



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΧΛΑΔΙΑΣ**



**Σωτηρία Τζαμαλή**

**Επιβλέπουσα: Δήμητρα Δήμου**

**Ακαδημαϊκή υπότροφος**

**Άρτα Φεβρουάριος 2021**

**MOLECULAR IDENTIFICATION OF GREEK PEAR  
VARIETIES**

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Άρτα, 22 Φεβρουαρίου 2021

### **ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ**

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

© Τζαμαλή, Σωτηρία, 2021.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του Ν. 2121/1993 περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι η παρούσα πτυχιακή 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.

Τζαμαλή Σωτηρία

Υπογραφή

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Δήμου Δήμητρα πρωτίστως για την εμπιστοσύνη που έδειξε ως προς το πρόσωπό μου, την άψογη συνεργασία και για την καθοδήγηση της όλο αυτόν τον καιρό. Η βοήθειά και οι συμβουλές της κατά την διεξαγωγή του πειράματος καθώς και κατά την συγγραφή της πτυχιακής εργασίας ήταν καθοριστική. Θερμές ευχαριστίες στον καθηγητή κύριο Πατακιούτα Γεώργιο και στην καθηγήτρια κυρία Υφαντή Παρασκευή για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή και στην ανάγνωση της πτυχιακής εργασίας μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τα άτομα που είναι κοντά μου και κυρίως την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει θέμα τη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας και την ταυτοποίηση τοπικών παραδοσιακών ποικιλιών αχλαδιάς. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκαν δεκατρείς τοπικές ποικιλίες αχλαδιάς που εντοπίστηκαν στον ορεινό όγκο της Ηπείρου. Ο εντοπισμός των ποικιλιών έγινε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος EcoVariety. Ο φυλογενετικός χαρακτηρισμός των ποικιλιών βασίστηκε στην ανάλυση της αλληλουχίας της ITS2 (internal transcribed spacer 2, εσωτερικό μεταγραφόμενο διάστημα 2) περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA. Οι αλληλουχίες της περιοχής ITS2 ενισχύθηκαν με την τεχνική PCR και τη χρήση των καθολικών εκκινητών ITS2-S2F και ITS4.

Σύμφωνα με την παραπάνω ανάλυση οι ποικιλίες B19,45, B19,22, B19,89 και B19,44 αποτελούν μια φυλογενετική ομάδα που βρίσκεται πλησιέστερα στο *Pyrus communis* ενώ οι ποικιλίες B19,63, B19,64, B19,65, B19,70, B19,80, B19,90, B19,92, B19,128 και B19,130 αποτελούν μια δεύτερη φυλογενετική ομάδα που βρίσκεται πλησιέστερα στο *Pyrus cordata*. Επίσης, η ανάλυση του γενετικού υλικού έδειξε μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ των ποικιλιών.

**Λέξεις-κλειδιά:** Αχλαδιά, τοπικές ποικιλίες, παραδοσιακές ποικιλίες, μοριακοί δείκτες, *Pyrus communis*

## **ABSTRACT**

The present study concerning the research of genetic diversity and the identification of local traditional pear varieties . More specifically, thirteen local pear varieties, located in the mountainous region of Epirus, were analyzed. 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 pear 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.

According with the above analysis the varieties B19,45, B19,22, B19,89 and B19,44 are a phylogenetic group which is located closer to *Pyrus communis*, while the varieties B19,63, B19,64, B19,65, B19,70, B19,80, B19,90, B19,92, B19,128 and B19,130 represent a second phylogenetic group which is located closer to *Pyrus cordata*. Furthermore, the genetic analysis showed a high level of diversity among the varieties.

**Keywords:** Pears, local varieties, molecular markers, *Pyrus communis*, ITS2 nrDNA



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT .....	v
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	x
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ/ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ .....	xiii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	xv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> : Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΑΧΛΑΔΙΑΣ.....	1
1.1 Καταγωγή και Γεωγραφική εξάπλωση της αχλαδιάς .....	1
1.2 Παραγωγή - Οικονομική σημασία της καλλιέργειας.....	1
1.3 Διατροφική αξία των αχλαδιών .....	4
1.4 Βοτανική ταξινόμηση – Περιγραφή του δένδρου.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> : ΦΥΤΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΡΟΙ ΚΑΙ ΤΟΠΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ.....	15
2.1 Φυτογενετικοί Πόροι: Ορισμός -Σημασία .....	15
2.2 Τοπικές Ποικιλίες – Σημασία διατήρησής τους .....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> : ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ .....	18
3.1 Μορφολογικοί δείκτες .....	18
3.2 Βιοχημικοί δείκτες .....	19
3.3 Μοριακοί δείκτες .....	19
3.4 Η περιοχή ITS2 του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA) ως φυλογενετικός μοριακός δείκτης .....	21
ΜΕΡΟΣ Β. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> .....	23
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
4.1 Φυτικό Υλικό .....	23
4.2 Συλλογή και αποθήκευση φυτικού υλικού. ....	25

4.3 Λυοφιλοποίηση φυτικών ιστών.....	25
4.4 Απομόνωση γενωμικού DNA από το φυτικό υλικό .....	26
4.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης <b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>	
Αρχή της μεθόδου.....	30
4.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	36
Αρχή της μεθόδου.....	36
Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	41
4.7 Σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών – Φυλογενετική ανάλυση.....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 <sup>ο</sup> .....	43
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	43
5.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικό υλικό τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς ...	43
5.2 Ανάλυση αλληλουχιών της περιοχής ITS2 του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA) .....	45
5.3 Φυλογενετική ανάλυση των τοπικών ποικιλιών του γένους <i>Pyrus</i> με βάση τις αλληλουχίες της περιοχής ITS2 nrDNA.....	52
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄ .....	59
• ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ITS2 ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΧΛΑΔΙΑΣ.....	59
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄ .....	62
• ΕΙΚΟΝΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	62

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Κυριότερες χώρες παραγωγής αχλαδιών σε Kg (2012) (Μολοσιώτης, χ.χ.).....	2
Πίνακας 2. Παραγωγή αχλαδιών στην Ευρώπη (χιλ. τόνοι) (Βασιλακάκης, 2016).....	2
Πίνακας 3. Παραγωγή αχλαδιού σε τόνους τα τελευταία έτη στην Ελλάδα (Ελληνική Στατιστική Αρχή) .....	3
Πίνακας 4. Παραγωγή αχλαδιών σε διάφορες περιφέρειες της Ελλάδος, 2018 σε τόνους (Ελληνική Στατιστική Αρχή).....	4
Πίνακας 5. Θρεπτική αξία ενός αχλαδιού βάρους 148g (Βουτσά, 2018) .....	5
Πίνακας 6. Βοτανική ταξινόμηση των κυριότερων καλλιεργούμενων ειδών.....	5
Πίνακας 7. Εποχή ωρίμανσης των κυριότερων ποικιλιών αχλαδιάς.....	10
Πίνακας 8. Τοπικές παραδοσιακές ποικιλίες αχλαδιάς που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία .....	24
Πίνακας 9. Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γενωμικού DNA από τους φυτικούς ιστούς .....	27
Πίνακας 10. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γενωμικού DNA από τους φυτικούς ιστούς .....	27
Πίνακας 11. Αντίδραση PCR .....	40
Πίνακας 12. Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR .....	40
Πίνακας 13. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,22.....	47
Πίνακας 14. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,44.....	47
Πίνακας 15. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,45.....	48
Πίνακας 16. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,63.....	48
Πίνακας 17. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,64.....	48
Πίνακας 18. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,65.....	49
Πίνακας 19. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,70.....	49

Πίνακας 20. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,80.....	49
Πίνακας 21. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,89.....	50
Πίνακας 22. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,90.....	50
Πίνακας 23. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,92.....	50
Πίνακας 24. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,128.....	51
Πίνακας 25. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,130.....	51

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Δένδρο αγλαδιάς .....	6
Εικόνα 2. Φύλλα δένδρου αγλαδιάς .....	7
Εικόνα 3. Άνθη αγλαδιάς .....	8
Εικόνα 4. Καρπός αγλαδιάς.....	8
Εικόνα 5. Κυριότερες ποικιλίες αγλαδιάς στην Ελλάδα (Ελληνική Στατική Αρχή, 2018)...	9
Εικόνα 6. Καρπός της ποικιλίας Κρυστάλλι .....	10
Εικόνα 7. Καρπός ποικιλίας Κοντούλα .....	11
Εικόνα 8. Καρπός ποικιλίας William's .....	12
Εικόνα 9. Καρπός ποικιλίας Sissy .....	13
Εικόνα 10. Καρπός ποικιλίας Highland .....	14
Εικόνα 11. Τοπικές παραδοσιακές ποικιλίες αγλαδιάς .....	17
Εικόνα 12. Τοπικές ποικιλίες αγλαδιάς .....	17
Εικόνα 13. Διάγραμμα της βασικής δομής του nrDNA στα φυτά .....	21
Εικόνα 14. Συσκευή λυοφιλοποίησης (λυοφιλοποιητής) .....	26
Εικόνα 15. Συσκευή Vortex .....	28
Εικόνα 16. Συσκευή φυγοκέντρησης .....	28
Εικόνα 17. Λυοφιλοποιημένα φύλλα .....	30
Εικόνα 18. Εναιώρημα λειοτριβημένου φυτικού ιστού δείγματος αγλαδιάς σε διάλυμα λύσης .....	31
Εικόνα 19. Ο χημικός τύπος του πολυσακχαρίτη αγαρόζη.....	31
Εικόνα 20. Συσκευή ηλεκτροφόρησης μαζί με το τροφοδοτικό της.....	33
Εικόνα 21. Τράπεζα Υπεριώδης Ακτινοβολίας και σύστημα ψηφιακής απεικόνισης πηκτωμάτων νουκλεϊκών οξέων.....	34
Εικόνα 22. 1Kb DNA Ladder plus .....	35
Εικόνα 23. Βακτήριο <i>Thermus aquaticus</i> .....	37
Εικόνα 24. Στάδια της αντίδρασης PCR (πλήρης κύκλος) .....	38
Εικόνα 25. 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 .....	39
Εικόνα 26. Συσκευή PCR.....	41

Εικόνα 27. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v γενωμικών DNA τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς B19,22 (διαδ. 2), B19,63 (διαδ. 3), B19,64 (διαδ. 4), B19,70 (διαδ. 5), B19,80 (διαδ. 6), B19,92( διαδ.7), B19,130(διαδ.8) Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder .....	43
Εικόνα 28. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v γενωμικών DNA τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς: B19,44 (διαδ. 2), B19,45 (διαδ. 3), B19,65 (διαδ. 4), B19,89 (διαδ. 5). Διαδ.: 1: 1 Kb DNA Ladder .....	44
Εικόνα 29. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v γενωμικών DNA τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς: B19,90 (διαδ. 2), B19,128 (διαδ. 3). Διαδ. 1: 1 Kb DNA Ladder...44	
Εικόνα 30. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,5% w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς και εκκινητές ITS2-2F και ITS4. Διαδ.: 1: 1 Kb DNA Ladder – 2: B19,65 – 3 Αρνητικός μάρτυρας – 4: B19,92 – 5: B19,130 – 6: B19,80 – 7: B19,22 – 8: B19,44 .....	45
Εικόνα 31. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,5 % w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς και εκκινητές ITS2-2F και ITS4. Διάδρομος: 1: 1 Kb DNA Ladder – 2: B19,45 – 3: B19,70 – 4: Αρνητικός μάρτυρας .....	46
Εικόνα 32. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,5 % w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς και εκκινητές ITS2-2F και ITS4. Διάδρομος: 1: 1 Kb DNA Ladder plus – 2: Αρνητικός μάρτυρας – 3: B19,89 – 4: B19,128 – 5: B19,90 – 6: B19,63 – 7: B19,64 .....	46
Εικόνα 33. Φυλογενετικές σχέσεις των τοπικών ποικιλιών του γένους <i>Pyrus</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 34. Δένδρο δείγματος B19,22 .....	62
Εικόνα 35 Καρποί δείγματος B19,22 .....	62
Εικόνα 36. Καρποί δείγματος B19,44 .....	63
Εικόνα 37. Καρποί δείγματος B19,63 .....	63
Εικόνα 38. Καρποί δείγματος B19,65 .....	64
Εικόνα 39. Καρποί δείγματος B19,80	Εικόνα 40. Δένδρο δείγματος B19,80
.....	.....
Εικόνα 41. Καρποί δείγματος B19,89 .....	65

Εικόνα 42. Καρποί δείγματος B19,90 δείγματος B19,90.....	Εικόνα 43. Δένδρο-κορμός .....
Εικόνα 44. Καρποί δείγματος B19,92 .....	65
Εικόνα 45. Καρποί του δείγματος B19,128.....	66
Εικόνα 46. Καρπίδια δείγματος B19,130 .....	66
	67

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ/ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

AFLP= Amplified Fragment Length Polymorphism= Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων

BLAST= Basic Local Alignment Statistical Tool = Εργαλείο Έρευνας Βασικής Τοπικής Ευθυγράμμισης

DNA= DeoxyriboNucleic Acid= Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ

ETS= External Transcribed Spacer= Εξωτερικό Μεταγραφόμενο Διάστημα

FAO= Food and Agriculture Organization= Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας

gr= γραμμάρια

IGS= InterGenic Spacer= διαγονιδιακό διάστημα

ITS= Internal Transcribed Spacer= Εσωτερικό Μεταγραφόμενο Διάστημα

Kg = κιλά

min= minute= λεπτά της ώρας

NCBI= National Center of Biotechnology Information= Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικής Πληροφόρησης

nrDNA= πυρηνικού ριβοσωμικού DNA

NTS= Non Transcribed Spacer= μη μεταγραφόμενο διάστημα

PCR= Polymerase Chain Reaction= Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

RAPDs= Random Amplified Polymorphic DNAs= Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά τμήματα DNA

RFLPs= Restriction Fragment Length Polymorphisms= Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA

RNA= ribonucleic acid= ριβονουκλεϊκό οξύ

sec= second= δευτερόλεπτα της ώρας

SNP= Single Nucleotide Polymorphism= μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός



SSRs= Simple Sequence Repeats- Microsatellite= απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες  
-Μικροδορυφόροι

SNPs= Single Nucleotide Polymorphisms= πολυμορφισμού απλού νουκλεοτιδίου

sp= species= είδη

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένα από τα πιο διαδεδομένα καλλιεργούμενα φυτικά είδη στον πλανήτη είναι η αχλαδιά.. Γνωστή από την αρχαιότητα, η καλλιέργεια της αχλαδιάς ανταποκρίνεται όλο και περισσότερο στην συνεχή αύξηση της κατανάλωσης αχλαδιού παγκοσμίως, καθώς το αχλάδι είναι από τα φρούτα με την μεγαλύτερη διατροφική αξία.

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές επιστημονικές μελέτες αναφέρονται στην αξιολόγηση του γενετικού υλικού και στον χαρακτηρισμό των ποικίλων γενοτύπων που διαθέτουν διάφορες περιοχές του ελλαδικού χώρου. Ωστόσο, οι τοπικές παραδοσιακές ποικιλίες αποτελούν βασικό γενετικό υλικό, καθώς μέσω της διατήρησής τους προσφέρουν στους γενετιστές και στους βελτιωτές μεγάλη γενετική ποικιλότητα. Η ταξινόμηση και η ταυτοποίηση των ποικιλιών, σε σημαντικό βαθμό στηρίζεται σε διάφορες τεχνικές ανάλυσης του γονιδιώματος όπως είναι οι μοριακοί γενετικοί δείκτες. Οι μοριακοί δείκτες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη γενετική ανάλυση-αξιολόγηση διάφορων ποικιλιών φυτικών ειδών, όπως και της αχλαδιάς.

Η παρούσα εργασία αποτελείται από τέσσερα κεφάλαια.

Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στην σημασία της καλλιέργειας της αχλαδιάς, ενώ στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφονται οι κυριότερες τοπικές παραδοσιακές ποικιλίες αχλαδιάς που καλλιεργούνται στον ελλαδικό χώρο, καθώς επίσης γίνεται ανάλυση στη σημασία διατήρησης των τοπικών ποικιλιών.

Στο τρίτο κεφάλαιο αναφέρονται οι μέθοδοι ταυτοποίησης των ποικιλιών.

Στο τέταρτο κεφάλαιο γίνεται αναλυτική περιγραφή των σταδίων-μέθοδών ολοκλήρωσης του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής: 1) συλλογή του φυτικού υλικού (φύλλα) από την αχλαδιά, 2) απομόνωση του γενωμικού DNA από το φυτικό υλικό, 3) ενίσχυση της αλληλουχίας της ITS2 (internal transcribed spacer 2, εσωτερικό μεταγραφόμενο διάστημα 2) περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA με την τεχνική PCR 4) Φυλογενετική ανάλυση των τοπικών ποικιλιών με βάση τις αλληλουχίες της περιοχής ITS2 nrDNA.

**Σκοπός** της παρούσας μελέτης είναι η ταξινόμηση και η διερεύνηση των γενετικών σχέσεων τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς (*Pyrus* 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<sup>ο</sup> : Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΑΧΛΑΔΙΑΣ

### 1.1. Καταγωγή και Γεωγραφική εξάπλωση της αχλαδιάς

Η αχλαδιά ήταν γνωστή από τους αρχαίους Έλληνες ως «δώρο των Θεών στους ανθρώπους». Ο Όμηρος, γύρω στα 800 π.Χ., αναφέρεται στην αχλαδιά, ενώ γίνεται αναφορά και από τον Θεόφραστο γύρω στα 300 π.Χ.. Ο Cato, το 235-150 π.Χ., περιέγραφε παρόμοιες μεθόδους καλλιέργειας με αυτές που χρησιμοποιούνται στην εποχή μας, όπως και ο Πλίνος γύρω στο 23-79 π.Χ. περιγράφει 35 ποικιλίες που καλλιεργούνταν στην Ρώμη. Οι αρχαίοι Ρωμαίοι, επίσης, συνεισέφεραν σημαντικά στην διάδοση της αχλαδιάς, καθώς ασχολήθηκαν αρκετά με διάφορες βελτιώσεις στον αγρό και δημιούργησαν περίπου 50 ποικιλίες. Σήμερα, υπάρχουν περισσότερες από 15.000 ποικιλίες αχλαδιάς στον κόσμο (<https://gaiagreek.gr/>).

Τα διάφορα είδη αχλαδιάς που υπάρχουν προέρχονται από δύο κύρια είδη, την Ευρωπαϊκή ή καρδιόσχημη αχλαδιά (*Pyrus communis*) και την ΝΑΣΙ ή αχλαδόμηλα (ασιάτικα ή ιαπωνικά αχλάδια, *Pyrus pyrifolia*). Η Ευρωπαϊκή αχλαδιά κατάγεται από την περιοχή της δυτικής Ασίας, γύρω από την Κασπία θάλασσα και καλλιεργείται στην Ευρώπη από τον 17<sup>ο</sup> αιώνα, σε αντίθεση με την Ασιατική αχλαδιά, η οποία είναι σε παγκόσμια κλίμακα πιο διαδεδομένη και κατάγεται από την Βόρεια Ασία και καλλιεργείται σε πολλές χώρες όπως είναι η Κίνα, η Ιαπωνία, η Κορέα καθώς και σε άλλες ανατολικές χώρες.

### 1.2. Παραγωγή - Οικονομική σημασία της καλλιέργειας

Σε παγκόσμια κλίμακα η αχλαδιά αποτελεί το δεύτερο πιο σπουδαίο φυλλοβόλο οπωροφόρο δένδρο αμέσως μετά την μηλιά. Χώρες όπως η Ιταλία, η Ισπανία, οι Η.Π.Α. και η Γαλλία θεωρούνται χώρες με μεγάλη παραγωγή Ευρωπαϊκών αχλαδιών, σε αντίθεση με την Κίνα και την Ιαπωνία που αποτελούν τις κύριες χώρες παραγωγής ασιάτικων αχλαδιών.

Πίνακας 1. Κυριότερες χώρες παραγωγής αχλαδιών σε Kg (2012) (Μολοσιώτης, χ.χ.)

Χώρα	Ποσότητα (Kg)	%
Ισπανία	4,817,757	42,23
Ιταλία	2,261,261	19,82
Αργεντινή	2,208,653	19,36
Κάτω Χώρες	194,894	4,34
Νότια Αφρική	459,818	4,03
Γερμανία	397,090	3,48
Χιλή	340,772	2,99
Βουλγαρία	123,519	1,08
Κίνα	97,760	0,86
Βέλγιο	84,012	0,74

Στην Ευρώπη, σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία, κατά την χρονική περίοδο 2012 η παγκόσμια παραγωγή αχλαδιών κυμαινόταν στους 1888 χιλιάδες τόνους, ενώ το έτος 2013 αυξήθηκε στους 2330 χιλιάδες τόνους, με κυριότερες χώρες παραγωγής αχλαδιών την Ιταλία και την Ισπανία (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Παραγωγή αχλαδιών στην Ευρώπη (χιλ. τόνοι) (Βασιλακάκης, 2016)

Χώρα	2012	2013
Βέλγιο	236	315
Γαλλία	124	157
Ελλάδα	42	32
Ισπανία	365	403
Ιταλία	650	726
Πολωνία	45	65
Πορτογαλία	115	162
Άλλες χώρες	324	470
Σύνολο	1888	2330

Η χώρα μας βρίσκεται στην ένατη θέση αμέσως μετά την Πολωνία. Μετά το 1990, στην χώρα μας έχει παρατηρηθεί ότι η καλλιεργητική έκταση αλλά και η παραγωγή αχλαδιών έχει μειωθεί, με επακόλουθο γίνεται εισαγωγή αχλαδιών κυρίως από Ισπανία, Ιταλία και Αργεντινή. Τα κυριότερα αίτια που οδήγησαν στο αποτέλεσμα αυτό είναι τα ακόλουθα:

- 1) το υψηλό κόστος καλλιέργειας, 2) η χαμηλή παραγωγικότητα και 3) η επιδημία του βακτηριακού καψίματος το 1988 (Νάνος Γ., 2013). Τα τελευταία έτη όμως διαπιστώνεται ότι η παραγωγή αχλαδιών στη χώρα μας σταδιακά αυξάνεται (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Παραγωγή αχλαδιού σε τόνους τα τελευταία έτη στην Ελλάδα (Ελληνική Στατιστική Αρχή)

Έτος	Παραγωγή
2018	100.807
2017	100.028
2016	99.839
2015	32.357
2014	30.626
2013	80.170
2012	87.671
2011	90.257

Πιο αναλυτικά, στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται η παραγωγή αχλαδιού ανά περιφέρεια της χώρας κατά το έτος 2018. Όπως παρατηρείται, η περιφέρεια με την μεγαλύτερη παραγωγή είναι η Θεσσαλία με 57.992 τόνους αχλαδιών, με σημαντική θέση να κατέχει ο νομός Λάρισας με παραγωγή 54.036 τόνους.

Πίνακας 4. Παραγωγή αχλαδιών σε διάφορες περιφέρειες της Ελλάδος, 2018 σε τόνους (Ελληνική Στατιστική Αρχή)

Περιφέρεια Ελλάδος	Παραγωγή
Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης	2.466
Κεντρικής Μακεδονίας	24.169
Δυτικής Μακεδονίας	1.389
Ηπείρου	477
Θεσσαλίας	57.992
Στερεάς Ελλάδας	1.306
Ιόνιων Νήσων	210
Δυτικής Ελλάδας	3.899
Πελοποννήσου	5.675
Αττικής	43
Βόρειου Αιγαίου	411
Νότιου Αιγαίου	238
Κρήτης	2.532
Σύνολο Ελλάδος	100.807

### 1.3. Διατροφική αξία των αχλαδιών

Το αχλάδι έχει μεγάλη διατροφική αξία και ευεργετικά οφέλη στην υγεία των καταναλωτών του. Η αξία του οφείλεται στα θρεπτικά συστατικά που περιέχει, εκ των οποίων τα κυριότερα είναι οι φυτικές ίνες, τα αντιοξειδωτικά, τα μέταλλα και οι βιταμίνες. Η υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες συμβάλει στην μείωση του κινδύνου ανάπτυξης του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Επιπλέον, μειώνουν τον κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου και διαφόρων καρδιαγγειακών παθήσεων. Επιπλέον, τα αχλάδια έχουν αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Η αντιοξειδωτική τους αξία βασίζεται κατά κύριο λόγο στην υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη C, σε αντίθεση με την αντιφλεγμονώδη αξία που βασίζεται στις βιταμίνες και τα μέταλλα όπως ο χαλκός και οι βιταμίνες C και K που καταπολεμούν τη φλεγμονή. Αποτελούν από τα πιο εύπεπτα φρούτα και γι' αυτό το λόγο έχουν άμεση σχέση με την κινητικότητα του εντέρου και με την πρόληψη της δυσκοιλιότητας. Τέλος, το αχλάδι ανήκει στα φρούτα με τις λιγότερες θερμίδες, περιέχει νερό και ίνες, γεγονός που το καθιστά από τα πιο ιδανικά και

κατάλληλα προϊόντα για την διατροφή και την απώλεια του σωματικού βάρους. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζεται η θρεπτική αξία του ενός μέτριου αχλαδιού των 148 gr

Πίνακας 5. Θρεπτική αξία ενός αχλαδιού βάρους 148g (Βουτσά, 2018)

Θρεπτική Αξία		Θρεπτική Αξία	
Νερό (g)	124	Μαγνήσιο (mg)	10,4
Ενέργεια (Kcal)	85,8	Φώσφορος (mg)	16,3
Πρωτεΐνες (g)	0,6	Κάλιο (mg)	176
Λιπαρά (g)	0,2	Νάτριο (mg)	1,5
Υδατάνθρακες (g)	22,9	Φυτοστερόλες (mg)	11,8
Φυτικές ίνες (g)	4,6	Βιταμίνη Α (IU)	34
Ασβέστιο (mg)	13	Βιταμίνη C (mg)	6,2
Σίδηρος (mg)	0,3	Φυλλικό οξύ (mcg)	10,4

#### 1.4. Βοτανική ταξινόμηση – Περιγραφή του δένδρου

Η αχλαδιά κατατάσσεται στα καρποφόρα δένδρα και στην ομάδα των Μηλοειδών ή Γυγαρτόκαρπων. Σύμφωνα, με την βοτανική ταξινόμηση, η ταξινόμηση του δένδρου της αχλαδιάς είναι ως εξής:

Πίνακας 6. Βοτανική ταξινόμηση των κυριότερων καλλιεργούμενων ειδών

Βασίλειο	Plantae
Διαίρεση	Magnoliophyta
Κλάση	Magnoliopsida
Τάξη	Rosales
Οικογένεια	Rosaceae
Γένος – Είδος	<i>Pyrus communis</i> (Ευρωπαϊκή αχλαδιά)
Γένος – Είδος	<i>Pyrus pyrifolia</i> (Ιαπωνική αχλαδιά)

Περισσότερα από 20 είδη περιλαμβάνει το γένος *Pyrus* τα οποία κατάγονται από την Ευρώπη και την Ασία και τα περισσότερα από αυτά χρησιμεύουν ως υποκείμενα, όπως τα *P. amygdaliformis* (γκορτσιά) *P. betulaeifolia* και *P. ussuriensis*. Στην Ελλάδα είναι αρκετά διαδεδομένο δένδρο είτε ως επαγγελματική καλλιέργεια είτε ως δένδρο οικιακού οπωρώνα (<https://www.kipogeorgiki.gr/>)

Η αχλαδιά ανήκει στα φυλλοβόλα δένδρα. Είναι πολυετές και ανάλογα με το υποκείμενο που χρησιμοποιείται, είναι μικρού έως μεγάλου μεγέθους. Εμβολιασμένη σε υποκείμενα κυδωνιάς το δένδρο της αχλαδιάς γίνεται νάνο και ζει γύρω στα 20 χρόνια. Αντίθετα, όταν είναι εμβολιασμένο σε σπορόφυτο αχλαδιάς φτάνει περίπου το ύψος των 5-6 μέτρων και ζει αρκετά χρόνια.



*Εικόνα 1. Δένδρο αχλαδιάς*

Ο φλοιός έχει καστανό χρώμα, είναι λείος στην αρχή, όπου με την πάροδο του χρόνου γίνεται πιο τραχύς. Το ξύλο του κορμού της αχλαδιάς είναι σκληρό και χρησιμοποιείται και στην ξυλουργική.

Τα φύλλα της αχλαδιάς είναι πράσινα και λαμπερά, απλά, εναλλασσόμενα και έχουν μακρύ μίσχο. Σχήματος ωοειδή ή καρδιόσχημα με προιονωτές παρυφές και λεπτά με έντονη διαπνοή. Αποκτούν κοκκινωπές αποχρώσεις το φθινόπωρο πριν πέσουν.





*Εικόνα 2. Φύλλα δένδρου αχλαδιάς*

Οι οφθαλμοί διακρίνονται σε βλαστοφόρους και σε μικτούς καρποφόρους. Βρίσκονται πλάγια ή επάκρια των βλαστών. Οι βλαστοφόροι οφθαλμοί της αχλαδιάς έχουν κωνικό σχήμα και δεν φέρουν χνούδι. Ακόμη, οι οφθαλμοί αυτοί σχηματίζουν στο σημείο έκφυσής τους με τον βλαστό οξεία γωνία.

Η αχλαδιά καρποφορεί σε αιχμές, λαμβούρδες, ασκούς και λεπτοκλάδια όπως και η μηλιά. Τα άνθη εμφανίζονται σε ταξιανθία κόρυμβο και κατά την άνθηση συνήθως πρώτα εκπτύσσονται τα πλάγια άνθη και μετά το βασιλικό άνθος. Κάθε άνθος αποτελείται από 5 πέταλα, 5 σέπαλα και 20 -30 στήμονες, που φέρουν κόκκινους ανθήρες. Ο αριθμός των στηλών κυμαίνεται από 2-5 και είναι ενωμένοι στη βάση τους. Τα πέταλα των ανθέων είναι συνήθως λευκά και σπανιότερα ρόδινα. Η αχλαδιά ανθίζει την Άνοιξη λίγο πιο νωρίς από την μηλιά με σημαντικές διαφορές ως προς τον χρόνο ανθοφορίας μεταξύ των ποικιλιών καθώς και από χρονιά σε χρονιά. Ελάχιστη μέση ημερήσια θερμοκρασία για την έναρξη της άνθησης είναι 9 °C. Το νέκταρ των ανθέων της αχλαδιάς είναι φτωχό σε σάκχαρα και έτσι οι μέλισσες δεν τα επισκέπτονται αν υπάρχουν άλλα είδη ανθισμένα. Γι' αυτό, για να επιτευχθεί καλή επικονίαση συνιστάται η τοποθέτηση μίας κυψέλης / 2-4 στέμματα καλλιέργειας. Οι περισσότερες ποικιλίες αχλαδιάς είναι αυτόστειρες και για μια καλή καρπόδεση χρειάζονται επικονιάστριες ποικιλίες.



*Εικόνα 3. Άνθη αχλαδιάς*

Ο καρπός της αχλαδιάς είναι άπιο, ψευδής καρπός, διότι στο σχηματισμό του συμμετέχουν και άλλα μέρη του άνθους εκτός από την ωοθήκη. Ο ανθικός σωλήνας θεωρείται το εδώδιμο μέρος του καρπού, ο οποίος σχηματίζεται από τις βάσεις των πετάλων, των στημόνων και των σεπάλων. Ο καρπός έχει σχήμα σφαιρικό-πεπιεσμένο ή αχλαδόμορφο, με ή χωρίς κάλυκα και σάρκα συνήθως με λιθώδη κύτταρα. Στις πρώιμες ποικιλίες της αχλαδιάς τα σπέρματα του ώριμου καρπού είναι λευκά, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ποικιλίες που εμφανίζονται ελαφρώς μαύρα ή μαύρα (Ποντίκης, 1994 Βασιλακάκης, 2016 κ.α.).



*Εικόνα 4. Καρπός αχλαδιάς*

## 1.5. Ποικιλίες αχλαδιάς που καλλιεργούνται στην Ελλάδα

Υπάρχουν εκατοντάδες ποικιλίες αχλαδιάς που καλλιεργούνται στην χώρα μας. Οι περισσότερες ποικιλίες έχουν προκύψει από την Ευρωπαϊκή αχλαδιά (*Pyrus communis* L.). Οι κυριότερες από αυτές που καλλιεργούνται ή εισάγονται στην πατρίδα μας είναι οι εξής: Τσακόνικη ή Κρυστάλλι, Κοντούλα, Abate Fetel, William's, Sissy, Passa Crassane, Decana del Comicio, Kaiser Alexander (Bosc), Highland, Corsia, Santa Maria, Harrow Sweet, Carmen, Conferense, Tosca, Etrusca, Packham's Triumph. Ακόμη, υπάρχουν και οι ερυθρές ποικιλίες, στις οποίες συγκαταλέγονται οι ακόλουθες: Red Bartlett, Red Anjou, Starkcrimson, Sensation, Cascade και πολλές άλλες. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 5, η κυριότερη ποικιλία αχλαδιάς είναι η Κρυστάλλι (τσακόνικο) και ακολουθούν οι ποικιλίες Κοντούλα, Highland και William's.



Εικόνα 5. Κυριότερες ποικιλίες αχλαδιάς στην Ελλάδα (Ελληνική Στατική Αρχή, 2018)

Ωστόσο, με βάση την εποχή ωρίμανσης οι ποικιλίες της αχλαδιάς κατατάσσονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, οι οποίες είναι οι: α) πρώιμες ποικιλίες, β) ποικιλίες μέσης εποχής και γ) όψιμες ή φθινοπωρινές ποικιλίες αχλαδιάς. Στον ακόλουθο πίνακα, παρουσιάζονται οι κυριότερες ποικιλίες αχλαδιάς στην Ελλάδα ανάλογα με την εποχή ωρίμανσης.

Πίνακας 7. Εποχή ωρίμανσης των κυριότερων ποικιλιών αχλαδιάς

Πρώιμες ποικιλίες	Μέσης εποχής ποικιλίες	Όψιμες ποικιλίες
Κοντούλα	Κρυστάλλι	Abate Fetel
Corsia	William's	Highland
Santa Maria	Sissy	Conference

Η **Κρυστάλλι** ή αλλιώς **Τσακώνικη** αποτελεί την βασικότερη φθινοπωρινή ελληνική ποικιλία αχλαδιάς. Αποτελεί κύρια καλλιέργεια, κυρίως στη Μακεδονία και στην Βόρεια Πελοπόννησο. Θεωρείται από τις πιο διαδεδομένες ποικιλίες και έρχεται πρώτη σε πωλήσεις. Είναι ζωνρή ποικιλία και με πολύ παραγωγικότητα, αν και αργεί να εισέλθει σε καρποφορία. Μειονέκτημα της είναι η ευπάθεια στο φουζικλάδιο και στο βακτηριακό κάψιμο. Έχει μέτριου μεγέθους καρπό με πρασινοκίτρινο χρώμα, είναι εύγεστος και χυμώδης με λευκή και λίγο υπόξινη σάρκα. Ο καρπός ωριμάζει γύρω στις 25 Αυγούστου, ενώ συγκομίζεται ανάλογα με την χρήση σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Για συντήρηση συγκομίζεται το πρώτο δεκαήμερο του Αυγούστου, αντίθετα όταν πρόκειται για κατανάλωση συγκομίζεται το δεύτερο δεκαήμερο του Αυγούστου. Συστήνεται για ορεινές περιοχές με χαμηλές θερμοκρασίες (Βασιλακάκης, 2016).



Εικόνα 6. Καρπός της ποικιλίας Κρυστάλλι

Η Ελληνική ποικιλία **Κοντούλα** κατατάσσεται ως θερινή ποικιλία αχλαδιάς. Αν και πρωτοδημιουργήθηκε στην Κόρινθο, πλέον στο εμπόριο υπάρχουν αρκετές παραλλαγές της ποικιλίας αυτής καθώς και υβρίδια (Συργιανίδης-ΙΦΔΝ-πρώην ΕΘΙΑΓΕ). Ο καρπός της ποικιλίας αυτής διαθέτει τα εξής ιδιαίτερα χαρακτηριστικά:

- Έχει μικρό έως μέτριο μέγεθος με κοντό κοτσάνι
- Το χρώμα ποικίλλει από κοκκινωπό έως γκριζοπράσινο
- Σχήματος στρογγυλό-αχλαδόμορφο
- Η σάρκα του είναι λευκή, χυμώδης, συνεκτική, γλυκιά και αρωματική με αρκετά λιθώδη κύτταρα
- Ωριμάζει το πρώτο δεκαπενθήμερο του Ιουλίου και δεν συντηρείται στο ψυγείο



*Εικόνα 7. Καρπός ποικιλίας Κοντούλα*

Συμπεριλαμβάνεται στις αυτόστειρες ποικιλίες αχλαδιάς, δηλαδή στις ποικιλίες όπου χρειάζεται επικονιαστή, όπως για παράδειγμα την μέλισσα και επικονιάστριες ποικιλίες, όπως η Coscia και η Κρυστάλλι. Δένδρο μέτριου μεγέθους, πολύ παραγωγικό, μπορεί να εμφανίσει αγκάθια. Η Κοντούλα θεωρείται από τις ποικιλίες που έχει πολλή καλή συμφωνία με το υποκείμενο της κυδωνιάς, ενώ παράλληλα είναι ευαίσθητη στο βακτηριακό κάψιμο. Ιδανικό δένδρο για ορεινές περιοχές και χαμηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, χαρακτηριστικό μειονέκτημα της ποικιλίας αυτής είναι η σποραδική ωρίμανση των καρπών και η πτώση αυτών μόλις ωριμάσουν (Βασιλακάκης, 2016).

Μία, ακόμη, σημαντική ποικιλία αχλαδιάς είναι η **William's**, γνωστή και ως Barlett. Αν και έχει προέλθει από τυχαίο σπορόφυτο στην Αγγλία θεωρείται πρώτη ποικιλία σε παραγωγή παγκοσμίως. Είναι από τις ποικιλίες που χρησιμοποιείται κυρίως στη βιομηχανία κομπόστας αχλαδιών, αλλά και για επιτραπέζια χρήση. Απαιτεί περιοχές με δροσερό καλοκαίρι για την καλύτερη ανάπτυξή της. Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές της συγκεκριμένης ποικιλίας, εκ των οποίων οι κυριότερες είναι οι ακόλουθες:

1. Μια από τις σημαντικές παραλλαγές της ποικιλίας αυτής είναι η πράσινη William's ποικιλία που παράγει μέσου έως μεγάλου μεγέθους καρπούς. Ποικιλία που καλλιεργείται κυρίως για κονσερβοποίηση. Χαρακτηρίζεται από τις ποικιλίες που χρειάζεται ενδιάμεσο εμβολιασμό με την ποικιλία B. Hardy καθώς δεν έχει καλή συγγένεια με το υποκείμενο της κυδωνιάς.
2. Η κόκκινη William's χρησιμοποιείται κυρίως για παραγωγή ερυθρών ποικιλιών αχλαδιάς σε διασταυρώσεις από τους βελτιωτές ποικιλιών.
3. Ο κλώνος PI241968, που αποτελεί γαλλική επιλογή της William's, και ο κλώνος PI267940 ( William's Boverly ή Swiss Bartlett ) φαίνεται ότι έχουν σχετικά καλή συγγένεια με την κυδωνιά. Σε αντίθεση με τον κλώνο OP9 του Όρεγκον – ΗΠΑ οι δύο παραπάνω κλώνοι θεωρούνται λιγότερο παραγωγικά δένδρα.

Χαρακτηριστικό, της ποικιλίας αυτής, αποτελεί ο καρπός της με τα πολυάριθμα μαυροκόκκινα στίγματα. Είναι από τις ποικιλίες που ο καρπός της ωριμάζει τον Αύγουστο και έχει την δυνατότητα να συντηρείται ως τον Ιανουάριο σε απλούς ψυκτικούς θαλάμους ελεγχόμενης ατμόσφαιρας. Αν και αναφέρεται ως η πιο διαδεδομένη ποικιλία αχλαδιάς στον κόσμο, ωστόσο βασικό μειονέκτημα αποτελεί η ευπάθειά της στο βακτηριακό κάψιμο και η ασυμφωνία με τα περισσότερα υποκείμενα της κυδωνιάς (Βασιλακάκης, 2016).



Εικόνα 8. Καρπός ποικιλίας William's

Ελληνική ποικιλία αχλαδιάς αποτελεί και η ποικιλία **Sissy**, ιδιοκτησία του φυτωρίου ΑΛΦΑ. Προέρχεται από τυχαίο σπορόφυτο της Seckler, όπου προήλθε από οφθαλμική

μετάλλαξη της ποικιλίας Highland. Η Sissy έχει καταχωρηθεί στον Εθνικό Κατάλογο Ποικιλιών. Κύρια χαρακτηριστικά της ποικιλίας αποτελούν τα εξής:

- Δεν προσβάλλεται από το βακτήριο *Erwinia amylovora*
- Σχετικά ανθεκτική στη ψύλλα της αχλαδιάς
- Σχετικά ανθεκτική στο φουζικλάδιο και στη σεπτόρια
- Καλή συγγένεια με τα υποκείμενα της κυδωνιάς

Κατατάσσεται στις μεσοπρώιμες ποικιλίες αχλαδιάς, καθώς συγκομίζεται το 1<sup>ο</sup> -2<sup>ο</sup> δεκαήμερο του Αυγούστου. Δέντρο μέτριας ζωηρότητας με γυαλιστερό πράσινο φύλλωμα, καρπό εξαιρετικής ποιότητας με βουτυρώδη γεύση και υπέροχο άρωμα. Κατάλληλος ακόμη και για κονσερβοποίηση. Συντηρείται μέχρι τον Μάρτιο στους -1<sup>ο</sup>C έως 0 <sup>ο</sup>C σε κοινά ψυγεία ή και αργότερα υπό συνθήκες ελεγχόμενης ατμόσφαιρας ή με εφαρμογή Smart Fresh.



Εικόνα 9. Καρπός ποικιλίας Sissy

Χαρακτηριστικό πλεονέκτημα της ποικιλίας αυτής είναι η ανθεκτικότητα της στην τοξικότητα των φυτοφαρμάκων και των χαμηλών θερμοκρασιών, όπου καθιστά εφικτή την φύτευσή της σε περιοχές με υψόμετρο (Βασιλακάκης, 2016).

Η ποικιλία **Highland** συγκαταλέγεται στις όψιμες (φθινοπωρινές) ποικιλίες αχλαδιάς. Αν και δεν είναι ιδιαίτερα γνωστή ποικιλία στην Ευρώπη, η Highland αναφέρεται ως ποικιλία υψηλής παραγωγικότητας με καρπούς εξαιρετικής ποιότητας. Ο καρπός της ποικιλίας παρουσιάζει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Κανονικό μέγεθος, αχλαδόμορφου σχήματος με ελαφρό επίχρωμα στην ηλιοζόμενη επιφάνεια
- Ελαφρώς γλυκός με ελαφριά οξύτητα

- Ωριμάζει μέσα Αυγούστου
- Χρησιμοποιείται για νωπή κατανάλωση, καθώς και για κονσερβοποίηση (Μολασιώτης, χ.χ.)



*Εικόνα 10. Καρπός ποικιλίας Highland*

Αναφέρεται ως αυτόστειρη ποικιλία αχλαδιάς με καλές επικονιάστριες ποικιλίες Passa Crassane και Williams. Συγκομίζεται περίπου 1-2 εβδομάδες μετά την ποικιλία Williams. Ωστόσο, η Highland παρουσιάζει ορισμένα χαρακτηριστικά μειονεκτήματα, όπως τα εξής:

1. Ευαίσθητη στο βακτηριακό κάψιμο και στην *Alternaria*
2. Ευαίσθητη στο ζωικό εχθρό ψύλλα
3. Παρουσιάζει ασυμφωνία με τα υποκείμενα της κυδωνιάς (Βασιλακάκης, 2016)



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>:

### ΦΥΤΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΡΟΙ ΚΑΙ ΤΟΠΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ

#### 2.1 Φυτογενετικοί Πόροι: Ορισμός –Σημασία

Σύμφωνα με τη Διεθνή Συνθήκη σχετικά με τους φυτογενετικούς πόρους για την διατροφή και τη γεωργία του FAO αυτοί ορίζονται ως «το γενετικό υλικό φυτικής προέλευσης, που έχει πραγματική ή δυνητική αξία για την διατροφή και τη γεωργία».

Οι φυτογενετικοί πόροι αποτελούν βασικό κομμάτι της παγκόσμιας βιοποικιλότητας, καθώς θεωρούνται σημαντικοί τόσο για το παρόν όσο και για το μέλλον της αγροτικής παραγωγής. Σε παγκόσμια κλίμακα υπάρχουν περίπου 350.000 διαφορετικά φυτικά είδη, εκ των οποίων περισσότερα από 18.000 αποτελούν τα αρωματικά είδη και περισσότερα από 60.000 τα φαρμακευτικά είδη (Ζέρβα, 2020).

Η Ελλάδα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα κέντρα του ενδημισμού της Ευρώπης και της Μεσογείου με 1.278 ενδημικά είδη, ποσοστό 22,2% του συνολικού αριθμού των φυτικών ειδών. Συνεπώς, η Ελλάδα διαθέτει ένα πλούτο φυτογενετικών πόρων, μια κληρονομιά που αναμένει τη συστηματική και αειφόρο αξιοποίησής της. Ο φυτογενετικός πλούτος της χώρα μας αποτελείται από:

- Σπάνια ενδημικά είδη
- Αρωματικά και Φαρμακευτικά είδη
- Τοπικές ποικιλίες καλλιεργούμενων φυτών
- Άγριοι πρόγονοι καλλιεργούμενων φυτών
- Αρτυματικά, βαφικά, μελισσοκομικά, δασικά φυτά
- Ανθοκομικά φυτά
- Φυτικά είδη με ιδιότητες που δεν γνωρίζουμε ακόμη (Μαλούπα, 2012)

Τα τελευταία χρόνια, στην χώρα μας, παρατηρείται μια αξιοσημείωτη προσπάθεια για την προστασία και την διατήρηση της ποικιλότητας του γενετικού υλικού, κυρίως των καλλιεργούμενων φυτών και οπωροφόρων δέντρων. Στην Τράπεζα Γενετικού υλικού που βρίσκεται στη Θέρμη, Θεσσαλονίκης και εποπτεύεται από τον ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ διατηρούνται (ex situ) πάνω από 14.000 δείγματα συλλογής εγχώριων παραδοσιακών ποικιλιών και άγριων συγγενών των καλλιεργούμενων ειδών. Επιπλέον, διαθέτει με τη

μορφή κλωνικού υλικού και μια συλλογή 270 ποικιλιών αμπέλου, από τις οποίες οι 200 αποτελούν σπάνιες γηγενείς ποικιλίες, ενώ οι υπόλοιπες συνιστούν ποικιλίες ξενικής προέλευσης (Μαλούπα Ε. 2019, Μυλωνά Φ. 2017).

## **2.2. Τοπικές Ποικιλίες – Σημασία διατήρησής τους**

Με βάση την Υπουργική Απόφαση 523/8481 της 30/1/2014 ως **τοπική ποικιλία** ορίζεται «ένα σύνολο πληθυσμών ή κλώνων ενός φυτικού υλικού οι οποίοι είναι φυσικώς προσαρμοσμένοι στις περιβαλλοντικές συνθήκες της περιοχής τους». Ωστόσο, υπάρχουν και αρκετοί ορισμοί που θεωρούνται πιο ολοκληρωμένοι από τον παραπάνω. Οι τοπικές ποικιλίες έχουν διαχρονική αξία και ταυτότητα, είναι τοπικά προσαρμοσμένες σε περιβαλλοντικές συνθήκες, είναι αναγνωρίσιμες και συνήθως φέρουν ονομασίες από τοπικές περιοχές. Ο πλούτος των τοπικών ποικιλιών της χώρας μας είναι τεράστιος. Υπάρχουν αρκετοί λόγοι που συνετέλεσαν στο αποτέλεσμα αυτό, όπως η γεωγραφική θέση της χώρας, η ποικιλία των εδαφών και του κλίματος, η παράδοση και η ιστορία.

Συγκεκριμένα, με βάση τον Χατζηχαρίση, στη χώρα μας διασώζονται μέχρι και σήμερα μερικές ντόπιες ποικιλίες αχλαδιάς όπως οι ακόλουθες:

1. Μαγιάτικη,
2. Αποστολιάτικα,
3. Κοντοποδαρούσα ή Κοντούλα που εμφανίζει αρκετούς κλώνους,
4. Σοπελίτικη γνωστή και ως Κολοκυθάτη και Αυγουστιάτικη,
5. Τσακόνικα,
6. Ημιάγρια Στρογγυλά ή Χειμωνιάτικα καθώς και
7. Άγρια Γκορτσιά που χρησιμοποιείται ως υποκείμενο.

Επιπρόσθετα, σώζονται και κάποιες παραλλαγές ξενικών ποικιλιών που φέρονται ως τοπικές παραδοσιακές ποικιλίες όπως για παράδειγμα:

1. Βουτυράτη,
2. Κρυστάλλια ή Ναπολέων,
3. Καμπάνες, τα Αραπάχλαδα,
4. Φλασκάδικα κ.α.

Οι παραδοσιακές ποικιλίες πρέπει να διατηρηθούν καθώς διαθέτουν πολύτιμα χαρακτηριστικά γνωρίσματα, τα κυριότερα των οποίων είναι τα εξής:

- Διαφύλαξη της αγροβιοποικιλότητας
- Παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας με ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, άρωμα, θρεπτική αξία)
- Κατάλληλες για χρήση βιολογικής γεωργίας
- Αποτελούν πολύτιμους φυτογενετικούς πόρους για την σημερινή γεωργία (Μαυρομάτης, Βλαχοστέργιος κ.α., 2013)



Εικόνα 11. Τοπικές παραδοσιακές ποικιλίες αχλαδιάς



Εικόνα 12. Τοπικές ποικιλίες αχλαδιάς

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ

Η ταξινόμηση και ταυτοποίηση των φυτικών ειδών και ποικιλιών επιτυγχάνεται με την χρήση διαφόρων ειδών δεικτών, όπως οι μορφολογικοί δείκτες, οι βιοχημικοί δείκτες, καθώς και οι μοριακοί δείκτες. Ιδιαίτερα για την ταυτοποίηση των τοπικών παραδοσιακών ποικιλιών, οι μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρύτατα καθώς συχνά μια ποικιλία απαντάται με διαφορετικά ονόματα στις διάφορες περιοχές καλλιέργειας. Με τη χρήση των μοριακών τεχνικών μπορεί να εκτιμηθεί εάν και κατά πόσο αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ποικιλίες ή η διαφορετικότητά τους σε μορφολογικά χαρακτηριστικά οφείλεται στα διαφορετικά περιβάλλοντα ανάπτυξης. Επιπλέον, με την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός του βαθμού συγγένειας των εξεταζομένων γενοτύπων τόσο σε κοντινές περιοχές όσο και σε απομακρυσμένες (Χατζόπουλος, 2001).

#### 3.1.Μορφολογικοί δείκτες

Η ανάπτυξη της επιστήμης της Γενετικής αρχικά επικεντρώθηκε στους μορφολογικούς δείκτες. Οι μορφολογικοί δείκτες εκπροσωπούν γενικά γενετικούς πολυμορφισμούς που διακρίνονται και εντοπίζονται εύκολα μέσω των φαινοτυπικών χαρακτήρων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων δεικτών - γνωρισμάτων είναι το χρώμα των λοβών, των λουλουδιών, το σχήμα του σπόρου, το μήκος του μίσχου κ.α.. Οι μορφολογικοί δείκτες έχουν εφαρμοστεί στην πλειονότητα των φυτών. Συγκεκριμένα, όσοι χρησιμοποιούνται επισήμως στην ταυτοποίηση ποικιλιών ονομάζονται περιγραφητές (descriptors).

Τα κυριότερα μειονεκτήματα των δεικτών αυτών είναι τα ακόλουθα:

- Είναι περιορισμένοι σε αριθμό
- Επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση γονότυπου και περιβάλλοντος ή από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού
- Δεν συσχετίζονται με ιδιαίτερα οικονομικά γνωρίσματα, όπως η απόδοση και η ποιότητα (Χατζόπουλος, 2001)

### **3.2. Βιοχημικοί δείκτες**

Στους βιοχημικούς δείκτες περιλαμβάνονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες και οι πρωτεΐνες. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οργανικές ενώσεις, προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των ανώτερων φυτών. Σε αυτή την κατηγορία δεικτών περιλαμβάνονται οι χρωστικές και τα φλαβονοειδή. Οι κυριότεροι πρωτεϊνικοί δείκτες είναι η πολυμορφική ομάδα των αποθηκευτικών πρωτεϊνών των σπόρων και τα ισοένζυμα (Bretting and Widrlechner, 1995).

Τα ισοένζυμα είναι δομικές παραλλαγές ενός ενζύμου, δηλαδή διαφέρουν στην αλληλουχία των αμινοξέων αλλά έχουν την ίδια καταλυτική δραστηριότητα. Η ισοενζυμική ανάλυση γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αμύλου όπου οι διαφορές στη σύσταση των αμινοξέων είναι ανιχνεύσιμες στο ηλεκτροφορητικό πρότυπο σαν διαφορετικές ζώνες που μεταναστεύει το κάθε ισοένζυμο. Το κυριότερο μειονέκτημα των ισοενζύμων είναι ο σχετικά μικρός αριθμός τους και το χαμηλό επίπεδο πολυμορφισμού τους. Επίσης, εξαρτώνται από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού και τον τύπο του ιστού που αναλύεται. Παρότι διαθέτουν τα παραπάνω αναφερόμενα μειονεκτήματα οι βιοχημικοί δείκτες και ειδικότερα τα ισοένζυμα αποτελούν χρήσιμα εργαλεία με αρκετές εφαρμογές όπως οι ακόλουθες:

1. Εκτίμηση της ποικιλομορφίας του γενετικού υλικού
2. Ταυτοποίηση ποικιλιών
3. Εύρεση φυλογενετικών σχέσεων

(Φανουράκης, 2010, Γανόπουλος, 2013)

### **3.3. Μοριακοί δείκτες**

Οι μοριακοί δείκτες ξεκίνησαν να εφαρμόζονται στη γενετική ανάλυση από τη δεκαετία του 1980 και έκτοτε μια μεγάλη ποικιλία δεικτών έχει επινοηθεί. Γενικά, ένας μοριακός δείκτης προέρχεται από μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA ανεξάρτητα με το αν κωδικοποιεί ή όχι κάποιο προϊόν, που παρουσιάζει πολυμορφισμό στην ακολουθία των νουκλεοτιδίων μεταξύ των ατόμων. Επομένως, μοριακός δείκτης μπορεί να είναι ένα ολόκληρο γονίδιο ή μια μικρή αλληλουχία όπως ένας μικροδορυφόρος (μικρή γραμμική επανάληψη ενός ολιγονουκλεοτιδίου, Simple Sequence Repeats, SSRs) ή τόσο μικρός όσο ένα μόνο νουκλεοτίδιο που διαφέρει ανάμεσα σε δυο αλληλόμορφα γονίδια σε μια αντίστοιχη περιοχή (μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός, single nucleotide

polymorphism, SNP). Οι μοριακοί δείκτες είναι χρήσιμοι στη γενετική ανάλυση, δηλαδή μπορεί να χρησιμοποιηθούν για διάκριση διαφορετικών ατόμων δηλαδή διαφορετικών γενοτύπων. Επίσης, άλλη σημαντική εφαρμογή των μοριακών δεικτών είναι η χρησιμοποίησή τους για τη δημιουργία δένδρων συγγένειας ή εξέλιξης διαφόρων ποικιλιών και οικοτύπων (Τσαυτάρης κ.α., 2012). Βασικό τους πλεονέκτημα συγκριτικά με τους μορφολογικούς και βιοχημικούς δείκτες είναι ότι εντοπίζουν διαφορές στις αλληλουχίες του DNA και όχι στα προϊόντα που εκφράζουν. Επομένως, δεν επηρεάζονται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος και δεν εξαρτώνται από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Επιπλέον, εμφανίζουν υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού και είναι απεριόριστοι σε αριθμό ώστε να μπορούν να καλύψουν ολόκληρο το γονιδίωμα (Χατζόπουλος, 2001).

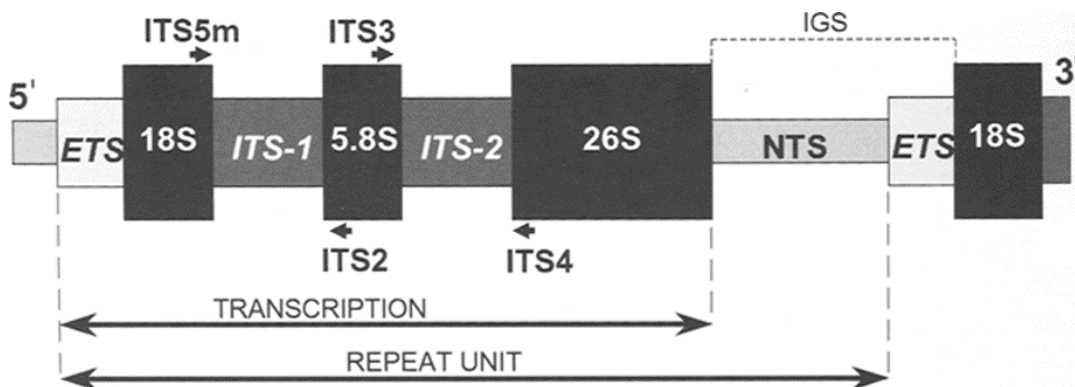
Οι μοριακοί δείκτες ανάλογα με τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των μοριακών πολυμορφισμών μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες.

- Δείκτες που βασίζονται σε υβριδισμό των νουκλεονικών οξέων: στην ομάδα αυτή ανήκουν οι RFLPs (restriction fragment length polymorphisms Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA) και το αποτύπωμα ολιγονουκλεοτιδίων (oligonucleotide fingerprinting).
- Δείκτες που βασίζονται στον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR): στην ομάδα αυτή ανήκουν οι δείκτες RAPDs (random amplified polymorphic DNAs Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά τμήματα DNA), οι SSRs (Simple Sequence Repeats- Microsatellite, απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες - Μικροδορυφόροι), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων) και μια ποικιλία τροποποιημένων τύπων αυτών.
- Δείκτες που βασίζονται σε μικρά αλληλουχημένα τμήματα: στην ομάδα αυτή ανήκουν οι δείκτες πολυμορφισμού απλού νουκλεοτιδίου (SNPs, single nucleotide polymorphisms).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περισσότεροι δείκτες που χρησιμοποιούνται στις γενετικές αναλύσεις βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA με την τεχνική PCR (Τσαυτάρης κ.α., 2012, Ξυνιάς, 2014).

### 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 25-26S 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 26S 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 13) (Soltis D.E. and Soltis P. S., 1998).



Εικόνα 13. Διάγραμμα της βασικής δομής του nrDNA στα φυτά

Οι περιοχές ITS-1 και ITS-2 δεν κωδικοποιούν κανέναν είδος λειτουργία και μπορούν να συσσωρεύσουν πλήθος μεταλλάξεων χωρίς κανένα ανιχνεύσιμο πρόβλημα για κάποια κυτταρική λειτουργία γεγονός που επιτρέπει το μήκος και η αλληλουχία των βάσεων των περιοχών αυτών να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό. Έτσι είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για την ταξινόμηση και τη φυλογενετική ανάλυση συγγενικών ειδών (Baldwin et.al, 1995, Alvarez and Wendel, 2003).

Η ITS-2 περιοχή του nrDNA χρησιμοποιείται ευρέως για φυλογενετικές μελέτες τόσο σε επίπεδο γένους όσο και σε επίπεδο είδους 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 που διευκολύνουν την ενίσχυσή της με PCR (Yao et.al., 2010, Chen et.al., 2010, Khan et. al, 2019)



## ΜΕΡΟΣ Β. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

#### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

##### 4.1. Φυτικό Υλικό

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκαν και αναλύθηκαν 13 τοπικές ποικιλίες αχλαδιάς (*Pyrus* sp.) που εντοπίστηκαν την ορεινή περιοχή της Ηπείρου και συγκεκριμένα στην περιοχή που ορίζεται από τα Αθαμάνια Όρη, Θεσπρωτικά Όρη (Μικρή Λάκκα Σουλίου) και Εθνικό Πάρκο Βόρειας Πίνδου. Ο εντοπισμός των δένδρων έγινε 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 ανοίξεως μέχρι και τις αρχές του καλοκαιριού του 2019.

Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 8. Τοπικές παραδοσιακές ποικιλίες αχλαδιάς που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

A/A	Κωδικός	Όνομα Ποικιλίας	Συλλέκτης	Τοποθεσία συλλογής
1	B19,22	Πέαρι Παναγιάς	Κύρκας Δημήτρης	Τρίκαλα, δήμος Καλαμπάκας, κοινότητα Παναγιάς
2	B19,44	Αυγουστέλια	Κύρκας Δημήτρης	Ιωάννινα, δήμος Βορείων Τζουμέρκων, κοινότητα Μονολιθίου
3	B19,45	Καμπάνες	Κύρκας Δημήτρης	Ιωάννινα, δήμος Βορείων Τζουμέρκων, κοινότητα Μονολιθίου
4	B19,63	Κρυστάλλια Κρανιάς	Υφαντή Βούλα	Πρέβεζα, δήμος Ζήρου, κοινότητα Κρανέας
5	B19,64	Θεριστιάτα Άρτας	Υφαντή Βούλα	Πρέβεζα, δήμος Ζήρου, κοινότητα Κρανέας
6	B19,65	Βουλιμάδες	Υφαντή Βούλα	Πρέβεζα, δήμος Ζήρου, κοινότητα Κρανέας
7	B19,70	Αχλάδι Φράξος	Δήμου Δήμητρα	Άρτα, δήμος Γεωργίου Καραϊσκάκη, κοινότητα Καστανέας
8	B19,80	Αχλαδιά Κέδρου	Δήμου Δήμητρα	Άρτα, δήμος Γεωργίου Καραϊσκάκη, κοινότητα Καστανέας
9	B19,89	Αχλαδιά Λαφίνα 1	Γιώτης Δημήτρης	Τρίκαλα, δήμος Πύλης, κοινότητα Νεράιδας
10	B19,90	Αχλαδιά Λαφίνα 2 ‘Μπακάλη’	Γιώτης Δημήτρης	Τρίκαλα, δήμος Πύλης, κοινότητα Νεράιδας
11	B19,92	Μυρωδιάρικα Ριζοβουνίου	Υφαντή Βούλα	Πρέβεζα, δήμος Ζήρου, κοινότητα Ριζοβουνίου
12	B19,128	Αχλαδιά Γκορτσαπιδιά Άρτας	Γιώτης Δημήτρης	Άρτα, δήμος Κεντρικών Τζουμέρκων, κοινότητα Κάτω Αθαμανίου
13	B19,130	Χειμωνιάτικα Μελιανών	Υφαντή Βούλα	Πρέβεζα, δήμος Ζηρού, κοινότητα Μελιανών

Οι πληροφορίες των δειγμάτων που αναφέρθηκαν είναι καταχωρημένες στην βάση δεδομένων Eco-Variety που είναι διαθέσιμη στη <https://ecovariety.azurewebsites.net/>, όπου συμπληρώθηκαν από τους συγκεκριμένους συλλέκτες/καταγραφείς .

#### **4.2. Συλλογή και αποθήκευση φυτικού υλικού.**

Η συλλογή δειγμάτων φύλλων από τα δένδρα των τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς που αναφέρονται στον πίνακα 8 έγινε το χρονικό διάστημα από αρχές Μαρτίου έως μέσα Ιουνίου του 2019. Από κάθε δένδρο αχλαδιάς συλλέχθηκαν 20 - 30 νεαρά φύλλα, χωρίς ορατά συμπτώματα προσβολών, από τρία τυχαία σημεία της κόμης του δένδρου. Τα φύλλα, έπειτα, τοποθετήθηκαν σε χάρτινη σακούλα, όπου σημειώθηκε ο κωδικός του κάθε δείγματος που συλλέχθηκε. Στην συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες συγκεντρώθηκαν σε φορητό ψυγείο με παγοκύστες και μεταφέρθηκαν το συντομότερο δυνατό στο εργαστήριο. 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  $-20^{\circ}\text{C}$  .

#### **4.3. Λυοφιλοποίηση φυτικών ιστών**

Η διαδικασία της λυοφιλοποίησης (freeze drying) αποτελεί μια μέθοδο ξήρανσης. Συγκεκριμένα, είναι μια διαδικασία αφυδάτωσης ενός κατεψυγμένου φυτικού υλικού σε συνθήκες κενού με την διαδικασία της εξάχνωσης (sublimation). Εξάχνωση ονομάζεται η διαδικασία, κατά την οποία μια ουσία μετατρέπεται από στερεό σε αέριο χωρίς να «περάσει» από την υγρή φάση.

Η διαδικασία της λυοφιλοποίησης περιλαμβάνει τα εξής βασικά στάδια:

- Ψύξη του φυτικού υλικού στους  $-20^{\circ}\text{C}$
- Τοποθέτηση του υλικού στην συσκευή
- Εφαρμογή κενού υπό ψύξη γύρω στους  $-50^{\circ}\text{C}$
- Εξάχνωση του νερού



*Εικόνα 14. Συσκευή λυοφιλοποίησης (λυοφιλοποιητής)*

Πιο αναλυτικά, τα δείγματα που είχαν προ-ψυχθεί στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  τοποθετήθηκαν στις θέσεις υποδοχείς της συσκευής, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 18, και στην συνέχεια εφαρμόστηκε κενό υπό ψύξη στους  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η διαδικασία της λυοφιλοποίησης διήρκησε περίπου 24 ώρες.

#### **4.4. Απομόνωση γενωμικού DNA από το φυτικό υλικό**

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

Στους Πίνακες 9 και 10 αναφέρονται τα όργανα - υλικά και τα αντιδραστήρια αντίστοιχα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία απομόνωσης του DNA.

Πίνακας 9. Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γενωμικού DNA από τους φυτικούς ιστούς

Όργανα	Υλικά
Vortex	Μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες (Eppendorfs) 1,5mL
Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας τριών (3) δεκαδικών ψηφίων	Σπάτουλα
Υδατόλουτρο	Ρύγχι (tips) κίτρινα (5-200 µl) για πιπέτα τύπου Gilson
Μικροφυγόκεντρος	Ρύγχι (tips) μπλε (100-1000 µl) για πιπέτα τύπου Gilson
Αυτόκαυστο	Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου Falcon των 50ml
	Μεταλλικά σφαιρίδια

Πίνακας 10. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γενωμικού DNA από τους φυτικούς ιστούς

Αντιδραστήρια
Lysis Buffer PL1: διάλυμα λύσης που περιέχει CTAB
Υδατικό Διάλυμα RNase A: 0,01 mg/µl
Binding Buffer PC: διάλυμα προσαρμογής συνθηκών για την πρόσδεση του DNA στη στήλη πυριτίου (silica membrane)
Wash Buffer PW1 και PW2: διαλύματα πλύσης της στήλης πυριτίου
Elution Buffer PE: διάλυμα έκλουσης DNA από την στήλη, 5mM Tris-HCl pH 8.5



Εικόνα 15. Συσκευή Vortex



Εικόνα 16. Συσκευή φυγοκέντρησης

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

#### Διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA

- **Λειοτριβήση του φυτικού ιστού:** Μικρή ποσότητα από το δείγμα λυοφιλοποιημένων φύλλων (~100 mg) τοποθετείται σε σωληνάριο τύπου Falcon 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 PL1:** Ζυγίζονται 20 mg λειοτριβημένου φυτικού ιστού και μεταφέρονται σε erpendorf 1,5 ml όπου προστίθενται 600 ml από το διάλυμα λύσης PL1. Ακολουθεί ανάδευση με vortex για να γίνει ομοιογενές το δείγμα και προστίθενται 15 µL διαλύματος RNase A. Στην συνέχεια, το erpendorf τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 65°C για μία ώρα με παράλληλη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα.  
Το Kit (NucleoSpin Plant II) περιλαμβάνει δύο διαφορετικά διαλύματα λύσης των κυττάρων (PL1 και PL2) και επιλέχθηκε το PL1 μετά από παράλληλα εφαρμογή των δύο πρωτοκόλλων καθώς έδινε καλύτερα αποτελέσματα.
- **Καθαρισμός του ακατέργαστου προϊόντος λύσης:** Το δείγμα στη συνέχεια φυγοκεντρήται στις 10000 rpm για 5 min και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε στήλη διήθησης η οποία τοποθετείται μέσα σε σωλήνα συλλογής των 2 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10000 rpm για 2 min και μεταφορά του καθαρού διαλύματος σε αποστειρωμένο erpendorf.
- **Προσαρμογή των συνθηκών πρόσδεσης του DNA στη silica membrane:** Στο καθαρό διάλυμα λύσης προστίθενται 675 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:** Γίνονται τρεις πλύσεις με την εξής διαδικασία:

- Στην πρώτη πλύση προστίθενται 400 μl Buffer PW1 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 10.000 rpm και απόρριψη της ροής
- Στην δεύτερη πλύση προστίθενται 700 μl Buffer PW2, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 10.000 rpm και απόρριψη της ροής.
- Τέλος, στην τρίτη πλύση προστίθενται 200 μl Buffer PW2 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 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 erpendorf 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 erpendorf. Το διάλυμα καθαρού DNA φυλάσσεται στους – 20°C

Ο έλεγχος της επιτυχής απομόνωσης γενωμικού DNA και η ποσοτικοποίησή του έγιναν οπτικά μετά από ηλεκτροφόρηση 3 μl σε πηκτική αγαρόζης (1% w/v σε 1xTAE) από το δείγμα DNA 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.)



*Εικόνα 17. Λυοφιλοποιημένα φύλλα*



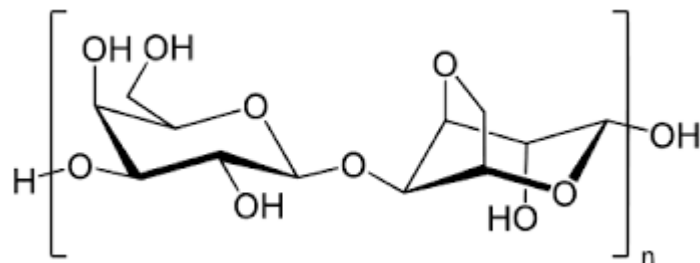


Εικόνα 18. Εναιώρημα λειοτριβημένου φυτικού ιστού δείγματος αχλαδιάς σε διάλυμα λύσης

#### 4.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

##### Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων. Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων κατά την κίνησή τους στο στερεό πορώδες υπόστρωμα αγαρόζης στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται συνεχές ηλεκτρικό πεδίο. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Το μόριο DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, εξαιτίας των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό, με αποτέλεσμα όταν βρεθεί σε συνεχές ηλεκτρικό πεδίο, να κινείται προς τον θετικό πόλο (Παλαιολόγου, 2015).



Εικόνα 19. Ο χημικός τύπος του πολυσακχαρίτη αγαρόζη

Ο ρυθμός μετανάστευσης ενός μορίου DNA μέσω του πηγήματος της αгарόζης καθορίζεται από τα ακόλουθα:

- 1. Το μέγεθος του μορίου DNA.** Τα γραμμικά μόρια DNA μετακινούνται στο πηγμα αгарόζης αντιστρόφως ανάλογα του δεκαδικού λογάριθμου των μοριακών βαρών τους. Επομένως τα μικρότερα μόρια DNA κινούνται ταχύτερα.
- 2. Τη συγκέντρωση της αгарόζης.** Η κινητικότητα του DNA σε σχέση με τη συγκέντρωση της αгарόζης δίνεται από τον τύπο:  $\log \mu = \log \mu_0 - k_r t$ , όπου  $\mu$  είναι η κινητικότητα του DNA,  $\mu_0$  η ελεύθερη κινητικότητα του DNA,  $k_r$  ο συντελεστής καθυστέρησης και  $t$  η συγκέντρωση της αгарόζης. Γενικά, σε πηκτώματα χαμηλής συγκέντρωσης ενοείται ο διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA, ενώ σε πηκτώματα υψηλής συγκέντρωσης ενοείται ο διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA.
- 3. Τη διαμόρφωση του DNA.** Μόρια DNA ίδιου μεγέθους αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα στο πηγμα αгарόζης. Τα κυκλικά υπερσπειρωμένα μόρια (συνήθως πλασμιδιακό DNA) κινούνται ταχύτερα και ακολουθούν τα ανοιχτά κυκλικά και τα ευθύγραμμα μόρια DNA.
- 4. Την τάση του ηλεκτρικού πεδίου** Η κινητικότητα του μορίου DNA είναι ανάλογη της τάσης του πεδίου. Ο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται σε τάση μικρότερη ή ίση 5 Volt/cm (Παλαιολόγου, 2015)

Για την ανίχνευση των ζωνών DNA σε πηγμα αгарόζης χρησιμοποιείται η χρώση με Gel Red. Η χρωστική Gel Red (χρωστική φθορισμού) προσδένεται στο DNA και χαρίζει έντονο πορτοκαλί χρώμα όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η χρωστική αυτή είναι φωτοευαίσθητη και παρουσιάζει μικρότερη τοξικότητα σε σύγκριση με το βρωμιούχο αιθίδιο.

### Πειραματική διαδικασία

#### *Εξοπλισμός*

1. Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA (Εικόνα 20)
2. Τροφοδοτικό συσκευής ηλεκτροφόρησης, παρέχει συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα με ρυθμιζόμενη τάση (V) ή ένταση (mA) (Εικόνα 20)
3. Τράπεζα Υπεριώδης Ακτινοβολίας και σύστημα ψηφιακής απεικόνισης πηκτωμάτων νουκλεϊκών οξέων (Εικόνα 21)

### 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 που περιέχει  
50% Glycerol, 0.9% SDS και 0.05% Bromophenol Blue
3. 10.000x GelRed Nucleic Acid Gel Stain



Εικόνα 20. Συσκευή ηλεκτροφόρησης μαζί με το τροφοδοτικό της



*Εικόνα 21. Τράπεζα Υπεριώδης Ακτινοβολίας και σύστημα ψηφιακής απεικόνισης πηκτωμάτων νουκλεϊκών οξέων*

### ***Παρασκευή πηκτής αγαρόζης***

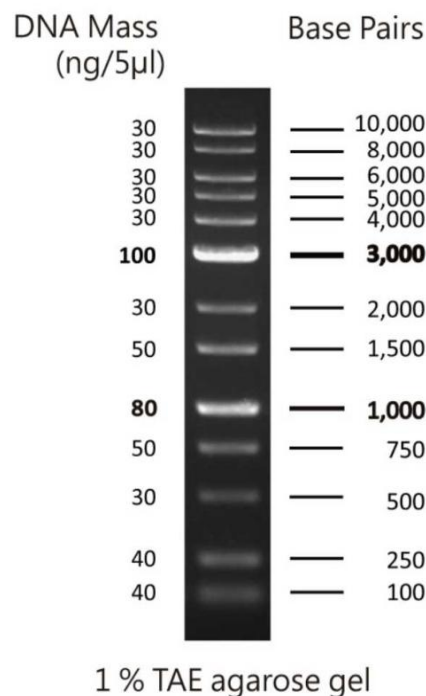
Αρχικά, ζυγίζονται 0,5 gr αγαρόζης και μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 250 ml όπου έχουν προστεθεί 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1X TAE (τελική συγκέντρωση του διαλύματος 1%). Στη συνέχεια, το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να γίνει διαυγές, δηλαδή η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος πέσει γύρω στους 50 °C προστίθενται 2,5 μl από τη χρωστική 10.000x Gel Red. Έπειτα, το ρευστοποιημένο πήκτωμα μεταφέρεται 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 (φρεάτια). Η ρευστή αγαρόζη χύνεται στο εκμαγείο με προσοχή, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Αν δημιουργηθούν φυσαλίδες, απομακρύνονται 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***

Το πήκτωμα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 1 X TAE σε ποσότητα ώστε να υπερκαλύψει το πήκτωμα κατά περίπου 0,5 cm. Ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση, όπου σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα τύπου erpendorf αναμιγνύονται 3 μl δείγματος με 15 μl

αποστειρωμένου νερού και 2 μl διαλύματος φόρτωσης (loading Buffer) 10X. Το διάλυμα φόρτωσης έχει μεγαλύτερο ειδικό βάρος από το διάλυμα ηλεκτροφόρησης, λόγω της περιεκτικότητάς του σε γλυκερόλη, με αποτέλεσμα το δείγμα DNA να κάθεται στον πυθμένα του φρεατίου και να εισχωρεί στο πήγμα της αγαρόζης μετά την εφαρμογή της διαφοράς δυναμικού. Επιπλέον, η χρωστική που περιέχει (Bromophenol Blue) κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA, συμβάλλοντας στον μακροσκοπικό εντοπισμό της κινητικότητας του δείγματος στην πηκτή. Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων στα φρεάτια της πηκτής αγαρόζης με μικροπιπέττα τύπου Gilson. Ταυτόχρονα φορτώνεται στο πρώτο φρεάτιο 5 μL δείγμα μάρτυρα DNA γνωστών μεγεθών (1Kb DNA Ladder). Τέλος, στην συσκευή ηλεκτροφόρησης εφαρμόζεται τάση 60 Volt και τα δείγματα αναλύονται σε συνεχές ηλεκτρικό πεδίο για 90 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου, το πήγμα αγαρόζης εκτίθεται σε UV ακτινοβολία, ώστε να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα μορίων DNA και της χρωστικής φθορισμού Gel Red και έπειτα φωτογραφίζεται.

Η ποσότητα του DNA ελέγχεται οπτικά συγκρίνοντας την ένταση της ζώνης του δείγματος DNA με την ένταση της ζώνης του ποσοτικού μάρτυρα 1Kb DNA Ladder (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. 1Kb DNA Ladder plus

## 4.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

### Αρχή της μεθόδου

Ο Kary B. Mullis (Νόμπελ χημείας, 1993) και οι συνεργάτες του το 1983 ανέπτυξαν μια επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδο με σκοπό να γίνεται επιτρεπτή η παραγωγή εκατομμυρίων αντίτυπων ενός μορίου DNA *in vitro* σε μικρό χρονικό διάστημα. Απαραίτητη προϋπόθεση της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι πρέπει να γνωρίζουμε την αλληλουχία λίγων νουκλεοτιδίων σε κάθε ένα από τα δύο άκρα της αλυσίδας που θέλουμε να αναπαράγουμε. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και είναι μια διαδικασία πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Πρόκειται για μια απλή, φθηνή, εύκολη και αξιόπιστη τεχνική, με ευρύ πλήθος εφαρμογών σε πολλά επιστημονικά πεδία (Σπέλλα, χ.χ.).

Τα συστατικά για μια PCR αντίδραση, που βασίζεται σε χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA είναι:

- **Μήτρα DNA:** είναι το DNA που περιέχει την αλληλουχία που θέλουμε να ενισχύσουμε (αλληλουχία-στόχος) π.χ. το απομονωμένο γενωμικό DNA ενός οργανισμού. Το DNA δεν θα πρέπει να είναι κατεστραμμένο στην περιοχή της αλληλουχίας-στόχου, καθώς και να είναι υψηλής καθαρότητας. Πολύ μικρές ποσότητες DNA (της τάξης των 25-100 ng ανά αντίδραση τελικού όγκου 50 μl) είναι επαρκείς για τις περισσότερες αντιδράσεις PCR.
- **Ειδικό ζεύγος εκκινητών (primers):** Οι εκκινητές είναι μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια μήκους ολίγων βάσεων (17 – 30 bp), που παράγονται συνθετικά και είναι συμπληρωματικοί στις αλληλουχίες των άκρων του προς ενίσχυση τμήματος DNA.
- **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<sup>+</sup> ή Na<sup>+</sup>
- **Διάλυμα MgCl<sub>2</sub>:** Τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> σχηματίζουν σύμπλοκα με τα dNTPs και σταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις της DNA πολυμεράσης με το DNA και τα

dNTPs. Ικανοποιητική τελική συγκέντρωση ιόντων  $Mg^{2+}$  στην αντίδραση θεωρείται 1-4mM, συνηθέστερη είναι η συγκέντρωση των 1,5 mM.

- **Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase):** Το ένζυμο αυτό απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Εικόνα 23), το οποίο ανακαλύφθηκε στις θερμές πηγές στην περιοχή Great Fountain του Lower Geysir Basin στο Εθνικό Πάρκο Yellowstone των ΗΠΑ. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι 72° C, ενώ διατηρεί επαρκή ενζυμική δραστηριότητα ακόμη και μετά από τη θέρμανση στους 95° C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η Taq DNA πολυμεράση επιμηκύνει και τους δύο εκκινητές προς την κατεύθυνση της αλληλουχίας-στόχου καθώς η σύνθεση της νέας συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA γίνεται σε κατεύθυνση 5' - 3' ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου που είναι δίκλωνο (Παλαιολόγου Δ. κ. α., 2015).



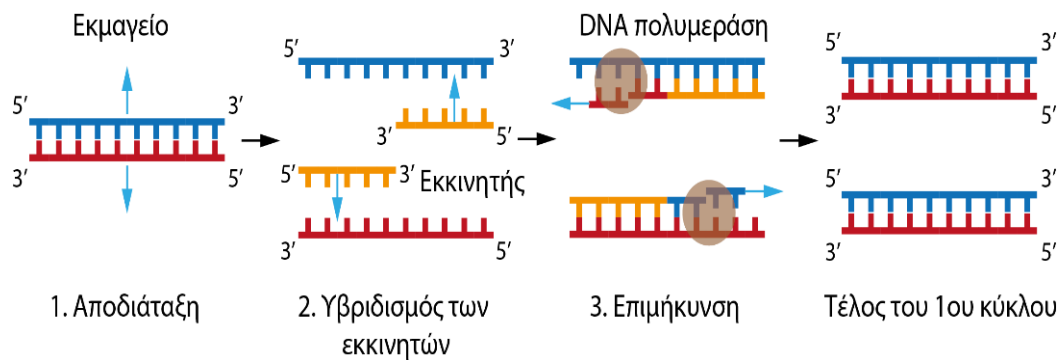
Εικόνα 23. Βακτήριο *Thermus aquaticus*

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (Εικόνα 24):

1. **Αποδιάταξη του DNA (denaturation):** Στο στάδιο αυτό διαχωρίζονται οι αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA με θέρμανση στους 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.
2. **Υβριδισμός ή αναδιάταξη των εκκινητών (annealing):** η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60° C για περίπου 30 sec έως 1 min και έτσι οι εκκινητές υβριδίζονται με τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA σε κάθε αλυσίδα. Η θερμοκρασία και ο απαιτούμενος χρόνος ψύξης ποικίλουν ανάλογα με 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. **Επιμήκυνση (extension):** η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72° C για περίπου ½ - 2 min ώστε να γίνει η αντίδραση πολυμερισμού από το ένζυμο DNA πολυμεράση, ο ρόλος του οποίου είναι να συνθέτει απέναντι από κάθε μονόκλωνη αλυσίδα την συμπληρωματική της. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η δημιουργία δύο δίκλωνων από το αρχικό δίκλωνο τμήμα DNA, αφού η κάθε μονόκλωνη αλυσίδα χρησιμοποιείται ως «πρότυπο» κατά την αντίδραση πολυμερισμού. Ο ίδιος κύκλος επαναλαμβάνεται αρκετές φορές, όπου σε κάθε κύκλο όλα τα αντίγραφα που έχουν παραχθεί χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο. Αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος είναι η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων DNA με γεωμετρική πρόοδο, δηλαδή μετά από n κύκλους λαμβάνονται  $2^n$  δίκλιωνα μόρια DNA (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Στάδια της αντίδρασης PCR (πλήρης κύκλος)

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή, τον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler) (Εικόνα 26). Η συσκευή αυτή φέρνει θερμαινόμενη πλάκα με ειδικές υποδοχές για τα σωληνάκια PCR (PCR tubes) μέσα στα οποία βρίσκεται το μίγμα των αντιδραστηρίων και μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια (Παλαιολόγου Δ. κ.α., 2015, Sambrook J. and Russell D. W., 2001).

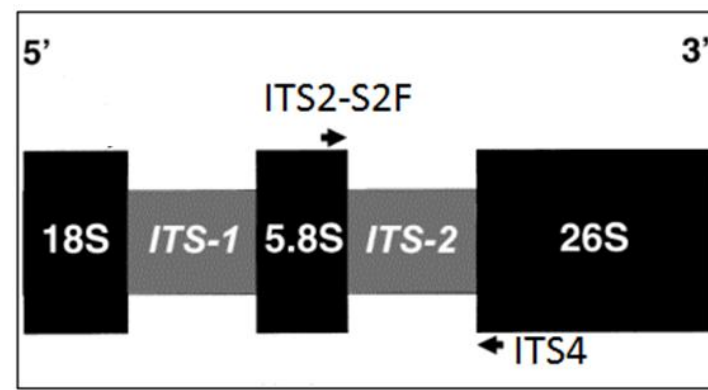


### Πειραματική διαδικασία

Η τεχνική PCR εφαρμόσθηκε 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 25).

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

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



*Εικόνα 25. 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 ειδικά σωληνάκια τύπου eppendorf (PCR tubes) όγκου 200 μl και το πακέτο υλικών, Taq polymerase kit της εταιρίας Kara Biosystems.

Πίνακας 11. Αντίδραση PCR

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Water Molecular Biology Reagent, αποστειρωμένο	27,6
5 x Buffer D	10
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5
Εκκινητής (primer) 1 (10 pmols/μl)	1,5
Εκκινητής (primer) 2 (10 pmols/μl)	1,5
Μίγμα dNTPs (10 mM το καθένα)	1
Γονιδιωματικό DNA	3 (~30ng)
Taq DNA πολυμεράση	0,4

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

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τον θερμικό κυκλοποιητή BioRad MyCycler Thermal Cycler (εικόνα 26) και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12. Συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR

Στάδια Αντίδρασης	Συνθήκες
1. Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 5 λεπτά
2. Αποδιάταξη	95 °C για 30 sec
3. Υβριδισμός εκκινητών	53 °C για 30 sec
4. Επιμήκυνση	72 °C για 1 λεπτό
5. Τελική επιμήκυνση	72 °C για 7 λεπτά

Πιο συγκεκριμένα, τα στάδια 2,3, και 4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους, ενώ τα στάδια 1 και 5 διαρκούν 1 κύκλο. Η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) διαρκεί περίπου 2 ώρες και μετά το πέρας του χρόνου η θερμοκρασία μειώνεται

στους 4°C ώστε να αποθηκευτούν προσωρινά τα προϊόντα PCR. Η μακροχρόνια αποθήκευσή τους γίνεται στους – 20°C.



Εικόνα 26. Θερμικός κυκλοποιητής (Thermal Cycler)

### **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

1. Αρχικά, σε eppendorf προσθέτουμε 40 μl προϊόντος DNA και 60 μl υπερκάθαρο νερό και 200 μl Buffer NT1 (διάλυμα προσαρμογής συνθηκών για την πρόσδεση του DNA στη στήλη πυριτίου).
2. Σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα τύπου eppendorf (2 ml) τοποθετείται μια στήλη NucleoSpin Gel και PCR Clean-up και φορτώνεται το προϊόν. Γίνεται φυγοκέντρηση για 30 sec στις 11.000 rpm και η ροή απορρίπτεται.
3. Γίνεται προσθήκη 700 μl Buffer NT3 (διάλυμα πλύσης) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec στις 11.000 rpm. Απορρίπτεται η ροή και επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία.
4. Έπειτα, για να γίνει οριστική η απομάκρυνση του Buffer NT3 τα προϊόντα φυγοκεντρούνται για 1 min στις 11.000 rpm. Σε περίπτωση που έχει παραμείνει αιθανόλη από το διάλυμα πλύσης NT3 μπορεί να ανασταλούν ενζυμικές

αντιδράσεις (π.χ. κατά την διαδικασία αλληλούχισης των προϊόντων PCR). Ωστόσο, για να μην συμβεί αυτό, πριν την έκλουση πραγματοποιείται επώαση των στηλών για 3 min στους 70 °C στο πυραντήριο.

5. Τέλος, σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα των 1,5 ml τοποθετείται η στήλη και προστίθεται 30 µl Elution Buffer NE (5mM Tris- HCl, pH=8,5) σε κάθε προϊόν. Πριν πραγματοποιηθεί η φυγοκέντρηση (11.000 rpm για 1 min), τα προϊόντα αφήνονται να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για ένα λεπτό. Το καθαρό προϊόν PCR (purified PCR product) φυλάσσεται στους -20 °C.

#### **4.6. 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>).

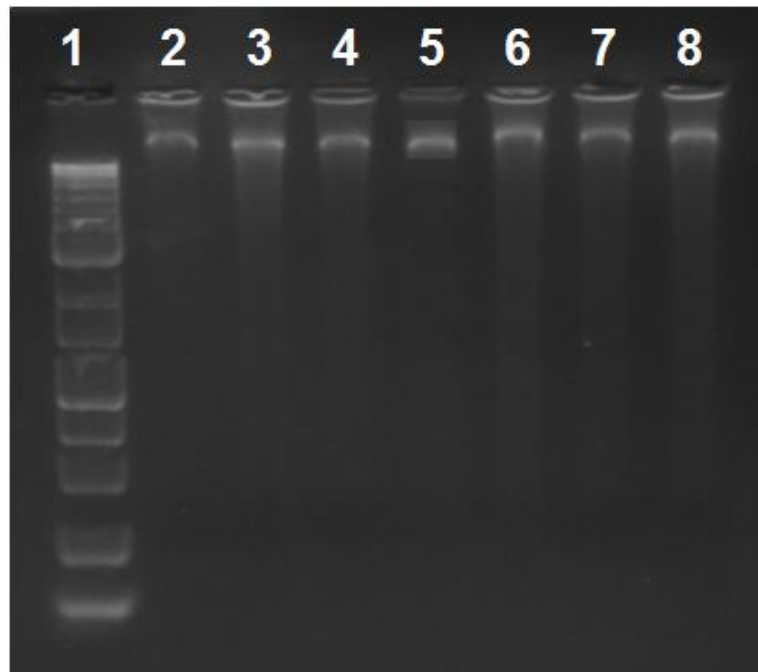
Τέλος, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δένδρο με τη μέθοδο Neighbor-Joining (στα ελληνικά, ένωση γειτόνων) μέσω του προγράμματος MEGA6.0 (Tamura K. et. al., 2013).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>

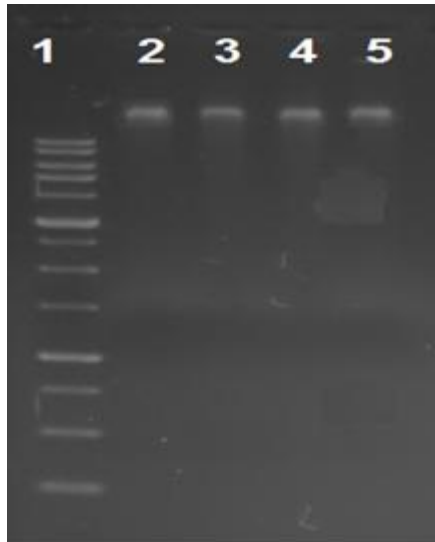
### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 5.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικό υλικό τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς

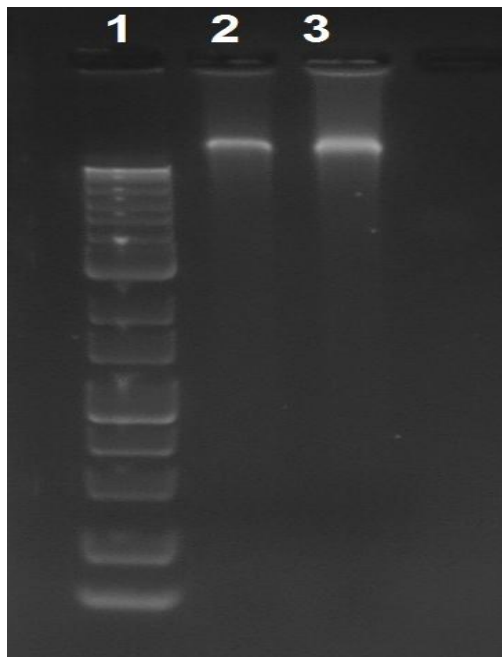
Η απομόνωση του γενωμικού DNA έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στο πρωτόκολλο Genomic DNA from plant της εταιρείας Macherey-Nagel. Ο έλεγχος της επιτυχής απομόνωσης DNA και η ποσοτικοποίησή του έγιναν οπτικά μετά από ηλεκτροφόρηση μιας ποσότητας δείγματος DNA (3  $\mu$ l) σε πηκτή αγαρόζης (1% w/v σε 1xTAE) μαζί με ποσοτικό μάρτυρα γνωστής συγκέντρωσης (5 $\mu$ l, 1Kb DNA Ladder). Όπως φαίνεται στις Εικόνες 27, 28 και 29 οι απομονώσεις DNA από τα δείγματα έδωσαν επαρκή ποσότητα για τις αντιδράσεις PCR.



Εικόνα 27. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v γενωμικών DNA τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς B19,22 (διαδ. 2), B19,63 (διαδ. 3), B19,64 (διαδ. 4), B19,70 (διαδ. 5), B19,80 (διαδ. 6), B19,92 (διαδ. 7), B19,130 (διαδ. 8) Διαδ. 1: 1 Kb DNA Ladder



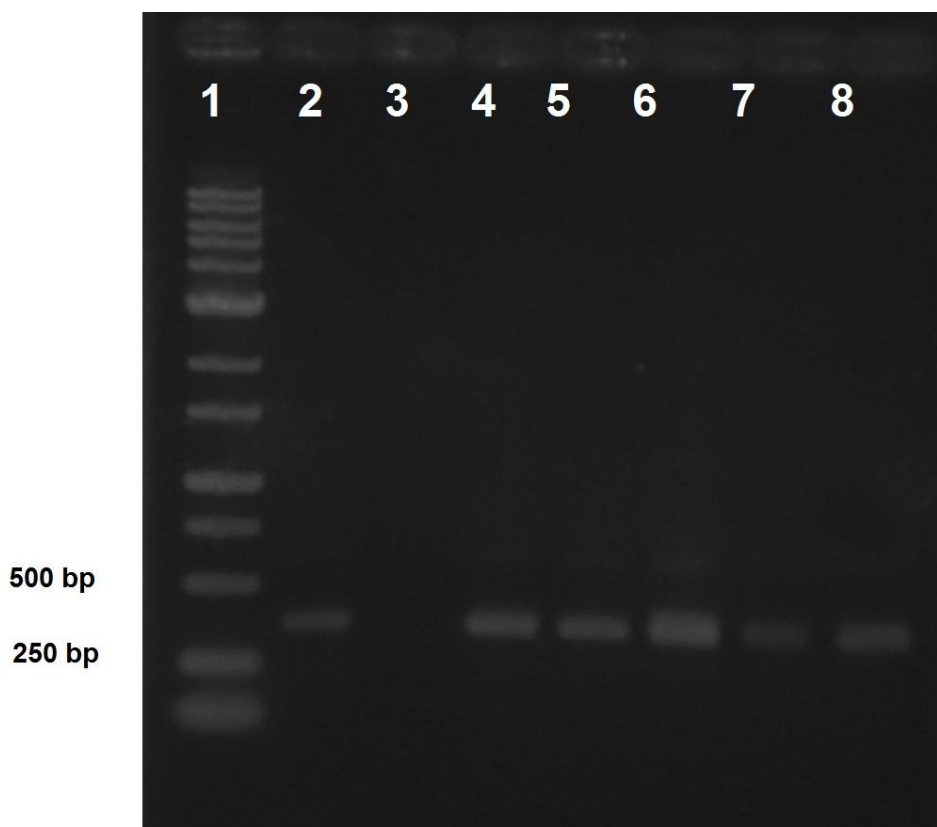
Εικόνα 28. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 1% w/v γενομικών DNA τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς: B19,44 (διαδ. 2), B19,45 (διαδ. 3), B19,65 (διαδ. 4), B19,89 (διαδ. 5). Διαδρομή: 1: 1 Kb DNA Ladder



Εικόνα 29. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 1% w/v γενομικών DNA τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς: B19,90 (διαδ. 2), B19,128 (διαδ. 3). Διαδρομή 1: 1 Kb DNA Ladder

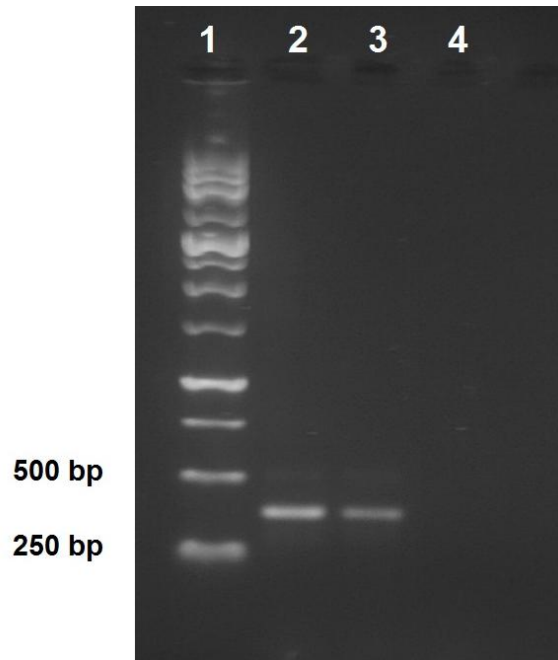
## 5.2. Ανάλυση αλληλουχιών της περιοχής ITS2 του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA)

Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από τις τοπικές ποικιλίες αχλαδιάς χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την ενίσχυση αλληλουχιών της περιοχής ITS2 του nrDNA με την τεχνική PCR. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν οι καθολικοί εκκινητές ITS2-S2F και ITS4. Η επιτυχής ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής ελέγχθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 1,5% w/v. (Εικόνες 30, 31 και 32). Διαπιστώθηκε ότι το μέγεθος των προϊόντων PCR ήταν περίπου 350 bp σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν.



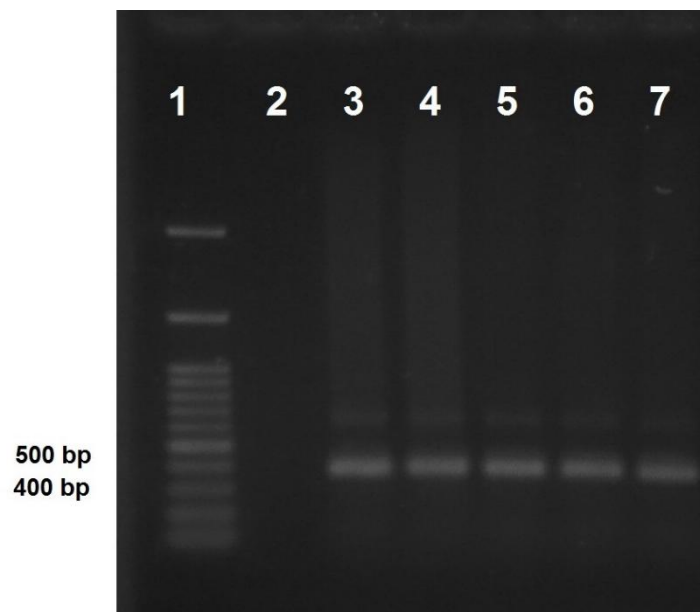
Εικόνα 30. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς και εκκινητές ITS2-2F και ITS4.

Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder – 2: B19,65 – 3: Αρνητικός μάρτυρας – 4: B19,92 – 5: B19,130 – 6: B19,80 – 7: B19,22 – 8: B19,44



Εικόνα 31. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς και εκκινητές ITS2-2F και ITS4.

Διαδ.1: 1 Kb DNA Ladder – 2: B19,45 – 3: B19,70 – 4: Αρνητικός μάρτυρας



Εικόνα 32. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς και εκκινητές ITS2-2F και ITS4.

Διάδ: 1: 100 bp DNA Ladder – 2: Αρνητικός μάρτυρας – 3: B19,89 – 4: B19,128 – 5: B19,90 – 6: B19,63 – 7: B19,64



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, που είναι διαθέσιμο στην ιστοσελίδα <https://blast.ncbi>.

Τα αποτελέσματα της ανάγνωσης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών παρουσιάζονται στο Παράρτημα Α

Τα αποτελέσματα από τη σύγκριση των προσδιορισμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

- Αποτελέσματα δείγματος B19,22 - Πέαρι Παναγίας

Πίνακας 13. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,22

Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus communis</i>	85 %	EU150012.1
<i>Pyrus elaeagrifolia</i>	84 %	FJ810046.1
<i>Pyrus cossonii</i>	84 %	EU150021.1
<i>Pyrus cordata</i>	82 %	KX167899.1

- Αποτελέσματα δείγματος B19,44 - Αυγουστέλια

Πίνακας 14. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,44

Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus communis</i>	87 %	MN577903.1
<i>Pyrus calleryana</i>	86 %	MH712568.1
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	86 %	KY964735.1
<i>Pyrus cordata</i>	85 %	KX167899.1

- Αποτελέσματα δείγματος B19,45 – Καμπάνες

Πίνακας 15. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,45

Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus communis</i>	88 %	EU150012.1
<i>Pyrus cossonii</i>	87 %	EU150021.1
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	86 %	EU150019.1
<i>Pyrus cordata</i>	83 %	KX197899.1

- Αποτελέσματα δείγματος B19,63 – Κρυστάλλια Κρασιάς

Πίνακας 16. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,63

Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus cordata</i>	89 %	KX167899.1
<i>Pyrus cossonii</i>	88 %	EU150021.1
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	87 %	KY964735.1
<i>Pyrus communis</i>	86 %	MN577903.1

- Αποτελέσματα δείγματος B19,64 – Θεριστιάτα Αχλαδιά

Πίνακας 17. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,64

Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus cordata</i>	96 %	KX167899.1
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	96 %	KY964735.1
<i>Pyrus calleryana</i>	95 %	MH712568.1
<i>Pyrus communis</i>	95 %	MN577903.1

- Αποτελέσματα δείγματος B19,65 – Βουλιμάδες Κρασιάς

Πίνακας 18. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,65

Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus cordata</i>	95 %	FJ810046.1
<i>Pyrus elaeagrifolia</i>	94 %	EU150019.1
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	93 %	KX167899.1
<i>Pyrus communis</i>	91 %	MN577903.1

- Αποτελέσματα δείγματος B19,70 – Αχλάδι Φράξος

Πίνακας 19. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,70

Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus cordata</i>	93 %	KX167899.1
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	91 %	KY964735.1
<i>Pyrus calleryana</i>	91 %	MH712568.1
<i>Pyrus communis</i>	91 %	MN577903.1

- Αποτελέσματα δείγματος B19,80 – Αχλαδιά Κέδρου

Πίνακας 20. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,80

Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus cordata</i>	97 %	KX167899.1
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	95 %	KY964735.1
<i>Pyrus calleryana</i>	95 %	MH712568.1
<i>Pyrus communis</i>	95 %	MN577903.1

- Αποτελέσματα δείγματος B19,89 – Αχλαδιά Λαφίνα 1

Πίνακας 21. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,89

Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus communis</i>	92 %	EU150012.1
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	91 %	EU150019.1
<i>Pyrus cordata</i>	91 %	KX167899.1
<i>Pyrus elaeagrifolia</i>	91 %	FJ810046.1

- Αποτελέσματα δείγματος B19,90 – Αχλαδιά Λαφίνα 2 “Μπακάλη”

Πίνακας 22. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,90

Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus cordata</i>	96 %	KX167899.1
<i>Pyrus elaeagrifolia</i>	95 %	FJ810046.1
<i>Pyrus communis</i>	95 %	EU150012.1
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	91 %	EU150019.1

- Αποτελέσματα δείγματος B19,92 – Μυρωδιάρικα Ριζοβουνίου

Πίνακας 23. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,92

Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus cordata</i>	97 %	KX167899.1
<i>Pyrus elaeagrifolia</i>	95 %	FJ810046.1
<i>Pyrus calleryana</i>	91 %	MH712568.1
<i>Pyrus communis</i>	91 %	MN577901.1

- Αποτελέσματα δείγματος B19,128 – Γκορτσαπιδιά Άρτας

Πίνακας 24. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,128

Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus cordata</i>	94 %	KX167899.1
<i>Pyrus amygdaliformis</i>	93 %	KY964735.1
<i>Pyrus communis</i>	92 %	MN577903.1
<i>Pyrus calleryana</i>	91 %	MH712568.1

- Αποτελέσματα δείγματος B19,130 – Χειμωνιάτικα Μελιανών

Πίνακας 25. Αποτελέσματα της ανάλυσης της αλληλουχίας της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA της ποικιλίας B19,130

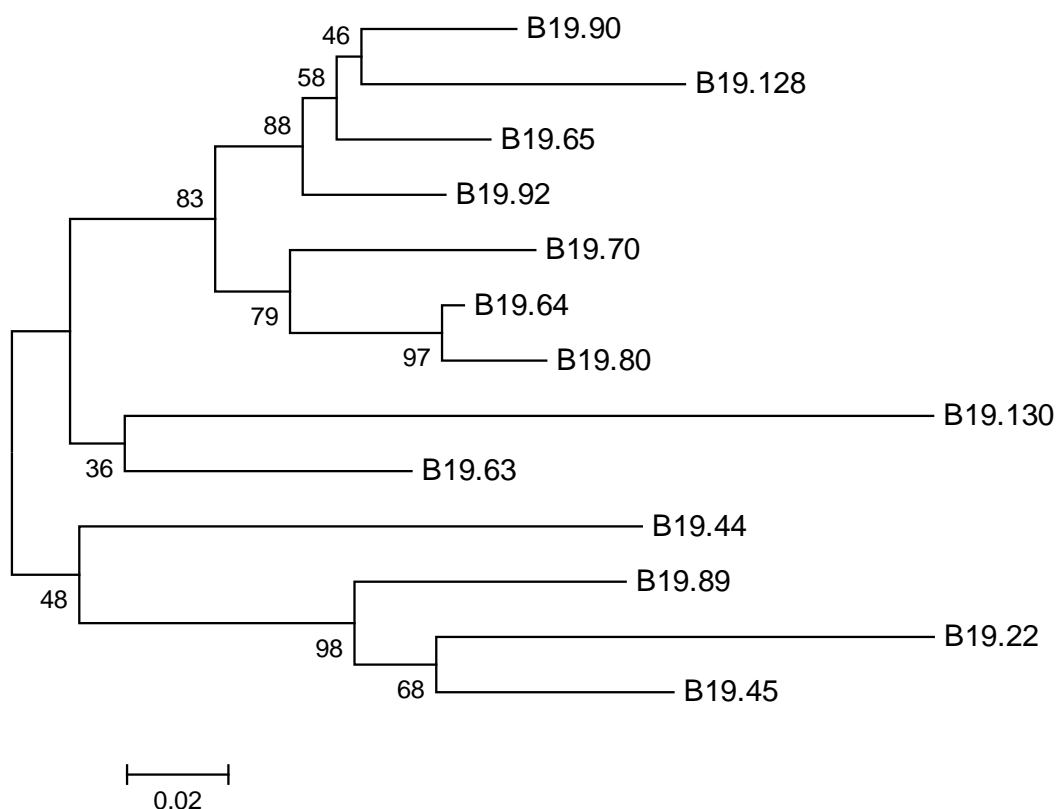
Είδη από τα οποία προέρχονται οι αλληλουχίες ITS2 nrDNA	% ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες ITS2 nrDNA	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Pyrus cordata</i>	85 %	KX167899.1
<i>Pyrus elaeagrifolia</i>	84 %	FJ810046.1
<i>Pyrus communis</i>	84 %	EU150012.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	84 %	KC895397.1

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 *Pyrus* και συγκεκριμένα:

- ✓ Οι B19,64, B19,64, B19,65, B19,70, B19,80, B19,90, B19,92, B19,128 και B19,130 παρουσίασαν μεγαλύτερη ομολογία με ITS2 αλληλουχίες του είδους *Pyrus cordata*
- ✓ Οι B19,22, B19,44, B19,45 και B19,89 παρουσίασαν μεγαλύτερη ομολογία με ITS2 αλληλουχίες του καλλιεργούμενου είδους *Pyrus communis*

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

Προκειμένου να διερευνηθούν οι φυλογενετικές σχέσεις των υπό μελέτη ποικιλιών κατασκευάστηκαν 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 33.



Εικόνα 33. Φυλογενετικές σχέσεις των τοπικών ποικιλιών του γένους *Pyrus* 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

Στο φυλογενετικό δένδρο της εικόνας 32 παρατηρείται ομαδοποίηση των ποικιλιών με βάση το είδος στο οποίο ανήκουν. Έτσι οι ποικιλίες B19,45, B19,22, B19,89 και B19,44 που βρίσκονται πιο κοντά στο *Pyrus communis* αποτελούν μία ομάδα (ομάδα A) ενώ οι υπόλοιπες που βρίσκονται πιο κοντά στο *Pyrus cordata* αποτελούν μια άλλη ομάδα (ομάδα B). Στην ομάδα A οι ποικιλίες B19,45 και B19,22 αποτελούν ένα ξεχωριστό

κλάδο. Στην Β ομάδα οι ποικιλίες B19,70, B19,64 και B19,80 αποτελούν ένα ξεχωριστό κλάδο με την ποικιλία B19,70 να διαχωρίζεται από τις υπόλοιπες. Επίσης οι ποικιλίες B19,90 και B19,128 αποτελούν ένα ξεχωριστό κλάδο.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι η γενετική ανάλυση των 13 τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς με βάση τις αλληλουχίες της ITS2 περιοχής του nrDNA έδειξε ότι οι ποικιλίες βρίσκονται πλησιέστερα στα είδη *P. communis* και *P. cordata* και παρουσιάζουν μεγάλη γενετική ποικιλότητα.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία έγινε μια αρχική προσπάθεια να μελετηθεί και να αποτιμηθεί η γενετική ποικιλότητα δεκατριών τοπικών ποικιλιών αχλαδιάς που εντοπίστηκαν σε ορεινές περιοχές της Ηπείρου. Η φυλογενετική ανάλυση με βάση τις αλληλουχίες της ITS2 περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA έδειξε ότι ποικιλίες B19,45, B19,22, B19,89 και B19,44 αποτελούν μια φυλογενετική ομάδα, ενώ οι ποικιλίες B19,63, B19,64, B19,65, B19,70, B19,80, B19,90, B19,92, B19,128 και B19,130 αποτελούν μια δεύτερη φυλογενετική ομάδα που βρίσκεται πλησιέστερα σε ποικιλίες του *Pyrus cordata*. Επίσης παρουσιάζεται υψηλή γενετική παραλλακτικότητα και μέσα σε κάθε φυλογενετική ομάδα.

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. Το τελευταίο θα βοηθήσει στον εντοπισμό χρήσιμης παραλλακτικότητας για τα προγράμματα βελτίωσης.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΞΕΝΗ BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Álvarez I, Wendel JF (2003).** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 29:417-434.

**Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ.** (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Mo Bot Gard.* 1995;82: 247–277.

**Bretting P. K. and Widrlechner M. P.** (1995). Genetic Markers and Plant Genetic Resource Management. In *Plant Breeding Reviews*. Edited by Jules Janick John Wiley & Sons, Vol.13, pp:11-86 NCRPIS Publications and Papers. 75. Ανακτήθηκε από [https://lib.dr.iastate.edu/ncrpis\\_pubs/75](https://lib.dr.iastate.edu/ncrpis_pubs/75)

**Chen, S., Yao, H., Han, J. et al.** (2010). Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS One* 5(1): e8613. pmid:20062805

**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).

**Lantz, P.G., Al-Soud, W.A., Knutsson, R., Hahn-Hagerdal, B. & Radstom, P.** (2000). Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples.

**Sambrook J. and Russell D.W.** (2001). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3th Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

**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](https://www.researchgate.net/publication/279350602_Molecular_Systematics_of_Plants_II)

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

**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).

Yao, H., Song, J. Liu, C., Luo, K., et al., (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. PLoS One 2010;5(1): e8613. PMID:20062805

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Βασιλακάκης, Μ.** (2016). Γενική και Ειδική Δενδροκομία (Α' έκδ.). Θεσσαλονίκη: Γαρταγάνης.

**Βουτσά, Α.** (2018). Λεξικό Διατροφής. Αχλάδι. <https://www.mednutrition.gr/portal/efarmoges/leksiko-diatrofis/15871-axladi>

**Γανόπουλος, Ι.** (2013). Διερεύνηση γενετικής παραλλακτικότητας, ταυτοποίησης και εφαρμογή λειτουργικών δεικτών στην κερασιά (*Prunus avium* L.). (Διδακτορική Διατριβή). Θεσσαλονίκη: Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

**Γανόπουλος, Ι., Μποσμάλη, Ει, Πασέντης, Κ. και Τσαυτάρης, Α.** (χ.χ.). Η χρήση του DNA και της τεχνολογίας DNA-Barcoding για την μελέτη της βιοποικιλότητας και τη διάκριση των ειδών και των τοπικών ποικιλιών οσπρίων. Ανακτήθηκε από [http://www.minagric.gr/gpa/gpa\\_second/omilies/MadesisTopikespoikiliesAthina2013v2.pdf](http://www.minagric.gr/gpa/gpa_second/omilies/MadesisTopikespoikiliesAthina2013v2.pdf)

**Ζέρβα, Χ.** (2020). «Σχεδιασμός, υλοποίηση και αξιολόγηση ολοκληρωμένων προγραμμάτων εκπαίδευσης για την αειφορία στο Φορέα Διαχείρισης Ε.Π. Τζουμέρκων». (Διπλωματική εργασία). Ιωάννινα: Παιδαγωγικό τμήμα Νηπιαγωγών. Τμήμα Ιατρικής. Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών.

**Μαλούπα, Ε.** (2012). Αξιοποίηση των ελληνικών φυτών. Ανακτήθηκε από <http://www.geotee-anmak.gr/img/ekdiloseis/aromatika/fitogenetikoi%20poroi.pdf>

**Μαλούπα, Ε.** (2019). Ολιστική αξιοποίηση της φυτικής βιοποικιλότητας, μέσω της προστασίας και διατήρησης σε Τράπεζες Γενετικού Υλικού. 2οΕτήσιο Διεθνές Συνέδριο AgriBusinessForum“2020-2025: Το μέλλον του αγροδιατροφικού τομέα στην ψηφιακή εποχή”Σέρρες1-2/11/2019

**Μαυρομάτης, Α., Βλαχοστέργιος, Δ. και Χατζηθεοδώρου, Β.** (2013). Ο ρόλος των τοπικών ποικιλιών οσπρίων και η αξιοποίησή τους στην παραγωγή βελτιωμένου γενετικού υλικού. Ανακτήθηκε από [http://www.minagric.gr/gpa/gpa\\_second/omilies/mayromatis.pdf](http://www.minagric.gr/gpa/gpa_second/omilies/mayromatis.pdf)

**Μελίδου, Χ.** (2013). Μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας και ταυτοποίηση ελληνικών ποικιλιών ροδιάς (*Punica granatum* L.) με τη χρήση μοριακών δεικτών. (Μεταπτυχιακή Διατριβή). Θεσσαλονίκη: Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

**Μολασιώτης, Α. (χ.χ.).** Η καλλιέργεια της αχλαδιάς. Ανακτήθηκε από [file:///C:/Users/user-rc/Downloads/%CE%91%CE%A7%CE%9B%CE%91%CE%94%CE%99%CE%91\\_2015%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/user-rc/Downloads/%CE%91%CE%A7%CE%9B%CE%91%CE%94%CE%99%CE%91_2015%20(2).pdf)

**Μυλωνά, Φ.** (2017). Τράπεζα Γενετικού Υλικού: Διατήρηση και αξιοποίηση της γενετικής ποικιλότητας. Περιοδικό Δήμητρα, τεύχος 20 σελ. 4-6

**Νάνος, Γ.** (2013). Δενδροκομία I Σημειώσεις για Ειδικά Θέματα. <http://www.astikoktellarisas.eu/ftpuploads/dendrI1.pdf>

**Ξυνιάς, Ι.** (2014). Βελτίωση Φυτών: Θεωρία και Ασκήσεις. Αθήνα: Έμβρυο.

**Παλαιολόγου, Δ.** 2015. Ηλεκτροφόρηση DNA (Κεφ.8) στο Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., Δούκισσας, Λ. Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 8. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/650>

**Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Παπανικολάου, Γ., Ε.** 2015. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. [Κεφ. 7]. Στο Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., Δούκισσας, Λ. 2015. Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 7. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/647>

**Ποντίκης, Κ.** ( 1994). Ειδική δενδροκομία Τόμος I "Μηλοειδή". Εκδόσεις Σταμούλης Α.Ε. Αθήνα

**Τσαυτάρης, Α., Νιάνιου- Ομπεϊντάτ Ε., Πολύδωρος Α..** (2012). Βελτίωση φυτών. Εκδόσεις σύγχρονη παιδεία, Θεσσαλονίκη

**Φανουράκης, Ν.** (2010). Γενετική βελτίωση φυτών: Βασικές αρχές (2<sup>η</sup> έκδ.). Αθήνα: ΙΩΝ

**Χατζηχαρίσης Ιωάννης (2015).** Ο πλούτος των γη ων ποικιλιών οπωροφόρων. 3η Επιστη-μονική Συνάντηση για τις γηγενείς και τοπικές ποικιλίες  
[http://www.minagric.gr/gpa/gpa\\_third/omilies/xatnixarisis3.pdf](http://www.minagric.gr/gpa/gpa_third/omilies/xatnixarisis3.pdf)

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

## ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

- [https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic\\_info.php?unitid=U100004337](https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100004337)
- <https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/>
- <https://ecovariety.azurewebsites.net/>
- [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)
- <https://www.kipogeorgiki.gr/%CE%91%CF%87%CE%BB%CE%B1%CE%B4%CE%B9%CE%AC-Pyrus-communis?search=%CE%91%CF%87%CE%BB%CE%B1%CE%B4%CE%B9%CE%AC>
- <https://www.statistics.gr/>
- <https://gaiagreek.gr/>

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α´

- ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ITS2 ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΧΛΑΔΙΑΣ

### **B19,22 (5´-3´) (350 bp)**

GGGGTTGGGACTCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGC  
CGTTGCTCCCCGCGCCTCCCTCGGGAGAGCGTCGGGGGGCAGAAGAGGCTCTCCCGTGCCACCCGCGCGGGTGTGGCA  
CATGTGCGGGGCCCTCGGACAAAGACCCCAACAATATCGGGGTTTCCACCTCTCTGTGCGTGGTGTGCTTTTTCCTCGCT  
CTCAGAGGGCCCCGAGACTCTCCGTGCTCTTTTTCGGGAGATTTTCCGCGACACCCCGTGTGGGGGGGTACCCCGGA  
GTTTTTACATATATCTATACGCGGAAAAA

### **B19,44 (5´-3´) (348 bp)**

GGAGTAGACTCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGCCGT  
TGCCCCCGCGCCTCCCTCGGGAGAGCGTCGGGGGGCACAATGGGCTCCCTGCGTCACCCGCGCGGGTGGGACAAA  
TGCGGGGGCCCCGCGGACAAAAACCCGACAATAGGTGGGTTTCCACCTCTGTTGTGCGTGTGCGCTTTTTTCGCGCTC  
TCATCGGCCCCGACGCTCCCCGCTCTGCTTTTGCCGAGATTTTACGCGACCCCGGTCAGGGGGGGTTACCCCTGAAA  
TTTAAGATATTAATAAAGGGAGGAAAAA

### **B19,45 (5´-3´) (350 bp)**

GCAATTGGACTCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGCCG  
TTGCTCCCCGCGCCTCCCTCGGGAGAGCGTCGGGGGGCAGAAGAGGCTCCCGCGCGTCCCCCGCGGGTGTGGCACAA  
GTGCGGGGCCCTCGGAGAAAAACCCCAAGAATATCGGGGTTTCCAAACCTCGTGTGCGTGTGTCGCTTTTCGTCGCTCT  
CAGAGGGGCCCGACGCTCCCCCTCTGCTTTTGCGGAGATTTTACACGACCCCGGGTGGGGGGGATCCCCTGAAT  
ATTTACATATTAATAAAGGAGAAAAA

### **B19,90 (5´-3´) (347 bp)**

TTGAACTCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGCCGTTG  
CTCCCCCGCGCCTCCCTCGGGAGAGCGTCGGGGGGCAGACGAKGGCCTCCCGTGCGTCACCCGCGCGGGTGGCACAAAT  
GCCGGTCTCTGGCGACGGACGCCACGACAATCGGTGGTTTCCAAACCTCGGTTGCCTGTTGTGCGCTTTCGTCGCGCTCC  
GAGCGGCCCGTACCCCTCCCGGCCCGGTTTCGGCGAATTTTACCAGCAACCCCGGGTCAGGGGGGGTTACCCGTTAATT  
TTAACATTAAGTGTGCGGAAGAAAA

### **B19,64 (5´-3´) (347bp)**

GACTGGACTCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGCCGTT  
GCYCCCCGCGCCTCCCTCGGGAGAGCGTCGGGGGGCAGGACGATGGCCTCCCGTGCGTCACCCGCGCGGGTGGCACAA  
ATGCCGGTCTCTGGCGACGGACGCCACGACAATCGGTGGTTTCCAAACCTCGGTTGCCGTTGTGCGCTTTCGTCGCGCT  
CCGAGCGGCCCGTGCACGCTCCCGCTCTGCTTCGGCCGAGTTTCAACGCGACCCAGGTCAGGGGGGGTTACCCGCTG  
AATTTAAGCATATCAAAAAGCGGAGAA

**B19,65 (5'-3') (351bp)**

GGAAGGGGACTCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGC  
CGTTGCTCCCCCGCGCTCCCTCGGGAGAGCGTCGGGGGGCGGACGATGGCCTCCCGTGCCTCACCCCGCGGGTTGGCA  
CAAATGCCGGGTCTCGGCGACGGACGCCACGACAATCGGTGGTTTCCAAACCTCGGTTGCCTGTTGTGCGCTTTCGTGCG  
CGCTCCGAGCGGCCCGTGCACCTCCCGGCTCTGTTTCGGCGAATTTTTACGGCAACCCCGGGTCAGGGGGGTTTACCC  
GTTGATTTTAACATTATCAAAAAGGGGAAGAAA

**B19,70 (5'-3') (355 bp)**

AGATGTGGACATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGC  
CCGTTGCTCCCCCGCGCTCCCTCGGGAGAGCGTCGGGGGGCGGACGATGGCCTCCCGTGCCTCACCCCGCGGGTTGGC  
ACAAATGCCGGGTCTCCGCGACGGACGCCACGACCATCGGTGGTTGTCTAACCTCGGTTGCCTGTTGTGCGCTTTCGTGCG  
CGTCCCAACGGGCGGGCGACGTTCCCGCTCTGCTTCGGCCGACTTTTCATCGCAACCCCGGGTCGGGGGGGTTTACCC  
GCTGATTTTATTATATCATTAATGGAAGAAAAGA

**B19, 89 (5'-3') (349 bp)**

AGATGGGACTCGAGTCTTTGACGCAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGCCGT  
TGCCCCCGCGCTCCCTCGGGAGAGCGTCGGGGGGGGAAAGATGGCCTCCCGTGCCTCCCCCGCGGGGTGGCACA  
AATGCCGGGCCCTCGGAGACAGACGCCACGAAAATCGGGGGTTTCCAACCCTCGKTTGCGTGTGTGCGTTCGTGCGCT  
CTCCGAGSGGCCGAGACTCTCCCTGCCCTTTTACGGAGATTTTTTACGACCCCGGGGTGGGGGGGGATCCCCCGA  
AAATTTAAATATTAATAAAGGGAGGAAAAA

**B19,128 (5'-3') (350 bp)**

GGATGGGACTCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGCCG  
TTGCTCCCCCGCGCTCCCTCGGGAGAGCGTCGGGGGGCGGACGATGGCCTCCCGTGCCTCACCCCGCGGGGTGGCACA  
AATGCCGGGTCTCGGAGACGGACGCCACGAMAATCGGTGGTTTCCAAACCTCGGTTGCCTGTTGTGCGCTTTCGTGCGG  
CTCCGAGCGACCCGCCACGCTCCCTGCCCTGTTTCGGCGAACTTTCCACGCCACCCCGGGCGGGGGGGTTTACCCGCT  
GAATTTAAACATATCAATAAGCGGAAGAAA

**B19,130 (5'-3') (347 bp)**

GGGAATCGAGTCTTTGACGCAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTACACGCCGTTGCC  
CCCCCGCGCTCCCTCGGGAGAGCGTGGGGGGGGAGACGATGGTCTCCCGCGCTCCCCCGCGGTGTGGACATGCGC  
CGGGTCTCCGAGAAAGACCACAACAATATCGGGGGTTTCCAACCCTTTCGCGCTGGTGTGCGCTTTCCTCGCGCTAGC  
AGCGGCCCGCGCTCTCCCTGCCCTTCTCCGACCATTTATCTACCCCCCCCCCGGGCGGGGGGTTCCCGCTTTTTTTTA  
ATTATAAATCAGGGGGGAAGAAAAGA

**B19,80 (5'-3') (356 bp)**

TAACCTGGACTCGAAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACG  
CCGTTGCTCCCCCGCGCTCCCTCGGGAGAGCGTCGGGGGGCGGACGATGGCCTCCCGTGCCTCACCCCGCGGGTGGC  
ACAAATGCCGGGTCTCGGCGACGGACGCCACGACAATCGGTGGTTGCCAAACCTCGGTTGCCGTTGTGCGCTTTCGTGCG

GCGCTCCCAAGGGGCCCGCAGCTCCCCGCTCTGCTTCGGCCGAGTTTTCAACGCGACCCCAGGTCAGGGGGGGTTACC  
CGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGGCCGGAGGAAA

**B19,63 (5'-3') (348 bp)**

AGGTTCACTCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGCCGT  
TGCCCCCGCGCCTCCCTCGGGAGAGCGTCGGGGGGCGGAAGATGCTCTCCCGTGCCTCCCCCGCGCGGTTGGCACAA  
GTGCCGGGTCTCGGAGAAAAGACCCACGACTATCGGGGGTTTTCAAACCTCGGGTGCCTGTTGTGCTTTTTCTCGCGCT  
CCGAGCGGCCCGAGACTCTCCGTGCCGTGTTTCGGCAGATTTTTCCACGCCACCCCGGGTCGGGGGGGTTTACCCGCTGA  
TTTTAAACATATATAAGGCGAGAGAAA

**B19,92 (5'-3') (353 bp)**

CCCACGGTAACTCGAGTCTTTGAACGCAGTTGCGCCCGAAGCCTTTCAGGCCGAAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACAC  
GCCGTTGCTCCCCCGCGCTCCCTCGGGAGAGCGTCGGGGGGCGGACGATGGCCTCCCGTGCCTACCCCGCGCGGTTGG  
CACAAATGCCGGGTCTCGGCGACGGACGCCACGACAATCGGTGGTTTTCAAACCTCGGTTGCCCGTTGTGCGCTTTCGT  
CGCGTCCGAGCGGCCATCAACCTTCCCGGCTCTGCTTCGGCCAACTTTTACCGCAACCCCGGGTCAGGCGGGTTTACC  
CGCTGATTTTAACCATATAAAGTCGGAAGGAA

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄

- ΕΙΚΟΝΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
- Δείγμα Β19,22



*Εικόνα 34. Δένδρο δείγματος Β19,22*



*Εικόνα 35. Καρποί δείγματος Β19,22*



- Δείγμα B19,44



Εικόνα 36. Καρποί δείγματος B19,44

- Δείγμα B19,63



Εικόνα 37 Καρποί δείγματος B19,63

- **Δείγμα B19,65**



*Εικόνα 38. Καρποί δείγματος B19,65*

- **Δείγμα B19,80**



*Εικόνα 39. Καρποί δείγματος B19,80*



*Εικόνα 40. Δένδρο δείγματος B19,80*

- **Δείγμα B19, 89**



*Εικόνα 41. Καρποί δείγματος B19,89*

- **Δείγμα B19,90**



*Εικόνα 42. Καρποί δείγματος B19,90*



*Εικόνα 43. Δένδρο-κορμός δείγματος B19,90*

- Δείγμα B19,92



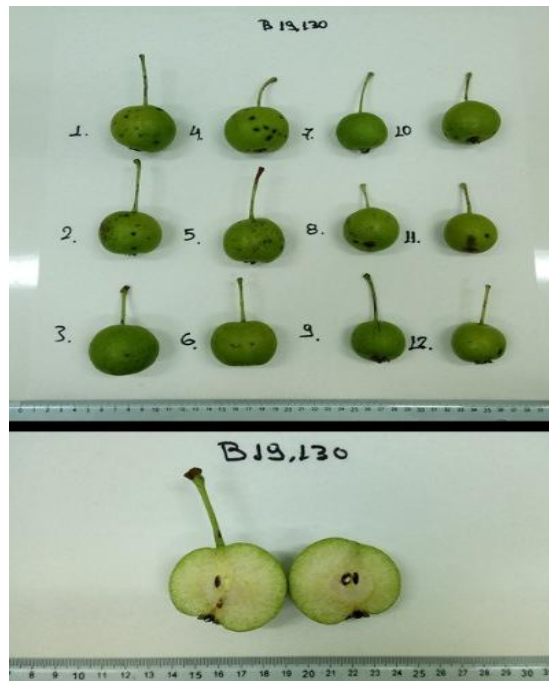
*Εικόνα 44. Καρποί δείγματος B19,92*

- Δείγμα B19,128



*Εικόνα 45. Καρποί του δείγματος B19,128*

- Δείγμα B19,130



Εικόνα 46. Καρπίδια δείγματος B19,130