscus* var *Chia*

Διαδρομές:

1. 10 μ l λ DNA/*Hind*III
2. 5 μ l DNA Bo8-1 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
3. 5 μ l DNA Bo8-2 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
4. 5 μ l DNA Bo9-1 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
5. 5 μ l DNA Bo9-2 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
6. 10 μ l λ DNA/*Hind*III
7. 5 μ l DNA Mr5-1 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
8. 5 μ l DNA Mr5-2 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
9. 5 μ l DNA Mx5-1 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
10. 5 μ l DNA Mx5-2 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
11. 7 μ l λ DNA/*Hind*III
12. 5 μ l DNA Mx3-1 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X
13. 5 μ l DNA Mx3-2 + 4 μ l H₂O + 1 μ l loading buffer 10X

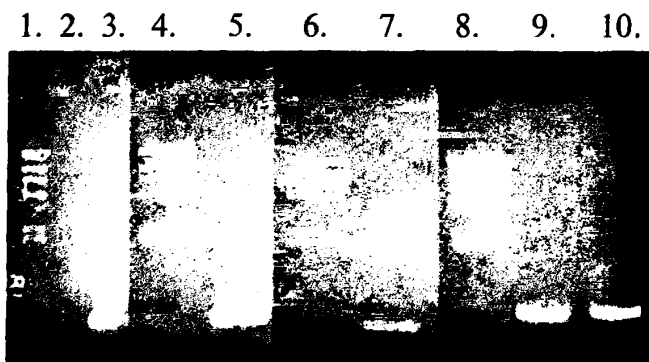
Στη συνέχεια τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στο φωτόμετρο Quawell DNA/Protein Analyzer έτσι ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα του DNA που θα προστεθεί στην αντίδραση της PCR. Γνωρίζουμε ότι τα νουκλεϊκά οξέα προσροφούν σε μήκος



κύματος 260 nm, ενώ οι πρωτεΐνες στα 280nm. Επομένως η καθαρότητα του DNA προσδιορίζεται μέσω των κλασματικών μετρήσεων A_{260}/A_{280} και αποδίδεται σε ng/μl.

Ακολούθησαν αντιδράσεις PCR, κατά τις οποίες ενισχύθηκε η περιοχή ITS του rDNA των γονιδιωματικών DNA των διαφορετικών ποικιλιών του μαστιχόδενδρου. Στα φυτά οι ITS αλληλουχίες ποικίλουν σε μέγεθος, το οποίο κυμαίνεται από 500-700 bp περίπου στα αγγειόσπερμα (Baldwin *et al.*, 1995), μέχρι 1500-3700 bp σε μερικά γυμνόσπερμα (Bobola *et al.*, 1992; Germano and Klein, 1999; Liston *et al.*, 1996; Maggini *et al.*, 2000; Marrocco *et al.*, 1996).

Η ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA πραγματοποιήθηκε σε διάφορους θερμοκυκλοποιητές (MiniCycler MJ Research New, Mastercycler gradient) σε 25 μl τελικό όγκο αντίδρασης με τη μέθοδο Hot Start σε ορισμένα δείγματα και σε άλλα δείγματα χωρίς Hot Start. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 2 αντιδράσεις / άτομο. Στο τέλος τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης 1% και τα αποτελέσματα φαίνονται στις εικόνες 7.2α και 7.2β.

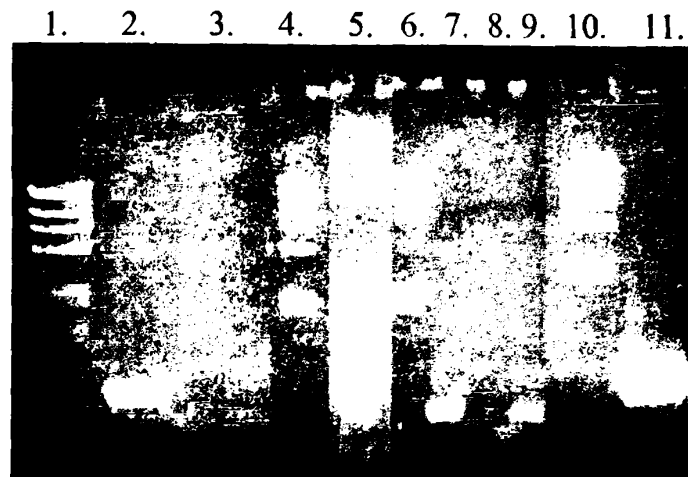


Εικόνα 7.2α: Ενίσχυση των αλληλουχιών ITS του rDNA των γονιδιωματικών DNA των ποικιλιών S4, F4, F5, Bo6 & Bo7 του μαστιχόδενδρου με PCR. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1 % (w/v)

Διαδρομές:

1. 7 μl λDNA/*Hind*III
2. Αρνητικός μάρτυρας (δείγμα χωρίς DNA)
3. DNA S4
4. 10 λDNA/*Hind*III
5. DNA F4
6. 10 λDNA/*Hind*III

7. DNA F5
8. 10 λDNA/*Hind*III
9. DNA Bo6
10. DNA Bo7



Εικόνα 7.2β: Ενίσχυση των αλληλουχιών ITS του rDNA των γονιδιωματικών DNA των ποικιλιών Bo8, Bo9, Mr5, Mx5 & Mx3 του μαστιγόδενδρου με PCR.

Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1 % (w/v)

Διαδρομές:

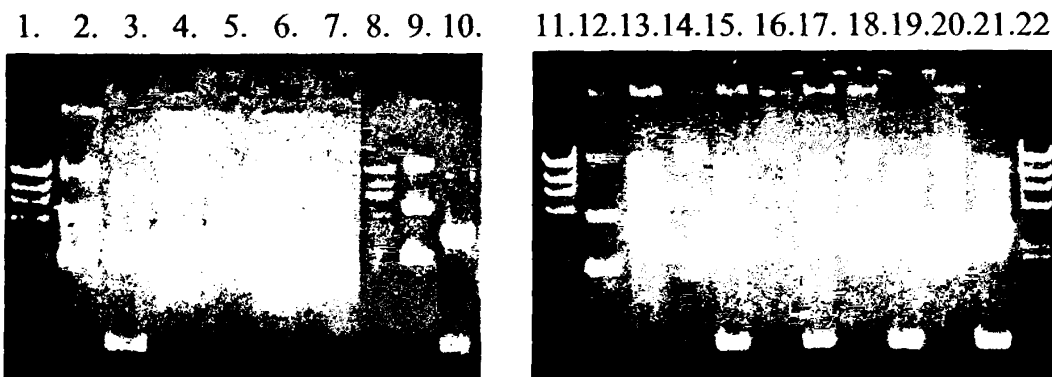
1. 10 μl λDNA/*Hind*III
2. DNA Bo8
3. Αρνητικός μάρτυρας (δείγμα χωρίς DNA)
4. 10 μl λDNA/*Hind*III
5. DNA Bo9
6. 10 μl λDNA/*Hind*III
7. DNA Mr5
8. Αρνητικός μάρτυρας (δείγμα χωρίς DNA)
9. DNA Mx5
10. 7 μl λDNA/*Hind*III
11. DNA Mx3

Μετά τις αντιδράσεις PCR ακολούθησε απομόνωση των ζωνών – ενθέσεων DNA από το πήγμα της αγαρόζης, με τη βοήθεια ειδικού Kit. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι ζώνες εμφανίζονται στις 600 bp περίπου. Μετά την απομόνωση τα

δείγματα φωτομετρήθηκαν στο φωτόμετρο Quawell DNA/Protein Analyzer έτσι ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα του DNA που περιέχεται στο διάλυμα.

Κατόπιν ακολούθησε κλωνοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript, ο οποίος έχει υποστεί περιοριστική πέψη με το ένζυμο *SmaI*. Αρχικά πραγματοποιήθηκε δεσμοποίηση της ένθεσης με τον πλασμιδιακό φορέα, με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA λιγάση και στη συνέχεια το προϊόν της αντίδρασης δεσμοποίησης μέσω ηλεκτροδιάτρησης εισήχθη σε κύτταρα DH5a του *Escherichia coli*.

Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία της ένθεσης DNA στα μετασχηματισμένα κύτταρα πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τους ανασυνδυασμένους κλώνους. Επιλέχθηκαν 4 λευκές και μία μπλε αποικία για κάθε άτομο. Κατόπιν ακολούθησαν πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI* και *EcoRI* για κάθε μία ποικιλία του μαστιχόδενδρου, οι οποίες ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης 1% (εικόνες 7.3α, 7.3β, 7.3γ, 7.3δ, 7.3ε).



Εικόνα 7.3α: Περιοριστικές πέψεις των ανασυνδυασμένων κλώνων με τα ένζυμα *BamHI* και *EcoRI*, των ποικιλιών S4 & F4 του μαστιχόδενδρου. Με τα κόκκινα βέλη σημειώνονται οι ενθέσεις.

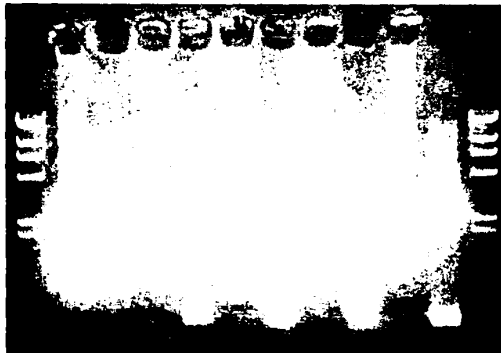
Διαδρομές:

- | | |
|------------------------------|--------------------------------|
| 1. 7 μl λDNA/ <i>HindIII</i> | 11. 10 μl λDNA/ <i>HindIII</i> |
| 2. DNA pS4-1 άκοπο | 12. DNA pF4-Blue άκοπο |
| 3. DNA pS4-1 κομμένο | 13. DNA pF4-Blue κομμένο |
| 4. DNA pS4-2 άκοπο | 14. DNA pF4-1 άκοπο |
| 5. DNA pS4-2 κομμένο | 15. DNA pF4-1 κομμένο |

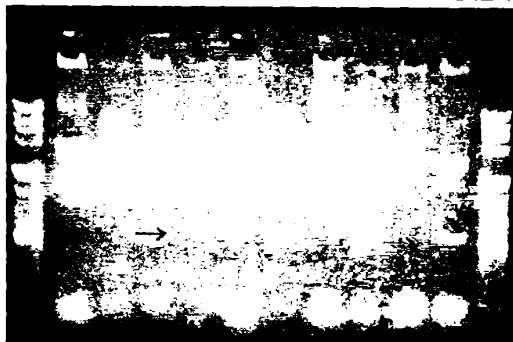
6. DNA pS4-Blue άκοπο
7. DNA pS4-Blue κομμένο
8. 7 μl λDNA/*Hind*III
9. DNA pS4-3 άκοπο
10. DNA pS4-3 κομμένο

16. DNA pF4-2 άκοπο
17. DNA pF4-2 κομμένο
18. DNA pF4-3 άκοπο
19. DNA pF4-3 κομμένο
20. DNA pF4-4 άκοπο
21. DNA pF4-4 κομμένο
22. 10 μl λDNA/*Hind*III

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12.



13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24.



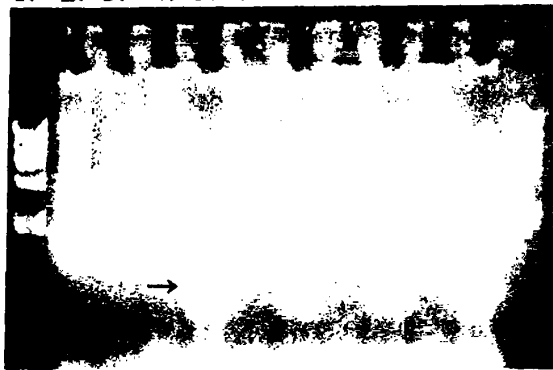
Εικόνα 7.3β: Περιοριστικές πέψεις των ανασυνδυασμένων κλώνων με τα ένζυμα *Bam*HI και *Eco*RI, των ποικιλιών F5 & Βο6 του μαστιχόδενδρου. Με τα κόκκινα βέλη σημειώνονται οι ενθέσεις.

Διαδρομές:

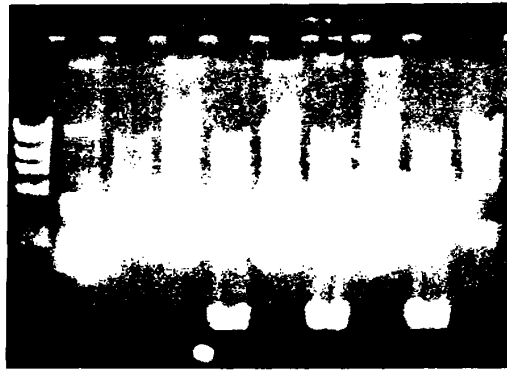
1. 10 μl λDNA/*Hind*III
2. DNA pF5-Blue άκοπο
3. DNA pF5-Blue κομμένο
4. DNA pF5-1 άκοπο
5. DNA pF5-1 κομμένο
6. DNA pF5-2 άκοπο
7. DNA pF5-2 κομμένο
8. DNA pF5-3 άκοπο
9. DNA pF5-3 κομμένο
10. DNA pF5-4 άκοπο
11. DNA pF5-4 κομμένο
12. 10 μl λDNA/*Hind*III

13. 10 μl λDNA/*Hind*III
14. DNA pBo6-Blue άκοπο
15. DNA pBo6-Blue κομμένο
16. DNA pBo6-1 άκοπο
17. DNA pBo6-1 κομμένο
18. DNA pBo6-2 άκοπο
19. DNA pBo6-2 κομμένο
20. DNA pBo6-3 άκοπο
21. DNA pBo6-3 κομμένο
22. DNA pBo6-4 άκοπο
23. DNA pBo6-4 κομμένο
24. 10 μl λDNA/*Hind*III

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12.



13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22.



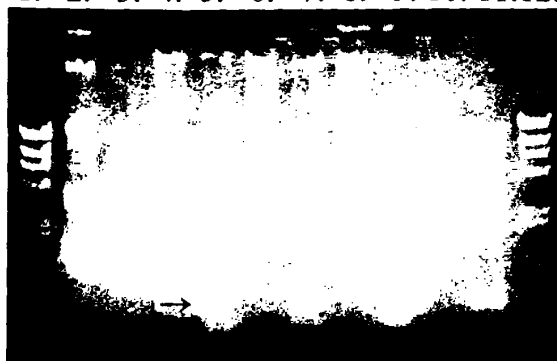
Εικόνα 7.3γ: Περιοριστικές πέψεις των ανασυνδυασμένων κλώνων με τα ένζυμα *Bam*HI και *Eco*RI, των ποικιλιών Bo7 & Bo8 του μαστιχόδενδρου. Με τα κόκκινα βέλη σημειώνονται οι ενθέσεις.

Διαδρομές:

1. 10 μl λDNA/*Hind*III
2. DNA pBo7-Blue άκοπο
3. DNA pBo7-Blue κομμένο
4. DNA pBo7-1 άκοπο
5. DNA pBo7-1 κομμένο
6. DNA pBo7-2 άκοπο
7. DNA pBo7-2 κομμένο
8. DNA pBo7-3 άκοπο
9. DNA pBo7-3 κομμένο
10. DNA pBo7-4 άκοπο
11. DNA pBo7-4 κομμένο
12. 10 μl λDNA/*Hind*III

13. 15 μl λDNA/*Hind*III
14. DNA pBo8-Blue άκοπο
15. DNA pBo8-Blue κομμένο
16. DNA pBo8-1 άκοπο
17. DNA pBo8-1 κομμένο
18. DNA pBo8-2 άκοπο
19. DNA pBo8-2 κομμένο
20. DNA pBo8-3 άκοπο
21. DNA pBo8-3 κομμένο
22. 15 μl λDNA/*Hind*III

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12.



13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24.

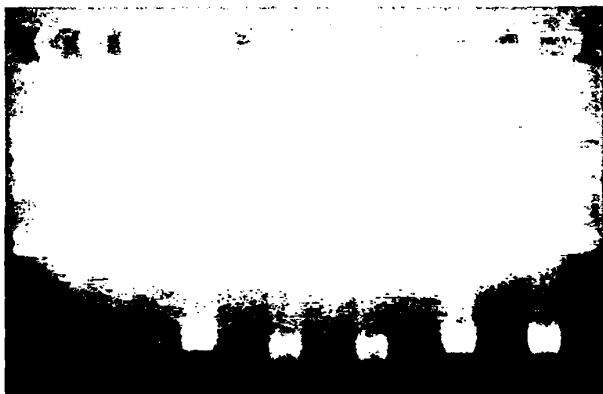


Εικόνα 7.3δ: Περιοριστικές πέψεις των ανασυνδυασμένων κλώνων με τα ένζυμα *Bam*HI και *Eco*RI, των ποικιλιών Bo9 & Mr5 του μαστιχόδενδρου. Με τα κόκκινα βέλη σημειώνονται οι ενθέσεις.

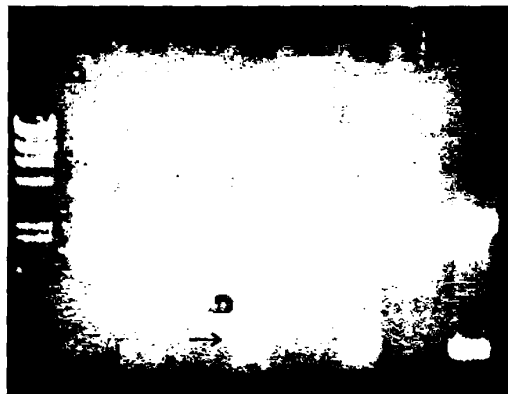
Διαδρομές:

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1. 10 μl λDNA/ <i>Hind</i> III | 13. 10 μl λDNA/ <i>Hind</i> III |
| 2. DNA pBo9-Blue άκοπο | 14. DNA pMr5-Blue άκοπο |
| 3. DNA pBo9-Blue κομμένο | 15. DNA pMr5-Blue κομμένο |
| 4. DNA pBo9-1 άκοπο | 16. DNA pMr5-1 άκοπο |
| 5. DNA pBo9-1 κομμένο | 17. DNA pMr5-1 κομμένο |
| 6. DNA pBo9-2 άκοπο | 18. DNA pMr5-2 άκοπο |
| 7. DNA pBo9-2 κομμένο | 19. DNA pMr5-2 κομμένο |
| 8. DNA pBo9-3 άκοπο | 20. DNA pMr5-3 άκοπο |
| 9. DNA pBo9-3 κομμένο | 21. DNA pMr5-3 κομμένο |
| 10. DNA pBo9-4 άκοπο | 22. DNA pMr5-4 άκοπο |
| 11. DNA pBo9-4 κομμένο | 23. DNA pMr5-4 κομμένο |
| 12. 10 μl λDNA/ <i>Hind</i> III | 24. 10 μl λDNA/ <i>Hind</i> III |

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.11.12.13.14



15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23.



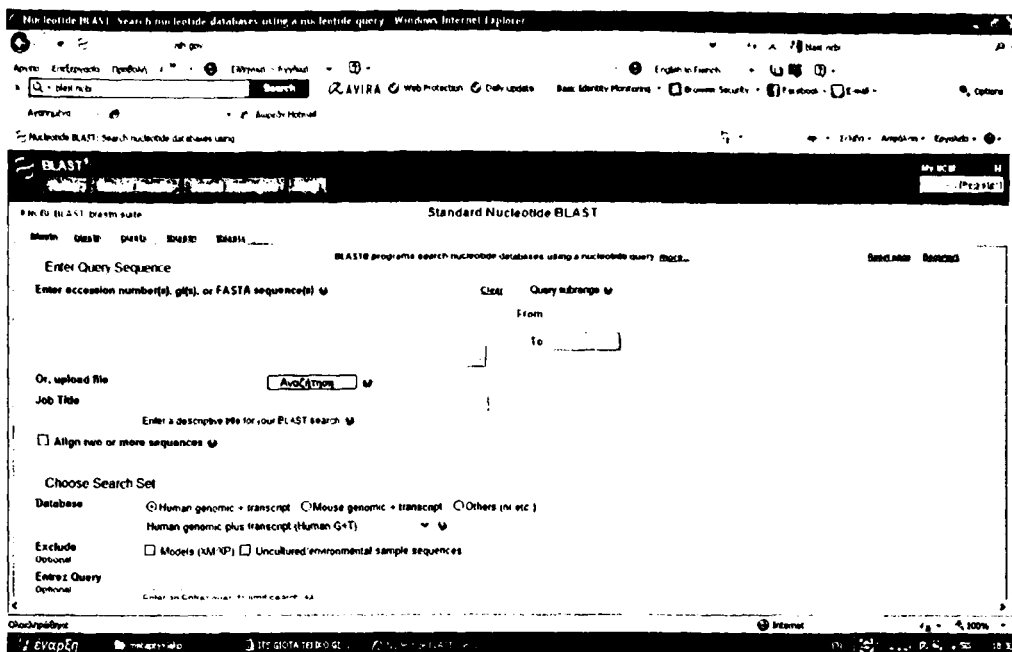
Εικόνα 7.3ε: Περιοριστικές πέψεις των ανασυνδυασμένων κλώνων με τα ένζυμα *Bam*HI και *Eco*RI, των ποικιλιών Mx3 & Mx5 του μαστιχόδενδρου. Με τα κόκκινα βέλη σημειώνονται οι ενθέσεις.

Διαδρομές:

1. 7 μl λDNA/*Hind*III
2. DNA pMx3-Blue άκοπο
3. DNA pMx3-Blue κομμένο
4. DNA pMx3-1 άκοπο
5. DNA pMx3-1 κομμένο
6. DNA pMx3-2 άκοπο
7. DNA pMx3-2 κομμένο
8. DNA pMx3-3 άκοπο
9. DNA pMx3-3 κομμένο
10. DNA pMx3-4 άκοπο
11. DNA pMx3-4 κομμένο
12. DNA pMx3-5 άκοπο
13. DNA pMx3-5 κομμένο
14. 7 μl λDNA/*Hind*III
15. 13 μl λDNA/*Hind*III
16. DNA pMx5-Blue άκοπο
17. DNA pMx5-Blue κομμένο
18. DNA pMx5-1 άκοπο
19. DNA pMx5-1 κομμένο
20. DNA pMx5-2 άκοπο
21. DNA pMx5-2 κομμένο
22. DNA pMx5-3 άκοπο
23. DNA pMx5-3 κομμένο

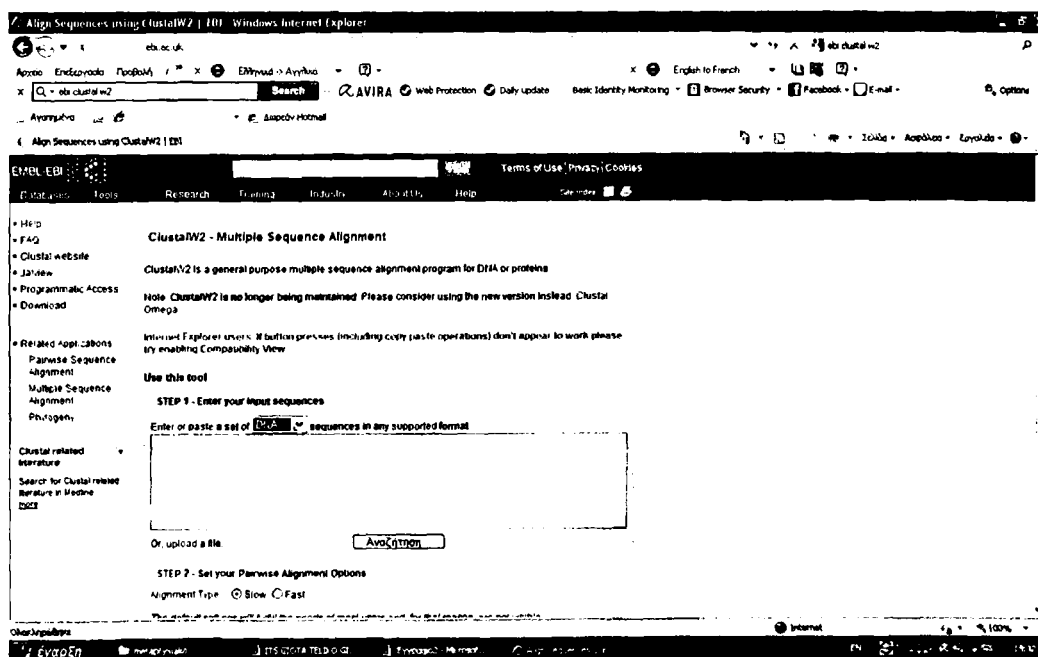
Από τις αποικίες που περιείχαν ένθεση επιλέχθηκαν δύο οι οποίες, με τη βοήθεια λούπας, μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με LBA + Amp + X-Gal (διαδικασία striking) έτσι ώστε να προκύψει μονή αποικία. Στη συνέχεια επιλέχθηκε μονή αποικία για κάθε δείγμα, η οποία μεταφέρθηκε σε υγρή καλλιέργεια με σκοπό να πραγματοποιηθεί απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA. Μετά την απομόνωση των ανασυνδυασμένων φορέων ακολούθησαν περιοριστικές πέψεις με *Bam*HI και *Eco*RI, ώστε να πιστοποιηθεί ότι φέρουν την ένθεση και τελικά τα πλασμιδιακά αυτά DNA απεστάλησαν σε εξωτερικό εργαστήριο για ανάγνωση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας (sequencing).

Μετά την ανάγνωση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εντοπίστηκαν οι αλληλουχίες ITS1 και ITS2 για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια η περιοχή ITS1 + 5,8S + ITS2 (654 βάσεις) κάθε δείγματος εισήχθη στο πρόγραμμα BLAST nucleotide του NCBI (εικόνα 7.4) και μέσα από τη βάση δεδομένων βρέθηκε η ομολογία της με αντίστοιχες ITS περιοχές συγγενικών ειδών του γένους *Pistacia*. Οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις ITS περιοχές κάθε δείγματος παρατίθενται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.



Εικόνα 7.4: BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nucleotide, εργαλείο εύρεσης ομολογιών μεταξύ νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του NCBI.

Κατόπιν από την ηλεκτρονική σελίδα του EBI και με τη βοήθεια του εργαλείου ClustalW2 (εικόνα 7.5) πραγματοποιήθηκε πολλαπλή στοίχιση (multiple sequence alignment) των αλληλουχιών (ITS1 + 5,8S + ITS2) των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα της πολλαπλής στοίχισης παρατίθενται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.



Εικόνα 7.5: ClustalW2 εργαλείο πολλαπλής στοίχισης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του EBI.



Προηγούμενη μελέτη

Στη μελέτη της, η κα. Πήλιου Κ. (2006) ασχολήθηκε με τον μερικό γονοτυπικό χαρακτηρισμό μιας ομάδας «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου με τη μέθοδο της «τυχαίας ενίσχυσης του πολυμορφικού DNA», γνωστή ως RAPD. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις RAPD με 5 άτομα από την κάθε μία από τις «ποικιλίες»: Μαυρόσχινος, Βότομος, Μαρουλίτης, Στενόφυλλος, Φαρδύφυλλος και χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικοί εκκινητές (OPG2, OPH13 και OPA2).

Ο εκκινητής OPG2 παρείχε ευδιάκριτα δεδομένα για τις «ποικιλίες» Μαυρόσχινο, Μαρουλίτη, και Βότομο ενώ τα αποτελέσματα για τους Φαρδύφυλλο και Στενόφυλλο δεν ήταν επαναλήψιμα. Οι πρώτες εικόνες έδειξαν ότι οι τρεις «ποικιλίες» εμφανίζουν ευκρινώς διαφορετικά πρότυπα ζώνωσης, άρα και αντίστοιχη γενετική ποικιλότητα, ενώ στον Βότομο, φαίνεται να υπάρχει περαιτέρω διαφοροποίηση σε περισσότερους του ενός γονότυπους. Για τις «ποικιλίες» Στενόφυλλο και Φαρδύφυλλο, ο εκκινητής OPG 2 έδωσε πολυμορφισμούς μεταξύ των ατόμων της ίδιας ποικιλίας. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι και οι δύο αυτές «ποικιλίες», όπως και ο Βότομος, δεν είναι ενδεχομένως μία ομοιογενής «ποικιλία», αλλά αποτελούνται από διαφορετικούς γονότυπους. Ενώ για τις «ποικιλίες» Μαρουλίτη και Μαυρόσχινο, ο εκκινητής OPG 2 δεν έδωσε πολυμορφισμούς ένδειξη ότι μάλλον πρόκειται για ομοιογενείς «ποικιλίες». Οι εκκινητές OPH13 και OPA2 δεν απέφεραν επαναλήψιμα αποτελέσματα και διερευνάται η βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης.

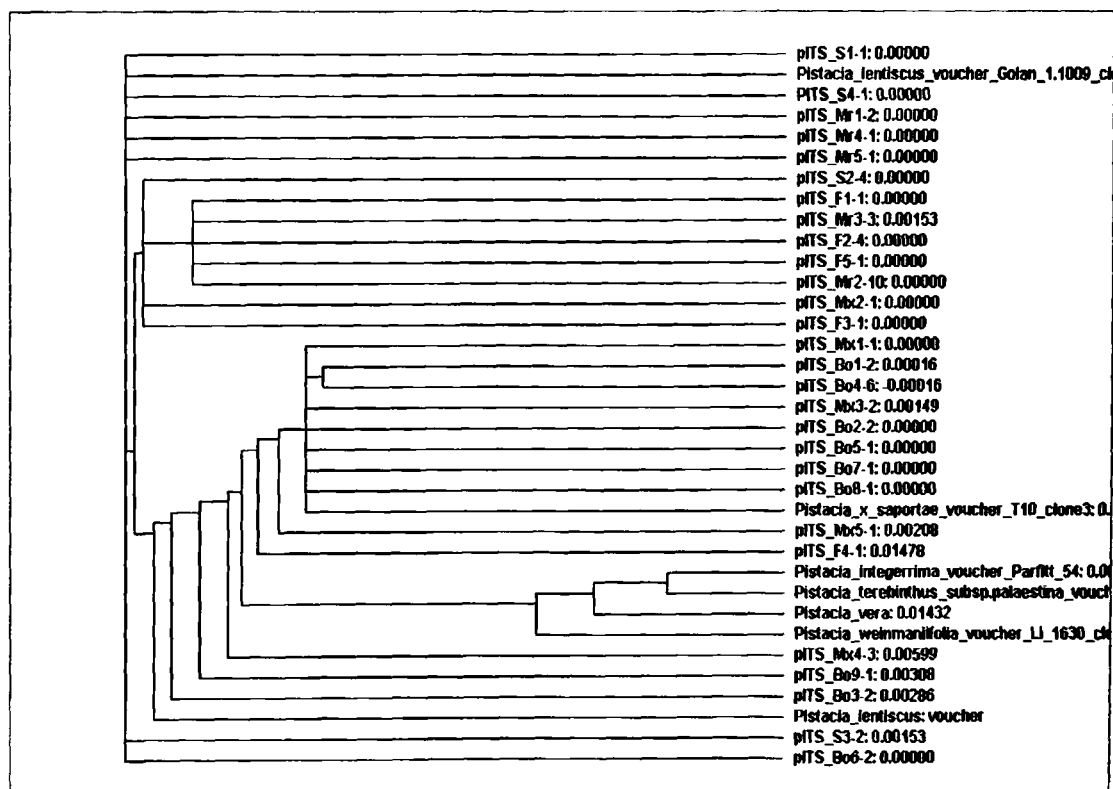
Αργότερα στη μελέτη της κας. Μυλωνά Αν. (2008) και της κας. Πάσχου-Ζέκα Κ. επιχειρήθηκε η μερική μοριακή ταξινόμηση μορφολογικών «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου της Χίου *P. lentiscus* var. *Chia*, χρησιμοποιώντας ως εργαλείο μοριακής ταξινόμησης τις ITS περιοχές. Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του, γνωστού πλέον, ριβοσωμικού DNA με PCR και ακολούθησε κλωνοποίηση της αλληλουχίας σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Στη συνέχεια μετασχηματίστηκαν κύτταρα *Escherichia coli* από τα οποία απομονώθηκε τελικά το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο του οποίου η αλληλουχία απεστάλη σε εξωτερικό εργαστήριο, ώστε να αναγνωστεί η νουκλεοτιδική του αλληλουχία.

Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν τα εξής: Βότομος (άτομα Bo1, Bo2, Bo3, Bo4, Bo5), Μαρουλίτης (άτομα Mr1, Mr2, Mr3, Mr4), Φαρδύφυλλος (άτομα F1, F2, F3), Στενόφυλλος (άτομα S1, S2), Μαυρόσχινος (άτομα Mx1, Mx2, Mx4).

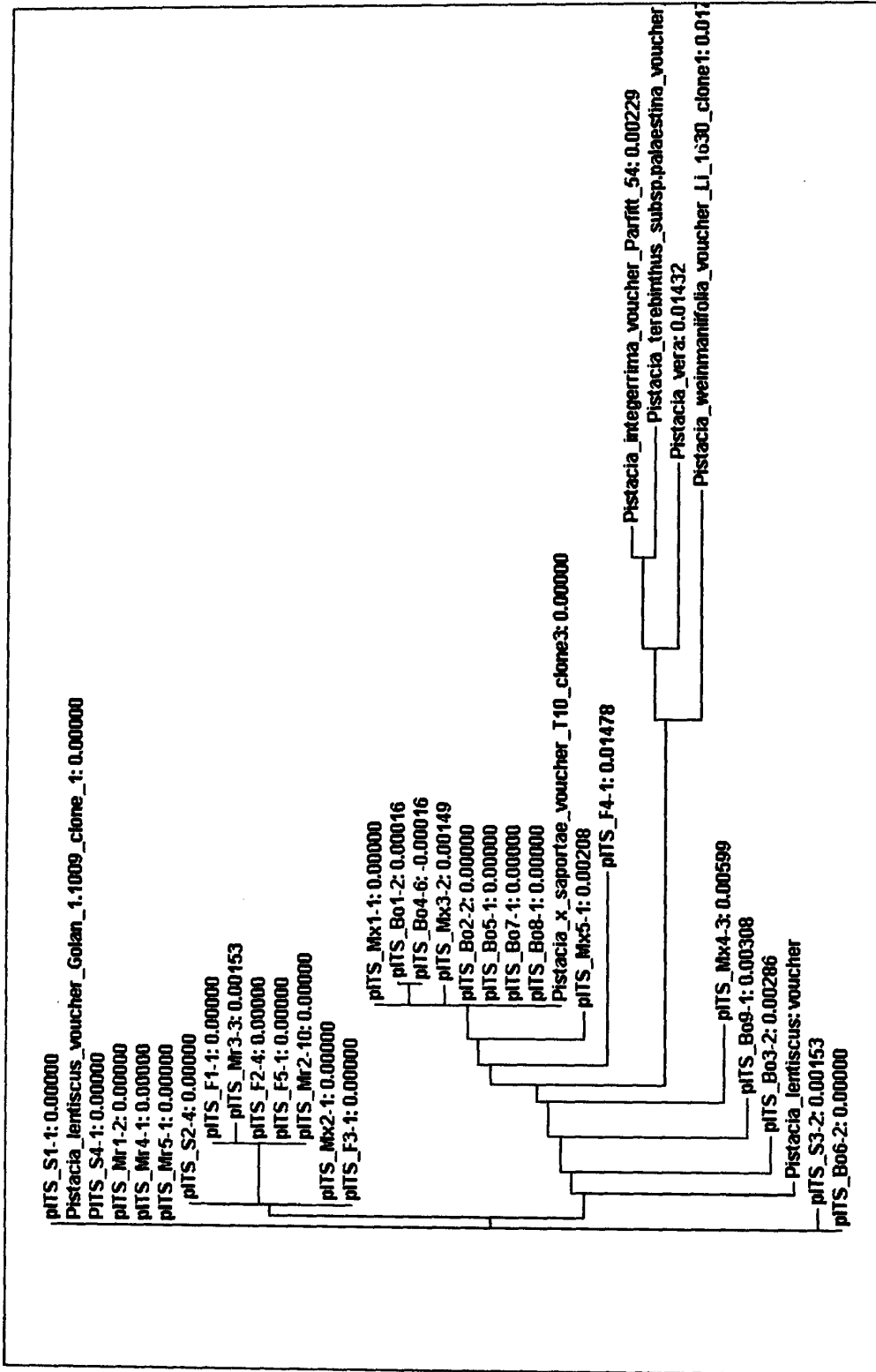


Οι αλληλουχίες (ITS1 + 5,8S + ITS2) των ατόμων αυτών μαζί με τις αλληλουχίες των ατόμων που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη και με αλληλουχίες συγγενικών ειδών του γένους *Pistacia* που υπάρχουν σε Ηλεκτρονικές Βάσεις Δεδομένων, χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή εξελικτικών δένδρων. Με τη βοήθεια του εργαλείου ClustalW2 Phylogeny του EBI προέκυψαν τα παρακάτω εξελικτικά δένδρα στα οποία αναπαρίστανται οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ατόμων των διαφορετικών «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου *P. lentiscus* var. *Chia*.

Στο κλαδόγραμμα (cladogram) (εικόνα 7.6.1) απεικονίζονται οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των διαφορετικών ατόμων καθώς και οι μεταξύ τους εξελικτικές αποστάσεις, ωστόσο τα μήκη των κλάδων του δεν αναπαριστούν τον αριθμό των αλλαγών των ITS αλληλουχιών. Αντίθετα στο φυλογενετικό δένδρο (phylogram) (εικόνα 7.6.2) απεικονίζονται οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών και τα μήκη των κλάδων του είναι ανάλογα με τον αριθμό μεταλλάξεων που έχουν υποστεί οι ITS αλληλουχίες κάθε δείγματος.



Εικόνα 7.6.1: Κλαδόγραμμα (cladogram) των περιοχών ITS των ατόμων διαφορετικών «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου *P. lentiscus* var. *Chia*



Εικόνα 7.6.2: Φυλογενετικό δένδρο (phylogram) των περιοχών ITS των ατόμων διαφορετικών «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου *P. lentiscus* var. *Chia*

Από τα εξελικτικά δένδρα που προέκυψαν φαίνεται ότι υπάρχει γενετική ποικιλομορφία τόσο μεταξύ διαφορετικών «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου όσο και μεταξύ διαφορετικών ατόμων της ίδιας «ποικιλίας». Επίσης παρατηρώντας τα αποτελέσματα της πολλαπλής στοίχισης αλληλουχιών (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2) είδαμε ότι η περιοχή 5,8S είναι αυστηρά συντηρημένη και ταυτίζεται απολύτως για όλα τα δείγματα, ενώ οι ITS αλληλουχίες παρουσιάζουν διαφορές από άτομο σε άτομο. Οι διαφορές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφορετικών γονοτύπων και φαινοτύπων μεταξύ των ατόμων «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου, οι οποίες αποτυπώνονται στα εξελικτικά δένδρα.

Παρατηρώντας τα εξελικτικά δένδρα βλέπουμε ότι:

- 1) όσον αφορά στην «ποικιλία» **Βότομος** φαίνεται ότι υπάρχει διάσπαση γονοτύπων, γεγονός που συμφωνεί με την μελέτη της κας. Πήλιου και Μυλωνά, από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αντιδράσεις RAPD. Οι ITS αλληλουχίες των ατόμων Bo2, Bo5, Bo7, Bo8 είναι ταυτόσημες με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των ατόμων Mx1 και *Pistacia x saportae voucher T10 clone3*, ενώ διαφέρουν μόλις σε 2 βάσεις από εκείνες των ατόμων Bo1 και Bo4. Όσον αφορά στα άτομα Bo9 και Bo3, οι ITS αλληλουχίες τους διαφέρουν σε 4 μόλις βάσεις και εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με το *P.lentiscus*. Ο Bo6 διαφέρει αρκετά από τα υπόλοιπα άτομα της ίδιας «ποικιλίας» και η αλληλουχία του είναι ταυτόσημη με εκείνη του *P.lentiscus voucher Golan 1.1009 clone1*. Επομένως θα μπορούσαμε να πούμε ότι στην «ποικιλία» Βότομος παρατηρούνται 5 διαφορετικοί γονότυποι.
- 2) όσον αφορά στην «ποικιλία» **Μαυρόσχινος** παρατηρούμε επίσης διάφορους γονοτύπους, γεγονός που δε συμβαδίζει με τα αποτελέσματα των αντιδράσεων RAPD. Τα άτομα Mx1 και Mx3 εμφανίζουν υψηλή ομολογία στις ITS περιοχές τους, καθώς διαφέρουν μόλις κατά μια βάση. Οι ITS αλληλουχίες του Mx5 σε σχέση με τις αντίστοιχες του Mx1 είναι κατά 99% ομόλογες, καθώς διαφέρουν σε 3 βάσεις από τις 654. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα άτομα Mx1, Mx3 και Mx5 εμφανίζουν υψηλή συγγένεια τόσο μεταξύ τους όσο και με το *Pistacia x saportae voucher T10 clone3*. Αντίθετα οι Mx2 και Mx4 διαφέρουν αρκετά από τα υπόλοιπα άτομα της «ποικιλίας». Τελικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι στην «ποικιλία» Μαυρόσχινος απαντώνται 5 διαφορετικοί γονότυποι.



- 3) όσον αφορά στην «ποικιλία» **Μαρουλίτης** παρατηρούμε επίσης διάφορους γονοτύπους, γεγονός που δε συμβαδίζει με τα αποτελέσματα των αντιδράσεων RAPD. Οι ITS αλληλουχίες των ατόμων Mr1, Mr4 και Mr5 είναι πανομοιότυπες μεταξύ τους και είναι ίδιες με εκείνες των ατόμων S1, S4, Bo6 και *P. lentiscus voucher Golan clone 1*. Τα άτομα Mr2 και Mr3 διαφέρουν αρκετά από τα υπόλοιπα άτομα της ίδιας «ποικιλίας», ωστόσο μεταξύ τους διαφέρουν μόλις κατά μία βάση. Συνεπώς στην «ποικιλία» Μαρουλίτης παρατηρούνται 3 διαφορετικοί γονότυποι.
- 4) όσον αφορά στην «ποικιλία» **Στενόφυλλος** παρατηρούμε ότι οι ITS περιοχές των ατόμων S1 και S4 είναι πανομοιότυπες και εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με τα άτομα Mr1, Mr4, Mr5, Bo6 και *P. lentiscus voucher Golan clone 1*. Το άτομο S2 διαφέρει από τα άτομα S1 και S4 κατά μία μόλις βάση, ενώ το S3 διαφέρει από το S2 κατά δυο βάσεις. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι μεταξύ των ατόμων της «ποικιλίας» Στενόφυλλος δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στον γονότυπο, ωστόσο δεν μπορούμε να πούμε ότι πρόκειται για μία ομοιογενή «ποικιλία», γεγονός που συμφωνεί και με τα αποτελέσματα των αντιδράσεων RAPD.
- 5) όσον αφορά στην «ποικιλία» **Φαρδύφυλλος** παρατηρούμε ότι οι ITS αλληλουχίες των ατόμων F1, F2 και F5 είναι πανομοιότυπες τόσο μεταξύ τους όσο και με εκείνη του Mr2, ενώ διαφέρουν μόλις κατά μία βάση από την ITS αλληλουχία του Mr3. Το άτομο F3 παρουσιάζει την ίδια ακριβώς αλληλουχία με εκείνες των S2 και Mx2, ενώ το F4 διαφέρει σημαντικά από τα υπόλοιπα άτομα της «ποικιλίας» του. Συνεπώς στην «ποικιλία» Φαρδύφυλλος φαίνεται να υπάρχουν 3 διαφορετικοί γονότυποι. Πρόκειται λοιπόν για μια ακόμα ανομοιογενή «ποικιλία» του μαστιχόδενδρου, όπως φαίνεται και από τους πολυμορφισμούς που προέκυψαν από τις αντιδράσεις RAPD.
- 6) όσον αφορά στις ITS αλληλουχίες των συγγενικών ειδών του γένους *Pistacia*: *P. integerima voucher Parfitt*, *P. terebinthus subsp. palaestina*, *P. vera*, *P. weinmanniifolia voucher Li 1630 clone1*, αυτές σχηματίζουν μεταξύ τους μια ξεχωριστή ομάδα (**outgroup**). Πρόκειται για μία μονοφυλετική ομάδα οργανισμών που λειτουργεί ως σημείο αναφοράς για τον καθορισμό των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των υπολοίπων ομάδων οργανισμών. Όπως φαίνεται από τα εξελικτικά δένδρα τα άτομα που ανήκουν στην εξωτερική



ομάδα, βρίσκονται ανάμεσα από τα άτομα F4 και Mx4, τα οποία διαφέρουν αρκετά από τα υπόλοιπα άτομα της «ποικιλίας» τους αντίστοιχα.

Ιδιαίτερη εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι ενώ ο Βότομος 6 εμφανίζει την ίδια ακριβώς αλληλουχία με το *P. lentiscus voucher Golan clone 1*, στο φυλογενετικό δένδρο βρίσκεται μακριά από το δεύτερο. Πιθανότατα αυτό συμβαίνει είτε επειδή δεν έχει γίνει πλήρης ανάγνωση της ITS 2 περιοχής του *P. lentiscus voucher Golan clone 1*, είτε επειδή η ITS 2 περιοχή του τελευταίου είναι μικρότερη από εκείνη του Βότομου 6.

Κάτι ανάλογο παρατηρείται και στα άτομα S2, Mx2 και F3 τα οποία ενώ εμφανίζουν ταυτόσημες αλληλουχίες, στο φυλογενετικό δένδρο το S2 βρίσκεται λίγο πιο μακριά από τα υπόλοιπα. Ομοίως και στην ομάδα ατόμων F1, F2, F5, Mr2, το άτομο F1 είναι πιο μακριά από τα υπόλοιπα, καθώς και στην ομάδα Mx1, Bo2, Bo5, Bo7, Bo8, *Pistacia x saportae voucher T10 clone3*, το άτομο Mx1 είναι λίγο πιο απομακρυσμένο.



8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

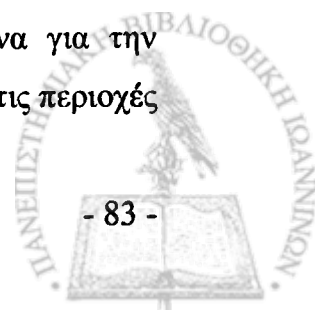
Τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης των περιοχών ITS του ριβοσωμικού DNA προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες για τη συστηματική κατάταξη των διαφορετικών ατόμων «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου και συνεισφέρουν στην κατανόηση των μεταξύ τους εξελικτικών σχέσεων. Η μοριακή αυτή μέθοδος επιτρέπει μεγαλύτερη ακρίβεια στην επεξήγηση των αποτελεσμάτων, συγκριτικά με άλλες μεθόδους.

Η ενίσχυση της περιοχής ITS του rDNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ακολουθούμενη από κλωνοποίηση και ταυτοποίηση της αλληλουχίας του DNA προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος αυτή: 1) απαιτεί μικρή ποσότητα χρωμοσωμικού DNA, (0.1 έως 10 ng) για την ενίσχυση της περιοχής ITS, 2) επιτρέπει να αναλυθούν και οι δυο αλυσίδες της περιοχής κατά την ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, οπότε μειώνονται τα λάθη, 3) είναι συμβατή με την αυτόματη ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA 4) τα αποτελέσματα που δίνει είναι επαναλήψιμα (White *et al.* 1990) και 5) επιτρέπει την αποθήκευση των τελικών κλώνων.

Τα εξελικτικά δένδρα που προέκυψαν μετά την πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών (ITS1 + 5,8S + ITS2) των δειγμάτων μας, έδειξαν ότι υπάρχει γονοτυπική ποικιλομορφία τόσο μεταξύ διαφορετικών «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου *P. lentiscus* var. *Chia*, όσο και μεταξύ διαφορετικών ατόμων της ίδιας «ποικιλίας».

Οι πέντε κύριοι γονότυποι που απαντώνται στο μαστιχόδενδρο της Χίου *P. lentiscus* var. *Chia*: Βότομος, Μαρουλίτης, Μαυρόσχιнос, Στενόφυλλος-Σιδερακικός και Φαρδύφυλλος, εμφανίζουν διακριτούς φαινότυπους και μπορούν εύκολα να ταυτοποιηθούν. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των περιοχών ITS που προέκυψαν από την παρούσα και προηγούμενες μελέτες, φαίνεται ότι μεταξύ των παραπάνω διακριτών γονοτύπων υπάρχει γονοτυπική ποικιλομορφία (Πίνακας 8.1).

Σε ορισμένα άτομα της ίδιας «ποικιλίας» η διάκριση περισσότερων του ενός γονοτύπων είναι διακριτή, καθώς οι ITS αλληλουχίες τους διαφέρουν σε αρκετά σημεία. Αντίθετα σε άτομα «ποικιλιών», όπως είναι ο Στενόφυλλος, οι διαφορές μεταξύ των ITS αλληλουχιών είναι πολύ μικρές (1 με 2 βάσεις), γεγονός που δεν οδηγεί απαραίτητα στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν περισσότεροι του ενός γονότυποι. Στην δεύτερη περίπτωση, είναι απαραίτητο να γίνει περαιτέρω έρευνα για την εξακρίβωση του αποτελέσματος, καθώς οι διαφορές που παρατηρούνται στις περιοχές



ITS μπορεί να οφείλονται σε πειραματικό λάθος ή μπορεί να είναι αποτέλεσμα σημειακών μεταλλάξεων, οι οποίες οδηγούν σε γενετική ποικιλομορφία. Σε επόμενη μελέτη θα μπορούσε να ερευνηθεί μεγαλύτερος αριθμός ατόμων, είτε να μελετηθούν διαφορετικές περιοχές του ριβοσωμικού DNA.

Τα περισσότερα άτομα εμφανίζουν υψηλή φυλογενετική συγγένεια με το *P. lentiscus voucher Golan 1.1009 clone1*, ενώ τα υπόλοιπα με το *P. x saportae voucher T10 clone3*. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι το μαστιχόδενδρο της Χίου αποτελεί παραλλαγή του είδους *Pistacia lentiscus* και μάλιστα αρκετές από τις «ποικιλίες» του (αυτές που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με το *P. saportae*) αποτελούν υβρίδια του *P. lentiscus* (μητρικό) και του *P. terebinthus* (πατρικό). Επειδή η ιστορία της καλλιέργειας του μαστιχόδενδρου χάνεται στα βάθη των αιώνων και η καταγραφή των καλλιεργητικών τεχνικών είναι πολύ πρόσφατη, ίσως κάποια στιγμή στο μακρινό παρελθόν να χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές πολλαπλασιασμού που να επέτρεπαν την διασταύρωση γονιδίων διαφορετικών ειδών. Η καταγεγραμμένη τεχνική πολλαπλασιασμού είναι η κλωνοποίηση επιλεγμένων φυτών με μοσχεύματα. Έως τώρα δεν υπάρχουν στοιχεία που να στηρίζουν την άποψη ότι ο κλωνικός πολλαπλασιασμός (με μοσχεύματα) μπορεί να οδηγήσει σε επαναδιάσπαση του υβριδίου σε ποικιλίες με περισσότερα πατρικά ή μητρικά χαρακτηριστικά.

| Κωδικός φυτού | % ταυτότητα | Συγγενές είδος |
|-------------------|-------------|--|
| Βότομος | | |
| Βότομος 1 | 99% | <i>Pistacia x saportae</i> voucher T10 clone 3 |
| Βότομος 2 | 100% | <i>Pistacia x saportae</i> voucher T10 clone 3 |
| Βότομος 3 | 99% | <i>Pistacia lentiscus</i> |
| Βότομος 4 | 99% | <i>Pistacia x saportae</i> voucher T10 clone 3 |
| Βότομος 5 | 100% | <i>Pistacia x saportae</i> voucher T10 clone 3 |
| Βότομος 6 | 100% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Βότομος 7 | 100% | <i>Pistacia x saportae</i> voucher T10 clone 3 |
| Βότομος 8 | 100% | <i>Pistacia x saportae</i> voucher T10 clone 3 |
| Βότομος 9 | 99% | <i>Pistacia x saportae</i> voucher T10 clone 3 |
| Μαρουλίτης | | |
| Μαρουλίτης 1 | 100% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Μαρουλίτης 2 | 99% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |



| | | |
|-------------------------------------|------|--|
| Μαρουλίτης 3 | 99% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Μαρουλίτης 4 | 100% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Μαρουλίτης 5 | 100% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Μαυρόσχινος
Μαυρόσχινος 1 | 100% | <i>Pistacia x saportae</i> voucher T10 clone 3 |
| Μαυρόσχινος 2 | 99% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Μαυρόσχινος 3 | 99% | <i>Pistacia x saportae</i> voucher T10 clone 3 |
| Μαυρόσχινος 4 | 99% | <i>Pistacia x saportae</i> voucher T10 clone 3 |
| Μαυρόσχινος 5 | 99% | <i>Pistacia x saportae</i> voucher T10 clone 3 |
| Στενόφυλλος
Στενόφυλλος 1 | 100% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Στενόφυλλος 2 | 99% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Στενόφυλλος 3 | 99% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Στενόφυλλος 4 | 100% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Φαρδύφυλλος
Φαρδύφυλλος 1 | 99% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Φαρδύφυλλος 2 | 99% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Φαρδύφυλλος 3 | 99% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |
| Φαρδύφυλλος 4 | 98% | <i>Pistacia x saportae</i> voucher T10 clone 3 |
| Φαρδύφυλλος 5 | 99% | <i>Pistacia lentiscus</i> voucher Golan 1.1009 clone 1 |

Πίνακας 8.1: Ταυτότητα (%) των ITS αλληλουχιών των ατόμων διαφορετικών «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου *P. lentiscus* var. *Chia*, με αντίστοιχες αλληλουχίες συγγενικών ειδών.

Συμπεράσματα:

- 1) παρατηρείται γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των ατόμων διαφορετικών «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου *P. lentiscus* var. *Chia*
- 2) επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα των RAPD για τις «ποικιλίες» Βότομος, Στενόφυλλος και Φαρδύφυλλος και ενισχύθηκαν από τα αποτελέσματα των

ITS περιοχών, όσον αφορά την ύπαρξη γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των «ποικιλιών» αυτών

- 3) τα δεδομένα των RAPD, όσον αφορά τις «ποικιλίες» Μαυρόσχιнос και Μαρουλίτης, ήρθαν σε σύγκρουση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των περιοχών ITS. Απ' ότι φαίνεται οι «ποικιλίες» αυτές δεν είναι ομοιογενής.
- 4) μια ομάδα ατόμων του *P. lentiscus* var. *Chia* εμφανίζει υψηλή φυλογενετική συγγένεια με το *P. saportae*, ενώ μία άλλη ομάδα εμφανίζει υψηλή φυλογενετική συγγένεια με το *P. lentiscus*

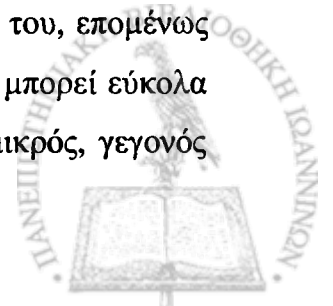
Περαιτέρω έρευνα

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο αριθμός των ατόμων που μελετήθηκε δεν είναι τόσο μεγάλος ώστε να αποκλείσει στατιστικά λάθη που τυχόν παρουσιάστηκαν σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Επομένως, είναι δόκιμο να μελετηθεί μεγαλύτερος αριθμός ατόμων ανά «ποικιλία» έτσι ώστε να αναδειχθεί πιο ξεκάθαρα ο τρόπος που χωρίζονται οι ομάδες των γονοτύπων.

Για την τεκμηρίωση και τον περαιτέρω εμπλουτισμό των αποτελεσμάτων, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι εκκινητές για τις ITS αλληλουχίες, έτσι ώστε να προκύψει ευκρινέστερη εικόνα όσον αφορά στην γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των διαφόρων «ποικιλιών» του *P. lentiscus* var. *Chia*. Επίσης θα μπορούσαν μελλοντικά να ερευνηθούν και ολόκληρες οι περιοχές του 18S και 26S rDNA, οι οποίες αν και είναι συντηρημένες εξελικτικά, μπορεί να μας δώσουν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των διαφόρων ατόμων του μαστιχόδενδρου.

Σε επόμενο στάδιο θα μπορούσε να μελετηθεί το χλωροπλαστικό (cpDNA) ή το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) των οργανισμών, καθώς είναι ιδανικοί μοριακοί δείκτες για την ανίχνευση φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ συγγενικών οργανισμών.

Το γενετικό υλικό των χλωροπλαστών είναι ιδιαίτερα συντηρημένο εξελικτικά και βρίσκεται σε αφθονία στα φυτικά κύτταρα. Η διαδικασία απομόνωσής του είναι σχετικά εύκολη και μπορεί να αποφέρει μεγάλες ποσότητες DNA. Υπάρχουν εκτενείς πληροφορίες σχετικά με την δομή και την νουκλεοτιδική αλληλουχία του, επομένως η εύρεση αλλαγών σε επίπεδο γονιδιώματος και δομικής οργάνωσης, μπορεί εύκολα να επιτευχθεί. Ο ρυθμός μεταλλάξεων που εμφανίζει είναι αρκετά μικρός, γεγονός



που το καθιστά κατάλληλο εργαλείο μοριακής ταξινόμησης για απομακρυσμένα συγγενικά είδη (Caputo 1997).

Το γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων είναι επίσης συντηρημένο εξελικτικά, ωστόσο στην πράξη δεν βοηθάει τόσο στη μοριακή ταξινόμηση συγγενικών ειδών. Το μεγάλο του μέγεθος, οι γενετικοί ανασυνδυασμοί, η ταχύτητα της αναδιοργάνωσης και ο αργός ρυθμός σημειακών μεταλλάξεων, το καθιστούν ακατάλληλο εργαλείο για την κατανόηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ συγγενικών ειδών (Caputo 1997).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Αποτελέσματα της ανάγνωσης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών κάθε δείγματος

➤ S4-1 (Στενόφυλλος)

Name: pITSS4 M13R

Report run date: Sat Aug 7 2010 Time: 05:55:37

Sample remarks:

18S

GTGAACCTGCGGAAGGATCA

ITS1

TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG
GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCCTCCACCCGTGCTTCGTGGGTGT
TGGTCGTATGTTTTCGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAACGAACC
CCGGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTGTT
GCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATCAAT
AACGACTCT

5.8S

CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATG
CGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAAC
GCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTC
ACG

ITS2

CATCGTTGCCCCCTCCCAAATCCTATGATCTTGTGGCGGTGGGCGGAAAA
TGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCCCAAATCTGAGTTTTCGGT
GATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTTTGAAACAGAACCTAGTGATCCT
GTCGTGCGGTTGCGTTCCTGTCTATGGACTCTTTGACCCTTGAGAGGAA
GCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCCAAGGTCAGGCG

26S

GGATTAC

➤ F4-1 (Φαρδύφυλλος)

Name: pITSF4 M13F

Report run date: Sun Sept 26 2010 Time: 3:3:25

Sample remarks:

18S

GTGAACCTGCGGAAGGATCA



ITS1

TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTATCATAACATTGG
GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTATGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTTCGGGTGT
CGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGGCTCGTTCGTTGCGCATTAAACGAACC
CCGGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTGTC
GCCCCGGACACGGTGCGCGTACGAGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATCAAT
AACGACTCT

5.8S

CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACG
CAAGTTGTGCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCA
CG

ITS2

CATCGTTGCCCCCTCCCAAATCCTATGATCTTGTGGTGGTGGGCGGAAAA
TGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTAGCCCAAATCTGAGTTCTCGGT
GATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAAACAGAACCTAGTGATCCT
GTCGTGGGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGACTCTTTGACCCTCGAGAGCAA
GCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCC
CAGGTCAGGCG

26S

GGATTAC

➤ F5-1 (Φαρδύφυλλος)

Name: **pITSF5 M13F**

Report run date: Sun Sept 26 2010 Time: 3:3:25

Sample remarks:

18S

GTGAACCTGCGGAAGGATCA

ITS1

TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG
GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTTCGGGTGT
TGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCGTTCGTTGCGCATTAAACGAACC
CCGGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATTTAACGAGAGAGCTCGATCCTGTT
GCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATCAAT
AACGACTCT

5.8S

CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACG
CAAGTTGTGCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCA
CG



ITS2

CATCGTTGCCCCCTCCCAAATCCTATGATCTTGTTGTGGTGGGCGGAAAA
TGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCCCAAATCTGAGTTTTCGGT
GATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAAACAGAACCTAGTGATCCT
GTCGTGCGGTTGCGTCTCCTGTCTATGGACTCTTTGACCCTTGAGAGCAAG
CGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCC
CAGGTCAGGCG

26S

GGATTAC

➤ B6-2 (Βότομος)

Name: **pITSB6 M13F**

Report run date: Wed Oct 13 2010 Time: 5:41:25

Sample remarks:

18S

GTGAACCTGCGGAAGGATCA

ITS1

TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG
GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGTGT
TGGTCGTATGTTTGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAACC
CCGGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTGTT
GCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATCAAT
AACGACTCT

5.8S

CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACG
CAAGTTGCGCCCCAAGCCTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCA
CG

ITS2

CATCGTTGCCCCCTCCCAAATCCTATGATCTTGTTGTGGCGGTTGGGCGGAAAA
TGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCCCAAATCTGAGTTTTCGGT
GATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAAACAGAACCTAGTGATCCT
GTCGTGCGGTTGCGTCTCCTGTCTATGGACTCTTTGACCCTTGAGAGGAA
GCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCC
AGGTCAGGCG

26S

GGATTAC



➤ B7-1 (Βότομος)

Name: pITSB7 M13F

Report run date: Wed Oct 13 2010 Time: 5:41:25

Sample remarks:

18S

GTGAACCTGCGGAAGGATCA

ITS1

TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG
GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTCCGGGTGT
CGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAACC
CCGGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTGTC
GCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATCAAT
AACGACTCT

5.8S

CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACG
CAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCA
CG

ITS2

CATCGTTGCCCCCTCCCAAATCCTATGATCTTGTGGCGGTGGGCGGAAAA
TGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCCCAAATCTGAGTTCTCGGT
GATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAAACAGAACCTAGTGATCCT
GTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGACTCTTTGACCCTCGAGAGCAA
GCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCC
CAGGTCAGGCG

26S

GGATTAC

➤ B8-1 (Βότομος)

Name: pITSB8 M13R

Report run date: Frid June 29 2012 Time: 12:32

Sample remarks:

18S

GTGAACCTGCGGAAGGATCA



ITS1

TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG
GGGCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTTCGGGTGT
CGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAACC
CCGGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCTGTC
GCCCCGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATCAAT
AACGACTCT

5.8S

CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACG
CAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCA
CG

ITS2

CATCGTTGCCCCCTCCCAAATCCTATGATCTTGTGGCGGTGGGCGGAAAA
TGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCCCAAATCTGAGTTCTCGGT
GATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTTTGAAACAGAACCTAGTGATCCT
GTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGACTCTTTGACCCTCGAGAGCAA
GCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCCAGGTCAGGCG

26S

GGATTAC

➤ B9-1 (Βότομος)

Name: pITSB9 M13F

Report run date: Sun Sept 26 2010 Time: 3:3:25

Sample remarks:

18S

GTGAACCTGCGGAAGGATCA

ITS1

TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG
GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTTCGGGTGT
TGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAACC
CCGGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCTGTC
GCCCCGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATCAAT
AACGACTCT

5.8S

CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACG
CAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCA
CG



ITS2

CATCGTTGCCCCCCTCCCAAATCCTATGATCTTGTGGCGGTGGGCGGAAAA
TGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCCCAAATCTGAGTTCTCGGT
GATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAAACAGAACCTAGTGATCCT
GTCGTGCGGTTGCGTTCCTGTGTTATGGACTCTTTGACCCTCGAGAGCAA
GCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC
AGGTCAGGCG

26S

GGATTAC

➤ Mr5-1 (Μαρουλίτης)

Name: pITSMr5 M13F

Report run date: Frid June 29 2012 Time: 12:32

Sample remarks:

18S

GTGAACCTGCGGAAGGATCA

ITS1

TTGTGCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG
GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGTGT
TGGTCGTATGTTTGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAACC
CCGGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTGTT
GCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATCAAT
AACGACTCT

5.8S

CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACG
CAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCA
CG

ITS2

CATCGTTGCCCCCCTCCCAAATCCTATGATCTTGTGGCGGTGGGCGGAAAA
TGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCCCAAATCTGAGTTTTCGGT
GATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAAACAGAACCTAGTGATCCT
GTCGTGCGGTTGCGTTCCTGTCTATGGACTCTTTGACCCTTGAGAGGAA
GCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCCAGGTCAGGCG

26S

GGATTAC



➤ Mx3-2 (Μαυρόσχινος)

Name: pITSMx3 M13F

Report run date: Frid Sept 14 2012 Time: 10:25

Sample remarks:

18S

GTGAACCTGCGGAAGGATCA

ITS1

TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG
GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTTCGGGTGT
CGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAACC
CCGGCGCAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTGTC
GCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGACCTTCTTTCATTATCAAT
AACGACTCT

5.8S

CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACG
CAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCA
CG

ITS2

CATCGTTGCCCCCTCCCAAATCCTATGATCTTGTGGCGGTGGGCGGAAAA
TGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCCCAAATCTGAGTTCTCGGT
GATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAAACAGAACCTAGTGATCCT
GTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGACTCTTTGACCCTCGAGAGCAA
GCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCCAAGGTCAGGCG

26S

GGATTAC

➤ Mx5-1 (Μαυρόσχινος)

Name: pITSMx5 M13F

Report run date: Frid June 29 2012 Time: 12:32

Sample remarks:

18S

GTGAACCTGCGGAAGGATCA



ITS1

TTGTTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG
GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTCTGGGTGT
CGGTTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAACC
CCGGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCTGTG
GCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATCAAT
AACGACTCT

5.8S

CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC
GATACTTGGTGC GAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACG
CAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCA
CG

ITS2

CATCGTTGCCCCCTCCCAAATCCTATGATCTTGTGGCGGTGGGGCGGAAAA
TGGCCTCCCGTGTGCTTGC GCGCCGCGGTTGGCCCAAATCTGAGTTCTCGGT
GATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTTGAACAGAACCTAGTGATCCT
GTTGTGCGGTTGCGTTCCTGTCTATGGACTCTTTGACCCTTGAGAGCAA
GCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCCAGGTCAGGCG

26S

GGATTAC



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2:

Αποτελέσματα πολλαπλής στοίχισης αλληλουχιών (multiple sequence alignment) με τη βοήθεια του εργαλείου ClustalW2 του EBI.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
pITS_Bo1-2
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Bo4-6
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Mx1-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Mx3-2
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Bo2-2
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Bo5-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Bo7-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Bo8-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
Pistacia_x_saportae_voucher_T1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Mx5-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_F4-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTATCATAACATTGG 50
pITS_F1-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Mr3-3
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_F2-4
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_F5-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Mr2-10
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_S2-4
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Mx2-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_F3-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_S1-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
Pistacia_lentiscus_voucher_Gol
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
PITS_S4-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Mr1-2
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Mr4-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Mr5-1
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_Bo6-2
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
pITS_S3-2
TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
```

Pistacia_lentiscus
 TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
 pITS_Bo3-2
 TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
 pITS_Bo9-1
 TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
 pITS_Mx4-3
 TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTCATAACATCGG 50
Pistacia_integerrima_voucher_P
 TTGTCGAAACCTGCCGAGCAGAACGACCCGCGAACCTGTCATCACATCGG 50
Pistacia_terebinthus_subsp.pal
 TTGTCGAAACCTGCCGAGCAGAACGACCCGCGAACCTGTCATCACATCGG 50
Pistacia_vera
 TTGTCGAAACCTGCCGAGCAGAACGACCCGCGAACCTGTCATCACATCGG 50
Pistacia_weinmaniifolia_vouche
 TTGTCGAAACCTGCCAAGCAGAACGACCCGCGAACCTGTGATAACATCGG 50

** **** **

pITS_Bo1-2
 GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Bo4-6
 GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Mx1-1
 GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Mx3-2
 GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Bo2-2
 GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Bo5-1
 GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Bo7-1
 GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Bo8-1
 GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
Pistacia_x_saportae_voucher_T1
 GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Mx5-1
 GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_F4-1
 GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTATGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_F1-1
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Mr3-3
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_F2-4
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_F5-1
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Mr2-10
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_S2-4
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Mx2-1
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_F3-1
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_S1-1
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
Pistacia_lentiscus_voucher_Gol
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 PITS_S4-1
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Mr1-2
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Mr4-1
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100



pITS_Mr5-1
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Bo6-2
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_S3-2
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 Pistacia_lentiscus
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Bo3-2
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Bo9-1
 GGGCCCATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 pITS_Mx4-3
 GGGCCTATGGGCTTCGTGCCTGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 Pistacia_integerrima_voucher_P
 GGGCCTGCGGGCTTCGTGCCCGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 Pistacia_terebinthus_subsp.pal
 GGGCCTGCGGGCTTCGTGCCCGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 Pistacia_vera
 GGGCCTGCGGGCTTCGTGCCCGTGTGCCTCCACCCGTGCTTCGTGCGGGTG 100
 Pistacia_weinmanifolia_vouche
 GGGCCTGCGGGCTTCGTGCCCGTGTGCCTCCACCCGTGCTTTGTGCGGGTG 100

pITS_Bo1-2
 TCGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Bo4-6
 TCGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Mx1-1
 TCGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Mx3-2
 TCGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Bo2-2
 TCGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Bo5-1
 TCGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Bo7-1
 TCGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Bo8-1
 TCGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 Pistacia_x_saportae_voucher_T1
 TCGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Mx5-1
 TCGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCATCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_F4-1
 TCGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGGCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_F1-1
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Mr3-3
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_F2-4
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_F5-1
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Mr2-10
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_S2-4
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Mx2-1
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_F3-1
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_S1-1
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 Pistacia_lentiscus_voucher_Go1
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150



PITS_S4-1
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Mr1-2
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Mr4-1
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Mr5-1
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Bo6-2
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_S3-2
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 Pistacia_lentiscus
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Bo3-2
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Bo9-1
 TTGGTCGTATGTTTGGCGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 pITS_Mx4-3
 TCAGTTGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 Pistacia_integerrima_voucher_P
 TCGGTCGCACGCTTGTGCTGCGGTTGCCCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 Pistacia_terebinthus_subsp.pal
 TCGGTCGCACACTTGTGCTACGGCTGCCCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 Pistacia_vera
 TCGGTCGTATGTTTGTGCATGCGACTGCCTCGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150
 Pistacia_weinmaniifolia_vouche
 TCGGTCGTACGCTTGTGCGTGCGGCTGCCCTGTGTCGTTGCGCATTAAACGAA 150

* * * * * * * * * * * * * *

pITS_Bo1-2
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTG 200
 pITS_Bo4-6
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTG 200
 pITS_Mx1-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTG 200
 pITS_Mx3-2
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTG 200
 pITS_Bo2-2
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTG 200
 pITS_Bo5-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTG 200
 pITS_Bo7-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTG 200
 pITS_Bo8-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTG 200
 Pistacia_x_saportae_voucher_T1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTG 200
 pITS_Mx5-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTG 200
 pITS_F4-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCTG 200
 pITS_F1-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATTTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_Mr3-3
 CCCC GGCGCGAATTGCATCAAGGAAATTTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_F2-4
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATTTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_F5-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATTTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_Mr2-10
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATTTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_S2-4
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_Mx2-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200



pITS_F3-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_S1-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 Pistacia_lentiscus_voucher_Go1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 PITS_S4-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_Mr1-2
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_Mr4-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_Mr5-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_Bo6-2
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_S3-2
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 Pistacia_lentiscus
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_Bo3-2
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGATCCTG 200
 pITS_Bo9-1
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCCTG 200
 pITS_Mx4-3
 CCCC GGCGCGAATTGCGTCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGGTCCCTG 200
 Pistacia_integerrima_voucher_P
 CCCC GGCGCGAATTGCGCCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGCTCCCG 200
 Pistacia_terebinthus_subsp.pal
 CCCC GGCGCGAATTGCGCCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGCTCCCG 200
 Pistacia_vera
 CCCC GGCGCGAATTGCGCCAAGGAAATCTTAACGAGAGAGCTCGCTCCCG 200
 Pistacia_weinmaniifolia_vouche
 CCCC GGCGCGAATTGCGCCAAGGAAATATAAACGAGGGAGCCCGCTCCCG 200

***** * *****

**** * * * * *

pITS_Bo1-2
 TCGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 pITS_Bo4-6
 TCGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 pITS_Mx1-1
 TCGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 pITS_Mx3-2
 TCGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGACCTTCTTTCATTATC 250
 pITS_Bo2-2
 TCGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 pITS_Bo5-1
 TCGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 pITS_Bo7-1
 TCGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 pITS_Bo8-1
 TCGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 Pistacia_x_saportae_voucher_T1
 TCGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 pITS_Mx5-1
 TCGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 pITS_F4-1
 TCGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGAGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 pITS_F1-1
 TTGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_Mr3-3
 TTGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_F2-4
 TTGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_F5-1
 TTGCCCCGGACACGGTGC GCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250



pITS_Mr2-10
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_S2-4
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_Mx2-1
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_F3-1
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_S1-1
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 Pistacia_lentiscus_voucher_Gol
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 PITS_S4-1
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_Mr1-2
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_Mr4-1
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_Mr5-1
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_Bo6-2
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_S3-2
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 Pistacia_lentiscus
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_Bo3-2
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATAATC 250
 pITS_Bo9-1
 TCGCCCCGGACACGGTGCGCGTACGGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 pITS_Mx4-3
 TCGCCCCGGACACGGTGCGCGTACAGGATGTGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 Pistacia_integerrima_voucher_P
 TCGCCCCGGACACGGTGCGCGCGGGATGCGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 Pistacia_terebinthus_subsp.pal
 TCGCCCCGGACACGGTGCGTGC GGGATGCGTGGCCTTCTTTCATTATC 250
 Pistacia_vera
 TCGCCCCGGACACGGTGCGCGTGC GGGATGGGTAGCCTTCTTTCATTATC 250
 Pistacia_weinmaniifolia_vouche
 TTGCCCCGGACACGGTGCGCGTGC GGGATGCGTGGCCTTCTTTCATTATC 250

* * * * *

***** ***

pITS_Bo1-2
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Bo4-6
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Mx1-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Mx3-2
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Bo2-2
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Bo5-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Bo7-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Bo8-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 Pistacia_x_saportae_voucher_T1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Mx5-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_F4-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_F1-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300



pITS_Mr3-3
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_F2-4
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_F5-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Mr2-10
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_S2-4
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Mx2-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_F3-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_S1-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 Pistacia_lentiscus_voucher_Gol
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 PITS_S4-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Mr1-2
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Mr4-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Mr5-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Bo6-2
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_S3-2
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 Pistacia_lentiscus
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Bo3-2
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Bo9-1
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 pITS_Mx4-3
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 Pistacia_integerrima_voucher_P
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 Pistacia_terebinthus_subsp.pal
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 Pistacia_vera
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300
 Pistacia_weinmaniifolia_vouche
 AATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 300

pITS_Bo1-2
 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
 pITS_Bo4-6
 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
 pITS_Mx1-1
 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
 pITS_Mx3-2
 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
 pITS_Bo2-2
 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
 pITS_Bo5-1
 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
 pITS_Bo7-1
 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
 pITS_Bo8-1
 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
 Pistacia_x_saportae_voucher_T1
 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350



pITS_Mx5-1
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_F4-1
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_F1-1
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_Mr3-3
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_F2-4
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_F5-1
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_Mr2-10
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_S2-4
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_Mx2-1
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_F3-1
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_S1-1
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
Pistacia_lentiscus_voucher_Gol
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
PITS_S4-1
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_Mr1-2
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_Mr4-1
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_Mr5-1
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_Bo6-2
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_S3-2
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
Pistacia_lentiscus
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_Bo3-2
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_Bo9-1
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
pITS_Mx4-3
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
Pistacia_integerrima_voucher_P
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
Pistacia_terebinthus_subsp.pal
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
Pistacia_vera
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350
Pistacia_weinmaniifolia_vouche
GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG 350

pITS_Bo1-2
AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCT 400
pITS_Bo4-6
AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCT 400
pITS_Mx1-1
AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCT 400
pITS_Mx3-2
AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCT 400
pITS_Bo2-2
AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCT 400
pITS_Bo5-1
AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCT 400



pITS_Bo7-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_Bo8-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 Pistacia_x_saportae_voucher_T1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_Mx5-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_F4-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_F1-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_Mr3-3
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_F2-4
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_F5-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_Mr2-10
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_S2-4
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_Mx2-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_F3-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_S1-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 Pistacia_lentiscus_voucher_Gol
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_S4-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_Mr1-2
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_Mr4-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_Mr5-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_Bo6-2
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_S3-2
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 Pistacia_lentiscus
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_Bo3-2
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_Bo9-1
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 pITS_Mx4-3
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 Pistacia_integerrima_voucher_P
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 Pistacia_terebinthus_subsp.pal
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 Pistacia_vera
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400
 Pistacia_weinmanifolia_vouche
 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGCTCT 400

pITS_Bo1-2 GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCCAA-
 TCCTATG-ATCTTG 448
 pITS_Bo4-6 GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCCAA-
 TCCTATG-ATCTTG 448
 pITS_Mx1-1 GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCCAA-
 TCCTATG-ATCTTG 448



| | |
|--|--------------------------------------|
| pITS_Mx3-2 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Bo2-2 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Bo5-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Bo7-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Bo8-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| <i>Pistacia_x_saportae_voucher_T1</i> | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Mx5-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_F4-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_F1-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Mr3-3 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_F2-4 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_F5-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Mr2-10 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_S2-4 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Mx2-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_F3-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_S1-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| <i>Pistacia_lentiscus_voucher_Gol</i> | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_S4-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Mr1-2 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Mr4-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Mr5-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Bo6-2 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_S3-2 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| <i>Pistacia_lentiscus</i> | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Bo3-2 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Bo9-1 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| pITS_Mx4-3 | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCTCCAAA- |
| TCCTATG-ATCTTG 448 | |
| <i>Pistacia_integerrima_voucher_P</i> | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCGCCAAA- |
| TCCTACG-ATCTTG 448 | |
| <i>Pistacia_terebinthus_subsp.pal</i> | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCGCCGGA- |
| TCCTACG-ATCTTG 448 | |
| <i>Pistacia_vera</i> | |
| GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCGCCAAAATCTTGCG-ATCTTG 449 | |
| <i>Pistacia_weinmaniifolia_vouche</i> | GCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCT-CCCAAG- |
| TCCTACGGATCTTG 448 | |

***** ** *

* *****



pITS_Bo1-2
 TGGCGGTGGGCAGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Bo4-6
 TGGCGGTGGGCAGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Mx1-1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Mx3-2
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Bo2-2
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Bo5-1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Bo7-1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Bo8-1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 Pistacia_x_saportae_voucher_T1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Mx5-1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_F4-1
 TGGTGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTAGCC 498
 pITS_F1-1
 TTGTGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Mr3-3
 TTGTGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_F2-4
 TTGTGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_F5-1
 TTGTGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Mr2-10
 TTGTGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_S2-4
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Mx2-1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_F3-1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_S1-1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 Pistacia_lentiscus_voucher_Gol
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_S4-1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Mr1-2
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Mr4-1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Mr5-1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Bo6-2
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_S3-2
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 Pistacia_lentiscus
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Bo3-2
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Bo9-1
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 pITS_Mx4-3
 TGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 Pistacia_integerrima_voucher_P
 AGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 Pistacia_terebinthus_subsp.pal
 CGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 498
 Pistacia_vera
 CGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGCGGTTGGCC 499



Pistacia_weinmaniifolia_vouche

CGGCGGTGGGCGGAAAATGGCCTCCCGTGTGCTTGCGCCCGGGTTGGCC 498

* ***** *****

***** ***

pITS_Bo1-2
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Bo4-6
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Mx1-1
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Mx3-2
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Bo2-2
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Bo5-1
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Bo7-1
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Bo8-1
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
Pistacia_x_saportae_voucher_T1
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Mx5-1
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_F4-1
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_F1-1
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Mr3-3
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_F2-4
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_F5-1
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Mr2-10
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_S2-4
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Mx2-1
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_F3-1
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_S1-1
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
Pistacia_lentiscus_voucher_Gol
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
PITS_S4-1
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Mr1-2
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Mr4-1
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Mr5-1
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Bo6-2
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_S3-2
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
Pistacia_lentiscus
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Bo3-2
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Bo9-1
CAAATCTGAGTTCTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548
pITS_Mx4-3
CAAATCTGAGTTTTTCGGTGATGCTTCCCACGACAATCGGTGGTGTGTTGAA 548



Pistacia integerrima_voucher_P
CAAATCCGAGTTCTCGGTGACGCTTCCCGCGACAATCGGTGGCGTTTGAA 548
Pistacia terebinthus_subsp.pal
CAAATCCGAGTTCTCGGTGACGCTTCCCGCGACAATCGGTGGCGTTTGAA 548
Pistacia vera
CAAATCCGAGTTCTCGGTGACGCTTCCCGCGACAATCGGTGGCGTTTGAA 549
Pistacia weinmaniifolia_vouche
CAAATCCGAGTTCTCGGTGACGCTTCCCGCGACAATCGGTGGCGTTTGAA 548
***** **

***** **

pITS_Bo1-2
ACAGAACCTAGTGATCCTGTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGA-- 596
pITS_Bo4-6
ACAGAACCTAGTGATCCTGTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGA-- 596
pITS_Mx1-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGA-- 596
pITS_Mx3-2
ACAGAACCTAGTGATCCTGTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGA-- 596
pITS_Bo2-2
ACAGAACCTAGTGATCCTGTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGA-- 596
pITS_Bo5-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGA-- 596
pITS_Bo7-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGA-- 596
pITS_Bo8-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGA-- 596
Pistacia_x_saportae_voucher_T1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGA-- 596
pITS_Mx5-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
pITS_F4-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGGGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGA-- 596
pITS_F1-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGT-
CTCCTGTCTATGGA-- 595
pITS_Mr3-3
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGT-
CTCCTGTCTATGGA-- 595
pITS_F2-4
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGT-
CTCCTGTCTATGGA-- 595
pITS_F5-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGT-
CTCCTGTCTATGGA-- 595
pITS_Mr2-10
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGT-
CTCCTGTCTATGGA-- 595
pITS_S2-4
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
pITS_Mx2-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
pITS_F3-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
pITS_S1-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
Pistacia_lentiscus_voucher_Gol
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
PITS_S4-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
pITS_Mr1-2
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
pITS_Mr4-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
pITS_Mr5-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
pITS_Bo6-2
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
pITS_S3-2
ACAGCACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
Pistacia_lentiscus
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596



pITS_Bo3-2
ACAGAACCTAGTGATCCTGTTGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGA-- 596
pITS_Bo9-1
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTTTATGGA-- 596
pITS_Mx4-3
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTATGGA-- 596
*Pistacia integerrima*_voucher_P
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTACGGA-- 596
*Pistacia terebinthus*_subsp.pal
ACATAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTACGGA-- 596
Pistacia vera
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTACTGTCTACGGA-- 597
*Pistacia weinmaniifolia*_vouche
ACAGAACCTAGTGATCCTGTCGTGCGGTTGCGTTCTCCTGTCTACGGATG 598
*** ***** **

**** ** **

pITS_Bo1-2 --CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAG-
GCACTCGCATTGCGACCCC 643
pITS_Bo4-6 --
CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_Mx1-1 --
CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_Mx3-2 --
CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_Bo2-2 --
CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_Bo5-1 --
CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_Bo7-1 --
CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_Bo8-1 --
CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
*Pistacia x saportae*_voucher_T1 --
CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_Mx5-1 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_F4-1 --
CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_F1-1 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 643
pITS_Mr3-3 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 643
pITS_F2-4 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 643
pITS_F5-1 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 643
pITS_Mr2-10 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 643
pITS_S2-4 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_Mx2-1 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_F3-1 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_S1-1 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGGAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
*Pistacia lentiscus*_voucher_Gol --
CTCTTTGACCCTTGAGAGGAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
PITS_S4-1 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGGAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_Mr1-2 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGGAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_Mr4-1 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGGAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
pITS_Mr5-1 --
CTCTTTGACCCTTGAGAGGAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644



pITS_Bo6-2 --
 CTCTTTGACCCTTGAGAGGAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
 pITS_S3-2 --
 CTCTTTGACCCTTGAGAGGAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
 Pistacia_lentiscus --
 CTCTTTGACCCTCGAGAGGAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
 pITS_Bo3-2 --
 CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
 pITS_Bo9-1 --
 CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
 pITS_Mx4-3 --
 CTCTTTGACCCTTGAGAGCAAGCGAAAGCGCACTCGCATTGCGACCCC 644
 Pistacia_integerrima_voucher_P --
 CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCGCTCGCATTGCGACCCC 644
 Pistacia_terebinthus_subsp.pal --
 CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCGCTCGCATTGCGACCCC 644
 Pistacia_vera --
 CTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCGCTCGCATCGCGACCCC 645
 Pistacia_weinmaniifolia_vouche
 GACTCTTTGACCCTCGAGAGCAAGCGAAAGCGCGCTCGCATTGCGACCCC 648

| | | |
|--------------------------------|------------|-----|
| pITS_Bo1-2 | AGGTCAGGCG | 653 |
| pITS_Bo4-6 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Mx1-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Mx3-2 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Bo2-2 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Bo5-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Bo7-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Bo8-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| Pistacia_x_saportae_voucher_T1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Mx5-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_F4-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_F1-1 | AGGTCAGGCG | 653 |
| pITS_Mr3-3 | AGGTCAGGCG | 653 |
| pITS_F2-4 | AGGTCAGGCG | 653 |
| pITS_F5-1 | AGGTCAGGCG | 653 |
| pITS_Mr2-10 | AGGTCAGGCG | 653 |
| pITS_S2-4 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Mx2-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_F3-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_S1-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| Pistacia_lentiscus_voucher_Gol | AGGTC----- | 649 |
| PITS_S4-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Mr1-2 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Mr4-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Mr5-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Bo6-2 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_S3-2 | AGGTCAGGCG | 654 |
| Pistacia_lentiscus | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Bo3-2 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Bo9-1 | AGGTCAGGCG | 654 |
| pITS_Mx4-3 | AGGTCAGGCG | 654 |
| Pistacia_integerrima_voucher_P | AGGTCAGGCG | 654 |
| Pistacia_terebinthus_subsp.pal | AGGTCAGGCG | 654 |
| Pistacia_vera | AGGTCAGGCG | 655 |
| Pistacia_weinmaniifolia_vouche | AGGTCAGGCG | 658 |



9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αγγελάκη- Ρουμπελάκη Καλλιόπη (2003). Φυσιολογία Φυτών (από το μόριο στο περιβάλλον), *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης* σελ.648-650.
2. Αλαχιώτης Σταμάτης (2007). Εισαγωγή στην Εξέλιξη, *Εκδοτικός Οίκος Α. Α. Λιβάνη*, σελ. 47, 84, 319-322.
3. Αλαχιώτης Σταμάτης (1992). Εξέλιξη & μοριακή εξέλιξη, *Εκδόσεις συμμετρία*, Κεφ. 9 σελ. 189-191 Κεφ. 12 σελ.257-262, Κεφ. 13 σελ.277-281.
4. Βασιλακάκης Μ., Θεριός Ι. (1984). Μαθήματα Ειδικής Δενδροκομίας- Φυλλοβόλα Οπωροφόρα Δένδρα, Θεσσαλονίκη, σελ. 224-225.
5. Βολιώτης Δημήτριος (1998). Οικονομική Βοτανική, Αθήνα, σελ. 179.
6. Μπελλές Χρίστος (2006). Το νησί Μαστίχα. *Ελληνικά γράμματα*, σελ. 221-229, 253-277.
7. Μυλωνά Αντιγόνη (2008). Μερική Μοριακή Ταξινόμηση Μορφολογικών «ποικιλιών» του μαστιχόδενδρου της Χίου *Pistacia lentiscus* var. *Chia*. Ιωάννινα.
8. Πανέτσος Κωνσταντίνος., Γενετική βελτίωση του Μαστιχόδενδρου- *Pistachia lentiscus* var. *Chia*- Επιπτώσεις στην ποιοτική και ποσοτική παραγωγή μαστίχας, σελ. 181-188
9. Πανέτσος Π. Κωνσταντίνος (1997). Η Μαστίχα της Χίου Παράδοση και Σύγχρονες Πρακτικές, Διεθνές Συμπόσιο, *Υπουργείο Αιγαίου*, σελ. 181-189.
10. Πατσάλη Παντελίτσα (2008). Επίδραση της πρόσληψης Μαστίχας Χίου σε Χημική Ελκώδη Κολίτιδα in vino. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας & Διατροφής. Αθήνα.
11. Πήλιου Κλεονίκη (2006). Μερικός Γονοτυπικός Χαρακτηρισμός διαφόρων μορφολογικών «ποικιλιών» του Μαστιχόδενδρου της Χίου (*Pistacia lentiscus* var. *chia*). Ιωάννινα.
12. Ποντίκης Α. Κωνσταντίνος (1983). Ειδική Δενδροκομία Τόμος Β' (Ακρόδρυα, Πυρηνόκαρπα, Λοιπά Καρποφόρα), *Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης*, σελ. 23-24.
13. Σαββίδης Θωμάς (2000). Το Μαστιχόδενδρο της Χίου (*Pistacia lentiscus* var. *chia*), *Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη α.ε.*, σελ.15-44.
14. Σαρλής Γεώργιος, Συστηματική Βοτανική – Εφαρμογές Κορμοφύτων, *Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης*, σελ.239-241.

15. Στεφανάκη – Νικηφοράκη Μαρία. Συστηματική Βοτανική – Αγγειόσπερμα Τόμος Α', Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, σελ.116-117.
16. Χατζηλουκάς Ευστάθιος (2004) Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, σελ. 164-171.
17. Χατζηλουκάς Ε. (2008).Εργαστηριακές Ασκήσεις Μοριακής Βιολογίας. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
18. Χατζόπουλος Π. (2001). Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο.
19. Aksoy A, Duran N, Koksal F (2006). In vitro and in vivo antimicrobial effects of mastic chewing gum against *Streptococcus mutans* and mutans streptococci. *Arch Oral Biol* **51(6)**:476-481.
20. AL-Saghir MG (2010). Phylogenetic Analysis of the Genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae) Based on Morphological Data. *Asian Journal of Plant Sciences* **9(1)**:28-35.
21. Alvarez I, Wendel JF (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**:417-434.
22. Andrikopoulos NK, Kaliora AC et al. (2003). Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. *Phytother Res* **17(5)**: 501-507.
23. Baldwin G. B. (1992). Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: An example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **1, No.1**, pp. 3-16.
24. Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM et al (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **82**:247-277.
25. Barazani O., Dudai N., Golan-Goldhirsh A.(2003). Comparison of Mediterranean *Pistacia lentiscus* Genotypes by Random Amplified Polymorphic DNA, and morphological analyses. *Journal of Chemical Ecology*, **29** No.8: 1939-1952.
26. Barker P. N., Vanderpoorten A., Morton M. C., Rourke P. J. (2004). Phylogeny, biogeography, and evolution of life-history traits in *Leucadendron* (Proteaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33**: 845-860.
27. Browicz K. (1987). *Pistacia lentiscus* cv. Chia (*Anacardiaceae*) on Chios island. *Pl. Syst. Evol.* **155**: 189-195.



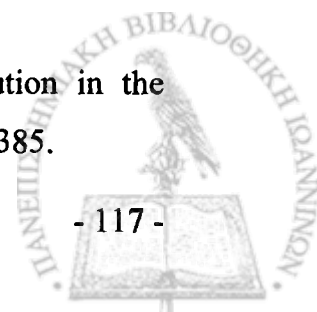
28. Caputo P (1997). DNA and phylogeny in plants: History and new perspectives. *Lagasalia* **19**(1-2):331-344.
29. Caruso T, Barone E, Zakyntinos G et al (1998). Genetic and phenotypic diversity in pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm collected in Mediterranean countries. *Acta Hort* **470**:168-178.
30. Choi HS, Song HS, Ukeda H et al. (2000). Radical scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem* **48**: 4156-4161.
31. Crowell PL (1999). Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *The Journal of Nutrition*. **129**: 7755-7785.
32. Cullings KW, Vogler DR (1998). A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Molecular Ecology* **7**:919-923.
33. Daifas DP, Smith JP et al (2004). Effects of mastic resin and its essential oil on the growth of proteolytic *Clostridium botulinum*. *Int Journal of Food Microb* **94**:313-322.
34. Doyle J.J., Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical Bulletin* **19**:11-15
35. Doyle J.J., Doyle J.L. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue, *Focus* **12**:13-15.
36. Golan-Goldhirsh A, Barazani O et al (2004). Genetic relationships among Mediterranean *Pistacia* species evaluated by RAPD and AFLP markers. *Plant System Evol.* **246**:9-18.
37. Hertog MG, Kromhout D et al. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* **155**: 381-386.
38. Hsu CL, Yen GC (2008). Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signalling mechanisms. *Mol Nutr Food Res* **52**(1): 53-61.
39. Jobes V. D., Thien B. L. (1997). A Conserved Motif in the 5.8S Ribosomal RNA (rRNA) Gene is a Useful Diagnostic Marker for Plant Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences. *Plant Molecular Biology Reporter* **15**: 326-334.



40. Inouye S, Yamaguchi H, Takizawa T (2001). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J Infect Chemother*, **7**: 251-254.
41. Kafkas S and Perl-Treves R (2001). Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in Turkey. *Theoretical and Applied Genetics* **102**:908-915.
42. Kafkas S (2006). Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* by AFLP markers. *Plant Syst and Evol* **262**:113-124.
43. Kafkas S, Karimi HR, Zamani Z et al (2009). Genetic relationships among *Pistacia* species using AFLP markers. *Plant Syst and Evol* **279**:21-28.
44. Kaliora AC, Mylona A, Chiou A et al. (2004). Detection and identification of simple phenolic in *Pistacia lentiscus* resin. *Lig Chromatogr R T* **27** No2: 289-300.
45. Kaliora AC, Stathopoulou MG, Triantafillidis JK et al. (2007). Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World J Gastroenterol* **13**(5): 748-753.
46. Katsiotis A, Hagidimitriou M, et al (2003). Genetic relationships among species and cultivars of *Pistacia* using RAPDs and AFLPs. *Euphytica* **132**: 279-286.
47. Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**:111-120.
48. Kokwaro JO and Gillett JB. (1980). Notes on the Anacardiaceae of eastern Africa. *Kew Bulletin* **34**:745-760.
49. Koutsoudaki C., Krsek M., Rodger A. (2005). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil and the Gum of *Pistacia lentiscus* Var. *chia*. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 7681-7685.
50. Loutrari H, Magkouta S, Pyriochou A et al. (2006). Mastic oil from *Pistacia lentiscus* var. *Chia* inhibits growth and survival of human K562 leukemia cells and attenuates angiogenesis. *Nutr. Cancer* **55**: 86-93.
51. Magiatis P, Melliou E et al. (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *Chia*. *Plant Med* **65**: 749-752.



52. Miller AJ, Young DA and Wen J (2001). Phylogeny and biogeography of *Rhus* (Anacardiaceae) based on ITS sequence data. *Int J Plant Sci* **162**:1401-1407.
53. Morrison DA (2005). Networks in phylogenetic analysis: new tools for population biology. *Int Journal for Parasitology*. **35**:567-582.
54. Nahum S, Moshe I et al (2008). Phenotypic plasticity and gene diversity in *Pistacia lentiscus* L. along environmental gradients in Israel. *Tree Genetics & Genomes* **4**:777-785.
55. Papageorgiou VP, Bakola-Christianopoulou MN et al. (1997). Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *J Chromatogr A*. **769**: 263-273.
56. Paraschos S., Magiatis P., Mitakou S., Petraki K., Kalliaropoulos A., Mentis A., Sgouras D., Skaltsounis A. (2007). In Vitro and In Vivo Activities of Chios Mastic Gum Extracts and Constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **51**, No. 2 p. 551–559.
57. Parfitt DE and Badenes ML. (1997). Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **94**:7987-7992.
58. Parfitt DE and Badenes ML. (1998). Molecular phylogenetic analysis of the genus *Pistacia*. *Acta Horticulturae* **470**:143-151.
59. Parfitt DE (2003). "Bonsai" ornamental pistachio. *HortScience* **38**:1260-1261
60. Pell SK (2004). Molecular Systematics of the cashew family (Anacardiaceae). PhD dissertation, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana USA.
61. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn., *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
62. Tassou C, Nychas GJE. (1995). Antimicrobial activity of essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. Chia) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system. *Int Biodeter Biodegr* **411-420**.
63. Triantafyllou A, Chaviaras N, Sergentanis TN (2007). Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *J Ethnopharmacol* **111(1)**: 43-49.
64. Wannan BS and Quinn CJ (1991). Floral structure and evolution in the Anacardiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **107**:349-385.



65. White et al., (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press* pp.315-322.
66. White, T.J., Bruns, T., Lee S., and Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR PROTOCOLS, A Guide to Methods and Applications. ACADEMIC PRESS
67. Yi T., Wen J., Golan-Goldhirsh A., Parfitt E. D. (2008). Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *American journal of botany. Botanical Society of America* **95(2)**:241-251.
68. Zografou P, Linos A and Hagedimitriou M (2010). Genetic diversity among different genotypes of *Pistacia lentiscus* Var. *chia* (mastic tree). *Options Mediterraneennes-XIV GREMPA Meeting on Pistachios and Almonds A* **94**:159-163
69. Zohary M (1952). A monographic study of the genus *Pistacia*. *Palestine J Bot Jerusalem Ser.* **5**:187-228.
70. Zohary M (1972). *Pistacia* L. *Flora Palestina* **2**:297-300. Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem, Israel.
71. Zohary D (2000). The taxonomic ranking of *Pistacia terebinthus* and *P. palaestina*. *FAO-Ciheam-Nucis-Newslett* **9**:39-40.

