



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΜΗΛΙΑΣ



Ιωάννα Ρίζου

Επιβλέπουσα: Δήμητρα Δήμου

Ακαδημαϊκή υπότροφος

Άρτα, Φεβρουάριος, 2021

**MOLECULAR IDENTIFICATION OF GREEK APPLE
VARIETIES**

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Άρτα 22/02/2021

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα
Δήμου Δήμητρα
Ακαδημαϊκή υπότροφος
2. Μέλος επιτροπής
Πατακιούτας Γεώργιος
Αναπληρωτής Καθηγητής
3. Μέλος επιτροπής
Υφαντή Παρασκευή
Μέλη ΕΔΙΠ

© Ρίζου, Ιωαννα, 2021.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Δήλωση μη λογοκλοπής

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του Ν. 2121/1993 περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία είναι εξ ολοκλήρου αποτέλεσμα δικής μου ερευνητικής εργασίας, δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές που χρησιμοποιήθηκαν (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) για τη συγγραφή της περιλαμβάνονται στη βιβλιογραφία.

Ρίζου, Ιωάννα

Υπογραφή

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Δήμου Δήμητρα για την βοήθεια της στο πείραμα, για τις συμβουλές της ώστε να βρεθούν περαιτέρω πηγές πληροφοριών αλλά και για τις διορθώσεις των στοιχείων της εργασίας. Ακολούθως, ευχαριστώ θερμά όλο το εκπαιδευτικό προσωπικό της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας για τις γνώσεις που μου προσέφεραν. Τέλος, εκφράζω τις μεγάλες μου ευχαριστίες προς την οικογένειά μου, για όλη τους τη στήριξη και τη βοήθεια που μου παρείχαν.

Με εκτίμηση,

Ρίζου Ιωάννα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η φυλογενετική ανάλυση δεκατριών τοπικών ποικιλιών μηλιάς που απαντώνται στα ορεινά και ημιορεινά περιβάλλοντα της Ηπείρου. Ο εντοπισμός των δένδρων και η συλλογή του φυτικού υλικού έγινε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος EcoVariety. Ο φυλογενετικός χαρακτηρισμός των ποικιλιών βασίσθηκε στην ανάλυση της αλληλουχίας της ITS2 (internal transcribed spacer 2, εσωτερικό μεταγραφόμενο διάστημα 2) περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA). Οι ITS2 nrDNA αλληλουχίες ενισχύθηκαν με την τεχνική PCR και τη χρήση των καθολικών εκκινητών ITS2-S2F και ITS4.

Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι οι ποικιλίες B19,34, B19,137, B19,100, B19,72, B19,24, B19,21, B19,41, και B19,96 βρίσκονται πλησιέστερα σε ποικιλίες του *Malus sieversii* ενώ οι ποικιλίες B19,14, B19,80, B19,82, και B19,83 βρίσκονται πλησιέστερα σε ποικιλίες του *Malus micromalus*. Επίσης, η ανάλυση του γενετικού υλικού έδειξε υψηλό επίπεδο παραλλακτικότητας μεταξύ των ποικιλιών.

Λέξεις-κλειδιά: *Malus sp*, Μοριακοί δείκτες, Ταυτοποίηση ποικιλιών, Τοπικές ποικιλίες, ITS2 nrDNA

ABSTRACT

The subject of the present study is the phylogenetic analysis of thirteen local apple varieties found in the mountain and sub-mountain environment of Epirus. The localization of trees and the collection of plant material were carried out as a part of the EcoVariety research project. The phylogenetic characterization of apple varieties was based on the analysis of sequencing of ITS2 (internal transcribed spacer 2) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA). ITS2 nrDNA sequences were amplified by PCR technique and the use of the universal primers ITS2-S2F and ITS4.

The phylogenetic analysis showed that the varieties B19,34, B19,137, B19,100, B19,72, B19,24, B19,21, B19,41, and B19,96 are closest to *Malus sieversii*, while the varieties B19,14, B19,80, B19,82, and B19,83 are closest to *Malus micromalus*. Furthermore, the genetic analysis showed a high level of diversity among the varieties.

Keywords: *Malus sp*, Molecular markers, Identification of varieties, Local varieties, ITS2 nrDNA

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iv
ABSTRACT	v
ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	viii
ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ ΚΑΙ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	xi
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	xii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	xiii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΜΗΛΙΑΣ	1
1.1. Καταγωγή και γεωγραφική εξάπλωση της μηλιάς.....	1
1.2. Παραγωγή - Οικονομική σημασία	2
1.3 Διατροφική αξία των μήλων	4
1.4 Βοτανική Ταξινόμηση.....	6
1.5. Βοτανικά Χαρακτηριστικά.....	7
1.6 Καλλιεργούμενες ποικιλίες μηλιάς	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο:	15
ΦΥΤΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΡΟΙ ΚΑΙ ΤΟΠΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	15
2.1. Γενικά Στοιχεία - Ορισμοί.....	15
2.2.Τοπικές ποικιλίες μηλιάς στον Ελλαδικό χώρο – Σημασία διατήρησής τους	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο:	19
ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ	19
3.1 Μορφολογικοί δείκτες.....	19
3.2. Βιοχημικοί δείκτες	19
3.3. Μοριακοί δείκτες.....	20
ΜΕΡΟΣ Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο:	23
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
4.1 Φυτικό υλικό	23
4.2.Συλλογή και αποθήκευση φυτικού υλικού.....	25
4.3. Απομόνωση γενωμικού DNA	26
4.3.1. Αποστείρωση.....	26
4.3.2. Λυοφιλοποίηση φύλλων	27
4.3.3. Διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA.....	27
4.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	31
4.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	36
4.6. Καθαρισμός προϊόντων PCR	42
4.7. Σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών – Φυλογενετική ανάλυση.....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο	44
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
5.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικό υλικό τοπικών ποικιλιών μηλιάς	44
5.2. Ανάλυση αλληλουχιών της περιοχής ITS2 του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA)	45
5.3. Φυλογενετική ανάλυση των τοπικών ποικιλιών του γένους Malus με βάση τις αλληλουχίες της περιοχής ITS2 nrDNA	50
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	52
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	57
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	59

ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1:Ανθοί και φύλλα μηλιάς.	7
Εικόνα 1.2:Φύλλο μηλιάς.....	8
Εικόνα 1.3:Καρποί μηλιάς.	8
Εικόνα 1.4:Δένδρο μηλιάς.	8
Εικόνα 1.5:Ποικιλία Red delicious.	10
Εικόνα 1.6:Ποικιλία Golden delicious.	11
Εικόνα 1.7:Ποικιλία Fuji.....	12
Εικόνα 1.8: Ποικιλία Granny smith.	13
Εικόνα 1.9:Ποικιλία Scarlet.	13
Εικόνα 1.10:Ποικιλία Πίλαφά Delicious.	14
Εικόνα 1.11:Ποικιλία Φιρίκι.	14
Εικόνα 2.1:Οπωρώνας μηλοκαλλιέργειας.	16
Εικόνα 3.1:Διάγραμμα της βασικής δομής του <i>nrDNA</i>	22
Εικόνα 4.1: Περιοχή συλλογής γενετικού υλικού τοπικών ποικιλιών.	23
Εικόνα 4.2: Λυοφιλοποίηση των δειγμάτων φύλλων με το λυοφιλοποιητή Christ Alpha 1-2 LDplus.	27
Εικόνα 4.3:Αυτόκαυστο (αριστερά) και Υδατόλουτρο (δεξιά).	29
Εικόνα 4.4:Μικροφυγόκεντρος (αριστερά) και Vortex (δεξιά).	30
Εικόνα 4.5:Στην αριστερή εικόνα είναι το φυτικό υλικό στην αρχική του μορφή και στη δεξιά είναι το λυοφιλοποιημένο και λειοτριβημένο φυτικό υλικό.	30
Εικόνα 4.6:Διαδικασία απομόνωσης DNA. Μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες με αιώρημα λειοτριβημένου φυτικού ιστού σε διάλυμα λύσης.	30
Εικόνα 4.7: Ο χημικός τύπος του πολυσακχαρίτη αγαρόζη (Πηγή: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agarose_polymere.svg#/media/File:Agarose_polymere.svg).	31
Εικόνα 4.8: Συσκευή Οριζόντιας ηλεκτροφόρησης.	33
Εικόνα 4.9: Μονάδα τάσης Apelex Generator Electrophoresis PS1006 P.	33
Εικόνα 4.10:Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας Mas major science UV transilluminator (αριστερά) και δεξιά παρατήρηση πηκτώματος αγαρόζης σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.....	35
Εικόνα 4.11: <i>1Kb DNA Ladder plus</i>	36

Εικόνα 4.12:Θερμοπηγές <i>Yellowstone</i>	38
Εικόνα 4.13:Τρόπος υβριδισμού των εκκινητών στην αλληλουχία του DNA.της αλληλουχίας DNA	38
Εικόνα 4.14: Τα στάδια της αντίδρασης PCR (Πηγή: Enzoklop).....	40
Εικόνα 4.15:Τα τρία γονίδια και οι ενδιάμεσα μεταγραφόμενα διαστήματα του nrDNA ενός τυπικού αγγείόσπερμου. Σημειώνονται οι θέσεις υβριδισμού των καθολικών εκκινητών που χρησιμεύουν για την ενίσχυση με PCR της ITS-2 περιοχής.....	40
Εικόνα 4.16: Διαδικασία PCR.....	41
Εικόνα 4.17:Θερμοκυκλοποιητής BioRad MyCycler Thermal Cycler και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε.....	42
Εικόνα 5.1:Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v των δειγμάτων μηλιάς (γενωμικό DNA): B19,14 (διαδ. 2), B19,24 (διαδ. 3), B19,96 (διαδ. 4), B19,100 (διαδ. 5) και εκκινητές:ITS2-S2F και ITS4. Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder.....	44
Εικόνα 5.2: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v των δειγμάτων μηλιάς (γενωμικό DNA), στην εικόνα α) B19,40 (διαδ. 2), B19,19 (διαδ. 3), B19,41 (διαδ. 4), B19,137 (διαδ. 5), B19,83 (διαδ. 6), B19,82 (διαδ. 7). Στην εικόνα β) B19,34(διαδ. 2), B19,72(διαδ. 3), B19,21 (διαδ. 4), και εκκινητές:ITS2-S2F και ITS4. Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder.	45
Εικόνα 5.3: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA της μηλιάς: B19,14 (διαδ. 2), B19,40 (διαδ. 3), B19,24 (διαδ. 4), B19,96 (διαδ. 5), B19,100 (διαδ. 6), B19,19 (διαδ. 7), B19,41 (διαδ. 8) και εκκινητές:ITS2-S2F και ITS4. Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder.	46
Εικόνα 5.4:Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA της μηλιάς: B19,137 (διαδ. 2), B19,83 (διαδ. 3) B19,82 (διαδ. 4) και εκκινητές: ITS2-S2F και ITS4. Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder.....	46
Εικόνα 5.5: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA της μηλιάς: B19,34 (διαδ. 2), B19,72 (διαδ. 4), B19,21 (διαδ. 5) και εκκινητές: ITS2-S2F και ITS4. Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder.....	47
Εικόνα 5.6: Φυλογενετικές σχέσεις των τοπικών ποικιλιών του γένους <i>Malus</i> οι οποίες βασίζονται στις αλληλουχίες της περιοχής ITS2 nrDNA. Το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Neighbor –Joining (NJ). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις φορές (%) που ένας κλάδος εμφανίζεται σε 1000 bootstrap επαναλήψεις. Η ράβδος 0.02 αντιπροσωπεύει τη σχετική απόκλιση των αλληλουχιών.....	52
Εικόνα A.1: Ο κορμός και οι νεαροί βλαστοί του δέντρου B19,24 (Φίλης Βαγγέλης).....	57

Εικόνα Α.2: Ο κορμός και τα φύλλα με τους καρπούς του δέντρου Β19,96 (Φίλης Βαγγέλης)	
.....	57
Εικόνα Α.3: Νεαροί βλαστοί του δέντρου Β19,21 (Κύρκας Δημήτρης)	58
Εικόνα Α.4: Καρποί και φύλλα δέντρου Β19,100 (Φίλης Βαγγέλης)	58

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ ΚΑΙ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Πίνακας 1.1:Γεωγραφική κατανομή των εκτάσεων σε επίπεδο περιφέρειας (ΕΛΣΤΑΤ,2018).	1
Πίνακας 1.2:Παραγωγή μήλων σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδος (παραγωγή σε τόνους 2018),(ΕΛΣΤΑΤ,2018).....	2
Πίνακας 1.3:Χώρες της Ευρώπης που παράγουν σημαντικές ποσότητες μήλων (χιλ. τόνοι Βασιλακάκης,Μ.,2016).	3
Πίνακας 1.4:Οι δέκα πρώτες χώρες σε παραγωγή μήλων (σε παγκόσμιο επίπεδο) (χιλ. τόνοι. FAO).....	3
Πίνακας 1.5:Αποτελέσματα ερευνάς οπωροφόρων στην Ελλάδα έτος 2017 (ΕΛΣΤΑΤ).	4
Πίνακας 1.6:Η χημική σύσταση των νωπών μήλων ανά 100 γρ. (Θεριός και Δημάσση-Θεριού, 2013).....	5
Γράφημα 1.1:Οι κυριότερες ποικιλίες Μηλιάς που καλλιεργούνται στην Ελλάδα (ΕΛΣΤΑΤ, 2017).....	9
Πίνακας 3.1:Σύγκριση διαφόρων συχνά χρησιμοποιούμενων μοριακών δεικτών.	21
Πίνακας 4.1:Τοπικές παραδοσιακές ποικιλίες μηλιάς που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.	24
Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας των προϊόντων PCR.....	48

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism, Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων

ETS: External Transcribed Spacer

IGS: InterGenic Spacer

ITPGRFA: International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, Διεθνής συνθήκη για τους φυτογενετικούς πόρους για τα τρόφιμα και τη γεωργία

ITS: Internal Transcribed Spacer

NCBI: National Center of Biotechnology Information

NTS: Non Transcribed Spacer

PCR: Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA, Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά τμήματα DNA

RFLP: Restriction Fregment Length Polymorphism, Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA

SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms, Μονονουκλεοτιδικός Πολυμορφισμός

SSRs: Simple Sequence Repeats- Microsatellite, απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες - Μικροδορυφόροι

TAE: Tris base, Glacial Acetic acid, EDTA

ΕΛΣΤΑΤ: Ελληνική Στατιστική Αρχή

ΠΟΠ: Προστατευόμενη ονομασία προέλευσης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μηλιά είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα και ευρύτατα καλλιεργούμενα οπωροφόρα δέντρα στην Ελλάδα. Ο καρπός της έχει μεγάλη διατροφική αξία για τον άνθρωπο, πρόκειται για ένα φυσικό αντιοξειδωτικό πλούσιο σε φυτικές ίνες και μέταλλα.

Στον Ελλαδικό χώρο καλλιεργούνταν αρκετές τοπικές ποικιλίες μηλιάς που σταδιακά αντικαταστάθηκαν από τις νέες ομοιόμορφες βελτιωμένες ποικιλίες υψηλών αποδόσεων. Η διάσωση των τοπικών ποικιλιών είναι αναγκαία για την διατήρηση της βιοποικιλότητας μιας περιοχής αλλά και για τη ανάπτυξη της αειφόρου γεωργίας καθώς παρουσιάζουν υψηλή προσαρμοστικότητα στις τοπικές συνθήκες του περιβάλλοντος.

Η ταξινόμησή των τοπικών ποικιλιών με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζει δυσκολίες, λόγω της προσαρμογής τους στις περιβαλλοντικές και κλιματικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής. Επομένως, η επιστημονική κοινότητα ανακάλυψε άλλους τρόπους για την ταυτοποίηση, τον εντοπισμό και την ταξινόμηση των ποικιλιών. Σημαντικό ρόλο στην αξιολόγηση και αξιοποίηση του γενετικού υλικού της μηλιάς καταλαμβάνουν και οι μοριακές τεχνικές ανάλυσης του γονιδιώματος όπως είναι οι μοριακοί δείκτες. Οι μοριακοί δείκτες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην ταξινόμηση και ταυτοποίηση διαφόρων ποικιλιών φυτικών ειδών και μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι σε περιπτώσεις όπου μία πιθανά ίδια ποικιλία έχει διαφορετικά προσωνυμία από περιοχή σε περιοχή. Με αυτές τις τεχνικές εκτιμάται η γενετική απόσταση και οι φυλογενετικές σχέσεις των ποικιλιών καθώς και οι αλλαγές που μπορεί να υπέστησαν.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ταξινόμηση και η διερεύνηση των γενετικών σχέσεων τοπικών ποικιλιών μηλιάς (*Malus* sp.) με βάση την ανάλυση της αλληλουχίας της ITS2 (internal transcribed spacer 2, εσωτερικό μεταγραφόμενο διάστημα 2) περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA

ΜΕΡΟΣ Α: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΜΗΛΙΑΣ

1.1. Καταγωγή και γεωγραφική εξάπλωση της μηλιάς

Η μηλιά είναι από τα πιο δημοφιλή οπωροφόρα δέντρα και καλλιεργείται σε όλα σχεδόν τα μέρη της γης για τους θρεπτικούς και εύγευστους καρπούς της. Ήταν γνωστή στους Αρχαίους Έλληνες και Ρωμαίους και αναφέρεται από το Θεόφραστο κατά τον 3^ο π.Χ. αιώνα (Janick et al., 1996) Το κέντρο καταγωγής της μηλιάς βρίσκεται Ν.Δ. Ασία, Καύκασο (*Malus sieversii*) (Juniper et al., 1999). Η περιοχή αυτή, από την Νεολιθική περίοδο (5.000-8.000 χρόνια πριν) διασχίστηκε προς το δημοφιλή Δρόμο του Μεταξιού που εκτείνεται από την Ρώμη της Ιταλίας μέσω του Σαμαρκαντ στο Ουζμπεκιστάν και στο Λουογιάνγκ της Κίνας. Οι ταξιδιώτες με την βοήθεια των εξημερωμένων ζώων τους αρχίσαν να μεταφέρουν σπόρους μηλιάς προς τα Δυτικά, επομένως καλλιέργειες μηλιάς ξεκίνησαν από την περιοχή των ακτών της Κασπίας και της Μαύρης θάλασσας και έφτασαν στην Εγγύς Ανατολή πριν 4.000 π.Χ. Οι Ρωμαίοι διέδωσαν την καλλιέργεια της μηλιάς στην Ευρώπη και σε μεσογειακές περιοχές και αργότερα οι Ευρωπαίοι σε νέα εδάφη τα τελευταία 500 χρόνια (Juniper et al., 1999). Η μηλοκαλλιέργεια πλέον είναι διαδομένη στην Ευρώπη, τη Νέα Ζηλανδία, την Ιαπωνία, την Ασία, την Αυστραλία τον Καναδά, στις ΗΠΑ, τη Ν. Αφρική και στη Ν. Αμερική όπου αντιπροσωπεύει το 50% των φυλλοβόλων δένδρων παγκοσμίως.

Στην Ελλάδα, η μηλοκαλλιέργεια έχει διαδοθεί στις 10 ψυχρότερες περιοχές, αλλά σε μορφή συστηματικών οπωρώνων εντοπίζεται κυρίως στην κεντρική και δυτική Μακεδονία, στην Πελοπόννησο και στη Θεσσαλία (Πίνακας 1.1.).

Πίνακας 1.1: Γεωγραφική κατανομή των εκτάσεων σε επίπεδο περιφέρειας (ΕΛΣΤΑΤ, 2018).

Περιφέρεια	Στέμματα	Σύνολο εκτάσεις %
Κεντρική Μακεδονία	29.670	31,6
Θεσσαλία	28.798	30,7
Δυτική Μακεδονία	19.946	21,3

1.2. Παραγωγή - Οικονομική σημασία

Η μηλιά αποτελεί για την Ελλάδα ένα από τα σημαντικότερα είδη οπωροφόρων δέντρων. Καλλιεργείται σε μεγάλη έκταση σε περιοχές ημιορεινές, ορεινές αλλά και σε πεδινές. Η ετήσια παραγωγή ανέρχεται γύρω στους 275.000 τόνους (Πίνακας 1.2)

Πίνακας 1.2: Παραγωγή μήλων σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδος (παραγωγή σε τόνους 2018), (ΕΛΣΤΑΤ, 2018).

Γεωγραφικό διαμέρισμα	Ποσότητα
Σύνολο Ελλάδος	273.074
Στερεά Ελλάδα	5.753
Πελοπόννησος	9.195
Ανατολική Μακεδονία και Θράκη	4.940
Ήπειρος	683
Θεσσαλία	60.938
Κεντρική Μακεδονία	60.839
Δυτική Μακεδονία	124.145
Δυτική Ελλάδα	3.079
Κρήτη	2.811
Αττικής	14
Βορείου Αιγαίου	329
Νοτίου Αιγαίου	232
Ιόνιοι Νήσοι	116

Σημαντικές ποσότητες μήλων παράγονται σε πολλές περιοχές της Ελλάδος, είναι γνωστά όμως τα μήλα της Νάουσας, της Ζαγοράς του Πηλίου, της Λάρισας, της Καστοριάς, της Φλώρινας, της Τριπόλεως. Μεγάλες ποσότητες μήλων παράγουν πολλές ευρωπαϊκές καθώς και άλλες χώρες και ως εκ τούτου υπάρχει έντονο διεθνές εμπορικό ενδιαφέρον για το μήλο καθώς και ανταγωνισμός. Μήλα παράγουν πολλές χώρες στον κόσμο. Οι σημαντικότερες φαίνονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 1.3. και Πίνακας 1.4.).

Πίνακας 1.3: Χώρες της Ευρώπης που παράγουν σημαντικές ποσότητες μήλων (χιλ. τόνοι)
(Βασιλακάκης, 2016).

Χώρα	2012	2013
Γαλλία	1.169	1.576
Ελλάδα	2.42	2.26
Ιταλία	1.939	2.122
Πολωνία	2.900	3.170
Άλλες	3.845	3.805
Σύνολο	10.095	10.909

Πίνακας 1.4: Οι δέκα πρώτες χώρες σε παραγωγή μήλων (σε παγκόσμιο επίπεδο) (χιλ. τόνοι. FAO).

Χώρα	2011	2012
Κίνα	35.985	37.000
ΗΠΑ	4.275	4.110
Τουρκία	2.680	2.889
Πολωνία	2.493	2.857
Ινδία	2.891	2.203
Ιταλία	2.411	1.991
Ιράν	1.842	1.700
Χιλή	1.588	1.625
Ρωσία	1.200	1.403
Γαλλία	1.857	1.382
Κόσμος	65.800	53.454

Σύμφωνα με έρευνα της Ελληνικής Στατιστικής αρχής (ΕΛΣΤΑΤ) κατά την πενταετία 2012 – 2017 παρατηρήθηκε αύξηση των καλλιεργούμενων εκτάσεων με μηλιές κατά 7.7 %, ενώ παράλληλα μειώθηκε ο αριθμός των εκμεταλλεύσεων κατά 6,6 %. Τα γεγονός αυτό υποδηλώνει τη της σταδιακή συγκέντρωσης των γεωργικών εκτάσεων σε λιγότερους παραγωγούς. Επίσης αυξήθηκε σημαντικά ο συνολικό αριθμός των δένδρων μηλιάς ως αποτέλεσμα τόσο της αύξησης των καλλιεργούμενων εκτάσεων όσο και της αύξησης του αριθμού των δένδρων ανά στρέμμα (Πίνακας 1.5.)

Πίνακας 1.5: Αποτελέσματα ερευνάς οπωροφόρων στην Ελλάδα έτος 2017 (ΕΛΣΤΑΤ).

	2012	2017	Μεταβολή % 2017/2012
Αριθμός εκμεταλλεύσεων με μηλεώνες	12.697	11.863	-6.6
Εκτάσεις με μηλεώνες	87.036	93.774	7.7
Αριθμός δένδρων μηλιάς	8.354.574	11.932.272	42.7
Αριθμός δένδρων ανά στρέμμα	96.0	127.2	32.6

1.3 Διατροφική αξία των μήλων

Τα μήλα περιέχουν ένα εξαιρετικό συνδυασμό θρεπτικών συστατικών όπως φυτικές ίνες, βιταμίνες, μέταλλα και φλαβονοειδή που εξασφαλίζουν σημαντικά οφέλη για την υγεία (Πίνακας 1.6.).

- Βιταμίνες:** Τα μήλα περιέχουν μεγάλη ποσότητα βιταμίνης C, πρόκειται για ένα ισχυρό φυσικό αντιοξειδωτικό που μπορεί να βοηθήσει στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας του σώματος τόσο στους μολυσματικούς παράγοντες όσο και στις βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, περιέχουν Β-σύμπλοκες βιταμίνες (τη ριβοφλαβίνη, τη θειαμίνη και τη βιταμίνη Β6) οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διατήρηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και τη διατήρηση του νευρικού συστήματος ισχυρού και υγιούς. Τα μήλα περιέχουν και βιταμίνη Κ η οποία ενισχύει τα οστά και ενθαρρύνει τη φυσιολογική πήξη του αίματος. Η βιταμίνη Ε βρίσκεται σε μικρότερες ποσότητες στα μήλα σε σύγκριση με τις άλλες βιταμίνες. Ωστόσο, συμβάλλει στην υγεία του δέρματος και σε ισχυρότερο ανοσοποιητικό σύστημα.
- Διαιτητικές ίνες:** Οι φυτικές ίνες αποτελούν βασικό συστατικό των μήλων και είναι στην πραγματικότητα ένας τύπος υδατανθράκων. Γνωστές για τη συμβολή στην πρόληψη και την ανακούφιση της δυσκοιλιότητας. Ωστόσο, προσφέρει και άλλα σημαντικά οφέλη για την υγεία βοηθά να διατηρήσετε ένα υγιές βάρος, μειώνει τα

επίπεδα χοληστερόλης και μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο καρδιακών παθήσεων, διαβήτη και ορισμένων μορφών καρκίνου.

- **Φυτοθεραπευτικά συστατικά:** Τα μήλα περιλαμβάνουν επίσης πολλά φυτοθεραπευτικά συστατικά, αυτές οι πολυφαινολικές ενώσεις λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά που μπορούν να προστατεύσουν από βλάβες από ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, μπορούν να παρέχουν αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα και να ενισχύσουν το ανοσοποιητικό σας σύστημα.
- **Μέταλλα:** Περιέχει μέταλλα όπως ασβέστιο, κάλιο και φώσφορο όπου απαιτούνται από το σώμα για να εκτελούν διάφορες λειτουργίες, όπως ενίσχυση των οστών (ασβέστιο), δημιουργία μυών (κάλιο) και φιλτράρισμα απορριμμάτων (φωσφόρου) (Μακρή,2013,<https://www.eckerts.com/what-vitamins-are-in-apples-apple-nutrition-facts>).

Πίνακας 1.6: Η χημική σύσταση των νωπών μήλων ανά 100 γρ. (Θεριός και Δημάσση-Θεριού, 2013).

Γενική σύσταση		Ανόργανα θρεπτικά στοιχεία	
Νερό	85,3 g	Na	3 mg
Πρωτεΐνες	0,3 g	K	145 mg
Λίπη	0,4 g	Mg	6 mg
Υδατάνθρακες	11,8 g	Ca	7 mg
Οργανικά Οξέα	0,6 g	Mn	0,06 mg
Φυτικές ίνες	2,3 g	Fe	0,48 mg
		Zn	0,02 mg
Βιταμίνες		Υδατάνθρακες	
Βιταμίνη E	490 μg	Γλυκόζη	2210 mg
Βιταμίνη K	0-5 μg	Φрукτόζη	6040 mg
Βιταμίνη B1	35 μg	Σακχαρόζη	2470 mg
Βιταμίνη B2	30 μg	Άμυλο	600 mg
Νικοτιναμίδη	300 μg	Σορβιτόλη	510 mg
Παντοθενικό οξύ	100 μg		
Βιταμίνη B6	45 μg		
Βιοτίνη L	8 μg		
Φολικό οξύ	7 μg		
Βιταμίνη C	12 μg		

Λιπαρά οξέα	
Παλμιτικό οξύ (κορεσμένο)	50 mg
Στεαρικό οξύ (κορεσμένο)	10 mg
Ολεϊκό οξύ (μονοακόρεστο)	20 mg
Λινολενικό οξύ (πολυακόρεστο)	100 mg
Λινολεϊκό οξύ (πολυακόρεστο)	20 mg
Οργανικά Οξέα	
Μηλικό οξύ	550 mg
Κιτρικό οξύ	16 mg
Σαλικυλικό οξύ	310 mg
Αμινοξέα	
Αργινίνη	8 μg
Ιστιδίνη	6 μg
Λευκίνη	16 μg
Λυσίνη	15 μg
Μεθειονίνη	3 μg
Φαινυλαλανίνη	9 μg
Θρεονίνη	8 μg
Ενέργεια 229 KJ (54 Kcal)	

1.4 Βοτανική Ταξινόμηση

Η μηλιά ανήκει στην οικογένεια Rosaceae, στην υποοικογένεια Pomoideae και στο γένος *Malus*. Η καλλιεργούμενη μηλιά (*Malus domestica* Borkh), καθώς αναφέρεται, προήλθε από το *Mallus pumilla* Mill., αλλά στην εξέλιξη της, καθώς παραδέχονται σήμερα, συνέβαλαν το *Mallus sylvestris* Mill., καθώς και πολλά άλλα είδη. Άλλα είδη που ανήκουν στην ίδια οικογένεια είναι τα εξής:

- *Malus baccata* Bockh
Χρησιμοποιείται για δημιουργία υβριδίων ανθεκτικών στο ψύχος
- *Malus floribunda* Sieb
Χρησιμοποιείται για δημιουργία υβριδίων ανθεκτικών στις ασθένειες
- *Malus prunifolia* Borkh
- *Malus micromalus* Mak
- *Malus atrosanguinea* Schneid

Οι περισσότερες από τις καλλιεργούμενες ποικιλίες μηλιάς είναι διπλοειδείς (2n=34, n=17), λίγες είναι τριπλοειδείς (3n=51, n=17) και ελάχιστες τετραπλοειδείς

($4n=68$, $n=17$), αλλά και εξαπλοειδείς ποικιλίες έχουν δημιουργηθεί με την επίδραση κολχικίνης επί τριπλοειδών ποικιλιών (Βασιλακάκης,2016).

1.5. Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Η μηλιά είναι δέντρο φυλλοβόλο, που εμβολιασμένο σε σπορόφυτο γίνεται μεγαλόσωμο (6-7 μ.) και ζει πολλά χρόνια, ενώ εμβολιασμένο σε νάνα υποκείμενα γίνεται μικρόσωμο (3-4 μ.) και ζει λιγότερα χρόνια.

Το ριζικό σύστημα της μηλιάς είναι πασσαλώδες με αρκετές πλάγιες ρίζες και καταλαμβάνει έκταση διπλάσια από εκείνη που καταλαμβάνει η προβολή της κόμης του δέντρου. Έχει φλοιό χρώματος σκούρο γκριζο. Τα φύλλα είναι απλά, κατ' εναλλαγή, ωοειδή, βραχύμισχα, οδοντωτά, με την κάτω επιφάνεια χνουδωτή. Η καρποφορία γίνεται με αιχμές (ακροκαρπεί), λαμβούρδες, ασκούς και λεπτοκλάδια. Από κάθε μικτό οφθαλμό αναπτύσσονται περίπου πέντε άνθη σε ταξιανθία κόρυμβο. Το κεντρικό άνθος, που καλείται βασιλικό, ανοίγει πρώτο και ακολουθείται από τα δύο άνθη της βάσης και εν συνεχεία από τα δύο ενδιάμεσα άνθη. Κάθε άνθος αποτελείται από πέντε σέπαλα, πέντε πέταλα χρώματος λευκού ελαφρού ρόδινου, είκοσι στήμονες με κίτρινους ανθήρες και έναν ύπερο αποτελούμενο από την ωοθήκη και πέντε στύλους που συμφύονται σε κοινή βάση. Τα άνθη είναι εντομόφιλα, σε μερικές ποικιλίες όπου οι στήμονες είναι μακρύτεροι από τους στύλους, οι μέλισσες μπορούν να συλλέγουν γύρη χωρίς να γίνεται επικονίαση. Ο καρπός είναι ψευδής, με χρώμα κίτρινο-πράσινο-κόκκινο και όλα τα ενδιάμεσα, με γεύση γλυκιά, υπόξινη και όξινη (Βασιλακάκης, 2016).



Εικόνα 1.1: Άνθοι και φύλλα μηλιάς.



Εικόνα 1.2: Φύλλο μηλιάς.



Εικόνα 1.3: Καρποί μηλιάς.



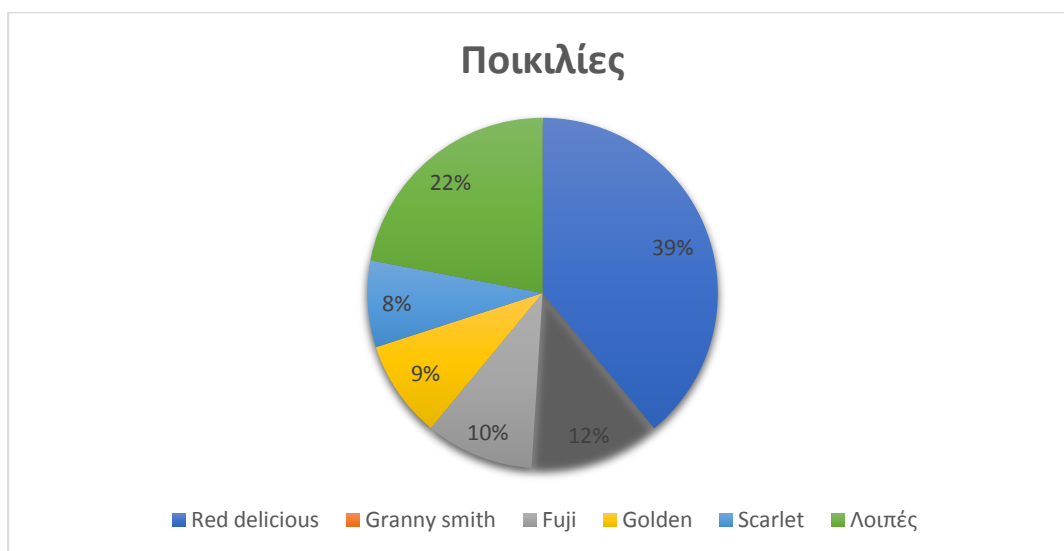
Εικόνα 1.4: Δένδρο μηλιάς.

1.6 Καλλιεργούμενες ποικιλίες μηλιάς

Οι ποικιλίες που καλλιεργούνται στην Ελλάδα και συμβάλλουν στην παραγωγή είναι οι:

- Κόκκινες: Red Delicious, Red Chief, Starkcrimson, Superchief, Jeromine, Scarlet Spur, Red Cup.
- Κίτρινες: Golden Delicious και οι παραλλαγές της (Smoothie, Reinders).
- Granny Smith (πράσινο ξινόμηλο).
- Το Φιρίκι, η Πιλαφά Delicious, η Jonagold, η Jonagored.
- Gala με παραλλαγές της (Royal Gala, Gala Brookfeld, Gala Mondial, Regal Gala, Scarlet Gala, Crimson Gala, Galaxy Gala, Gala Buckeye).
- Fuji και οι παραλλαγές της (Aki Fu No 1, Aki Fu No 2, Aki Fu No 7, Naga Fu Ni 1, Naga Fu No 2, Naga Fu No 6, Naga Fu No 12, Fuji Zhen Aztek, Fungi Fujiko).
- Forlady, Modi, Pink Lady (Βασιλακάκης,2016).

Παρακάτω περιγράφονται οι κυριότερες ποικιλίες μηλιάς που καλλιεργούνται στον Ελλαδικό χώρο (Γράφημα 1.1.) καθώς και οι ελληνικές ποικιλίες Φιρίκι και Πιλαφά Delicious.



Γράφημα 1.1: Οι κυριότερες ποικιλίες Μηλιάς που καλλιεργούνται στην Ελλάδα (ΕΛΣΤΑΤ, 2017).

Red Delicious

Ο τόπος καταγωγής της ποικιλίας είναι η Iowa των ΗΠΑ όπου εντοπίστηκε το 1872 στον οπωρώνα του Jesse Hiatt (Σωτηρόπουλος,2016). Το δένδρο είναι μέσης-ζωηρής ανάπτυξης, πλαγιόκλαδο και εισέρχεται αργά στην καρποφορία όταν είναι εμβολιασμένο σε ζωηρά υποκείμενα (Sotiropoulos, 2008). Η τάση τα τελευταία χρόνια είναι να χρησιμοποιούνται κλώνοι τύπου spur (Red Chief, Super Chief, Scarlet Spur, Jeromine, Red Cap κ.α.) με έντονο ερυθρό επίχωμα σε όλη την επιφάνεια του καρπού. Ο καρπός είναι μέσου – μεγάλου μεγέθους, κωνικός – επιμήκης με πέντε χαρακτηριστικές μαστοειδείς αποφύσεις στην περιοχή του κάλυκα έχει επίχωμα ερυθρό σε όλη την επιφάνεια. Η σάρκα του καρπού είναι λευκοκίτρινη, γλυκιά, αρωματική, αποδίδει ώριμους καρπούς τέλη Σεπτέμβρη-μέσα Οκτώβρη (Σωτηρόπουλος, 2016).



Εικόνα 1.5: Ποικιλία Red delicious.

Golden Delicious

Προέρχεται από τυχαίο σπορόφυτο (Βιρτζίνια, Η.Π.Α., 1916) και είναι γνωστό ως μπανόμηλο. Το δένδρο είναι ζωηρής ανάπτυξης, ημιορθόκλαδο, πολύ παραγωγικό και παρουσιάζει τάση για παρενιαυτοφορία (Sotiropoulos, 2006). Το αραίωμα των καρπών είναι απαραίτητο για τη βελτίωση του μεγέθους των καρπών και για την αποφυγή της παρενιαυτοφορίας (Sotiropoulos, 2006). Είναι πολύ ανθεκτική στο κρύο και ευδόκιμη σε πολλά είδη εδαφών. Ο καρπός είναι μεσαίου-μεγάλου μεγέθους σφαιρικός - κωνικός με κίτρινο χρώμα εύχυμος, τραγανός, με ελαφρώς υπόξινη γεύση. Η επιδερμίδα είναι πολύ λεπτή και ευπαθής σε μολωπισμούς κατά τη συγκομιδή και τη συσκευασία. Επίσης, αποκτά σκωριόχροη απόχρωση σε συνθήκες υψηλής υγρασίας. Οι καρποί συγκομίζονται το πρώτο

δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου και συντηρούνται καλά σε ψύξη για 10 -11 μήνες. Οι χρήσεις του είναι για νωπή κατανάλωση και μεταποίηση (Σωτηρόπουλος, 2016).



Εικόνα 1.6: Ποικιλία Golden delicious.

Fuji

Αυτή η ποικιλία δημιουργήθηκε μετά από την διασταύρωση των ποικιλιών Ralls Janet x Delicious στο Fujisaki, Aomori , Ιαπωνία , στα τέλη της δεκαετίας του 1930. Η Fuji είναι η κυριότερη ποικιλία στην Κίνα, στην Ιαπωνία, στη Βραζιλία, στην Αργεντινή, στην Αυστραλία καθώς και σε άλλες χώρες. Η ποικιλία Fuji σήμερα είναι προωθούμενη ιδιαίτερα σε πολλές Ασιατικές αλλά και σε Ευρωπαϊκές χώρες. Το δέντρο είναι μέτριας ανάπτυξης, πλαγιόκλαδο, πολύ παραγωγικό και δεν παρουσιάζει τάση προσυλλεκτικής καρπόπτωσης. Ο καρπός είναι μέσου-μεγάλου μεγέθους, σφαιρικός - πεπλατυσμένος με ευρεία κοιλότητα κάλυκα. Το κόκκινο επίχρωμα εμφανίζεται είτε διάχυτο σε όλη την επιφάνεια του φλοιού (Aztec, Fujiko), είτε σε μορφή ραβδώσεων (Kiku 8). Η σάρκα είναι γλυκιά, χυμώδης και τραγανή (Sotiropoulos κ.ά., 2013). Τα μήλα Fuji συγκομίζονται αρχές Οκτωβρίου και έχουν πολύ μεγάλη διάρκεια ζωής σε σύγκριση με άλλα μήλα, ακόμη και χωρίς ψύξη .Με ψύξη, μπορούν να παραμείνουν φρέσκα για ένα χρόνο (Σωτηρόπουλος, 2016).



Εικόνα 1.7:Ποικιλία Fuji.

Granny Smith

Προέρχεται από σπορόφυτο που εντοπίστηκε στην Αυστραλία το 1868 και θεωρείται ότι είναι ένα υβρίδιο του *Malus sylvestris* x *Malus pumila*. Το δένδρο είναι ζωηρό, ημι-ορθόκλαδο με τάση απογύμνωσης και συγκέντρωσης της καρποφορίας στην περιφέρεια του. Εισέρχεται στην καρποφορία νωρίς και είναι δένδρο παραγωγικό με ικανοποιητική καρπόδεση χωρίς να είναι απαραίτητο το αραίωμα. Επίσης δεν παρουσιάζει τάση προσυλλεκτικής καρπόπτωσης. Ο καρπός είναι μεσαίου-μεγάλου μεγέθους, σφαιρικός-κωνικός. Έχει επιδερμίδα πράσινη κηρώδης με χαρακτηριστικά λευκά φακίδια. Η σάρκα είναι λευκή, συνεκτική, χυμώδης, τραγανή και η γεύση είναι ξινή και όξινη και όσο προχωράει η ωρίμανση γίνεται πιο γλυκιά (Σωτηρόπουλος,2016). Όταν συγκομίζεται νωρίς παρουσιάζει ευπάθεια στο καφέτιασμα. Διαθέτη μεγάλη συντηρητικότητα έως 8 μήνες. Σε δένδρα με μικρή ανάπτυξη και όταν πριν από τη συγκομιδή επικρατήσουν χαμηλές θερμοκρασίες, οι καρποί εμφανίζουν ερυθρό επίχρωμα μη επιθυμητό για την ποικιλία. Επίσης, αυτό παρατηρείται και στις ορεινές περιοχές όπου δεν ενδείκνυται η καλλιέργειά της. Εμβολιασμένη στα υποκείμενα M9 και M26 και όταν επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες το θέρος, δίνει καρπούς οι οποίοι αποκτούν κίτρινο χρώμα που δεν είναι επιθυμητό (Σωτηρόπουλος, 2014).



Εικόνα 1.8: Ποικιλία Granny smith.

Scarlet

Εφευρέθηκε το 1980 από τον William G. Evans και τον Don R. Snipes στην πόλη Yakima της Ουάσιγκτον, προέρχεται από τυχαίο σπορόφυτο της Red Delicious. Το δέντρο είναι μεσαίου μεγέθους με αργή ανάπτυξη και πολύ παραγωγικό. Παράγει μεγάλο καρπό, σχήματος κωνικού με έντονο κόκκινο χρώμα. Η σάρκα του είναι λευκή, τραγανή και ζουμερή καλής ποιότητας με γλυκιά γεύση χωρίς οξύτητα. Ο καρπός ωριμάζει πρώιμα (1-10 Σεπτεμβρίου) και για αυτό αποτελεί την πιο δημοφιλή ποικιλία κόκκινου μήλου (Σωτηρόπουλος, 2014, <https://tse-smelis.gr/portfolio/poikilia-milia-scarlet-spur/>).



Εικόνα 1.9: Ποικιλία Scarlet.

Πιλαφά Delicious

Η ποικιλία Πιλαφά Delicious πήρε το όνομα της από τον δημιουργό της Ηλία Πιλαφά, παράγεται στην Αρκαδία και έχει κατοχυρωθεί ως προϊόν ονομασίας προέλευσης (Π.Ο.Π) το 1994. Ο καρπός είναι μεγάλος σφαιρικός-κωνικός με πέντε χαρακτηριστικές μαστοειδείς αποφύσεις στην περιοχή του κάλυκα, το χρώμα του είναι κιτρινοκόκκινο με θαμπή όψη και

καστανά στίγματα, η γεύση του καρπού είναι ιδιαίτερη, πλούσια υπόξινη, ωριμάζει αρχές Οκτώβρη (Σωτηρόπουλος,2016).



Εικόνα 1.10: Ποικιλία Πιλαφά Delicious.

Φιρίκι

Η ποικιλία φιρίκι προήλθε από την περιοχή του Ευξείνου Πόντου, καλλιεργείται στην περιοχή του Πηλίου από το 18ο αιώνα. Το Φιρίκι Πηλίου πρόσφατα κατοχυρώθηκε ως προϊόν ονομασίας προέλευσης (Π.Ο.Π) (Σωτηρόπουλος, 2014). Το δέντρο είναι ορθόκλαδο ζωηρό και μπαίνει αργά στην καρποφορία, είναι ένα μήλο μικρού έως μεσαίου μεγέθους με χρώμα πρασινοκίτρινο με επίχρυσμα έντονα κόκκινο στα σημεία που το βλέπει ο ήλιος το σχήμα του μήλου είναι κυλινδρικό επίμηκες, η σάρκα είναι τραγανή με υφή λεία ενώ η γεύση του είναι γλυκιά χυμώδη με έντονο άρωμα (<http://www.minagric.gr>).



Εικόνα 1.11: Ποικιλία Φιρίκι.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο:

ΦΥΤΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΡΟΙ ΚΑΙ ΤΟΠΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ

2.1. Γενικά Στοιχεία - Ορισμοί

Σύμφωνα με τη Διεθνή Συνθήκη για τους Φυτογενετικούς Πόρους, τη Διατροφή και την Γεωργία (ITPGRFA) (2001) ως **φυτογενετικοί πόροι** για τη διατροφή και τη γεωργία ορίζονται: «το γενετικό υλικό φυτικής προέλευσης που έχει πραγματική ή δυνητική αξία για την διατροφή και την γεωργία». Ο όρος φυτογενετικοί πόροι περιλαμβάνει κατηγορίες του γενετικού υλικού που δεν προστατεύονται από ειδικές νομοθεσίες, όπως ντόπιες ποικιλίες που εκτοπίζονται από τις μοντέρνες ποικιλίες και κινδυνεύουν με εξαφάνιση, παλιές ποικιλίες που δημιουργήθηκαν από βελτιωτές ,αγρία ή ημιάγρια είδη προγονικά των καλλιεργουμένων φυτών, αγρία φυτικά είδη χρησιμοποιούμενα άμεσα για την διατροφή ανθρώπων και ζώων, την βιομηχανική παραγωγή ή την διακόσμηση. Η διατήρηση και η βιώσιμη χρήση τους είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της παραγωγής φυτικών προϊόντων και την αντιμετώπιση των αυξανόμενων περιβαλλοντικών προκλήσεων και της αλλαγής του κλίματος. Η διάβρωση των πόρων αυτών αποτελεί σοβαρή απειλή για την επισιτιστική ασφάλεια στον κόσμο μακροπρόθεσμα.

Οι φυτογενετικοί πόροι συμβάλλουν στην βιοποικιλότητα αλλά και στην ασφάλεια των τροφίμων και καθορίζουν το μέλλον της γεωργικής παραγωγής αφού συμβάλλουν ενεργά στη σίτιση μεγάλων πληθυσμών παρά τις κλιματικές αλλαγές. Το αποτέλεσμα αυτών είναι πως δρουν καθοριστικά στην παγκόσμια παραγωγή λόγω της εξέλιξης της γενετικής επιστήμης και της βιοτεχνολογίας επιπλέον βοηθούν στην ανάπτυξη της υπαίθρου, υποστηρίζουν την γεωργία, το περιβάλλον, την βιοποικιλότητα και την αγροτική παράδοση (Χατζηχαρίση, 2015)

Οι **τοπικές ποικιλίες** είναι αβελτίωτος πληθυσμός και ορίζεται ως «ένα σύνολο πληθυσμών ή κλώνων ενός φυτικού είδους οι οποίοι είναι φυσικώς προσαρμοσμένοι στις περιβαλλοντικές συνθήκες της περιοχής τους» (Υπουργική Απόφαση 523/8481). Οι τοπικές ποικιλίες δημιουργήθηκαν από αγρία είδη τα οποία εξημέρωσε ο άνθρωπος και είναι προσαρμοσμένες στις περιβαλλοντικές συνθήκες της περιοχής καλλιέργειάς τους. Η σημασία των τοπικών ποικιλιών είναι ιδιαίτερα σημαντική λόγω των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους, οι καρποί έχουν ιδιαίτερη γεύση, άρωμα με μεγάλη θρεπτική αξία.

Επίσης είναι πολύ καλά προσαρμοσμένες στο εδαφοκλιματικό περιβάλλον των διάφορων περιοχών (Μαυρομάτης κ.α. 2013) και παρουσιάζουν αντοχή σε εχθρούς, ασθένειες που ενδημούν στη ζώνη καλλιέργειας τους. Σπορόφυτα ή άγρια είδη εμφανίζουν επιζητούμενα χαρακτηριστικά για την χρησιμοποίησή τους ως υποκείμενα των καλλιεργουμένων σύγχρονων ποικιλιών επιπλέον μπορούν να αποτελέσουν τράπεζες γονιδίων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα βελτίωσης ποικιλιών και υποκειμένων. (Χατζηχαρίσης, 2015)

Οι προσπάθειες διάσωσης γίνονται συνήθως από επίσημους Εθνικούς και Διεθνείς Φορείς, ιδιωτικούς φορείς, κρατικά ή ιδιωτικά Ιδρύματα, βιομηχανίες, επιχειρήσεις, ακόμα και ιδιώτες, με τη χρηματοδότηση ειδικών προγραμμάτων και εξερευνητικών αποστολών ή ατομικών πρωτοβουλιών. Σήμερα οι τοπικές ποικιλίες κινδυνεύουν να εξαφανιστούν, πολλές καλλιέργειες έχουν εγκαταλειφθεί με αποτέλεσμα την υποβάθμιση τους λόγω της προσβολής από έντομα και ασθένειες. Οι αλλαγές του περιβάλλοντος, η αλλαγή της χρήσης της γης, η μόλυνση της ατμοσφαιράς αλλά και άλλες ανθρώπινες δραστηριότητες συμβάλουν στην εξαφάνιση των τοπικών ποικιλιών. Η διάσωση τους δεν αποτελεί μόνο μια υποχρέωση της ανθρωπότητας για την διατήρηση της χλωρίδας της γης και της ζωντανής ιστορίας των φυτών, αλλά έχει και μεγάλη επιστημονική και οικονομική σημασία. Το συμπέρασμα είναι πως τον πλούτο που μας χάρισε η φύση πρέπει να τον διαφυλάξουμε γιατί αποτελεί ένα στοιχείο της παράδοσής μας αλλά και μια ανεκτίμητη παρακαταθήκη για την ανθρωπότητα (Χατζηχαρίσης, 2015).



Εικόνα 2.1: Οπωρώνας μηλοκαλλιέργειας.

2.2. Τοπικές ποικιλίες μηλιάς στον Ελλαδικό χώρο – Σημασία διατήρησής τους

Η μηλιά έχει μεγάλη οικονομική σημασία και είναι από τα πιο διαδεδομένα φυλλοβόλα οπωροφόρα. Στην Ελλάδα καλλιεργείται από τους αρχαίους ακόμα χρόνους. Αναφέρεται η καλλιέργειά της από το Θεόφραστο κατά τον 3^ο π. Χ. αιώνα. Εμφανίζει πολύ καλή προσαρμοστικότητα στις διάφορες εδαφοκλιματικές συνθήκες εξαιτίας της υψηλής γενετικής παραλλακτικότητας της, που επέτρεψε την επιλογή τύπων προσαρμοσμένων σε διάφορα περιβάλλοντα. Επομένως, κατά περιοχή καλλιεργούνταν τοπικές ποικιλίες προσαρμοσμένες στα τοπικά περιβάλλοντα. Επίσης, εισάχθηκαν στη χώρα μας ποικιλίες από διάφορες άλλες χώρες με παρόμοιες κλιματικές συνθήκες. Οι ποικιλίες αυτές διασταυρώθηκαν τυχαία μεταξύ τους, με τοπικές ποικιλίες καθώς και με αυτοφυή άγρια είδη με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων τοπικών ποικιλιών. Συμπερασματικά στη χώρα μας καλλιεργήθηκαν, κατά καιρούς, πάρα πολλές τοπικές ποικιλίες μηλιάς που εμφάνιζαν μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς την περίοδο ωρίμανσης του καρπού, το σχήμα και το μέγεθος του καρπού, το χρώμα της επιδερμίδας και της σάρκας καθώς και σε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως το άρωμα και η περιεκτικότητα της σάρκας σε οξέα και σάκχαρα.

Τα τελευταία χρόνια, οι απαιτήσεις για αυξημένη παραγωγή και υψηλή ποιότητα καρπών οδήγησαν στην σταδιακή εγκατάλειψη από τους παραγωγούς των καλλιεργούμενων παραδοσιακών ποικιλιών και αντικατάστασή τους από ομοιόμορφες βελτιωμένες ποικιλίες υψηλών αποδόσεων. Αποτέλεσμα αυτής της εγκατάλειψης είναι η εξαφάνιση των περισσότερων τοπικών ποικιλιών μηλιάς και όσες διασώθηκαν, χάρη στο μεράκι κάποιων παλιών παραγωγών, βρίσκονται σε απομονωμένες περιοχές, νησιά ή σε κτήματα και αυλές σπιτιών. Οι μονές τοπικές ποικιλίες που συνεχίζουν να καλλιεργούνται συστηματικά είναι η Πιλαφά Delicious, που καλλιεργείται στην περιοχή της Αρκαδίας και οι διάφοροι τύποι της ποικιλίας Φιρίκι, που καλλιεργείται κυρίως στην περιοχή του Βόλου. Μετά από αυτά διαπιστώνεται ότι είναι επιτακτική η ανάγκη να επισημανθούν οι διασωζόμενες τοπικές ποικιλίες, στις διάφορες περιοχές που βρίσκονται, να καταγραφούν και να ληφθεί μέριμνα διάσωσης αυτών, πριν εξαφανιστούν και όσες έχουν απομείνει (Χατζηχαρίσης,2015).

Τα οφέλη από τη διάσωση αλλά και την επανένταξη κάποιων απ' αυτές στην καλλιέργεια είναι πολλαπλά. Η καλλιέργεια των τοπικών ποικιλιών μπορεί να συμβάλει:

- στην ενίσχυση της τοπικής οικονομίας ιδιαίτερα των μειονεκτικών αγροτικών περιοχών

- στη παραγωγή προϊόντων με ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά συμβάλλοντας στη διαφοροποίηση των γεωργικών προϊόντων που αποτελεί κρίσιμη παράμετρο λόγω της τάσης ομογενοποίησης των καλλιεργούμενων ποικιλιών.
- στην παραγωγή τοπικών εδεσμάτων που θα συμβάλει στην τόνωση του αγροτουρισμού της περιοχής.
- στη γεωργία χαμηλών εισροών και στη βιολογική γεωργία λόγω της προσαρμοστικότητάς τους στις τοπικές εδαφοκλιματικές συνθήκες

Ακόμα, μπορούν να αποτελέσουν μια αναντικατάστατη πηγή γενετικού υλικού για τη βελτίωση καλλιεργούμενων ποικιλιών (Θανόπουλος Ρ., κ.α., 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο:

ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ

Για την ταξινόμηση και τον καθορισμό των φυλογενετικών σχέσεων φυτικών οργανισμών κάνουμε χρήση διαφορετικών ειδών δεικτών όπως οι μορφολογικοί, οι βιοχημικοί και οι μοριακοί δείκτες. Ιδιαίτερα για την ταυτοποίηση των παραδοσιακών ποικιλιών, οι μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρύτατα και ειδικότερα στις περιπτώσεις όπου μία ποικιλία έχει διαφορετική ονομασία σε διάφορες περιοχές. Με την χρήση μοριακών τεχνικών μπορεί να εκτιμηθεί εάν και κατά πόσο η διαφορετικότητά τους σε μορφολογικά χαρακτηριστικά εξαρτάται από το περιβάλλον ή πράγματι αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ποικιλίες. Επίσης με την χρήση αυτών των τεχνικών επιτυγχάνεται προσδιορισμός του βαθμού συγγένειας των εξεταζομένων γενοτύπων τόσο σε κοντινές περιοχές όσο και σε απομακρυσμένες (Χαντζόπουλος, 2001).

3.1 Μορφολογικοί δείκτες

Οι μορφολογικοί δείκτες αποτελούν τους πρώτους δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν. Η επιλογή γίνεται με βάση τα εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού τα οποία είναι μετρήσιμα και ορατά. Τέτοια είναι η δομή των σπόρων, το χρώμα των ανθέων, το σχήμα και ο χρωματισμός του καρπού και των φύλλων, η ύπαρξη τριχών κ.α. Οι μορφολογικοί δείκτες έχουν εφαρμοστεί στην πλειονότητα των φυτών και δεν απαιτούν ειδικό εξοπλισμό, αναλώσιμα ή εξειδικευμένο προσωπικό. Το κύριο μειονέκτημα των μορφολογικών δεικτών είναι ότι οι διάφοροι παράγοντες του περιβάλλοντος, στο οποίο αναπτύσσεται ένα φυτό, είναι δυνατό να επηρεάζουν την έκφρασή τους και να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα. Επίσης, η εκτέλεση βελτιωτικών προγραμμάτων με αυτούς τους δείκτες είναι χρονοβόρα, απαιτεί χειρωνακτική εργασία και μεγάλο πληθυσμό των φυτών (Stuber et.al, 1999)

3.2. Βιοχημικοί δείκτες

Οι κυριότεροι βιοχημικοί δείκτες είναι τα ισοένζυμα. Τα ισοένζυμα είναι ένζυμα που καταλύουν την ίδια χημική αντίδραση αλλά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον μοριακό τους τύπο και την ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Για να διαχωρίσουμε τα ένζυμα

χρησιμοποιούμε την ηλεκτροφόρηση όπου διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το μοριακό τους βάρος ή το ηλεκτρικό τους φορτίο. Επομένως, άτομα ενός πληθυσμού που φέρουν διαφορετικά αλληλόμορφα που κωδικοποιούν ένα ενζυμικό σύστημα, θα παράγουν πολυπεπίδια με διαφορές στη σύστασή τους σε αμινοξέα και οι διαφορές αυτές θα είναι ανιχνεύσιμες στο ηλεκτροφορητικό πρότυπο σαν διαφορετικές ζώνες που μεταναστεύει κάθε ισοένζυμο. Επομένως, τα ισοένζυμα είναι μια καλή πηγή άντλησης γενετικών χαρακτηριστικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την περιγραφή μιας ποικιλίας, για την ανίχνευση των γενετικών διαφορών σε φυτά της ίδιας ποικιλίας καθώς και για την ανίχνευση της συγγενείας μεταξύ των φυτών. Το κυριότερο μειονέκτημα των ισοενζύμων είναι ο σχετικά μικρός αριθμός τους και το χαμηλό επίπεδο πολυμορφισμού τους. (Φανουράκης, 2010, Γανόπουλος, 2013).

3.3. Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες είναι περιοχές του γονιδιώματος, χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο, που παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των προς μελέτη ατόμων, η ανάδειξη των οποίων χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κληρονομικότητας χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών. Το κύριο πλεονέκτημα των μοριακών δεικτών σε σχέση με τους μορφολογικούς και βιοχημικούς δείκτες είναι ότι ανιχνεύουν διαφορές στις αλληλουχίες του DNA και όχι στα προϊόντα που αυτές εκφράζουν. Επομένως, δεν επηρεάζονται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος και δεν εξαρτώνται από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Επιπλέον, εμφανίζουν υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού και μπορούν να καλύψουν ολόκληρο το γονιδίωμα σε προβλεπόμενες γενετικές αποστάσεις (Χατζόπουλος, 2001, Φανουράκης 2010).

Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι δείκτες RFLP (Restriction Fregment Length Polymorphism, Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA) που βασίζονται σε δύο τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη μοριακή βιολογία: την πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα και τον υβριδισμό. Μετά την εισαγωγή της τεχνικής PCR (Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) ως πολύτιμο εργαλείο στην έρευνα, αναπτύχθηκαν νέοι μέθοδοι μοριακών δεικτών που βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA. Η ανίχνευση δεικτών RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά τμήματα DNA) ήταν η πρώτη εφαρμογή που αξιοποίησε την PCR για την ανίχνευση της γενετικής παραλλακτικότητας σε επίπεδο DNA. Στη συνέχεια εμφανίσθηκαν οι μοριακοί

δείκτες δεύτερης γενιάς που συμπεριλαμβάνουν τους SSRs (Simple Sequence Repeats-Microsatellite, απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες -Μικροδορυφόροι), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων) και μια ποικιλία τροποποιημένων τύπων αυτών. Ακολούθησαν οι μοριακοί δείκτες τρίτης γενιάς όπως είναι οι SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms, Μονονουκλεοτιδικός Πολυμορφισμός). Οι διάφοροι μοριακοί δείκτες διαφέρουν μεταξύ τους σε σημαντικά σημεία όπως στην αφθονία στο γονιδίωμα, στο επίπεδο πολυμορφισμού που ανιχνεύεται στην εξειδίκευση ως προς την επαναληψιμότητα, τα τεχνικά μέσα και το κόστος. Οι διάφοροι μοριακοί δείκτες διαφέρουν μεταξύ τους σε σημαντικά σημεία όπως στην αφθονία στο γονιδίωμα, στο επίπεδο πολυμορφισμού που ανιχνεύεται στην εξειδίκευση ως προς την επαναληψιμότητα, τα τεχνικά μέσα και το κόστος (Τσαυτάρης κ.α., 2012, Agarwal et.al, 2008).

Πίνακας 3.1: Σύγκριση διαφόρων συχνά χρησιμοποιούμενων μοριακών δεικτών.

Δείκτες	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SNP
Βασίζεται σε	υβριδισμό	PCR	PCR	PCR	PCR/αλληλούχιση
Βαθμός παραλλακτικότητας	υψηλός	υψηλός	υψηλός	πολύ υψηλός	πολύ υψηλός
Κληρονόμηση	συγκυρίαρχη	κυρίαρχη	Κυρίαρχη/συγκυρίαρχη	συγκυρίαρχη	συγκυρίαρχη
Κόστος	υψηλό	χαμηλό	υψηλό	υψηλό	υψηλό
Επαναληψιμότητα	υψηλή	χαμηλή	υψηλή	υψηλή	υψηλή
Ανάλυση δεδομένων	εύκολη	εύκολη	δύσκολη	πολύ εύκολη	πολύ εύκολη

3.4 Η περιοχή ITS2 του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA) ως φυλογενετικός μοριακός δείκτης

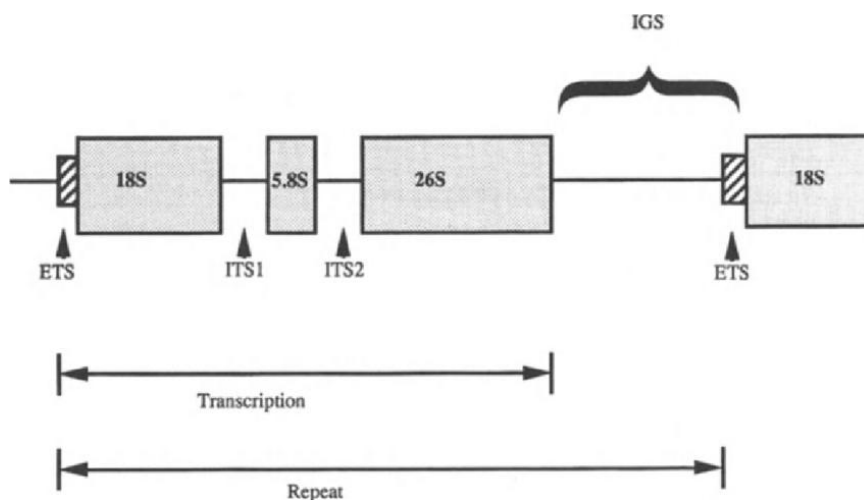
Στις φυλογενετικές αναλύσεις των φυτικών οργανισμών χρησιμοποιούνται επίσης οι γενετικοί τόποι που κωδικοποιούν τη σύνθεση του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA). Οι γενετικοί αυτοί τόποι οργανώνονται σε ξεχωριστές μονάδες που επαναλαμβάνονται πολλές φορές στο γονιδίωμα των περισσότερων ανώτερων φυτών, γεγονός που διευκολύνει την ευαισθησία της μεθόδου. Κάθε τέτοια μονάδα περιλαμβάνει τα γονίδια για τα 18S, 5,8S και 25-28S ριβοσωμικά RNA. Δύο εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα (ITS: Internal

Transcribed Spacer), ITS1 και ITS2, διαχωρίζουν το 18S από το 5.8S rRNA γονίδιο και το 5.8S από το 28S rRNA γονίδιο, αντίστοιχα. Ανοδικά του 18S υπάρχει ένα εξωτερικό μεταγραφόμενο διάστημα, το ETS (External Transcribed Spacer). Παρακείμενα αντίγραφα της rDNA συστοιχίας διαχωρίζονται από ένα μη μεταγραφόμενο διάστημα (NTS: Non Transcribed Spacer), που αποκαλείται και διαγονιδιακό διάστημα (IGS: InterGenic Spacer) (Εικόνα 3.1) (Soltis D.E. and Soltis P. S., 1998)

Οι περιοχές ITS-1 και ITS-2 παρουσιάζουν γρηγορότερο ρυθμό εξελικτικών μεταβολών σε σχέση με τις κωδικοποιούσες περιοχές που τις περιβάλλουν γεγονός που τις καθιστά κατάλληλες για την ταξινόμηση και τη φυλογενετική ανάλυση συγγενών ειδών (Baldwin et.al, 1995, Alvarez and Wendel, 2003).

Η ITS-2 περιοχή του nrDNA χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ταυτοποίηση συγγενικών φυτικών ειδών εξαιτίας των παρακάτω ιδιοτήτων της:

- Ύπαρξη υψηλού πολυμορφισμού
- Ύπαρξη συντηρημένων περιοχών που χρησιμεύουν στο σχεδιασμό καθολικών εκκινητών που οριοθετούν την ITS-2 περιοχή και επιτρέπουν την ενίσχυσή της με PCR
- Το μικρό μέγεθος της ITS-2 περιοχής και ο υψηλός αριθμός αντιγράφων του nrDNA (Yao et.al., 2010, Chen et.al., 2010, Khan et. al, 2019) .



Εικόνα 3.1: Διάγραμμα της βασικής δομής του nrDNA.

ΜΕΡΟΣ Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Φυτικό υλικό

Αναλυθήκαν 13 επιλεγμένοι γενότυποι (Πίνακας 4.1) τοπικών παραδοσιακών ποικιλιών μηλιάς (*Malus sp.*) προερχόμενοι από την ορεινή περιοχή της Ηπείρου. Συγκεκριμένα οι ποικιλίες αυτές αναφέρονται σε δένδρα ηλικίας πάνω από 50 ετών που εντοπίστηκαν στις περιοχές έρευνας Αθαμάνια Όρη, Θεσπρωτικά Όρη (Μικρή Λάκκα Σουλίου) και Εθνικό Πάρκο Βόρειας Πίνδου (Εικόνα 4.1.) στα πλαίσια του ερευνητικού Προγράμματος EcoVariety: "Ανάδειξη τοπικών παραδοσιακών ποικιλιών και αυτοφυών οπωροφόρων δέντρων και θάμνων". Ο εντοπισμός των ποικιλιών και η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν από τα μέσα της άνοιξης μέχρι και τις αρχές του καλοκαιριού του 2019.

Επιπλέον πληροφορίες για τις ποικιλίες που μελετήθηκαν μπορούν να αντληθούν από την εφαρμογή καταγραφής Eco-Variety <https://ecovariety.azurewebsites.net/>.



Εικόνα 4.1: Περιοχή συλλογής γενετικού υλικού τοπικών ποικιλιών.

Πίνακας 4.1: Τοπικές παραδοσιακές ποικιλίες μηλιάς που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

A/A	Κωδικός	Όνομα Ποικιλίας	Συλλέκτης	Τοποθεσία Συλλογής
1	B19,14	Μηλιά Βίτσας	Φίλης Βαγγέλης	Ν. Ιωαννίνων, Δήμος Ζαγορίου, Κοινότητα Βίτσας
2	B19,24	Μηλιά 2	Φίλης Βαγγέλης	Ν. Τρικάλων, Δήμος Καλαμπάκας, Κοινότητα Παναγιάς Κουτσουφλιανής
3	B19,96	Μηλιά "Σωτήρος"	Φίλης Βαγγέλης	Ν. Ιωαννίνων, Δήμος Κόνιτσας, Κοινότητα Δίστρατο
4	B19,100	Μηλιά Μπαμπομηλιά	Φίλης Βαγγέλης	Ν. Ιωαννίνων, Δήμος Κόνιτσας Κοινότητα Δίστρατο
5	B19,19	Θυμαϊίκη	Μάτζος Νίκος	Ν. Ιωαννίνων, Δήμος Βόρειων Τζουμέρκων Κοινότητα Ραφταναίων
6	B19,34	Μηλιά, Φράξος	Μηλιά, Φράξος	Ν. Ιωαννίνων, Δήμος Βόρειων Τζουμέρκων Κοινότητα Ραφταναίων
7	B19,72	Κοκκινόμηλα Κρασιάς	Δήμου Δημήτρα	Ν. Αρταίων, Δήμος Γεώργιου Καραϊσκάκη Κοινότητα Ρετσιανών
8	B19,21	Μηλιά καλή	Κύρκας Δημήτρης	Ν. Τρικάλων, Δήμος Καλαμπάκας Κοινότητα Παναγιά Κουτσουφλιανή
9	B19,40	Μπανανομηλιά	Κύρκας Δημήτρης	Ν. Τρίκαλων, Δήμος Καλαμπάκα Κοινότητα Παναγιάς Κουτσουφλιανής
10	B19,41	Μηλιά ποτίστρα	Κύρκας Δημήτρης	Ν. Τρίκαλων, Δήμος Καλαμπάκας Κοινότητα Παναγιάς Κουτσουφλιανής
11	B19,137	Μηλιά αρωματική	Κύρκας Δημήτρης	Ν. Ιωάννινων, Δήμος Δωδώνης Κοινότητα Αρτοπούλα Λάκκο
12	B19,83	Μήλα Ρετσιανών	Δήμου Δημήτρα	Ν. Αρταίων, Δήμος Γεώργιου Καραϊσκάκη Κοινότητα Κέντρο Ρετσιανών
13	B19,82	Μήλα Ρετσιανών	Δήμου Δημήτρα	Ν. Αρταίων, Δήμος Γεώργιου Καραϊσκάκη Κοινότητα Κέντρο Ρετσιανών

Ενδεικτικές φωτογραφίες από τις τοπικές ποικιλίες μηλιάς που αναφέρονται στον Πίνακα 4.1. παραθέτονται στο παράρτημα Α

4.2.Συλλογή και αποθήκευση φυτικού υλικού.

Υλικά

1. Χάρτινες και πλαστικές σακούλες (τύπου zip – lock)
2. Φορητό εκδρομικό ψυγείο με παγοκύστες
3. Ανεξίτηλος μαρκαδόρος για τη σήμανση κάθε δείγματος.
4. Γάντια μιας χρήσης
5. Διηθητικό χαρτί
6. Σωληνάρια τύπου Falcon
7. Αυτόκαυστο (Εικόνα 4.3)

Αντιδραστήρια

1. Απιονισμένο H₂O
2. Αραιό διάλυμα κοινού απορρυπαντικού

Διαδικασία συλλογής

Από κάθε δένδρο συλλέχθηκαν 20 – 30 νεαρά φύλλα (όπου αυτό ήταν δυνατό) από τρία τυχαία σημεία της κόμης και τοποθετήθηκαν σε χάρτινη σακούλα όπου σημειώθηκε ο κωδικός του δείγματος. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες, συγκεντρώθηκαν σε φορητό ψυγείο με παγοκύστες και μεταφέρθηκαν το συντομότερο δυνατό στο εργαστήριο. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε ώστε τα φύλλα να προέρχονται από υγιή βλάστηση χωρίς εμφανή συμπτώματα προσβολών.

Προεργασία και Αποθήκευση του υλικού

Τα φύλλα στο εργαστήριο πλύθηκαν με αραιό διάλυμα κοινού απορρυπαντικού. Η πλύση με απορρυπαντικό κρίθηκε απαραίτητη για την αποφυγή μόλυνσης του φυτικού DNA με DNA από μύκητες και βακτήρια. Ακολούθησε ξέπλυμα αρχικά με τρεχούμενο νερό βρύσης και στη συνέχεια με απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Τα φύλλα αφού στέγνωσαν σε διηθητικό χαρτί τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Falcon και αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

4.3. Απομόνωση γενωμικού DNA

Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από ιστό λυοφιλοποιημένων φύλλων με τη χρήση του πακέτου υλικών (Kit) NucleoSpin Plant II της Macherey-Nagel.

Όργανα – Υλικά

1. Λυοφιλοποιητής Christ Alpha 1-2 LDplus (Εικόνα 4.2)
2. Αυτόκαυστο (Εικόνα 4.3)
3. Μεταλλικά σφαιρίδια
4. Υδατόλουτρο (Εικόνα 4.3)
5. Vortex (Εικόνα 4.4)
6. Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας τριών (3) δεκαδικών ψηφίων
7. Μικροφυγόκεντρος (Εικόνα 4.4)
8. Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου Falcon, 50 ml
9. Μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες (Eppendorfs) 1,5mL
10. Ρύγχι (tips) κίτρινα (5-200 μl) για πιπέτα τύπου Gilson
11. Ρύγχι (tips) μπλε (100-1000 μl) για πιπέτα τύπου Gilson

Αντιδραστήρια

Buffer PL2: διάλυμα λύσης που περιέχει SDS

Υδατικό Διάλυμα RNase A: 0,01 mg/ml

Buffer PL3: διάλυμα οξικού καλίου

Buffer PC: διάλυμα προσαρμογής συνθηκών για την πρόσδεση του DNA στη στήλη πυριτίου (silica membrane)

Buffer PW1, PW2, PW3: διαλύματα πλύσης της στήλης πυριτίου

Buffer PE: διάλυμα έκλουσης DNA από την στήλη, 5mM Tris-HCl pH 8.5

4.3.1. Αποστείρωση

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση DNA καθώς και για τα υπόλοιπα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν στην παρούσα εργασία πριν τη χρήση τους αποστειρώθηκαν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο) στους 121 °C, πίεση 1,2 atm για 20 min.

4.3.2. Λυοφιλοποίηση φύλλων

Η **λυοφιλοποίηση** (Freeze drying) είναι μία ήπια μέθοδος ξήρανσης των φυτικών ιστών με ψύξη υπό κενό. Η μέθοδος βασίζεται στο φυσικό φαινόμενο της εξάχνωσης (άμεση μετάβαση από τη στερεά κατάσταση στην κατάσταση ατμών χωρίς να περάσει από την υγρή κατάσταση).

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν κατευθείαν από τους -20°C στις ειδικές θέσεις του λυοφιλοποιητή Christ Alpha 1-2 LDplus. Η διαδικασία διήρκησε περίπου 24 ώρες.



Εικόνα 4.2: Λυοφιλοποίηση των δειγμάτων φύλλων με το λυοφιλοποιητή Christ Alpha 1-2 LDplus.

4.3.3. Διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA

Αρχή της μεθόδου

Το DNA περιέχεται μέσα στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων. Για να μπορέσει να εξαχθεί το DNA από το κύτταρο πρέπει να διασπασθούν η κυτταρική και πυρηνική μεμβράνη που αποτελούνται από φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση ενός τασιενεργού (απορρυπαντικού) όπως το SDS. Η διαδικασία γίνεται στους 65°C καθώς σε αυτή τη θερμοκρασία γίνεται πιο εύκολη η διάσπαση των μεμβρανών, αλλά επίσης απενεργοποιούνται διάφορα ένζυμα όπως η DNase που θα μπορούσε να κόψει το DNA σε μικρότερα τμήματα. Για την απομόνωση καθαρού DNA χρησιμοποιείται στήλη εφοδιασμένη

με το κατάλληλο υλικό (silica membrane) για την ειδική δέσμευση του γενωμικού DNA. Το DNA εκλούεται από τη στήλη με τη χρήση διαλύματος 5 mM Tris-HCl pH 8,5.

Πειραματικό μέρος

- **Λειοτριβήση φυτικού ιστού:** Μικρή ποσότητα από το δείγμα λυοφιλοποιημένων φύλλων (~100 mg) τοποθετείται σε σωληνάριο τύπου Falcon 50 ml μαζί με δύο μεταλλικά σφαιρίδια και αναδεύεται έντονα με την χρήση Vortex, σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι ο φυτικός ιστός να γίνει λεπτή σκόνη.

Λύση των κυττάρων με το Buffer PL2: Ζυγίζονται 20 mg λειοτριβημένου φυτικού ιστού και μεταφέρονται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα όπου προστίθενται 600 μl από το διάλυμα λύσης PL2. Ακολουθεί ανάδευση με vortex για να γίνει ομοιογενές το δείγμα και προστίθενται 20 μl διαλύματος RNase A. Στην συνέχεια ο μικροφυγοκεντρικός σωλήνας τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 65°C για μία ώρα με παράλληλη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Μετά το τέλος της επώασης ο μικροφυγοκεντρικός σωλήνας μεταφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 150 μl από το Buffer PL3 και ακολουθεί ανάδευση και τοποθέτησή του στον πάγο για 5 min.

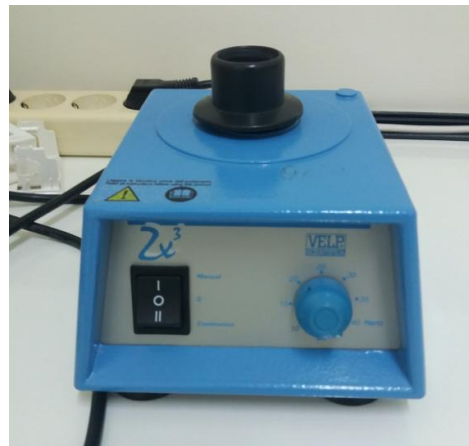
Το Kit (NucleoSpin Plan II) περιλαμβάνει δύο διαφορετικά διαλύματα λύσης των κυττάρων (PL1 και PL2) και επιλέχθηκε το PL2 μετά από παράλληλα εφαρμογή των δύο πρωτοκόλλων καθώς έδινε το βέλτιστο αποτέλεσμα.

- **Καθαρισμός του ακατέργαστου προϊόντος λύσης:** Το δείγμα στη συνέχεια φυγοκεντρήται στις 10.000 rpm για 5 min και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε στήλη διήθησης η οποία τοποθετείται μέσα σε σωλήνα συλλογής των 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10.000 rpm για 2 min και μεταφορά του καθαρού διαλύματος σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα.
- **Προσαρμογή των συνθηκών πρόσδεσης του DNA στη silica membrane:** Στο καθαρό διάλυμα λύσης προστίθενται 900 μl Buffer PC και ακολουθεί ανάμιξη.
- **Πρόσδεση του DNA στη silica membrane:** Στην συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται στη στήλη πρόσδεσης του DNA η οποία τοποθετείται μέσα σε σωλήνα συλλογής των 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10.000 rpm για 1 min ώστε το DNA να προσδεθεί στο ειδικό υλικό πρόσδεσης (silica membrane).

- **Πλύσιμο και ξήρανση της silica membrane:** Στη στήλη προστίθενται 400 μl Buffer PW1 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 10.000 x g. Μετά την απόρριψη της ροής προστίθενται 700 μl από το δεύτερο διάλυμα πλύσης Buffer PW2 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 10.000 rpm. Τέλος, προστίθενται μετά την απόρριψη της ροής επιπλέον 200 μl Buffer PW3 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 min στις 10.000 rpm με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος πλύσης και την ξήρανση της silica membrane.
- **Έκλυση DNA από τη silica membrane:** Η στήλη προσαρμόστηκε σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και προστίθενται 50 μl προθερμασμένου στους 65°C διαλύματος έκλυσης (Buffer PE). Ακολουθεί επώαση στους 65° C για 5 min και φυγοκέντρηση του δείγματος για 1 min στις 10.000 rpm. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται και το διάλυμα έκλυσης μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Το διάλυμα καθαρού DNA φυλάσσεται στους - 20°C.



Εικόνα 4.3: Αυτόκαυστο (αριστερά) και Υδατόλουτρο (δεξιά).



Εικόνα 4.4: Μικροφυγόκεντρος (αριστερά) και Vortex (δεξιά).



Εικόνα 4.5: λυοφιλοποιημένα φύλλα μηλιάς (αριστερά) και φυτικός ιστός μετά από λειοτριβήση (δεξιά)



Εικόνα 4.6: Διαδικασία απομόνωσης DNA. Μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες με αιώρημα λειοτριβημένου φυτικού ιστού σε διάλυμα λύσης.

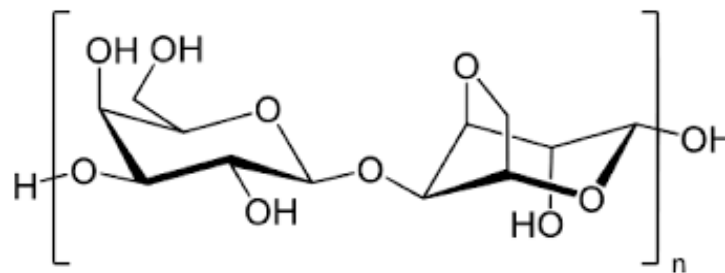
Ο έλεγχος της επιτυχής απομόνωσης γενωμικού DNA και η ποσοτικοποίησή του γίνεται οπτικά μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1% w/v σε 1xTAE) μιας ποσότητας δείγματος DNA (3μl) παράλληλα με ποσοτικό μάρτυρα DNA (5μl 1Kb DNA Ladder). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται συγκρίνοντας την ένταση της ζώνης του DNA του δείγματος με τη ζώνη του μάρτυρα (Εικόνα 4.11.).

4.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

Αρχή της Μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται συνεχές ηλεκτρικό πεδίο. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους.

Η ηλεκτροφόρηση των μορίων DNA σε πηκτή αгарόζης πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό επομένως όταν βρεθεί σε συνεχές ηλεκτρικό πεδίο, να κινείται προς τον θετικό πόλο (Παλαιολόγου, 2015).



Εικόνα 4.7: Ο χημικός τύπος του πολυσακχαρίτη αгарόζη
(Πηγή: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agarose_polymer.svg#/media/File:Agarose_polymer.svg).

Η κίνηση του DNA στη πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από:

1. **Το μέγεθος**, όσο μικρότερο είναι το μόριο του DNA τόσο πιο ταχύτερη είναι η κίνηση του, αφού βρίσκει μικρότερη αντίσταση. Επομένως τα μικρά μόρια θα βρίσκονται πιο χαμηλά στο πήγμα.
2. **Η συγκέντρωση της αγαρόζης** διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, στα πηκτά πηκτώματα κινούνται με μεγαλύτερη ευκολία τα μικρά μόρια DNA με αποτέλεσμα τον επιτυχή διαχωρισμό τους, ενώ τα μεγάλα μόρια δεν θα διαχωριστούν. Η κίνηση του DNA σε σχέση με την συγκέντρωση δίνεται από το τύπο:

$$\log \mu = \log \mu_0 - krt, \text{ όπου}$$

μ = κίνηση DNA, μ_0 = η ελεύθερη κινητικότητα του DNA, kr = συντελεστής καθυστέρησης, t = συγκέντρωση αγαρόζης.

Τη τάση πεδίου: Η κινητικότητα του μορίου DNA είναι ανάλογη της τάσης του πεδίου. Ο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται σε τάση 5 Volt/cm

3. **Τη διαμόρφωση του DNA**, τα μόρια του μπορεί να έχουν τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις. Α) Κυκλικά μόρια (όπως τα πλασμίδια, το βακτηριακό ή το ιικό DNA), Β) Κυκλικά μόρια με εγκοπές (όπως τα πλασμίδια με εγκοπές στη μια αλυσίδα, Γ) Γραμμικά μόρια, είναι συνήθως όλα τα μόρια DNA τα οποία έχουν υποστεί πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Μόρια DNA ίδιου μεγέθους αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα στο πήγμα αγαρόζης. Η σειρά αύξησης της κινητικότητας είναι: κυκλικό μόριο όχι υπερσπειρωμένο, γραμμικό μόριο και κυκλικό μόριο υπερσπειρωμένο (Σπέλλα Μ., biologylab.eap.gr).

Για την ανίχνευση των ζωνών DNA σε πήγμα αγαρόζης χρησιμοποιείται η χρώση με GelRed. Η GelRed είναι χρωστική νουκλεϊκών οξέων που φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 4.10.). Η χρωστική αυτή παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα και αντικαθιστά το ισχυρά τοξικό βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) για χρώση DNA σε πηκτή αγαρόζη.

Πειραματική διαδικασία

Εξοπλισμός

1. Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA (Εικόνα 4.8.)
2. Τροφοδοτικό συσκευής ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 4.9.)
3. Τράπεζα Υπεριώδης Ακτινοβολίας και σύστημα ψηφιακής απεικόνισης πηκτωμάτων νουκλεϊκών οξέων (Εικόνα 4.10.)

Διαλύματα

1. 50 x TAE (Tris-Acetate - EDTA), ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

Για την παρασκευή ενός λίτρου χρειάζονται :

240 g Tris base,

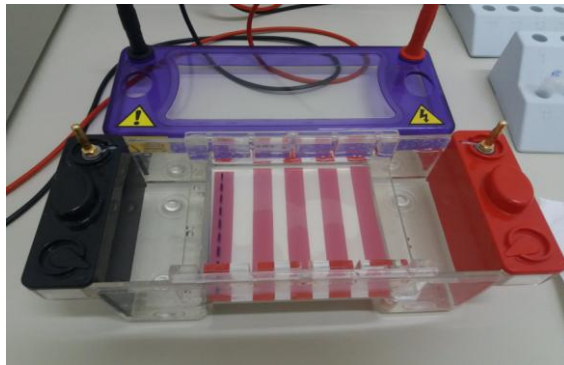
57.1 ml Glacial Acetic acid (οξικό οξύ),

100 ml 0.5 M EDTA

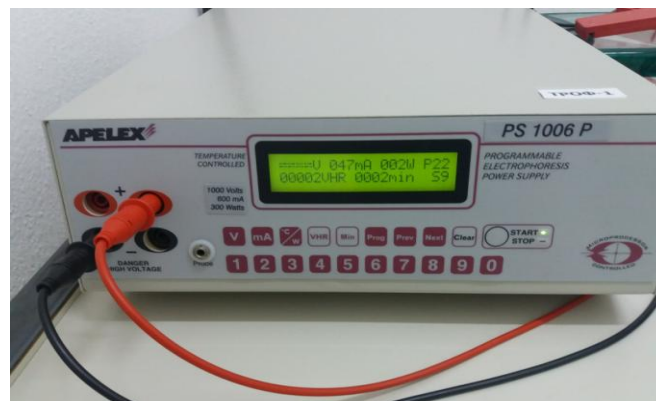
Νερό αποσταγμένο έως το 1 λίτρο.

Για την παρασκευή 1 L 1x TAE σε ογκομετρική φιάλη των 1000 ml μεταφέρονται 20 ml διαλύματος 50 x TAE και προστίθεται αποσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή, πωματίζεται, ανακινείται και χρησιμοποιείται άμεσα.

2. 10X Loading Buffer, διάλυμα φόρτωσης
50% Glycerol, 0.9% SDS, 0.05% Bromophenol Blue
3. 10.000x GelRed Nucleic Acid Gel Stain



Εικόνα 4.8: Συσκευή Οριζόντιας ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 4.9: Μονάδα τάσης Apex Generator Electrophoresis PS1006 P.

Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

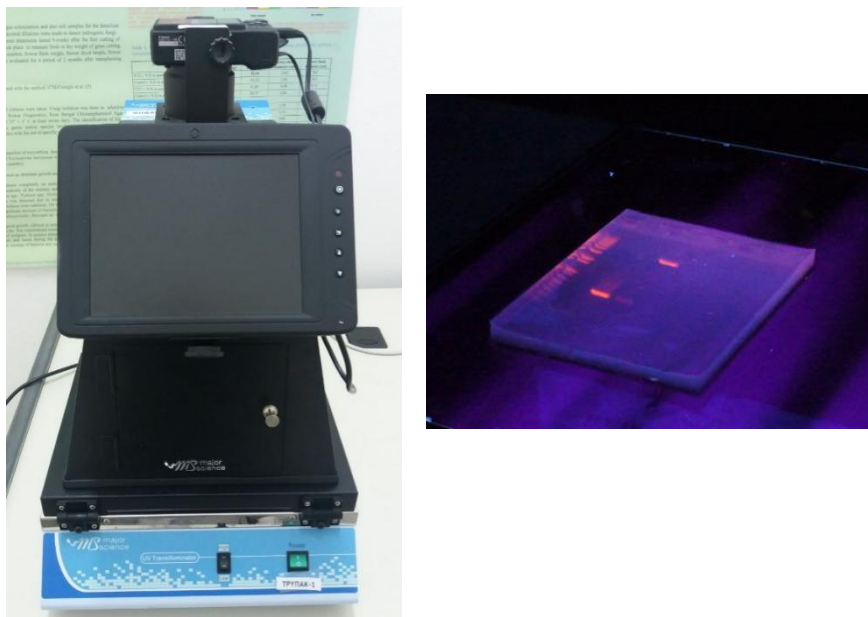
- Σε κωνική φιάλη των 250 ml προστίθενται 0,5 g αγαρόζης και 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1X TAE έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 1%.
- Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος μειωθεί στους 50° C περίπου προστίθενται 2,5 μl από τη χρωστική GelRed
- Τοποθέτηση της ρευστής αγαρόζης στο εκμαγείο. Το εκμαγείο έχει προετοιμαστεί κλείνοντας τις ανοικτές πλευρές του με ειδικούς υποδοχείς και τοποθετώντας τα «χτένια», που χρησιμεύουν ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων (‘‘πηγαδάκια’’). Η ρευστή αγαρόζη χύνεται στο εκμαγείο με προσοχή, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Αν δημιουργηθούν φυσαλίδες, φροντίζουμε να τις απομακρύνουμε με τη βοήθεια ενός tip. Το ρευστό πήγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στερεοποιηθεί. Στο τέλος αφαιρούνται προσεκτικά οι ειδικοί υποδοχείς και τα «χτένια».

Τοποθέτηση των δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση:

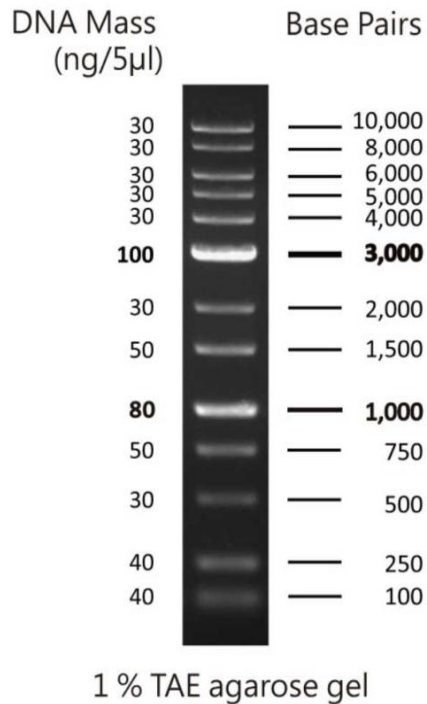
- Μεταφορά του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης: Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στη δεξαμενή προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 1 X TAE σε ποσότητα ώστε να υπερκαλύψει το πήκτωμα κατά περίπου 1 mm. Κατά την πλήρωση της δεξαμενής εξασφαλίζεται ότι δεν έχει παγιδευτεί αέρας στο εσωτερικό των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων.
- Προετοιμασία δειγμάτων: Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προετοιμάζονται κατάλληλα με την ανάμιξή τους με διάλυμα φόρτωσης 10X. Το διάλυμα φόρτωσης έχει μεγαλύτερο ειδικό βάρος από το διάλυμα ηλεκτροφόρησης με αποτέλεσμα το δείγμα DNA να κατακρατείται στον πυθμένα του ‘‘πηγαδιού’’ και να εισχωρεί στο πήγμα της αγαρόζης μετά την εφαρμογή της διαφοράς δυναμικού. Επίσης η χρωστική που περιέχει κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA, συμβάλλοντας στον μακροσκοπικό εντοπισμό της κινητικότητας του δείγματος στην πηκτή. Σε ένα μικροφυγοκεντικό σωλήνα αναμιγνύονται 3 μl δείγματος με 15 μl αποστειρωμένου νερού και 2 μl διαλύματος φόρτωσης 10X.

- Τοποθέτηση των δειγμάτων. Τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις υποδοχής με τη βοήθεια πιπέτας ρυθμιζόμενου όγκου. Παράλληλα τοποθετείται και δείγμα μάρτυρα DNA γνωστών μεγεθών. Χρησιμοποιούνται 5 μ l από το 1 Kb DNA Ladder (Εικόνα 4.11.)
- Εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης στη πηκτή αгарόζης: Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής εφαρμόζεται το καπάκι της συσκευής, έτσι ώστε τα ηλεκτρόδια του τροφοδοτικού να συνδεθούν στους πόλους της δεξαμενής ηλεκτροφόρησης. Το θετικό ηλεκτρόδιο (κάθοδος) τοποθετείται πάντα απέναντι από τις θέσεις υποδοχής των δειγμάτων προκειμένου τα μόρια του DNA να μετακινηθούν κατά τη σωστή φορά στο πήκτωμα. Τέλος ρυθμίζεται η τάση στο τροφοδοτικό σε 60V. Η ηλεκτροφόρηση τερματίζεται μετά από 90 min περίπου.

Η πηκτή παρατηρείται στη τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας Mas major science UV transilluminator προκειμένου να ελεγχθεί η ποιότητα του DNA. Τέλος για λόγους αρχείου και οργάνωσης φωτογραφίζεται κάθε προσπάθεια και αποθηκεύεται σε ψηφιακό μέσο (Εικόνα 4.10).



Εικόνα 4.10: Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας Mas major science UV transilluminator (αριστερά) και (δεξιά) παρατήρηση πηκτώματος αгарόζης σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.



Εικόνα 4.11: *1Kb DNA Ladder plus*.

4.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αρχή της Μεθόδου

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αναπτύχθηκε από τον αμερικανό βιοχημικό Kary Mullis και τους συνεργάτες του το 1983 (βραβείο Νόμπελ Χημείας, 1993). Πρόκειται για μια αξιόπιστη, φθηνή και γρήγορη μέθοδο με την οποία μπορούμε εύκολα να επιλέξουμε σε ένα γονιδίωμα ένα συγκεκριμένο κομμάτι (γονίδιο) και να το πολλαπλασιάσουμε κατά εκατομμύρια φορές *in vitro*, με την προϋπόθεση να είναι γνωστές οι αλληλουχίες των άκρων της περιοχής στόχου. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα στις βιολογικές επιστήμες και έχουν πλέον αναπτυχθεί πάνω από 30 διαφορετικές παραλλαγές της

Αντίδραση PCR

Η πραγματοποίηση μιας αντίδρασης PCR περιλαμβάνει την ανάμιξη των εξής συστατικών:

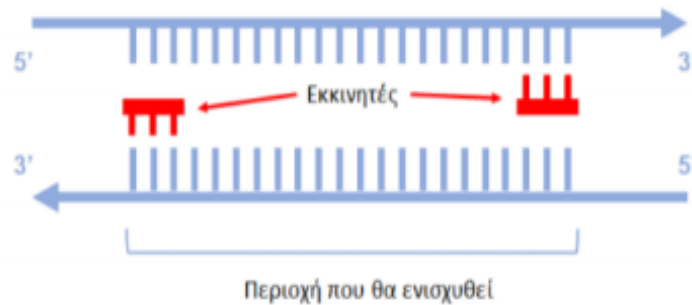
- Μήτρα DNA: είναι το DNA που περιέχει την αλληλουχία που θέλουμε να ενισχύσουμε π.χ. το απομονωμένο γενωμικό DNA ενός οργανισμού. Το αρχικό DNA πρέπει να είναι καθαρό, δηλαδή να μην έχει προσμίξεις από άλλα κυτταρικά

συστατικά ή οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά την απομόνωσή του. Η ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται σε μία PCR κυμαίνεται από 10 – 50 ng.

- Ειδικό ζεύγος εκκινητών (primers): Οι εκκινητές είναι μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 17 – 30 νουκλεοτίδια, που παράγονται συνθετικά και είναι συμπληρωματικοί στις παράπλευρες αλληλουχίες του τμήματος DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Συνήθως τους ονομάζουμε πρόσθιο και ανάστροφο εκκινητή, με τον ένα να υβριδοποιείται στην περιοχή που βρίσκεται στην 3' κατεύθυνση της αλληλουχίας-στόχου στη μια αλυσίδα του DNA και τον άλλο στην 3' κατεύθυνση της αλληλουχίας-στόχου στην άλλη αλυσίδα του DNA (Εικόνα, 30)
- Μίγμα των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) όπου το κάθε ελεύθερο νουκλεοτίδιο έχει συγκέντρωση 0,2 mM.
- Ρυθμιστικό διάλυμα: Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) μιας αντίδρασης PCR ρυθμίζει το pH και το ιοντικό περιβάλλον της αντίδρασης ώστε να είναι το βέλτιστο για τη λειτουργία της DNA πολυμεράσης. Το pH ρυθμίζεται στο ~8,5 από την παρουσία Tris-HCl στο ρυθμιστικό διάλυμα ενώ η ιοντική ισχύς παρέχεται από ιόντα K^+ ή Na^+
- Διάλυμα $MgCl_2$: Τα ιόντα Mg^{2+} σχηματίζουν σύμπλοκα με τα dNTPs και σταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις της DNA πολυμεράσης με το DNA και τα dNTPs. Συνήθως βρίσκονται στην αντίδραση σε συγκεντρώσεις 1,5 – 2,0 mM
- Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase). Το ένζυμο αυτό απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* το οποίο ανακαλύφθηκε στις θερμοπηγές του πάρκου Yellowstone (Εικόνα 4.12). Το ένζυμο αυτό είναι σταθερό σε πολύ υψηλότερες θερμοκρασίες από ότι οι ευκαρυωτικές DNA πολυμεράσες, για το λόγο αυτό, δεν είναι απαραίτητο να προστίθεται ξανά μετά από κάθε κύκλο της αντίδρασης και επιτρέπει την αυτοματοποίηση της μεθόδου. Το εύρος των θερμοκρασιών βέλτιστης ενεργότητας του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση είναι στους $75^{\circ}C - 80^{\circ}C$ αλλά συνήθως επιλέγονται οι $72^{\circ}C$ γιατί σε αυτή τη θερμοκρασία γίνονται λιγότερα λάθη κατά την αντιγραφή του DNA. Η Taq DNA πολυμεράση επιμηκύνει και τους δύο εκκινητές προς την κατεύθυνση της αλληλουχίας-στόχου καθώς η σύνθεση του DNA γίνεται σε κατεύθυνση από το 5' προς το 3' άκρο της νουκλεοτιδικής αλυσίδας (Εικόνα 4.13.) (Σπέλλα Μ., biologylab.eap.gr).



Εικόνα 4.12: Θερμοπηγές Yellowstone.



Εικόνα 4.13: Τρόπος υβριδισμού των εκκινητών στην αλληλουχία του DNA. της αλληλουχίας DNA

(Πηγή: Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο).

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 3 στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται για 25 -35 κύκλους. Η ακολουθία αυτών των κύκλων λαμβάνει χώρα σε μία συσκευή (θερμικό κυκλοποιητή, Εικόνα 4.17) η οποία θερμαίνει και ψύχει τα ειδικά σωληνάκια PCR (PCR tubes) μέσα στα οποία βρίσκεται το μίγμα των αντιδραστηρίων σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Τα 3 επιμέρους στάδια της αντίδρασης PCR είναι τα εξής:

1. **Στάδιο μετουσίωσης (denaturation)** : Το δίκλωνο μόριο του DNA θερμαίνεται στους 95°C με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο μονόκλωνων αλυσίδων. Συγκεκριμένα, η υψηλή θερμοκρασία σπάει τους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τις δύο αλυσίδες μεταξύ τους και έτσι διαχωρίζονται. Το στάδιο αυτό διαρκεί συνήθως 30 – 45 sec
2. **Στάδιο υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing)**: το διάλυμα ψύχεται απότομα στους 48-55°C και οι εκκινητές προσδένονται στις συμπληρωματικές προς αυτούς

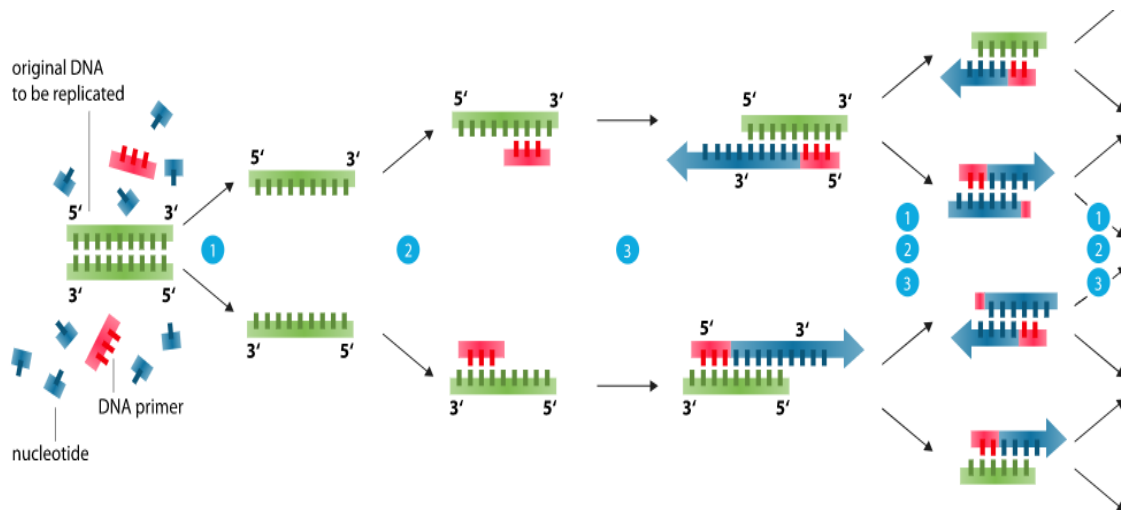
αλληλουχίες στις δύο αλυσίδες DNA. Η θερμοκρασία και ο χρόνος της φάσης αυτής εξαρτάται από το μήκος, τη νουκλεοτιδική αλληλουχία και τη συγκέντρωση του ζεύγους των εκκινητών. Γενικά, αύξηση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης ευνοεί την ειδικότητα του τελικού προϊόντος καθώς μειώνεται η μη ειδική δέσμευση των εκκινητών. Προσθέτοντας εκκινητές σε περίσσεια αποφεύγουμε την υβριδοποίηση του αρχικού DNA με τον εαυτό του.

3. **Στάδιο Επιμήκυνσης – Σύνθεσης (elongation / extension):** η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72° C για περίπου ½ - 2 min ώστε να γίνει η αντίδραση πολυμερισμού από το ένζυμο DNA πολυμεράση το οποίο συνθέτει απέναντι από κάθε μονόκλωνη αλυσίδα την συμπληρωματική της. Επομένως θα παραχθούν δύο δίκλινα από ένα αρχικό δίκλινο τμήμα DNA αφού η κάθε μονόκλωνη αλυσίδα χρησιμοποιείται ως εκμαγείο κατά την αντίδραση πολυμερισμού. Ο κύκλος που αναφέρθηκε παραπάνω (Εικόνα 4.14) θα επαναληφθεί πολλές φορές, Σε κάθε κύκλο τα αντίγραφα που έχουν δημιουργηθεί χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την επόμενο κύκλο και ο αριθμός των αντιγράφων αυξάνεται με γεωμετρική πρόοδο (Εικόνα 4.14)
4. Μετά την ολοκλήρωση των απαιτούμενων κύκλων η θερμοκρασία παρέμεινε στους 72° C για 7 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η τελική επιμήκυνση των νέων κλώνων. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα παραγόμενα προϊόντα διατηρούνται στους 4° C (Σπέλλα Μ., biologylab.eap.gr, Sambrook J. and Russell D.W. , 2001).

Η PCR είναι μια ευαίσθητη τεχνική που η αποτελεσματικότητά της επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, οι βασικότεροι είναι η σωστή διεξαγωγή της διαδικασίας και η καταλληλότητα των δειγμάτων.

Η απόδοση της μεθόδου εξαρτάται επίσης από:

- Επιλογή κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης
- Χρήση κατάλληλου προγράμματος σχεδιασμού των εκκινητών
- Εκτίμηση ποιότητας των δειγμάτων και έλεγχος αναστολέων
- Έλεγχο για τυχόν επιμόλυνση
- Βελτιστοποίηση ποιότητας και συγκέντρωσης αντιδραστηρίων
- Ρύθμιση των παραμέτρων του προγράμματος



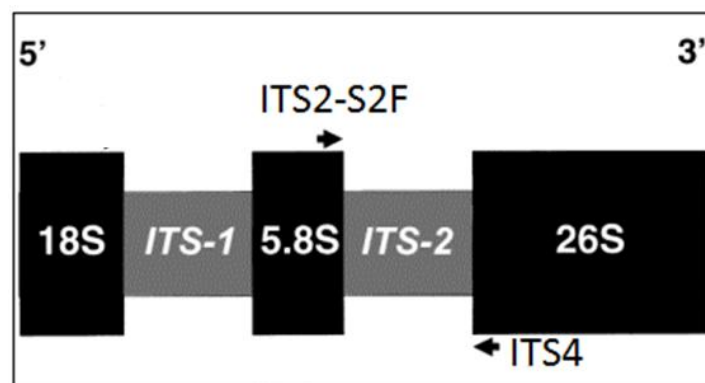
Εικόνα 4.14: Τα στάδια της αντίδρασης PCR (Πηγή: Enzoklop).

Πειραματική διαδικασία

Η τεχνική PCR εφαρμόστηκε για την ενίσχυση της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα το απομονωμένο γενωμικό DNA από τους υπό μελέτη φυτικούς ιστούς και τους καθολικούς εκκινητές (universal primers) ITS2-S2F και ITS4 (Εικόνα 4.15)

ITS2-S2F: 5'- ATGCGATACTTGGTGTGAAT- 3' (Chen et. al., 2010)

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (white et. al., 1990)



Εικόνα 4.15: Τα τρία γονίδια και οι ενδιάμεσα μεταγραφόμενα διαστήματα του nrDNA ενός τυπικού αγγειόσπερμου. Σημειώνονται οι θέσεις υβριδισμού των καθολικών εκκινητών που χρησιμεύουν για την ενίσχυση με PCR της ITS-2 περιοχής.

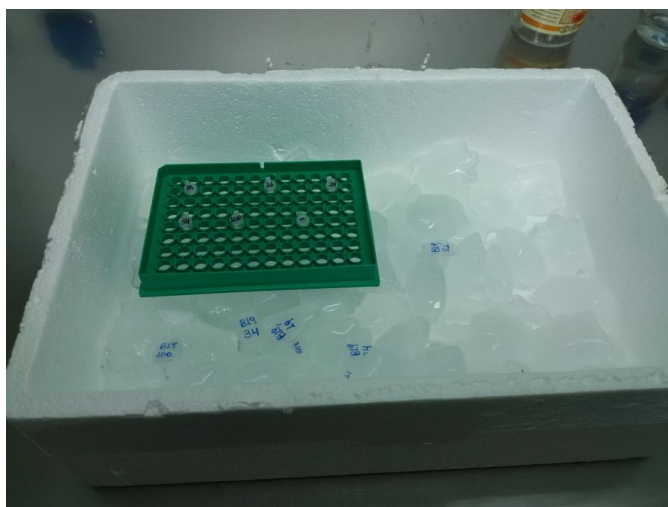
Αντίδραση PCR

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν σωληνάκια τύπου erpendorf όγκου 200 μ l και το πακέτο υλικών, Taq polymerase kit της εταιρίας Kapa Biosystems.

Αντίδραση PCR

Αντιδραστήριο	Όγκος
Water Molecular Biology Reagent, αποστειρωμένο	29,6 μ l
5xBuffer D	10 μ l
25 mM MgCl ₂	3 μ l
dNTPs (10 mM το καθένα)	1 μ l
Εκκινητής ITS2-S2F (10 pmols/ μ l)	1,5 μ l
Εκκινητής ITS4 (10 pmols/ μ l)	1,5 μ l
Εκμαγείο DNA	3 μ l (~30 ng)
Taq DNA polymerase (5 unit/ μ l)	0,4 μ l
Τελικός όγκος	50 μ l

Η προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και στον πάγο (Εικόνα 4.16.) . Για την επιβεβαίωση της απουσίας μόλυνσης χρησιμοποιούμε ένα αρνητικό μάρτυρα όπου προσθέτουμε όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το DNA.



Εικόνα 4.16: Διαδικασία PCR.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τον θερμικό κυκλοποιητή BioRad MyCycler Thermal Cycler και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής (Εικόνα 4.17.): ένα αρχικό στάδιο μετουσίωσης του DNA (95 °C για 5min) και ακολούθησαν 35 κύκλοι που ο καθένας αποτελείτο από 30 sec στους 95 °C (μετουσίωση DNA) , 30 sec στους 53 °C (πρόσδεση των εκκινητών στο συμπληρωματικό τμήμα του γενωμικού DNA), 60 sec στους 72°C (επιμήκυνση του εκκινητή για τη σύνθεση των νέων κλώνων). Μετά την ολοκλήρωση των απαιτούμενων κύκλων η θερμοκρασία παρέμεινε στους 72°C για 7 min ώστε να πραγματοποιηθεί η τελική επιμήκυνση των νέων κλώνων. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα παραγόμενα προϊόντα διατηρήθηκαν στους 4°C.



Εικόνα 4.17:Θερμικός κυκλοποιητής BioRad MyCycler Thermal Cycler και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε.

4.6. Καθαρισμός προϊόντων PCR

Για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR έγινε χρήση του εμπορικού kit PCR clean-up Gel extraction της Macherey Nagel. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση ειδικά διαμορφωμένης στήλης πυριτίου (silica membrane) που επιτρέπει την πρόσδεση των μορίων DNA χωρίς να προσδένονται άλλα συστατικά.

Η απομόνωση του DNA έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή

- **Προσαρμογή των συνθηκών πρόσδεσης στη silica membrane:** Στα 40 µl προϊόντος PCR προστίθενται 60 µl υπερκαθαρό νερό (συνολικός όγκος 100 µl) και 200 µl Buffer NT (διάλυμα προσαρμογής συνθηκών για την πρόσδεση του DNA στη στήλη πυριτίου).
- **Πρόσδεση DNA :** Η στήλη πυριτίου NucleoSpin® Extract II Column τοποθετείται σε ένα σωλήνα συλλογής (2ml) και ακολουθεί μεταφορά του μείγματος στη στήλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11.000 x g και στην συνέχεια η ροή απορρίπτεται με την στήλη να τοποθετείται πίσω στο σωληνάριο συλλογής.
- **Πλύση της στήλης πυριτίου:** Προσθέτονται 700 µl Buffer NT3 (διάλυμα πλύσης) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11.000 x g , η ροή απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται ξανά πίσω στο σωληνάριο συλλογής.
- **Ξήρανση της στήλης πυριτίου:** Η υπολειμματική αιθανόλη από το διάλυμα πλύσης NT3 μπορεί να αναστείλει τις ενζυματικές αντιδράσεις (π.χ. κατά την διαδικασία αλληλούχισης των προϊόντων PCR) επομένως για να την απομάκρυνσή της γίνεται φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 x g και επώαση των στηλών για 3 min στους 70°C.
- **Έκλυση DNA:** Για την έκλυση του DNA γίνεται τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin® Extract II Column σε νέο σωλήνα μικροφυγόκεντρο 1,5 ml με προσθήκη 30 µl Buffer NE (5mM Tris- HCl, pH=8,5) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου 18-25°C. Τέλος, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 x g. Το διάλυμα καθαρού DNA φυλάσσεται στους -20 °C

4.7. Σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών – Φυλογενετική ανάλυση

Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR εστάλησαν προς προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας στο εργαστήριο VBC- Biotech στην Αυστρία. Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν με κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων του NCBI (National Center of Biotechnology Information) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLASTN 2.2.32. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

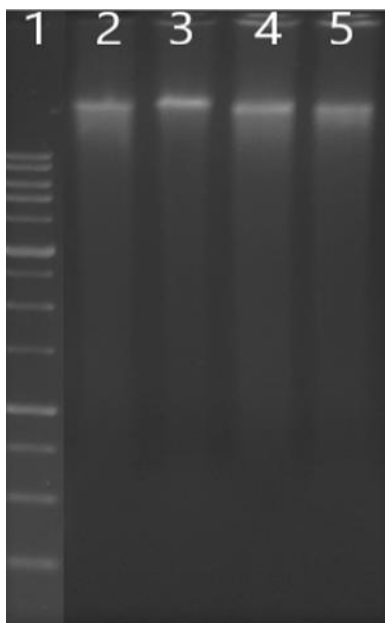
Τέλος, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δένδρο με τη μέθοδο Neighbor-Joining (στα ελληνικά, ένωση γειτόνων) μέσω του προγράμματος MEGA6.0 (Tamura K. et. al., 2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

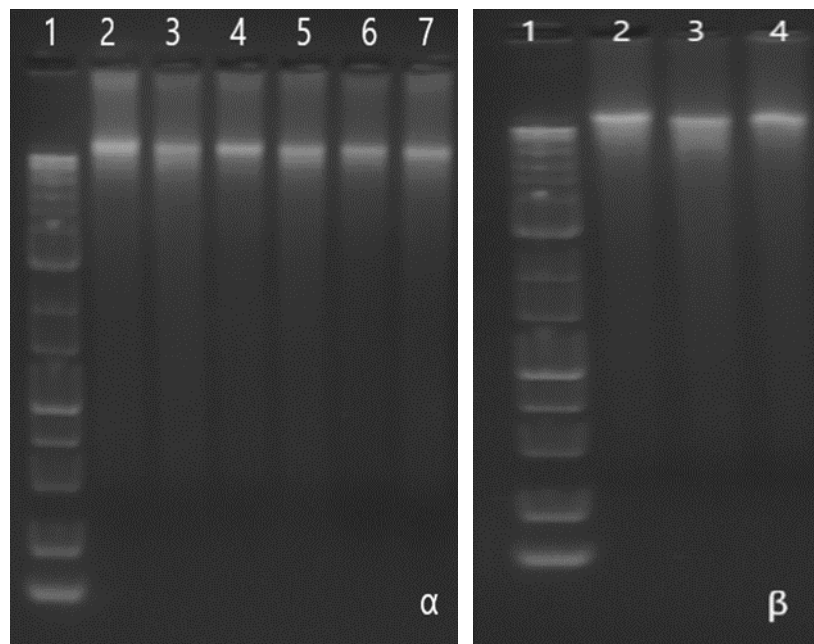
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικό υλικό τοπικών ποικιλιών μηλιάς

Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από ιστό λυοφιλοποιημένων φύλλων (20 mg) με τη χρήση του πακέτου υλικών NucleoSpin Plant II της Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο έλεγχος της επιτυχούς απομόνωσης DNA και η ποσοτικοποίησή του έγιναν οπτικά μετά από ηλεκτροφόρηση μιας ποσότητας δείγματος DNA (3 μl) σε πηκτή αγαρόζης (1% w/v σε 1xTAE) μαζί με ποσοτικό μάρτυρα γνωστής συγκέντρωσης (5μl, 1Kb DNA Ladder). Όπως φαίνεται στις Εικόνες 5.1 και 5.2 οι απομονώσεις DNA από τα δείγματα έδωσαν επαρκή ποσότητα για τις αντιδράσεις PCR.



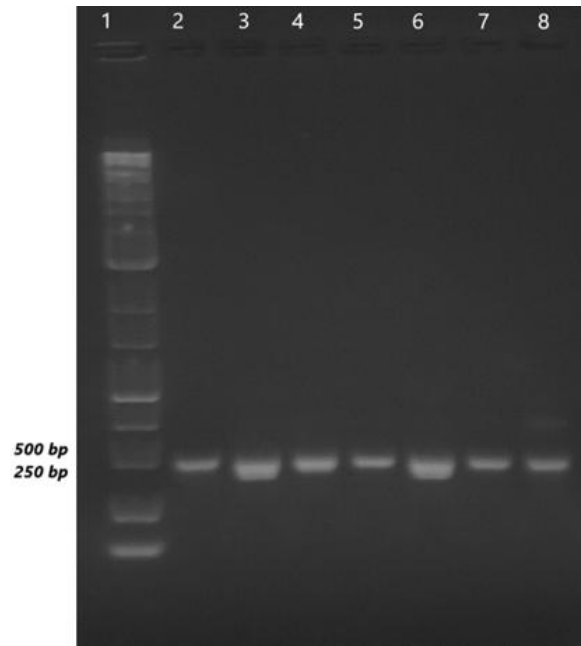
Εικόνα 5.1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v γενωμικών DNA τοπικών ποικιλιών μηλιάς: B19,14 (διαδ. 2), B19,24 (διαδ. 3), B19,96 (διαδ. 4), B19,100 (διαδ. 5), Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder



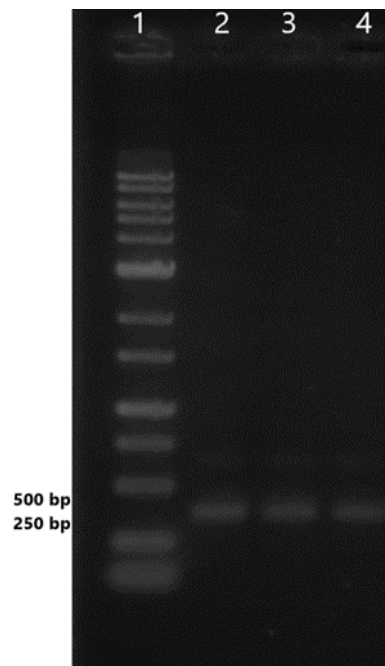
Εικόνα 5.2.: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 1% w/v γενωμικών DNA τοπικών ποικιλιών μηλιάς **(α)**: B19,40 (διαδ. 2), B19,19 (διαδ. 3), B19,41 (διαδ. 4), B19,137 (διαδ. 5), B19,83 (διαδ. 6), B19,82 (διαδ. 7). **(β)** B19,34(διαδ. 2), B19,72(διαδ. 3), B19,21 (διαδ. 4), Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder.

5.2. Ανάλυση αλληλουχιών της περιοχής ITS2 του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA)

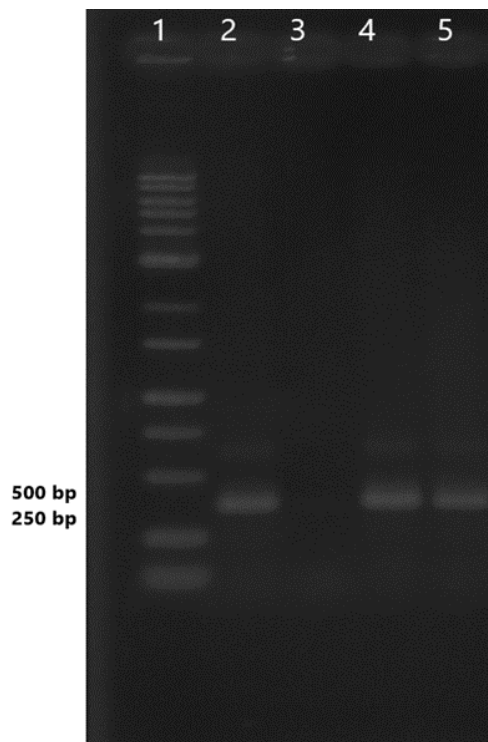
Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από τις ποικιλίες μηλιάς χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την ενίσχυση αλληλουχιών της περιοχής ITS2 του nrDNA με την τεχνική PCR. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο ITS2-S2F και ITS4. Η επιτυχής ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής ελέγχθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή αραρόζης 1,5% (w/v σε 1xTAE) (Εικόνες: 5.3, 5.4, 5.5.). Το μέγεθος των προϊόντων PCR είναι ~ 350 bp.



Εικόνα 5.3: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1,5 % w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των ποικιλιών μηλιάς: B19,14 (διαδ. 2), B19,40 (διαδ. 3), B19,24 (διαδ. 4), B19,96 (διαδ. 5), B19,100 (διαδ. 6), B19,19 (διαδ. 7), B19,41 (διαδ. 8) και εκκινητές: ITS2-S2F και ITS4. Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder.



Εικόνα 5.4.: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1,5% w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των ποικιλιών μηλιάς: B19,137 (διαδ. 2), B19,83 (διαδ. 3) B19,82 (διαδ. 4) και εκκινητές: ITS2-S2F και ITS4. Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder.



Εικόνα 5.5: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των ποικιλιών μηλιάς: B19,34 (διαδ. 2), Αρνητικός μάρτυρας (διαδ.3), B19,72 (διαδ. 4), B19,21 (διαδ. 5) και εκκινήτες: ITS2-S2F και ITS4. Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR καθαρίστηκαν με τη χρήση του πακέτου υλικών PCR-clean up gel extraction της Macherey- Nagel και εστάλησαν προς προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας (VBC- Biotech, Austria). Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν με κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων του NCBI (National Center of Biotechnology Information) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLASTN 2.2.32.

Τα αποτελέσματα της ανάγνωσης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών παρουσιάζονται στο Παράρτημα Β

Τα αποτελέσματα από τη σύγκριση των προσδιορισμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1

Πίνακας 5.1. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας των προϊόντων PCR

Κωδικός δείγματος	Συγγενές είδος	Ομολογία %	Κωδικός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων NCBI
B19,14	<i>Malus micromalus</i>	91	KU288713.1
	<i>Malus micromalus</i>	91	KU288711.1
	<i>Malus sieversii</i>	89	AF186485.1
	<i>Malus domestica</i>	89	AF186481.1
B19,19	<i>Malus sieversii</i>	96	KF454333.1
	<i>Malus sieversii</i>	96	MN215992.1
	<i>Malus sylvestris</i>	95	MT937123.1
B19,21	<i>Malus sieversii</i>	98	KF454333.1
	<i>Malus domestica</i>	98	MH633844.1
	<i>Malus sieversii</i>	97	MN215992.1
	<i>Malus domestica</i>	97	MH633846.1
	<i>Malus domestica</i>	97	MH633852.1
B19,24	<i>Malus sieversii</i>	96	MN215992.1
	<i>Malus sieversii</i>	96	KF454333.1
	<i>Malus domestica</i>	95	MH633852.1
	<i>Malus domestica</i>	95	MH633844.1
B19,34	<i>Malus sieversii</i>	94	MN215992.1
	<i>Malus sieversii</i>	94	KF454333.1
	<i>Malus domestica</i>	92	MH633852.1
B19,40	<i>Malus micromalus</i>	80	KU288713.1
	<i>Malus micromalus</i>	80	KU288711.1
	<i>Malus sieversii</i>	79	MN215992.1
	<i>Malus domestica</i>	79	MH633852.1
B19,41	<i>Malus sieversii</i>	99	MN215992.1
	<i>Malus sieversii</i>	98	KF454333.1

	<i>Malus domestica</i>	98	MH633852.1
	<i>Malus domestica</i>	98	MH633844.1
B19,72	<i>Malus sieversii</i>	97	KF454333.1
	<i>Malus sieversii</i>	97	MN215992.1
	<i>Malus domestica</i>	96	MH633846.1
B19,82	<i>Malus micromalus</i>	82	KU288713.1
	<i>Malus micromalus</i>	82	KU288711.1
	<i>Malus domestica</i>	79	KY964734.1
B19,83	<i>Malus micromalus</i>	81	KU288713.1
	<i>Malus micromalus</i>	81	KU288711.1
	<i>Malus sylvestris</i>	80	FJ899096.1
B19,96	<i>Malus sieversii</i>	99	KF454333.1
	<i>Malus domestica</i>	98	MH633844.1
	<i>Malus domestica</i>	98	MH633852.1
B19,100	<i>Malus sieversii</i>	94	MN215992.1
	<i>Malus sieversii</i>	94	KF454333.1
	<i>Malus domestica</i>	94	MH633852.1
B19,137	<i>Malus sieversii</i>	95	MN215992.1
	<i>Malus sieversii</i>	95	KF454333.1
	<i>Malus domestica</i>	94	MH633852.1

Από την ανάλυση των αλληλουχιών των ITS2 περιοχών φαίνεται ότι οι 13 ITS2 αλληλουχίες που μελετήθηκαν παρουσίασαν ομολογία με ITS2 αλληλουχίες της Genbank οι οποίες έχουν καταχωρηθεί ως αλληλουχίες τους γένους *Malus* και συγκεκριμένα:

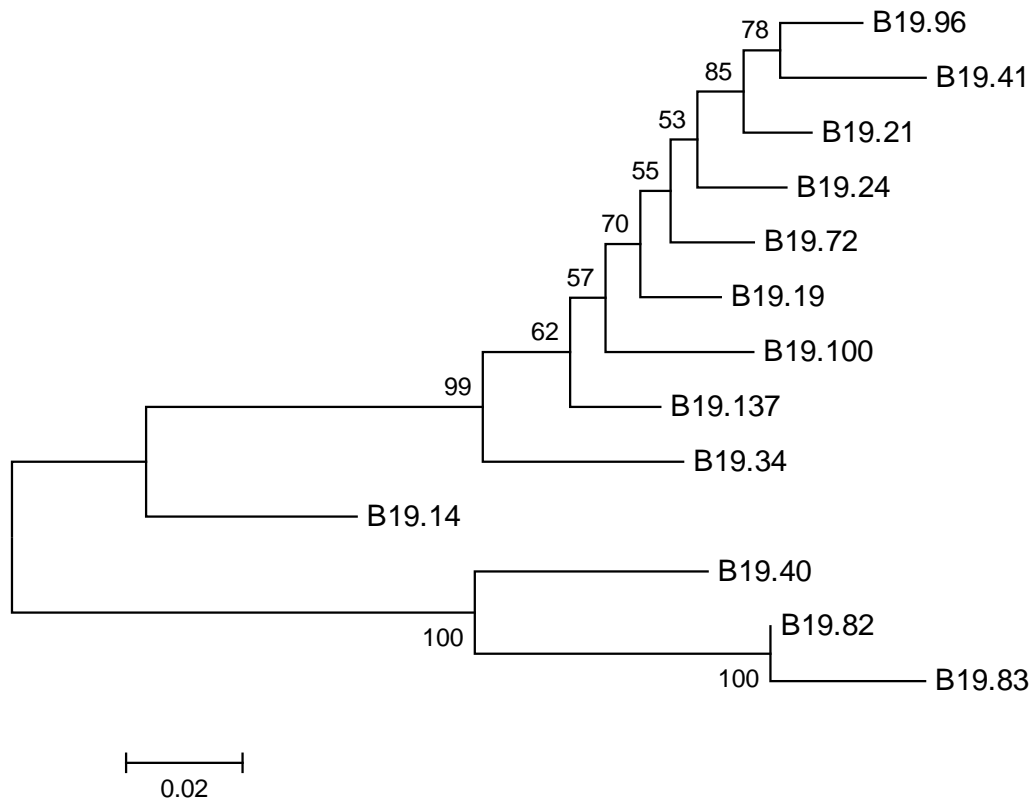
- ✓ Οι B19,14, B19,80, B19,82, και B19,83 παρουσίασαν μεγαλύτερη ομολογία με ITS2 αλληλουχίες του είδους *Malus micromalus*.
- ✓ Οι B19,21, B19,72, B19,19, B19, 24, B19,34, B19,41, B19,96, B19,100 και B19,137 παρουσίασαν μεγαλύτερη ομολογία με ITS2 αλληλουχίες του είδους *Malus sieversii* και μάλιστα με υψηλό ποσοστό ομολογίας (>94%). Ιδιαίτερα οι B19,41, B19,96 παρουσίασαν ποσοστό ομολογίας 99%.

5.3. Φυλογενετική ανάλυση των τοπικών ποικιλιών του γένους *Malus* με βάση τις αλληλουχίες της περιοχής ITS2 nrDNA

Προκειμένου να διερευνηθούν οι φυλογενετικές σχέσεις των υπό μελέτη ποικιλιών κατασκευάστηκε φυλογενετικό δένδρο με βάση την ανάλυση Neighbor –Joining (NJ) των αλληλουχιών της περιοχής ITS2 nrDNA. Από την παραπάνω ανάλυση προέκυψε το φυλογενετικό δένδρο της εικόνας 5.6

Στο φυλογενετικό δένδρο της εικόνας 5.6. παρατηρείται ότι: Οι ποικιλίες B19,83, B19,82 και B19,40 αποτελούν μία ομάδα. Οι ποικιλίες B19,83 και B19,82 αποτελούν ξεχωριστό κλάδο. Πιθανά, πρόκειται για την ίδια ποικιλία καθώς οι ποικιλίες B19,83 και B19,82 προέρχονται από τον ίδιο γεωγραφικό τόπο (Πίνακα 5.6.). Η ομαδοποίηση αυτή συμβαδίζει και με το γεγονός ότι και οι τρεις ποικιλίες βρίσκονται πιο κοντά στο ίδιο είδος το *Malus micromalus*. Οι ποικιλίες B19,34, B19,137, B19,100, B19,72, B19,24, B19,21, B19,41, και B19,96 που βρίσκονται κοντά στο *Malus sieversii* αποτελούν μία δεύτερη ομάδα. Οι ποικιλίες B19,96 και B19,41 αποτελούν ξεχωριστό κλάδο παρουσιάζοντας μεγαλύτερη γενετική συγγένεια. Η ποικιλία B19,14 αποτελεί ξεχωριστή ομάδα με μικρότερη γενετική απόσταση από την ομάδα των ποικιλιών B19,83, B19,82 και B19,40 καθώς και αυτή βρίσκεται πλησιέστερα στο *Malus micromalus*.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι η γενετική ανάλυση των 13 τοπικών ποικιλιών μηλιάς με βάση τις αλληλουχίες της ITS2 περιοχής του nrDNA έδειξε ότι οι ποικιλίες βρίσκονται πλησιέστερα στα είδη *M. micromalus* και *Malus sieversii* και παρουσιάζουν μεγάλη γενετική ποικιλότητα.



Εικόνα 5.6. Φυλογενετικές σχέσεις των τοπικών ποικιλιών του γένους *Malus* οι οποίες βασίζονται στις αλληλουχίες της περιοχής ITS2 nrDNA. Το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Neighbor –Joining (NJ). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις φορές (%) που ένας κλάδος εμφανίζεται σε 1000 bootstrap επαναλήψεις. Η ράβδος 0.02 αντιπροσωπεύει τη σχετική απόκλιση των αλληλουχιών

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία έγινε μια αρχική προσπάθεια να μελετηθεί και να αποτιμηθεί η γενετική ποικιλότητα δεκατριών τοπικών ποικιλιών μηλιάς που βρίσκονται στην ορεινή Ήπειρο. Η φυλογενετική ανάλυση με βάση τις αλληλουχίες της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA έδειξε ότι οι ποικιλίες B19,34, B19,137, B19,100, B19,72, B19,24, B19,21, B19,41, και B19,96 βρίσκονται πλησιέστερα σε ποικιλίες του *Malus sieversii* ενώ οι ποικιλίες B19,14, B19,80, B19,82, και B19,83 βρίσκονται πλησιέστερα σε ποικιλίες του *Malus micromalus*. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι γενότυποι B19,82 και B19,83, πιθανά αναφέρονται στην ίδια ποικιλία καθώς αποτελούν ξεχωριστό κλάδο και βρίσκονται στον ίδιο γεωγραφικό τόπο. Επίσης, η ανάλυση του γενετικού υλικού έδειξε μεγάλη γενετική ποικιλότητα μεταξύ των ποικιλιών χαρακτηριστικό που τις καθιστά χρήσιμο γενετικό υλικό για τη βελτίωση των καλλιεργούμενων ποικιλιών.

Η παραπέρα διερεύνηση της ταξινόμησης των ειδών καθώς και η μελέτη της γενετικής τους ποικιλότητας μπορεί να γίνει με τη χρήση μοριακών δεικτών που θα καλύπτουν μεγάλο εύρος του γονιδιώματος όπως οι SSRs αλληλουχίες. Επίσης στην παραπέρα ταυτοποίηση του είδους θα βοηθήσει και η συνεκτίμηση των μορφολογικών δεικτών όταν ολοκληρωθεί η καταγραφή τους από τους ερευνητές της ομάδας EcoVariety.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh, H., 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27, 617–631
2. Álvarez I, Wendel JF (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 29:417-434.
3. Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Mo Bot Gard.* 1995;82: 247–277.
4. Brock TD., 1997. The value of basic research: Discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. *Genetics*, 146: 1207–1210.
5. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* 2010;5(1): e8613. pmid:20062805
6. Elisa, Ηλεκτροφόρηση & Διαγνωστικές Εφαρμογές: Πρωτεϊνών και DNA στην Κτηνιατρική επιστήμη. Τμήμα Κτηνιατρικής- Εργαστήριο Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
<http://archive.eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SEYB197/%CE%97%CE%BB%CE%B5%CE%BA%CF%84%CF%81%CE%BF%CF%86%CF%8C%CF%81%CE%B7%CF%83%CE%B7%20%26%20%CE%94%CE%B9%CE%B1%CE%B3%CE%BD%CF%89%CF%83%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AD%CF%82%20%CE%95%CF%86%CE%B1%CF%81%CE%BC%CE%BF%CE%B3%CE%AD%CF%82.pdf>
7. Erlich, H.A. (1989). In ‘PCR technology: principles and applications for DNA amplifications’. Strockton Press, NY.
8. Janick, J., J.N. Cummins, S.K. Brown, and M. Hemmat. 1996. Apples,.In: J. Janick and J. Moore (eds.). *Fruit breeding. Vol II. Tree and tropical fruits.* Wiley, New York
9. Juniper,B.E., Watkins,R.,Harris,S.A.,Tobutt,K.R.,Alston,F.H.,The origin of the apple. No.484, pp.27-33
10. Khan, S.A., Baeshen, M.N., Ramadan, H.A. et al. ITS2: An Ideal DNA Barcode for the Arid Medicinal Plant *Rhazya Stricta*. *Pharm Med* 33, 53–61 (2019).
11. Sambrook J. and Russell D.W. (2001). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3th Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

12. Soltis Douglas E. and Soltis Pamela S., 1998. Choosing an Approach and an Appropriate Gene for Phylogenetic Analysis in book: *Molecular Systematics of Plants II* (pp.1-42).
https://www.researchgate.net/publication/279350602_Molecular_Systematics_of_Plants_II
13. Sotiropoulos, T. (2006). Performance of the apple cultivar ‘Golden Delicious’ grafted on five rootstocks in northern Greece. *Archives of Agronomy and Soil Science*
14. Sotiropoulos, T. (2008). Performance of the apple cultivar Imperial Double Red Delicious grafted on five rootstocks. *HortScience (Prague)*, 35: 7-11.
15. Sotiropoulos, T., Syrgianidis, G., N. Koutinas. (2009). ‘Myrto’ apple. *HortScience*44(5):1452-1453.
16. Sotiropoulos, T., M. Koukourikou –Petridou, A. Petridis, D. Almaliotis, N. Koutinas, I. Therios. (2013). Assessment of quality attributes of the apple cultivar ‘Fuji Kiku 8’ grown in northern Greece. *Acta Horticulturae*. 981: 671-674
17. Stuber, C. W., Polacco, M. L. and Senior, M. L. 1999. Synergy of Empirical Breeding, Marker Assisted selection and Genomics to Increase Crop Yield Potential. *Crop Science* 39:1571-1583.
18. Tamura K., Stecher G., Peterson D., et al.(2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*30, 2725-2729.
19. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322. (διαθέσιμο στη διεύθυνση file:///C:/Users/user/AppData/Local/Temp/WhiteT.1990r.Book.pdf)
20. Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., ... & Chen, S. (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS one*, 5(10), e13102

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

21. Βασιλακάκης, Μ. (2016). Γενική και Ειδική Δεντροκομία. Εκδόσεις Γαρταγάνη, 1η έκδοση, Θεσσαλονίκη.
22. Γανόπουλος, Ι, 2013. Διερεύνηση γενετικής ποικιλότητας, ταυτοποίηση και εφαρμογή λειτουργικών δεικτών στην κερασιά (*Prunus avium L.*). Διδακτορική Διατριβή.

23. Θανόπουλος, Ρ., Σαμαράς, Στ., Γανίτης Κ., Γκατζελάκη Χ., Κόταλη Ε., Ψαρρά Ε., Κυπριωτάκης, Ζ., Τζίτζικας, Ε.Ν., Καλαϊτζής, Π., Τερζόπουλος Π. Ι., Μπεμπέλη, Π. Ι. (2008). Τοπικές ποικιλίες καλλιεργούμενων ειδών στην Κρήτη με έμφαση στα κηπευτικά Ένα δυναμικό για πολλαπλή αξιοποίηση. Γεωργία - Κτηνοτροφία, τεύχος 9:42-4
24. Θερίος Ι. και Κ. Δημάση-Θεριού. (2013). Ειδική Δενδροκομία. Εκδόσεις Γαρταγάνη
25. Μαυρομάτης, Α., Βλαχοστέργιος, Δ., Χατζηθεοδώρου, Β., (2013). Ο ρόλος των τοπικών ποικιλιών οσπρίων & η αξιοποίησή τους στην παραγωγή βελτιωμένου γενετικού υλικού. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
26. Παλαιολόγου, Δ. 2015. Ηλεκτροφόρηση DNA, στο Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίδα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., Δούκισσας, Α. Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 8. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/650>
27. Σπέλλα, Μ., Άσκηση: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) Διαθέσιμο ηλεκτρονικά (03-10-2020): <http://biologylab.eap.gr/ASKHSEIS/PCR/%CE%91%CE%BB%CF%85%CF%83%CE%B9%CE%B4%CF%89%CF%84%CE%AE%20%CE%91%CE%BD%CF%84%CE%AF%CE%B4%CF%81%CE%B1%CF%83%CE%B7%20%CE%A0%CE%BF%CE%BB%CF%85%CE%BC%CE%B5%CF%81%CE%AC%CF%83%CE%B7%CF%82%2C%20PCR%20-%20A.pdf>
28. Σωτηρόπουλος, Ζ., 2014. Οι ποικιλίες της μηλιάς, ΑγροΤύπος.
29. Σωτηρόπουλος, Θ., (2016). ΜΟΝΟΓΡΑΦΙΑ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ, ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΜΗΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ. Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός Δήμητρα.
30. Τσαυτάρης, Α., Νιάνιου- Ομπειντάτ Ε., Πολύδωρος Α., (2012). Βελτίωση φυτών. Εκδόσεις σύγχρονη παιδεία, Θεσσαλονίκη.
31. Φανουράκης, Ν., (2002). Γενετική Βελτίωση Φυτών. Εκδόσεις Ίων, Αθήνα
32. Φανουράκης, Ν. (2010). Γενετική βελτίωση φυτών: Βασικές Αρχές (2η έκδοση). Αθήνα: ΙΩΝ
33. Χατζηχαρίσης, Ι., (2015). Ο πλούτος των τοπικών ποικιλιών οπωροφόρων, 3η Επιστημονική Συνάντηση για τις γηγενείς και τοπικές ποικιλίες, Αθήνα, 6 Φεβρουαρίου 2015. Διαθέσιμο ηλεκτρονικά (03-10-2020): http://www.minagric.gr/gpa/gpa_third/omilies/xatnixarisis3.pdf

34. Χατζόπουλος, Π.,(2001).Βιοτεχνολογία φυτών. Αθήνα: Έμβρυο

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

1. http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/POP-PGE/firiki_piliou_specifications.pdf
2. <https://www.statistics.gr/documents/20181/9e0ee927-6f0f-4913-b197-d75b1b9a7330>
3. <https://www.evamakri.gr/system/uploads/asset/data/216/mhlo.pdf>
4. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
5. <https://ecovariety.azurewebsites.net/>
6. http://www.minagric.gr/gpa/omilies/BEBELI-OMILIA-final_WEB.pdf
7. <https://tsemmelis.gr/portfolio/poikilia-milia-scarlet-spur/>
8. <https://www.eckerts.com/what-vitamins-are-in-apples-apple-nutrition-facts>
9. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg
10. <https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΕΙΚΟΝΕΣ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ



Εικόνα Α.1: Ο κορμός και οι νεαροί βλαστοί του δέντρου Β19,24 (Φίλης Βαγγέλης)



Εικόνα Α.2: Ο κορμός και τα φύλλα με τους καρπούς του δέντρου Β19,96 (Φίλης Βαγγέλης)



Εικόνα Α.3: Νεαροί βλαστοί του δέντρου Β19,21 (Κύρκας Δημήτρης)



Εικόνα Α.4: Καρποί και φύλλα δέντρου Β19,100 (Φίλης Βαγγέλης)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ITS2 ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΗΛΙΑΣ

B19,96 (349 bp)

TAAAGTGAAC TCGAGTCTTTG AACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCAC
GCCTGCCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCGCCCGCGCATCCCTCGGGAGCGTCGGGGGGC
GGACGATGGCCTCCCGTGCTTACCCCGCGCGGTTGGCACAAATGCCGGGTCTCTCGGCGA
CGAACGCCACGACAATCGGTGGTCGTCGAACCTCGGTTGCCAGTTGTGCGCTTTCGTCGC
GCTCCGAGCGGCCCGCGACGCTCGCTGCTCTCGCTTCGGCGGAGCTTTC AACGCGACCCC
AGGTCAGGCGGGGTTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGGCGGGAGGAAAA

B19,82 (349 bp)

AGAGTGACTCGAGTCTTTGACGCAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCACGCCTG
CCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCGCCCGCGCTTCCCTCGGAAGGGTCGGGGGGGGACG
AAGGACGCCCTCGCGTGCCCCCGGGTGGTTGGAATGACGGGTGCTCCCTGACGAAC
GACCCACAAACAATGGGCGGCCAACCACCCTTGGTTGCTGTGTGCTTTCCTCCCGCTCCC
ACCGAGCCGCCAGGCACGCTGCTTCTCTTCCCTTGGAGGTTTCTTTCGACCCCCCGCCGG
GCGGGGGTACCCACCGAATTTATTTATATATAAAGGGAGGAAAA

B19,83 (349 bp)

AGAGTGACTCGAGTCTTTGACGCAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCACGCCTG
CCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCGCCCGCGCTTCCCTCGGAAGGGTCGGGGGGGGACG
AAGGACGCCCTCGCGTGCCCCCGGGTGGTTGGAATGACGGGTGGTCCCTCACGAAC
GACCCACAAACAATGGGCGGCCAACCACCCTTGGTTGCTGTTTGCGTTCTTTCGCTCGC
TCCGAGCGGCCAGGCACGCTGCTTCTCTTCCCTTGGAGGTTTCTTTCGACCCCCCGCCGGG
CGGGGGTACCCACCGAATTTATTTATATATAAAGGGAGGAAAA

B19,100 (349 bp)

AGAGTGACTCGAGTCTTTGACGCAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCACGCCTG
CCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCGCCCGCGCATCCCTCGGGAACGTCCGGGGGGGGACG
AAGGCTCCCGCGCGTCACCCCGCGGTTGGTGCAAATGCCGGGTCTCTCGCGACGAAC
GCCACCACAATCGGTGGTCGTCGAACCTCCGTTGCCAGTTGTGCGCTTTCCTCGCGCTCCG
AGCGGCCCGCGACGCTCGCTGCTCTCGCTTCGGCGGAGCTTTC AACGCGACCCCCGGTCA
GGCGGGGTTACCCGCTGAATTTAATCATATCAAAAAGCGGAGGAAAA

B19,41 (349 bp)

TAATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCACGCCTGCCT
GGGCGTCACACGCCGTTGCCCCCCCCGCGCATCCCTCGGGAGCGTCGGGGGGCGGACGAT
GGCCTCCCGTGCGTCACCCCGCGCGGTTGGCACAAATGCCGGGTCCTCGGCGACGAACGC
CACGACAATCGGTGGTCGTCGAACCTCGGTTGCCAGTTGTGCGCTTTCGTCGCGCTCCGA
GCGGCCCGCGACGCGCGCTGCTCACGCATCGGCGGAGCTTCAACGCGACCCCAAGGTCAG
GCGGGGTTACCCGCTGAATTTAAGCATAAAAAAACCCCGAAAGGAAAAA

B19,14 (342 bp)

CCATTGTAACCTCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTCAGGCCGAAGGGCA
CGCCTGGCCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCCCCCCGCGCATCCCTCGGGAACGTCCGGGG
GGGACGGAGGACTCCCGTGCGTCACCCCGCGCGGTTGGTTCAAATGTCGGGTCTCCGC
GACGAACGCCACCACCATCGGTGGTCGTCACCAACCACGCTTGCCTGTTGTGTGCTTTCTTTC
CGCTCCCAGCGGCCCGCGACGCTCGCTCTCTCTTCGTTGGACTTTTCTTTCCACCCCC
CGGCCGGGCGGGGTTACCTCCTAAATTTATTTATATAAAA

B19,24 (353 bp)

CCAGTTGACTCGAGTCCTTTGAACGCAGTTGCGCCCGAAGCCATTCAGGCCGAAGGGCAC
GCCTGCCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCCCCCCGCGCATCCCTCGGGAGCGTCCGGGGGG
GGACGATGGCCTCCCGTGCGTCACCCCGCGCGGTTGGCGCAAATGTCGGGTCTCGGCGA
CGAACGCCACGACAATCGGTGGTCGTCGAACCTCGGTTGCCAGTTGTGCGCTTTCTTCGC
GCTCCGAGCGGCCCGCGACGCTCGCTCTCGCTTCGGCGGAGCTTCAACGCGACCCCA
CGGTCAGGCGGGGTTACCCGCTGAATTTAAGCATATCTAGAGGGAGGAAAAAA

B19,19 (349 bp)

GCGTGGACTCGAGTCTTTGACGCAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCACGCCTG
CCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCCCCCCGCGCATCCCTCGGGAGCGTCCGGGGGGGGACG
ATGGCCTCCCGTGCTTACCCCGCGCGGTTGGCCCAAATGCCGGGTCCTCCGCGACGAAC
GCCACCACAATCGGTGGTCGTCGAACCTCGGTTGCCAGTTGTGCGCTTTCCTTCGCGCTCCG
AGCGGCCCGCGACGCCGCTGCTCTCGCTTCGGCGGAGCTTCTACGCGACCCCGGTCA
GGCGGGGTTACCCGCTGAATTTAATCATATCAAAAGCGGAGGAAAAAA

B19,21 5'-3' (353 bp)

CAACGGGACTCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCACGC
CTGCCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCCCCCCGCGCATCCCTCGGGAGCGTCCGGGGGGCSG
ACGATGGCCTCCCGTGCTTACCCCGCGCGGTTGGCCCAAATGCCGGGTCCTCGGCGACG
AACGCCACGACAATCGGTGGTCGTCGAACCTCGGTTGCCAGTTGTGCGCTTTCGTCGCG

CTCCGAGCGGCCCGCGACGCTCGCTGCTCTCGCTTCGGCGGAGCTTTCAACGCGA
CCCCAGGTCAGGCGGGGTTACCCGCTGAATTTAAGCATATCTAAAGCCCGGAGGA
AAAAA

B19, 34 (350 bp)

CCGTTGACTCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCACGCCT
GCCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCCCCCCGCGCATCCCTCGGGAGCGTCCGGGGGGGGAC
GATGGCCTCCCGTGCCTCACCCCCCGCGGTTGGCACAAATGTCGGGTCTTCGGCGACAAA
CGCCACGACAATCGGTGGTCGTCGAACCTCGGTTGCCAGTTGTGCGCTTTCTTCGCGCTCC
CAGCGGCCCGCGACGCTCGCTGCTCTCCCTTCGGTGGAGTTTTCTCCCCACCCCCGGCCA
GGGGGGGTTACCCCTGAATTTAATCAAATAAAAAGCGAAGAAAAAAA

B19,40(352bp)

ACGTTTTCCCTCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAAGGGCACGC
TGCCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCCCCCCGCGCTTCCCTCGGAAGGGCCGGGGGGGGA
CGAAGGACTCCCCCGCTCCCCCCCCCGGGTGGTTGAAATGCCGGGTCTCCCCACCA
ACGACCCACCAACAGTGGGCGTCCAACCACCCTTGTTGCTGTGTGCGTTCTTCCCGCTC
CCACCGAGCCGCCACGCACGCTGCTTTCTCTTCCCTGGAGTTTTCTTCCGACCCCCGTC
GGGCGGGGGTACTCCCTGAATTTAATATATATTAATAGAAAGAAAAAAA

B19,72 (351 bp)

CCAGTTCACTCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCACGCC
TGCCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCCCCCCGCGCATCCCTCGGGAGCGTCCGGGGGGGGGA
CGATGGCCTCCCGTGCCTCACCCCCGCGCGGTTGGCCCAAATGCCGGGTCTTCGGCGACGA
ACGCCACGACAATCGGTGGTCGTCGAACCTCGGTTGCCAGTTGTGCGCTTTCTTCGCGCTC
CGAGCGGCCCGCGACGCCCGCTGCTCTCGCTTCGGCGGAGCTTTCAACGCGACCCCCGGT
CAGGCGGGGTTACCCGCTGAATTTAATCATATCATAAATCGGAGGAAAAA

B19,137 (350 bp)

AAGTTCACTCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCACGCCT
GCCTGGGCGTCACACGCCGTTGCCCCCCCCGCGCATCCCTCGGGAGCGTCCGGGGGGGGAC
GAAGGCCTCCCGTGCCTCACCCCCCGCGGTTGGCTCAAATGCCGGGTCTTCGGCGACGAA
CGCCACGACCATCGGTGGTCGTCGAACCTCGGTTGCCAGTTGTGCGCTTTCTTCCCGCTCC
CAGCGGCCCGCGACGCTCGCTGCTCTCGCTTCCGCGGAGCTTTCTACGCGACCCCCGGTC
AGGCGGGGTTACCCGCTGAATTTAATCATATCAAAGCGGAGGAAAAAAA