

ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ

Τμήμα φυτικής Παραγωγής

ΣΤΕΓ

**Ανίχνευση γενετικής ποικιλομορφίας σε παραδοσιακές ποικιλίες αγγουριού με
χρήση μοριακών δεικτών**

Κορνωτάκης Ιωάννης

Ηράκλειο 2007

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

6

1.1. Καταγωγή, Βοτανικά Χαρακτηριστικά.	7
1.2. Εδαφοκλιματικές Απαιτήσεις.	10
1.3. Κυριότερες Ασθένειες της Καλλιέργειας.	10
2. Μοριακοί Δείκτες.	11
2.1. Πλεονεκτήματα του Cucumis sativus στη Γενετική.	12
2.2. RAPDS (Random Amplified Polymorphic DNA).	13
2.3. Χαρακτηριστικά Μοριακών Δεικτών.	16
2.4. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της τεχνικής RAPDS.	17
3. Σκοπός της Παρούσας Εργασίας.	21
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.	22
4.1. Προβλάστηση Σπόρων.	23
4.2. Μεταφύτευση Νεαρών Φυτών στο Θερμοκήπιο.	24
4.3. Φροντίδα Φυτών στο Θερμοκήπιο.	25
4.4. Τεχνητές Επικοινωνίες.	25
4.5. Συγκομιδή Καρπών Εξαγωγή Σπόρου.	27
4.6. Απομόνωση DNA(DNA Extraction) από Φύλλα Αγγουριού.	28
4.7. Διαδικασία Ποσοτικού Προσδιορισμού DNA.	29
4.8. Ενίσχυση RAPD Μετά την PCR.	30
4.9. Ηλεκτροφόρηση Αγαρόζης.	32
4.10. Βαθμονόμηση Μοριακών Δεικτών.	32
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.	34
5.1. Ποσοτικός Προσδιορισμός DNA.	35
5.2. Ανάλυση RAPD.	35
5.3. Αποτελέσματα Ηλεκτροφόρησης DNA.	37
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.	44
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.	48
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.	53

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, κατ' αρχήν τον εισηγητή μου Δρ. Νικόλαο Φανουράκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το παρόν θέμα, για τις πολύτιμες γνώσεις, καθώς και την

ανεκτίμητη βοήθεια του τόσο στο πειραματικό, όσο και στο θεωρητικό μέρος, τον υποψήφιο Δρ. Μάνο Τραντά για την πολύτιμη και ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε, που χωρίς αυτή η παρούσα εργασία θα ήταν πιο δύσκολη και για την τεχνογνωσία που μου προσέφεραν στο πειραματικό μέρος.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σπουδαστή Μηνά Ιακωβίδη για την συνεργασία που είχαμε και τους φίλους μου για την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν άμεσα και έμμεσα.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου υποψήφιο Δρ. Παναγιώτη Σαρρή, χωρίς τη συμβολή του οποίου δεν θα ασχολιόμουν με το συγκεκριμένο αντικείμενο που τόσο πολύ επιθυμούσα.

Με εκτίμηση

Κορνιωτάκης Ιωάννης

Abstract

In many regions of Greece, mostly the previous years, farmers cultivated traditional varieties (landraces), certain those characteristics that constitute usefully tools for the geneticists today, in order to incorporate desirable characteristics in plants with wide consumption. One of this plants is the cucumber, which presents explicit advantages than other plants, in regard to its culture and the usefulness that this demonstrates in genetic studies.

The object of the present work was the detection of genetic diversity among the plants of the landrace Kalivia with the use of the RAPD molecular markers and the registration of qualitative phenotypical characteristics, aiming at the estimate of the genetic cleanliness of the variety and if this is reflected in the phenotype. For this aim, it was used DNA from 30 randomly selected plants for the molecular detection with RAPD, using 20 10-mer oligonucleotides with randomly sequence of nucleotides. Each DNA segment that was detected, constitutes an RAPD marker and all the plants were checked for the presence or absence of the markers. The morphological description of each plant separately included the following characteristics: Sex expression, powdery mildew resistance, bitterness, immature fruit color, mature fruit color, spine size, spine frequency, spine color, warted fruit and fruit skin gloss.

The result of the RAPD molecular analysis showed that there was no divergence from absolute uniformity in the detected markers, some of which are specific for this concrete landrace and they could be used to distinguish it from other landraces with same or similar phenotypical expression.

The morphological characteristics of the plants of this variety indicated high phenotypical uniformity between them. This agrees with the results of the RAPD molecular analysis and proves their high degree of genetic purity.

Περίληψη

Οι μοριακοί δείκτες θεωρούνται ως ένα αξιόπιστο εργαλείο για την ανίχνευση πολυμορφισμών της αλληλουχίας του DNA και την εξακρίβωση των γενετικών διαφορών οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη διάκριση και κατοχύρωση των εμπορικών ποικιλιών σε σχέση με την περιγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών. Τέτοιου είδους μελέτες έχουν γίνει σε διάφορα είδη φυτών όπως αυτά της οικογένειας Cucurbitaceae για την χαρτογράφηση του γονιδιώματος, την ανίχνευση της γενετικής ποικιλομορφίας, τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων και την ταυτοποίηση ποικιλιών. Για τον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλομορφίας και των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των φυτών, έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα μια πληθώρα τεχνικών που στηρίζονται στη μελέτη μορφολογικών, γενετικών και μοριακών χαρακτηριστικών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε και ένας μεγάλος αριθμός δεικτών όπως δείκτες πρωτεϊνών (Ισοένζυμα) και δείκτες νουκλεϊκών οξέων όπως τα RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) και τα RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καταγωγή, Βοτανικά Χαρακτηριστικά.

Το αγγούρι, είδος γνωστό και καλλιεργούμενο από αρχαιοτάτων χρόνων, πιστεύεται ότι κατάγεται από την Ινδία ή από την Αφρική. Αυτοφύες δεν έχει βρεθεί. Στην Ευρώπη έχει εισαχθεί πιθανά από τους Έλληνες, οι οποίοι το καλλιεργούσαν όπως και σήμερα, για τον καρπό του. Είναι ο Σίκυος ή Σίκυς του Θεόφραστου. Σήμερα καλλιεργείται στην χώρα μας σε έκταση περίπου 40.000 στρεμμάτων. Σημαντικό μέρος αυτής της έκτασης καταλαμβάνουν πρώιμες καλλιέργειες, θερμοκηπίων, εκεί όπου οι κλιματικές συνθήκες είναι περισσότερο ευνοϊκές, όπως στην Πελοπόννησο (Μεσσηνία, Λακωνία, Ηλεία), στην Κρήτη (Ιεράπετρα, Τυμπάκι) στην Πρέβεζα κ.λ.π. Είναι ένα από τα κυριότερα λαχανικά και το δεύτερο σε σειρά σπουδαιότητας κηπευτικό θερμοκηπίου.

Η αγγουριά, *Cucumis sativus* L. ανήκει στην οικογένεια των *Cucurbitaceae*, είναι φυτό πολυετές αλλά καλλιεργείται σαν ετήσιο, είναι ποώδες, έρπον ή αναρριχώμενο, τα φύλλα είναι απλά με λωβούς γωνιώδους απολήξεως και τα άνθη του είναι μόνουκα και δικλινή.

Με βάση τους χαρακτήρες του φυτού το διαιρούν στα υποείδη *Rigibus*, *Gracilis* και *Argestis*, από τα οποία μόνο τα δύο πρώτα περιλαμβάνουν ποικιλίες με καρπό εδώδιμο. Οι καλλιεργούμενες μορφές είναι διπλοειδείς ή τετραπλοειδείς με αριθμό χρωμοσωμάτων $2n$ ίσον 14 και $4n$ ίσον 28. Το φυτό είναι ετήσιο ποώδες, δίκλινο, μόνουκο και σπάνια ανδρομόνουκο (φέρει και ερμαφρόδιτα άνθη).



Σίδηρος	2,2 mgr
Βιταμίνη Α	0,0 mgr
θειαμίνη Β2	0,26 mgr
Ριβοφλαμίνη 02	0,62 mgr
Νισσίνη	0,10 mgr
Ασκορβικό οξύ	69,4 mgr

Πίνακας 1. Διατροφική αξία του *Cucumis sativus*

Ποικιλίες–Υβρίδια: Ανάλογα με τον προορισμό του καρπού οι καλλιεργούμενες ποικιλίες διακρίνονται σε εκείνες των οποίων ο καρπός είναι ευμεγέθης και χρησιμοποιείται νωπός για σαλάτα και σε μικρόκαρπες ποικιλίες που προορίζονται για τουρσί . Από τις μεγαλόκαρπες ποικιλίες καλλιεργούνται μερικές ντόπιες όπως το Καλυβιώτικο, των Φιλιατρών, της Τήνου, και άλλες, καθώς και μερικές ξενικής προελεύσεως όπως Telegraph, η Long Green, η Marketez και άλλες. Όλες αυτές οι ποικιλίες καλλιεργούνται κυρίως σε υπαίθριες καλλιέργειες.



Εικόνα 1. Ποικιλία καλύβια. Άνθος και φυτό.

Από τις μικρόκαρπες ποικιλίες, που χρησιμοποιούνται για τουρσί καλά αποτελέσματα δίνουν οι εξής : Vert, De Paris και άλλες. Στον παραγωγό οι σπόροι φτάνουν συσκευασμένοι σε φακελάκια.

Τα χαρακτηριστικά που συνήθως επιδιώκεται να έχει μια ποικιλία ή ένα υβρίδιο είναι : καλή απόδοση, πρωιμότητα, καλή ποιότητα καρπών και αντοχή στις ασθένειες.

Οι βλαστοί είναι έρποντες και διακλαδιζόμενοι, μήκους μέχρι 3-4 μέτρα, γωνιώδεις, τριχωτοί με έλικες, φύλλα εναλλασσόμενα, πλατειά με 3-5 γωνιώδεις λοβούς ή απλά πενταγωνικά, μακρόμισχα και με επιφάνεια καλυπτόμενη από τρίχες. Τα άνθη είναι μασχαλιαία με περιάνθιο συνήθως πενταμερές κίτρινο. Από αυτά τα άρρενα εμφανίζονται κατά δέσμες συνήθως ανά 5, τα δε θήλεα είναι μονήρη. Τα τελευταία εμφανίζονται μετά τα άρρενα και κατά το πλείστον σε βλαστούς δεύτερης ή μεγαλύτερης τάξης. Τα άρρενα έχουν τρεις στήμονες, ένα με ανθήρα απλό και δύο με ανθήρες δίλοβους. Τα θήλεα έχουν ωοθήκη τριμερή και στύλο με τρία δισχιδή

στίγματα. Γενικά ανοίγουν τις πρωινές ώρες για να παραμείνουν ανοικτά μία και σπάνια δύο ημέρες ή και περισσότερες στα θήλα, εφ' όσον αυτά δεν έχουν γονιμοποιηθεί.

Η επικονίαση γίνεται με έντομα. Ο καρπός είναι ράγα, κυλινδρικός, λιγότερο ή περισσότερο επιμήκης, με επιφάνεια λεία ή έχει εξογκώματα και χρώμα βαθύ πράσινο ή πρασινοκίτρινο, ανάλογα με την ποικιλία.

Έχει σάρκα λευκή-λευκοπράσινη, η ποία περικλείει 200-400 και πλέον σπόρους πεπλατυσμένους επιμήκεις, λευκοκίτρινους. Η σύνθεση του καρπού ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία και τις συνθήκες καλλιέργειας. Περιέχει περίπου 95% νερό, 1% σάκχαρα, 0,5% πρωτεΐνες και 0,1% λιπαρές ουσίες, είναι δε πλούσιος σε βιταμίνη C. Από άποψη διατροφής το αγγούρι δεν μπορεί να θεωρηθεί σαν τρόφιμο ενεργειακό (θερμιδοπαραγωγικό) ή δομικό (ιστιοπλαστικό). Μόνο που ένα κιλό αγγούρια μπορούν να μας προμηθεύσουν 101,2 θερμίδες, πρέπει ν' αναγνωρισθεί ότι οι ποσότητες, που χρησιμοποιούνται στη διατροφή μας είναι πάντα ασήμαντες.

***Cucumis sativus* var. Kalivia** (Ποικιλία καλύβια). Προέρχεται από τα Καλύβια, μία περιοχή στον νομό Αττικής, βορειοανατολικά της Αθήνας. Λέγεται και Καλυβιώτικο αγγουράκι. Είναι φυτό μόνικο, ευπαθές σε ασθένειες, παρθενοκαρπικό με μέτριες διακλαδώσεις. Είναι επιδεκτικό στον περονόσπορο, στο οίδιο, στους νηματώδεις και στο φουζάριο. Το μήκος του καρπού είναι περίπου 20 με 25cm, το χρώμα είναι ομοιόμορφο πράσινο. Ο καρπός στιλπνός και έχει τρυφερή υφή. Φέρει πλούσιο σκούρο αγκάθωμα. Το φυτό έχει μέτρια παραγωγικότητα και είναι μέτριας επίσης ζωηρότητας.



Εικόνα 2. Ποικιλία Καλύβια. Φυτό, φύλλο και καρπός

1.2 Εδαφοκλιματικές Απαιτήσεις.

Η αγγουριά είναι φυτό θερμής εποχής, ζημιώνεται δηλαδή από θερμοκρασίες κάτω των 10°C. Αναπτύσσεται σε πολλούς τύπους εδαφών αλλά προτιμά έδαφος αμμοπηλώδες, γόνιμο, καλά στραγγιζόμενο, πλούσιο σε οργανική ουσία, με pH 5,5-7,0. Οι άριστες θερμοκρασίες ανάπτυξης του φυτού κυμαίνονται μεταξύ 18 και 24°C (24°C τη μέρα και 18°C τη νύχτα). Οι θερμοκρασίες εδάφους κάτω των 18°C κάνουν το ριζικό σύστημα ευαίσθητο σε μυκητολογικές προσβολές. Η σχετική υγρασία πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 70 και 80%, αν και οι υψηλές υγρασίες πρέπει να αποφεύγονται καθώς ευνοούν τις ασθένειες.

1.3 Κυριότερες Ασθένειες της Καλλιέργειας

Οι κυριότερες ασθένειες και οι εχθροί που συνήθως προσβάλλουν το αγγούρι αναφέρονται παρακάτω. Οι ασθένειες είναι οι εξής:

- Ψευδοπερονόσπορος (*Pseudoperonospora cubensis*)
- Ανθράκωση (*Colletotrichum lagenarium*)
- Κλαδοσπορίωση (*Cladosporium cucumerinum*)
- Τεφρά Σήψη (*Botrytis cinerea*)
- Σκληρωτινίαση (*Sclerotinia sclerotiorum*)
- Ωίδιο (*Podosphaera xanthii*)
- Φουζαρίωση (*Fusarium* sp.)
- Τήξη φυταρίων (*Pythium* sp.)
- Βακτηρίωση (*Phytomonas lachrimans*)
- Βερτιτσιλίωση (*Verticillium dahliae*)
- Αλτερναρίωση (*Alternaria alternata*)
- Προσβολή λαιμού ριζών (*Pythium* sp., *Phytophthora*)

Στο αγγούρι μεταδίδονται και διάφορες ιώσεις οι οποίες είναι οι εξής:

- Μωσαϊκό του αγγουριού (CMV)
- Πράσινο ποικιλοχρωματικό μωσαϊκό (CGMMV)
- "Δέρμα Βατράχου" (CTSV)

Συμπτώματα των ιώσεων είναι ο μεταχρωματισμός των φύλλων, ποικιλοχλώρωση και παραμόρφωση των φύλλων, ο νανισμός και η ακαρπία των φυτών.

Οι κυριότερες βακτηριολογικές ασθένειες του αγγουριού είναι οι εξής:

- Γονιώδης κυλίδωση (*Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*)
- Βακτηριακή μάρανση (*Erwinia tracheiphila*)

Άλλα συνήθη παράσιτα, έντομα που προκαλούν πολλές φορές ζημιές στις καλλιέργειες του αγγουριού είναι τα παρακάτω:

- Αφίδες (*Aphis* sp.)
- Αλευρώδης (*Trialeurodes vaporariorum*)
- Υλέμυα (*Hylemyia antiqua*)
- Έντομα εδάφους (*Glyptotalpa vulgaris*, *Agrotis* sp.)
- Τετράνυχος (*Tetranychus urticae*)
- Νηματώδεις (*Heterodera* sp.)
- Θρίπας (*Frankliniella occidentalis*)
- Λιριόμυζα (*Liriomyza* sp.)
- Πράσινο σκουλήκι (*Heliothis armigera*)

2. Μοριακοί Δείκτες

Στις διάφορες ποικιλίες φυτών μπορεί κανείς να διακρίνει διαφορές σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, η εκδήλωση των οποίων δεν επηρεάζεται από το περιβάλλον (ποιοτικά χαρακτηριστικά). Η μελέτη των χαρακτηριστικών αυτών γίνεται με μοριακή ανάλυση του γονιδιώματος (DNA) των φυτών που εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά αυτά. Το βιοτεχνολογικό εργαλείο που συνδέεται με την ανάλυση του DNA καλείται μοριακή ανάλυση δεικτών.

Μια από τις εφαρμογές της ανάλυσης του DNA είναι η διάκριση διαφορών μεταξύ συγγενικών φυτών. Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα του DNA, χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο, που παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των προς μελέτη ατόμων, η ανάδειξη των οποίων χρησιμοποιείται για την μελέτη της

κληρονομικότητας χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών (Fanourakis *et al.*, 2004). Επιπρόσθετα, είναι τυχαία επιλεγμένα τμήματα DNA, δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον αλλά ούτε από το αναπτυξιακό στάδιο που βρίσκονται τα άτομα που μελετώνται. Θεωρητικά, για τη μελέτη της κληρονομικότητας, του πολυμορφισμού μεταξύ των ατόμων και την κατασκευή γενετικών χαρτών ενός πληθυσμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν μοριακοί δείκτες που να καλύπτουν ολόκληρο το γονιδίωμα σε προβλεπόμενες ή μη γενετικές αποστάσεις (Χατζόπουλος, 2002). Πρόσφατα, οι μοριακοί δείκτες έχουν επιτρέψει στους γενετιστές και τους βελτιωτές να επινοήσουν στρατηγικές για την ταχύτερη χαρτογράφηση των γονιδιωμάτων των φυτών (Staub *et. al.*, 1996, Stam, 1993). Εντούτοις, η χρησιμότητα των χαρτών για τη βελτίωση φυτών όπως της οικογένειας *Cucurbitaceae*, περιορίζεται από την έλλειψη στενών συνδέσμων με σημαντικά οικονομικά γνωρίσματα. Στο εμπορικό αγγούρι (*Cucumis sativus L. var. sativus*) η χρήση των μοριακών δεικτών έχει επιτρέψει την καλύτερη κατανόηση του γονιδιώματος του (Fanourakis and Simon, 1987, Kennard, *et al.*, 1994).

2.1 Πλεονεκτήματα του *Cucumis sativus* στη γενετική

Τα πλεονεκτήματα του αγγουριού που το καθιστούν χρήσιμο εργαλείο σε γενετικές μελέτες (Thomas and Staub, 1999) είναι τα ακόλουθα:

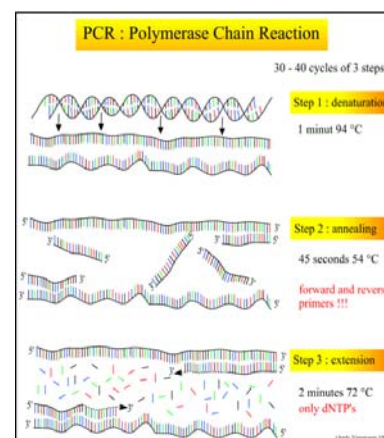
1. Μικρός κύκλος ζωής, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται περισσότερες από μία γενιές το χρόνο.
2. Χαμηλό κόστος και εύκολη καλλιέργεια χωρίς προβλήματα καταπόνησης.
3. Τα άνθη των φυτών αγγουριού ενός σταδίου ανάπτυξης μπορούν να διασταυρωθούν με φυτά που βρίσκονται σε διαφορετικό στάδιο ωριμότητας.
4. Εύκολη επικονίαση.
5. Μικρός αριθμός χρωμοσωμάτων που διευκολύνει τις γενετικές μελέτες.
6. Μεγάλος αριθμός σπόρων και καρπών.
7. Εύκολη αναπαραγωγή είτε με γονιμοποίηση είτε παρθενοκαρπικά.

2.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

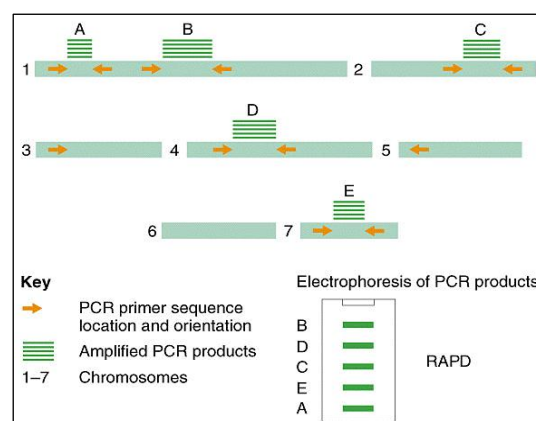
Τα RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) κυκλοφόρησαν στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και ήταν οι δεύτεροι σε μια σειρά από διαφορετικού τύπου μοριακούς δείκτες (Williams *et al.*, 1990). Τα RFLP και τα RAPD αποτελούν τους μοριακούς δείκτες πρώτης γενιάς που χρησιμοποιήθηκαν ευρέως για ταυτοποίηση ποικιλιών. Τη δεκαετία του 1990 αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν οι δεύτερης γενιάς μοριακοί δείκτες, που συμπεριλαμβάνουν τους SSR (Simple sequence repeat) (Hearne *et al.*, 1992), AFLP (Amplified fragment length polymorphism) (Vos *et al.*, 1995) και μία ποικιλία τροποποιημένων τύπων τους. Στα τέλη

της δεκαετίας του 1990 αναπτύχθηκαν και η τρίτης γενιάς μοριακοί δείκτες IFLP (Intron fragment length polymorphism) (Hongtrakul *et al.*, 1998) και οι SNP (Single nucleotide polymorphism) (Landegren *et al.*, 1988). Τις δύο τελευταίες δεκαετίες μία πολύ μεγάλη γκάμα μοριακών δεικτών έχει γίνει διαθέσιμη. Οι μοριακοί δείκτες παρά τα μειονεκτήματά τους που περιορίζονται κυρίως στις αυστηρές συνθήκες εφαρμογής τους, χρησιμοποιούνται σε ένα πλήθος μελετών και πολλές φορές σε συνδυασμό με τις κλασικές μεθόδους, για τον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλομορφίας, την ταυτοποίηση ποικιλιών και των προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων. Είναι μια τεχνική που στηρίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (Polymerase Chain Reaction) για την ανίχνευση γενετικής

ποικιλομορφίας και όχι στη χρήση ραδιοσημασμένων ανιχνευτών, όπως γίνεται στη χρήση των δεικτών RFLP. Η PCR είναι μια νέα τεχνική που επιτυγχάνει τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό σε εκατομμύρια αντίγραφα αλληλουχιών DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA. Η μέθοδος χρησιμοποιεί το ένζυμο DNA-πολυμεράση (polymerase) και ειδικούς εκκινητές (primers), οι οποίοι κατασκευάζονται με βάση την αλληλουχία των άκρων του επιθυμητού τμήματος DNA. Η DNA-πολυμεράση αντιγράφει μονόκλωνες



Εικόνα 3. Τα βήματα της τεχνικής PCR.



Εικόνα 4. Η βασική αρχή της τεχνικής RAPD.

αλληλουχίες DNA όταν στο 3' άκρο τους υπάρχει μια μικρή δίκλωνη περιοχή. Οι δίκλωνες αυτές περιοχές μπορούν να δημιουργηθούν με τη χρήση εκκινητών που είναι μικρά συνθετικά τμήματα μονόκλωνου DNA μεγέθους 10-20 νουκλεοτιδίων και έχουν αλληλουχία συμπληρωματική με το 3' άκρο της αλυσίδας που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Για τον πολλαπλασιασμό μιας δίκλωνης περιοχής DNA απαιτούνται δυο εκκινητές, ένας για το 3' άκρο της κάθε αλυσίδας. Η διαδικασία PCR γίνεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους, όπου ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει: α) Την αποδιάταξη των δυο κλώνων του DNA με θέρμανση στους 90-95°C, β) τη σύνθεση (υβριδισμός) των εκκινητών στις συμπληρωματικές περιοχές των δύο αλυσίδων, η οποία επιτυγχάνεται με μείωση της θερμοκρασίας στους 35 έως 55°C και γ) τη σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων με τη δράση της ειδικής θερμοάντοχης DNA-πολυμεράσης στους 72°C. Το τελικό αποτέλεσμα της PCR θα είναι στο τέλος των 20 κύκλων να έχουν δημιουργηθεί 2^{20} ενισχυμένα τμήματα για κάθε αρχικό μόριο DNA που χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα (Λουλακάκης, 2002).

Σύμφωνα με την τεχνική των RAPD, ενισχύονται τμήματα DNA κάνοντας χρήση εκκινητών με τυχαία ακολουθία νουκλεοτιδίων (Williams et al., 1990; Welsh and McClelland, 1990). Κάθε προϊόν ενίσχυσης προκύπτει από τον υβριδισμό των τυχαίων αυτών εκκινητών με τις συμπληρωματικές περιοχές του υπό εξέταση DNA. Οι εκκινητές είναι μικρά τμήματα μονόκλωνου DNA μεγέθους συνήθως 10-20 νουκλεοτιδίων που είναι συμπληρωματικά του τμήματος του DNA που υβριδίζει (εικόνα 4). Ένα δίκλωνο μόριο DNA για να σχηματιστεί είναι απαραίτητη η ύπαρξη 2 εκκινητών, ένας για το 3' άκρο της κάθε αλυσίδας (Williams et al., 1990). Οι ζώνες πολυμορφισμού θα μπορούσαν να προκληθούν από τις διαφορές στις ακολουθίες της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στα μέρη της υβριδοποίησης (όπως οι μεταλλαγές σημείου), ή από τις τοπικές ιδιόμορφες διαμορφώσεις της χρωμοσωμικής αλυσίδας μέσα στην ενισχυμένη ακολουθία (π.χ. εισαγωγές, διαγραφές, αντιστροφές) (Welsh and McClelland, 1990). Οι εκκινητές αυτοί που χρησιμοποιούνται στην τεχνική RAPD δεν είναι γνωστοί ή συγκεκριμένοι αλλά η επιλογή τους γίνεται τυχαία.

Το παραπάνω εξασφαλίζει την επιλογή τυχαίων αλληλουχιών στο γενωμικό μόριο DNA, οπότε κάθε εκκινητής να μπορεί να υβριδοποιήσει μία, πολλές ή ακόμα και σε καμία θέση του γενωμικού DNA. Το αποτέλεσμα του παραπάνω είναι ότι πολλαπλασιάζονται ανισομεγέθη τμήματα για το DNA κάθε ατόμου, τα οποία όμως

είναι συγκεκριμένα για το κάθε DNA, επομένως και για το κάθε άτομο. Διαφορετικά φυτά δίδουν με αυτή τη μέθοδο τμήματα DNA που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος, τον αριθμό, ή και τα δυο (Φανουράκης, 2002). Η παρατήρηση και ταυτοποίηση των τμημάτων DNA γίνεται εύκολα με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Οποιοδήποτε τμήμα του DNA μπορεί να αναγνωριστεί μέσω της ηλεκτροφόρησης αγαρόζης και χρησιμοποιείται ευρύτατα για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση τόσο του DNA όσο και του RNA. Ένα πήκτωμα αγαρόζης είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο πολυμερών σακχάρων, του οποίου το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος και τη συγκέντρωση (%) της αγαρόζης. Οι πόροι αυτοί παίζουν καταλυτικό ρόλο στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA ανάλογα με το μέγεθος των μορίων αυτών. Κατά την ηλεκτροφορητική κινητικότητα, τα μόρια του DNA εμφανίζουν μια πλαστική συμπεριφορά όπου αυτή μεταβαίνει από την κατάσταση της πλήρους αναδίπλωσης σε κατάσταση μιας πυκνής σφαίρας. Σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση αγαρόζης που έχει διαλυθεί σε ένα συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα, ένα εύρος μεγεθών μορίων DNA μπορεί να διαχωριστεί ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Η κινητικότητα των μορίων του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του μεγέθους ή του μοριακού βάρους. Τα διακριτά τμήματα των νουκλεϊκών μπορούν να εντοπιστούν εύκολα, με υπεριώδη ακτινοβολία, σαν ζώνες που βάφονται με EtBr (Χατζόπουλος, 2001).

Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA (ή τα αντιγραφόμενα τμήματα) δημιουργούνται μόνο στις περιοχές του γονιδιώματος που υβριδίζει ο εκκινητής με κατάλληλο προσανατολισμό σε μια απόσταση 300 έως 3.000 βάσεις. Ο κύκλος υβριδισμού, αποδιάταξης και πολυμερισμού επαναλαμβάνεται με αποτέλεσμα τη λογαριθμική αύξηση της συγκέντρωσης του μέρους αυτού του γονιδιώματος. Η σύγκριση του παραπάνω χαρακτηριστικού της μεθόδου RAPD μεταξύ διαφορετικών φυτών μπορεί να συμβάλλει στην αποκάλυψη δεικτών (μορίων DNA) που καταδεικνύουν ότι τα φυτά αυτά διαφέρουν. Η χρησιμότητα των δεικτών αυτών (Ghany and Zaki, 2003) έγκειται στα εξής:

- Αξιολόγηση της γενετικής παραλλακτικότητας στους πληθυσμούς και τα είδη (π.χ. μαζική διαχωρισμένη ανάλυση).
- Για να μελετηθούν οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών και των υποειδών (π.χ. family genome mapping).
- Για να κατασκευαστούν και να μελετηθούν οι γενετικοί χάρτες συνδέσμων, η επικόλληση γονιδίων και ο προσδιορισμός των ποικιλιών.

2.3. Χαρακτηριστικά μοριακών δεικτών

Η φύση των μοριακών δεικτών εξαρτάται άμεσα από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αξιοποίησή τους σε προγράμματα ταυτοποίησης και πιστοποίησης γενετικού υλικού. Οι μοριακοί δείκτες πρέπει να συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα παρακάτω γνωρίσματα (Hu *et al.*, 1995, Χατζόπουλος, 2001), ώστε να παρουσιάζουν τη μέγιστη χρησιμότητα:

- Παρουσία πολυμορφισμού ή ύπαρξη πολλών αλληλόμορφων για κάθε γενετικό τόπο.
- Απλή κληρονομικότητα (Μεντελιανή).
- Να μπορούν να διακρίνουν την ομόζυγη από την ετερόζυγη κατάσταση.
- Υψηλός συντελεστής κληρονομικότητας.
- Διασπορά και στην ιδανική περίπτωση ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Η μεθοδολογία να μην κοστίζει πολύ, να μην έχει αρνητικές συνέπειες στο φυτό, να είναι εύκολη, να εφαρμόζεται κατά τα νεαρά στάδια της ανάπτυξης των φυτών και συγκεκριμένα όταν τα φυτά έχουν αναπτυχθεί τόσο ώστε να μπορεί να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA.

2.4. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της τεχνικής RAPD

Η τεχνική RAPD παρουσιάζει μια πλειάδα πλεονεκτημάτων αλλά και μειονεκτημάτων, τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω. (Benter *et al.*, 1995).

Πλεονεκτήματα της τεχνολογίας

- Περισσότερος πολυμορφισμός σε σχέση με τα RFLP.
- Απλή και γρήγορη μέθοδος.
- Δεν χρησιμοποιούνται ραδιοϊσότοπα.
- Λόγω της χρήσης τυχαίων εκκινήτων, εξασφαλίζεται η αντικειμενικότητα των αποτελεσμάτων.
- Διαφοροποιείται στην ενίσχυση τμημάτων DNA έπειτα από μεταλλαγές.
- Η μέθοδος εφαρμόζεται και σε δείγματα χαμηλής καθαρότητας DNA.
- Μεγάλος αριθμός ζωνών παράγεται ανά εκκινήτη.
- Οι εκκινήτες μπορούν να συντεθούν εύκολα.

Μειονεκτήματα της τεχνολογίας

- Η ανίχνευση του πολυμορφισμού είναι ακόμα περιορισμένη (παρόμοια με RFLP).
- Η δυνατότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων είναι ανακόλουθη.
- Το πήκτωμα αγαρόζης μπορεί να δημιουργήσει φτωχά πρότυπα ανάλυσης, λόγω της περιορισμένης ικανότητας της αγαρόζης να διαχωρίζει διαφορετικού μεγέθους τμήματα DNA και κατά συνέπεια της εμφάνισης λιγότερων ζωνών
- Ανιχνεύει μόνο τους κυρίαρχους δείκτες.
- Μη εφικτή για χρήση ενός προγράμματος αναπαραγωγής με τη βοήθεια δεικτών.

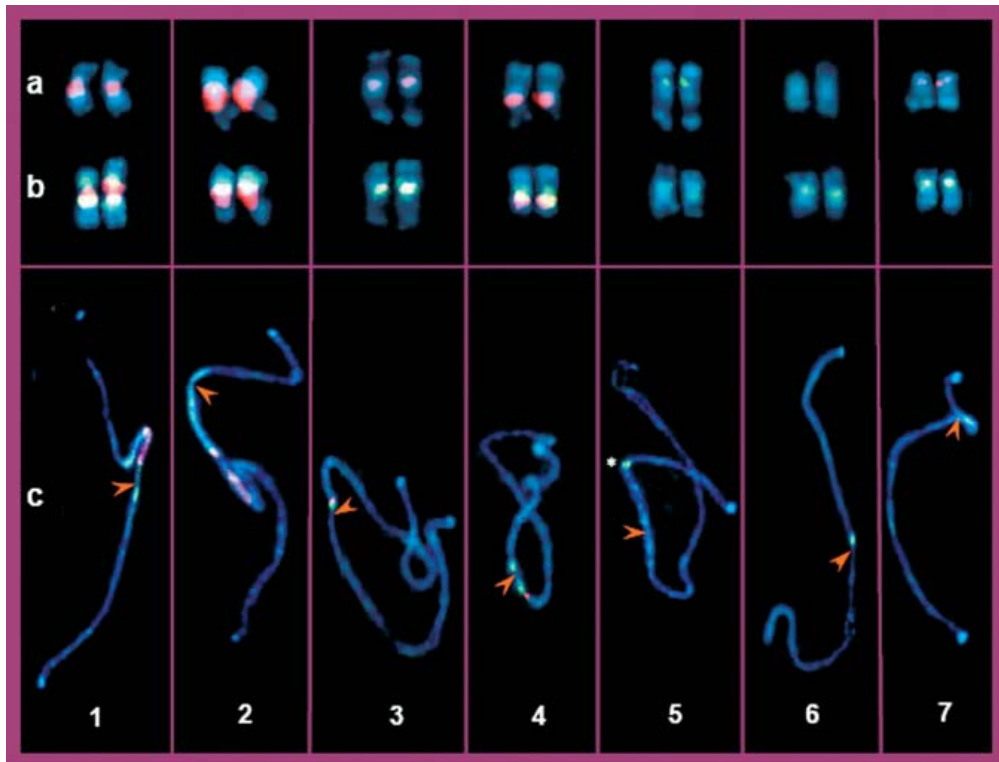
2.5. Γονιδίωμα του *Cucumis sativus*

Το αγγούρι (*Cucumis sativus* L., $2n = 2x = 14$), έχει το μικρότερο αριθμό

χρωμοσωμάτων στο γένος *Cucumis*. Το μέγεθος του γονιδιώματος του (376 Mbp) είναι σχετικά μικρό (430 Mbp στο ρύζι, 953 Mbp στην ντομάτα και 2504 Mbp στον αραβόσιτο), αλλά μεγαλύτερο από το *Arabidopsis* (145 Mbp) (Bennett and Smith 1976). Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μοριακές και κυτταρολογικές μελέτες για το αγγούρι (Chen *et al.* 2005, Koo *et al.* 2005). Εντούτοις, εξ αιτίας του μικρού μεγέθους και της μορφολογικής ομοιότητας των χρωμοσωμάτων στο αγγούρι, αυτά έχουν χαρακτηριστεί μόλις πρόσφατα. Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα των μοριακών δεικτών σε σχέση με τους μορφολογικούς δείκτες είναι το ότι είναι απελευθερωμένοι από τις αλληλεπιδράσεις γονότυπου–περιβάλλοντος. Σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί το ότι αναφέρονται σε επίπεδο DNA και επομένως είναι παρόντες σε όλα τα στάδια ανάπτυξης και σε όλα τα όργανα του φυτού. Είναι απαλλαγμένοι από επιστατικές αλληλεπιδράσεις και έτσι μπορεί να επιλέγονται στον ίδιο πληθυσμό περισσότεροι μοριακοί δείκτες ταυτόχρονα. Για τη μελέτη του γονιδιώματος σε διάφορα είδη *Cucumis* έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετοί μοριακοί δείκτες που δημιουργούνται με RAPD (Kner and Staub, 1992, Staub and Meglic, 1993). Η γενετική ανάλυση με RAPD είναι αρκετά δημοφιλής μέθοδος για τον καθορισμό των φυλογενετικών σχέσεων και της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των φυτών αλλά πρόσφατα σχετικά έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του αγγουριού και συγγενικών του ειδών. Η πρώτη αναφορά για χρήση της μεθοδολογίας αυτής στη μελέτη του αγγουριού έγινε από τους Poeter *et al.*, (1992) οι οποίοι μελέτησαν διάφορες μεθόδους απομόνωσης του DNA και την επανάληψη των αποτελεσμάτων της ανάλυσης με RAPD. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι το πρότυπο που δίνουν αυτοί οι μοριακοί δείκτες δεν επηρεάζεται από την ηλικία του ιστού, την μόλυνση ή όχι των φυτών από μερικές ασθένειες και από την παραγωγή ή όχι καρπών. Από τότε έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή γενετικού χάρτη στο αγγούρι (Staub *et al.*, 1996) και για την ανίχνευση πολυμορφισμών μέσα και μεταξύ των ποικιλιών πεπονιού, όπου αναφέρθηκε ότι έδωσαν και καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τους μοριακούς δείκτες με RFLP (Lopez-Seze *et al.*, 2002).

Ποικιλίες αγγουριού δεν έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα γενετικά και δεν είναι δυνατή η εκτίμηση της υπάρχουσας γενετικής παραλλακτικότητας, καθώς και ο προσδιορισμός των σχέσεων των ποικιλιών αυτών με άλλες τοπικές ποικιλίες που προέρχονται από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Η μελέτη γίνεται με την ανάλυση των μοριακών δεικτών RAPDs. Η ανάλυση αυτή μπορεί να συμβάλλει στον

προσδιορισμό και στην προστασία παραδοσιακών ποικιλιών ή στην ανακάλυψη νέων τοπικών ποικιλιών και μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη βελτίωση εμπορικών ποικιλιών.



Εικόνα 5. Γονιδίωμα του *Cucumis sativus*

Πίνακας 2. Μοριακοί δείκτες (Pushpendra *et al.*, 2002)

AFLP	Amplified fragment length polymorphism (Vos <i>et al.</i> , 1995)
AMP-PCR	Anchored microsatellite primed PCR (Wolff <i>et al.</i> , 1995)
AP-PCR	Arbitrarily primed PCR (Welsh and McClelland, 1990)
ASA	Allele-specific amplification (Wu <i>et al.</i> , 1989)
ASSR	Anchored simple sequence repeat (Wu <i>et al.</i> , 1994)
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequence (Akopyanz <i>et al.</i> , 1992)
DAF	DNA amplification fingerprint (Caetano-Annoles <i>et al.</i> , 1991)
DALP	Direct amplification of length polymorphism (Desmarais <i>et al.</i> , 1998)
DAMD-PCR	Direct amplification of microsatellite DNA by PCR (Heath <i>et al.</i> , 1993)
DFLP	DNA fragment length polymorphism (Hongtrakul <i>et al.</i> , 1998)
dRAMP	Digested RAMP (Becker and Heun, 1995)
IFLP	Intron fragment length polymorphism (Hongtrakul <i>et al.</i> , 1998)
IM-PCR	Inter-microsatellite PCR (Zietkiewikz <i>et al.</i> , 1994)
IRAP	Inter-retrotransposon amplified polymorphism (Kalendar <i>et al.</i> , 1999a)
ISA	Inter-SSR amplification (Zietkiewikz <i>et al.</i> , 1994)
ISSR	Inter-simple sequence repeats (Zietkiewikz <i>et al.</i> , 1994)
MAAP	Multiple arbitrary amplicon profiling (Caetano-Annolles, 1994)
MP-PCR	Microsatellite-primed PCR (Meyer <i>et al.</i> , 1993)
OLA	Oligonucleotide ligation assay (Landegren <i>et al.</i> , 1988)
RAHM	Randomly amplified hybridizing microsatellites (Cifarelli <i>et al.</i> , 1995)
RAMPO	Randomly amplified microsatellite polymorphisms (Richardson <i>et al.</i> , 1995)
RAMP	Randomly amplified microsatellite polymorphism (Wu <i>et al.</i> , 1994)
RAMS	Randomly amplified microsatellites (Ender <i>et al.</i> , 1996)
RAPD	Random amplified polymorphic DNA (Williams <i>et al.</i> , 1990)
RBIP	Retrotransposon-based insertion polymorphism (Flavell <i>et al.</i> , 1998)
REMAP	Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (Kalendar <i>et al.</i> , 1999)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Botstein <i>et al.</i> , 1980)
SAMPL	Selective amplification of microsatellite polymorphic loci (Morgante and Vogel 1994)
SCAR	Sequence characterised amplified regions (Paran and Michelmore, 1993)
SNP	Single nucleotide polymorphism (Landegren <i>et al.</i> , 1988)
SPAR	Single primer amplification reactions (Gupta <i>et al.</i> , 1994)
S-SAP	Sequence-specific amplification polymorphism (Waugh <i>et al.</i> , 1997)
SSCP	Single strand conformation polymorphism (Hayashi, 1992)
SSLP	Simple sequence length polymorphism (Tautz, 1989)
SSR	Simple sequence repeat (Hearne <i>et al.</i> , 1992)
STAR	Sequence tagged amplified region (Rafalaski and Tingey, 1993)
STMS	Sequence-tagged microsatellite site (Beckmann and Soller, 1990)
STR	Short tandem repeat (Edwards <i>et al.</i> , 1991)
STS	Sequence-tagged-site (Olson <i>et al.</i> , 1989)
VNTR	Variable number of tandem repeats (Nakamura <i>et al.</i> , 1987)

3. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Είναι η ανίχνευση πιθανής γενετικής ποικιλομορφίας μέσα σε άτομα της παραδοσιακής ποικιλίας «Καλύβια» και η συσχέτιση των μοριακών δεδομένων με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που καταγράφηκαν κατά την καλλιέργεια της συγκεκριμένης ποικιλίας. Έως σήμερα, η προαναφερθείσα ποικιλία δεν έχει μελετηθεί αρκετά σε γενετικό επίπεδο, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η εκτίμηση της υπάρχουσας γενετικής παραλλακτικότητας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Προβλάστηση Σπόρων

Οι σπόροι των αγγουριών που επιλέχθηκαν, δόθηκαν από το εργαστήριο Γενετικής και Βελτίωσης φυτών του ΤΕΙ Κρήτης, ανήκαν στην ποικιλία Καλύβια και ήταν ενός έτους. Για την προβλάστησή τους εισήχθησαν περίπου 70 σπόροι σε τριβλία Petri, στα οποία είχε τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί, βρεγμένο με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, τα τριβλία αυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης σπόρων για περίπου 24 h. Ο χρόνος αυτός θεωρήθηκε αρκετός για την προβλάστησή τους, αφού μετά το πέρας των 24 h, σχεδόν όλοι οι σπόροι είχαν αναπτύξει μικρό ριζίδιο, τόσο όσο έπρεπε για τη σωστή μεταφύτευση τους σε δίσκους φύτευσης πολλαπλών θέσεων. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν για 24 ώρες σε θάλαμο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας στους 32°C. Οι προβλαστημένοι σπόροι φυτεύτηκαν σε δίσκο ο οποίος παρέμεινε για 3 εικοσιτετράωρα σε θερμαινόμενο πάγκο εντός θερμοκηπίου. Στην συνέχεια και ενώ είχαν φυτρώσει όλα τα φυτά, τοποθετήθηκε ο δίσκος σε θάλαμο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας και φωτισμού. Η θερμοκρασία είχε ρυθμιστεί στους 26°C ενώ το φως παρεχόταν για 12 συνεχόμενες ώρες το εικοσιτετράωρο. Τα φυτά παρέμειναν στο θάλαμο για 10 περίπου ημέρες. Στο διάστημα αυτό είχαν αναπτυχθεί ως το τρίτο πραγματικό φύλλο. Πριν φυτρώσουν γίνονταν καθημερινά ποτίσματα ενώ στην συνέχεια τα φυτά ποτίζονταν κάθε τρεις μέρες. Μετά το στάδιο των κοτυληδόνων γίνονταν υδρολιπάνσεις κάθε 7 μέρες με 1% λίπασμα (20-20-20, N-P-K). Όταν τα φυτά ανέπτυξαν καλά τα τρία πρώτα φύλλα, επιλέχθηκε από το κάθε φυτό ένα φύλλο. Η επιλογή έγινε βάση του πόσο καλά είχε αναπτυχθεί το φύλλο καθώς επίσης και από το χρώμα του, γιατί τα φυτά δεν έφεραν προβληματικά φύλλα



Εικόνα 6. Διαδικασία προ-βλάστησης σπόρων.

ώστε η επιλογή να πρέπει να γίνει με βάση την υγειονομική ή φυσιολογική κατάσταση του φύλλου. Τα φύλλα που επιλέχθηκαν πλύθηκαν πολύ καλά και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σακουλάκια και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

4.2. Μεταφύτευση των Νεαρών Φυταρίων στο Θερμοκήπιο

Οι βλαστημένοι σπόροι φυτεύτηκαν σε δίσκους φύτευσης πολλαπλών θέσεων. Σε κάθε θέση που περιείχε τύρφη τοποθετήθηκε ένας σπόρος σε βάθος 5 cm περίπου, ώστε να εξελιχθεί ομαλά η συνέχεια της ανάπτυξης τους. Η μεταφύτευση των φυταρίων έγινε με τη μπάλα χώματος, ώστε να μην τραυματιστούν οι ρίζες. Τα νεαρά φυτά φυτεύθηκαν σε διπλή σειρά στο γυάλινο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Γενετικής και Βελτίωσης φυτών στο αγρόκτημα του ΤΕΙ Κρήτης, σε απόσταση 25 cm επί της γραμμής και 50 cm μεταξύ των γραμμών.

4.3. Φροντίδα Φυτών στο Θερμοκήπιο

Τα φυτά στην αρχή και μέχρι το ύψος των 50 cm ποτίζονταν καθημερινά, ενώ στη συνέχεια ποτίζονταν κάθε δύο μέρες, από μια φορά την ημέρα. Λίπανση γινόταν μια φορά κάθε βδομάδα με λίπασμα 5% w.v. 19-19-19. Οι πλάγιοι βλαστοί αφαιρούνταν από τα φυτά μέχρι το ύψος των 50 cm, όχι όμως πάνω από αυτό, διότι ήταν επιθυμητή η μεγάλη φυλλική επιφάνεια λόγω της διεξαγωγής τεχνητών επικονιάσεων για την εξαγωγή σπόρου.

4.4. Τεχνητές Επικονιάσεις

Οι τεχνητές επικονιάσεις άρχισαν όταν είχαν αναπτυχθεί αρσενικά και θηλυκά άνθη πάνω στο ίδιο το φυτό. Για την αποφυγή τυχαίων επικονιάσεων (λόγω ανέμου ή εντόμων) το θερμοκήπιο είχε κλειστεί ερμητικά με σήτες ώστε να μην εισέρχονται έντομα και η πόρτα του θερμοκηπίου έκλεινε κάθε φορά που γινόταν κάποια επέμβαση στα φυτά μέσα στο θερμοκήπιο. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για να γίνουν οι επικονιάσεις ήταν η εξής:



Εικόνα 7. Διαδικασία τεχνητής επικονίασης στο αγγούρι.

Από το αρσενικό άνθος, το οποίο κοβόταν μαζί με το μίσχο του, αφαιρούνταν τα πέταλα μαζί με ένα μικρό μέρος από τα σέπαλα που είναι ενωμένα ώστε να αποκαλυφθούν οι στήμονες με τη γύρη. Φροντίδα λαμβανόταν ώστε να γίνεται την πιο κατάλληλη στιγμή της ημέρας (συνήθως πρωινές ώρες) που η γύρη να διατηρούσε όσο το δυνατόν περισσότερο την κολλώδη ιδιότητά της. Στη συνέχεια, το αρσενικό άνθος τοποθετούνταν με τέτοιο τρόπο πάνω στο θηλυκό ώστε η γύρη του αρσενικού άνθους να εφάπτεται με το στίγμα που βρίσκεται πάνω στο στύλο του θηλυκού άνθους όσο το δυνατόν περισσότερο. Με τον παραπάνω τρόπο εξασφαλιζόταν η προσκόλληση μεγαλύτερης ποσότητας γύρης πάνω στο στίγμα και κατά συνέπεια μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχίας της επικονίασης. Στη συνέχεια το θηλυκό άνθος κλείνονταν με έλασμα με τέτοιο τρόπο ώστε το αρσενικό άνθος να παραμένει μέσα. Με τον τρόπο αυτό αυξανόταν η πιθανότητα επιτυχίας και παράλληλα μειωνόταν η πιθανότητα τυχαίας επικονίασης (εικόνα 7). Η τοποθέτηση καρτέλας στο μίσχο του άνθους ανέφερε τα στοιχεία της αυτεπικονίασης, όπως τα στοιχεία των γονέων και την ημερομηνία της τεχνητής επικονίασης. Οι τεχνητές

επικονιάσεις συνεχίστηκαν για χρονικό διάστημα περίπου 40-45 ημερών, έως ότου από το κάθε φυτό να έχουν πραγματοποιηθεί 3-4 αυτεπικονιάσεις τουλάχιστον. Ο μικρός σχετικά αριθμός των επικονιάσεων οφειλόταν, αφενός στο μεγάλο βάρος των καρπών που θα μπορούσαν να τραυματίσουν το φυτό και αφετέρου στο μεγάλο αριθμό σπόρων που περιέχει ο κάθε καρπός. Μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος σταμάτησαν οι επικονιάσεις μέχρι να γίνει η συγκομιδή των καρπών και η εξαγωγή των σπόρων από κάθε φυτό που έγινε αυτογονιμοποίηση.

4.5. Συγκομιδή Καρπών και Εξαγωγή Σπόρου

Η συγκομιδή των καρπών που προήλθαν από τα άνθη στα οποία είχε γίνει τεχνητή επικονίαση έγινε μετά το πέρας 50-55 ημερών από την έναρξη της διαδικασίας της αυτογονιμοποίησης. Οι καρποί που συγκομίστηκαν ήταν 3-4 από κάθε φυτό. Ο καρπός στο στάδιο της συγκομιδής ήταν διογκωμένος, με χρώμα κίτρινο. Η εξαγωγή των σπόρων έγινε με νερό βρύσης ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία: Έγινε συγκέντρωση των καρπών του κάθε φυτού ξεχωριστά, οι καρποί κόβονταν στη μέση και σε τρεχούμενο νερό αφαιρούνταν οι σπόροι από το εσωτερικό των καρπών, οι οποίοι κατέληγαν σε ένα οικιακό στραγγιστήρι, ώστε ν' αποφευχθεί η έκπλυσή τους και η απώλεια αυτών. Οι σπόροι που είχαν συγκεντρωθεί στο στραγγιστήρι, πλένονταν καλά με νερό ώστε να αποβληθούν στην αποχέτευση τα περιβλήματα αγονιμοποίητων σπόρων και ακαθαρσιών από τον καρπό που είχαν συσσωρευθεί στο σκεύος στράγγισης κατά τη διαδικασία εξαγωγής τους.

Μετά το τέλος της παραπάνω διαδικασίας οι σπόροι από κάθε φυτό τοποθετούνταν σε ένα πλαστικό δοχείο διάτρητο στη βάση του για τη διευκόλυνση της περαιτέρω στράγγισης του νερού που υπήρχε στο δοχείο. Κάθε δοχείο περιείχε τους σπόρους του κάθε φυτού ξεχωριστά που είχε αυτογονιμοποιηθεί. Τα δοχεία αυτά αφήνονταν για μια μέρα περίπου σε κανονικές συνθήκες περιβάλλοντος για να αποβληθεί όσο πιο πολύ νερό ήταν δυνατόν και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ειδικό ξηραντήρα για περίπου 24 h στους 37 °C. Το χρονικό αυτό διάστημα ήταν αρκετό για να στεγνώσουν πλήρως οι σπόροι από το νερό. Στη συνέχεια οι σπόροι από το κάθε δοχείο που αντιπροσώπευαν το κάθε φυτό, τοποθετούνταν σε ειδικά χάρτινα σακουλάκια πάνω στα οποία εγγραφόταν ο χρόνος εξαγωγής των σπόρων και ο αριθμός του φυτού που είχε αυτογονιμοποιηθεί και απ' το οποίο είχαν παρθεί οι

σπόροι, καθώς επίσης και η ποικιλία του φυτού. Τα σακουλάκια αυτά φυλάσσονταν στη συνέχεια στον ειδικό ψυκτικό χώρο του εργαστηρίου Γενετικής και Βελτίωσης φυτών του ΤΕΙ Κρήτης σε θερμοκρασία 5 °C και σχετική υγρασία 25% περίπου για περαιτέρω χρήση και μελέτη.

4.6. Απομόνωση DNA (DNA Extraction) από φύλλα αγγουριάς

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CTAB (Hulbert and Bennetzen 1991), με κάποιες τροποποιήσεις όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

Το DNA απομονώθηκε από νεαρά φύλλα κάθε φυτού. Κάθε φύλλο, αφού πλύθηκε καλά τεμαχίστηκε σε πολύ μικρά κομμάτια.

- Σε σωληνάκι erpendorf τοποθετήθηκαν 200-300 μL τεμαχισμένων φύλλων και προστέθηκε ίσος όγκος προθερμασμένου (60 °C) διαλύματος CTAB. Ακολούθησε ομογενοποίηση.
- Προστέθηκε ίδιος όγκος προθερμασμένου (60 °C) διαλύματος CTAB και έγινε ήπια ανάδευση και επιπλέον ομογενοποίηση όπου χρειαζόταν.
- Τα δείγματα επώαστηκαν στους 60 °C για 15-30 min. Κάθε 5 min γινόταν ήπια ανάδευση.
- Προστέθηκε χλωροφόρμιο ίσου όγκου με το περιεχόμενο διάλυμα CTAB και έγινε καλή αλλά ήπια ανάδευση.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στις 8.000 rpm/min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάκια. Αν χρειαζόταν (ανάλογα με την καθαρότητα) επαναλαμβάνονταν τα δύο τελευταία βήματα.
- Η κατακρήμνιση των νουκλεϊκών έγινε με προσθήκη 1/10 του όγκου οξικού νατρίου 3M και ίσου όγκου ισοπροπανόλης.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 20 min σε 14.000 στροφές/min, στους 4 °C.
- Το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% αιθυλική αλκοόλη και στέγνωσε στους 60 °C για 10 min και στη συνέχεια επαναδιαλύθηκε με 50 μl απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.
- Μετά την επαναδιάλυση προστέθηκε 1 μL RNase (10 mg/mL) και έγινε επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Το DNA που απομονώθηκε διατηρήθηκε στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί και η ποσότητά του ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 0,8% w.v πύκτωμα αγαρόζης (Sigma A-9311) με EtBr (0,5μg/ml) σε 0,5x TBE (0.54% w.v Tris, 0.275% w.v. Boric Acid, 0,01M EDTA).

Πίνακας 3. CTAB διάλυμα, απομόνωσης DNA (5 mL διαλύματος)

CTAB (5%)	2 mL
Tris (1M pH 8)	0.5 mL
EDTA (0.5M pH8)	0.2 mL
NaCl (5 M)	1.4 mL
ddH ₂ O	0.9 mL

4.7. Διαδικασία Ποσοτικού Προσδιορισμού του DNA

Η ποσότητα DNA που περιέχεται στο υδατικό διάλυμα, υπολογίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης του στα 260nm. Όπως είναι γνωστό, τα νουκλεϊκά οξέα έχουν το μέγιστο της απορρόφησης τους στην περιοχή αυτή της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Με βάση το γεγονός ότι 1 μονάδα απορρόφησης στα 260 nm (1 OD₂₆₀) αντιστοιχεί σε 50 μg/mL δίκλωνου DNA βρέθηκε η συγκέντρωση των δειγμάτων που απομονώθηκαν, λαμβάνοντας 1μL από το απομονωμένο DNA και προσθέτοντας 999 μL ddH₂O και τοποθετώντας το υδατικό αυτό διάλυμα σε φωτόμετρο και ρυθμίζοντας το στα 260 nm.

4.8. Ενίσχυση RAPD μετά την PCR

Για την ανίχνευση ποικιλομορφίας στην παραδοσιακή ποικιλία αγγουριού Καλύβια χρησιμοποιήθηκαν 20 διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια (Williams *et al.* 1990), η αλληλουχία των οποίων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ DNA 5'→3'
OPA01	CAGGCCCTTC
OPA02	TGCCGAGCTG
OPA03	AGTCAGCCAC
OPA04	AATCGGGCTG
OPA05	AGGGGTCTTG
OPA06	GGTCCCTGAC
OPA07	GAAACGGGTG
OPA08	GTGACGTAGG
OPA09	GGGTAACGCC
OPA10	GTGATCGCAG
OPA11	CAATCGCCGT
OPA12	TCGGCGATAG
OPA13	CAGCACCCAC
OPA14	TCTGTGCTGG
OPA15	TTCCGAACCC
OPA16	AGCCAGCGAA
OPA17	GACCGCTTGT
OPA18	AGGTGACCGT
OPA19	CAAACGTCGG
OPA20	GTTGCGATCC

Πίνακας 4.

Αλληλουχία των τυχαίων εκκινητών OPA (Operon Technologies), που χρησιμοποιήθηκαν για την τυχαία πολυμορφική ανάλυση του DNA του *Cucumis sativus* var. *kalivia*

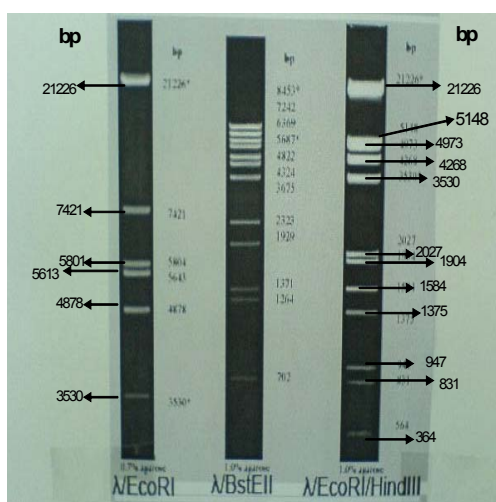
Πίνακας 5. Παρουσίαση των τετράδων ολιγονουκλεοτιδίων (OPA) που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

Τετράδες ολιγονουκλεοτιδίων	Σειρά ολιγονουκλεοτιδίων (OPA)
ΣΕΙΡΑ_1	1,2,3,4
ΣΕΙΡΑ_2	5,6,7,8
ΣΕΙΡΑ_3	9,10,11,12
ΣΕΙΡΑ_4	13,14,15,16
ΣΕΙΡΑ_5	17,18,19,20

Οι παραπάνω αντιδράσεις έγιναν σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf Mastercycler Gradient και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: 3 min στους 94 °C (για να γίνει η αποδιάταξη του DNA) και ακολούθησαν 45 κύκλοι που ο καθένας αποτελείτο από 30 sec στους 94 °C, 30 sec στους 36 °C (για να γίνει η υβριδοποίηση των εκκινήτων με το αντίστοιχο συμπληρωματικό τμήμα του γενωμικού DNA), 1 min στους 72 °C (για να γίνει η σύνθεση των ελεύθερων dNTP's με τα αντίστοιχα συμπληρωματικά τμήματα του γενωμικού DNA του αγγουριού με τη βοήθεια της θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης) και με το πέρας των 45 κύκλων ακολούθησαν 3 min στους 72 °C.

4.9. Ηλεκτροφόρηση Αγαρόζης

Η ανάλυση των προϊόντων της απομόνωσης DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Sigma A-9311) 0.8% w.v με προσθήκη EtBr (0,5μg/mL), ενώ των προϊόντων της PCR έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% w.v.. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συνεχή ηλεκτρική τάση 5 V/cm, ενώ το διάλυμα ηλεκτροφόρησης ήταν TBE 0,5x (0.54% w.v Tris, 0.275% w.v. Boric Acid, 0,01M EDTA). Για τον προσδιορισμό των προϊόντων της PCR, χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, DNA από το φάγο λ που είχε κοπεί με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *HindIII*. Τα μεγέθη του μάρτυρα λ*EcoRI* καθώς και του μάρτυρα λ*EcoRI/HindIII* φαίνονται στον πίνακα 6.



Πίνακας 6. Μεγέθη των μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν στον πείραμα.

4.10. Βαθμονόμηση Μοριακών Δεικτών

Τα αποτελέσματα που μας έδωσαν οι αντιδράσεις PCR (bands) είναι οι δείκτες RAPD της ποικιλίας Kalivia, το μέγεθος των οποίων προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του μάρτυρα λ*EcoRI/HindIII*. Κάθε ζώνη DNA στο πήκτωμα αποτελεί και ένα δείκτη RAPD, ενώ και τα 24 άτομα ελέγχθηκαν για την παρουσία ή την απουσία δεικτών που έδινε η κάθε τετράδα ολιγονουκλεοτιδίων. Όλα αυτά τα αποτελέσματα μπήκαν σε ένα συγκεντρωτικό πίνακα, τα οποία συγκρίθηκαν με τα φαινοτυπικά

χαρακτηριστικά της ποικιλίας που καταγράφηκαν καθ' όλη τη διάρκεια του παραπάνω πειράματος. Κάθε δείκτης που εμφανιζόταν συμβολιζόταν με 1, ενώ η απουσία συμβολιζόταν με 0. Τα φαινοτυπικά αυτά χαρακτηριστικά της ποικιλίας Καλύβια είναι άμεσα συνδεδεμένα με την ύπαρξη ή μη ποικιλομορφίας στην ποικιλία, ο έλεγχος και η ταυτοποίηση της οποίας γίνεται με τους δείκτες RAPD.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Ποσοτικός Προσδιορισμός των DNA

Όλα τα προϊόντα από κάθε αντίδραση RAPD-PCR που αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση, εξετάστηκαν για την παρουσία και απουσία τμημάτων DNA των οποίων το μέγεθος υπολογίστηκε κατά προσέγγιση με τη βοήθεια του μάρτυρα. Κάθε τμήμα DNA αποτελεί έναν μοριακό δείκτη και σημειώθηκε με έναν κωδικό που συμβόλιζε το ολιγονουκλεοτίδιο από το οποίο δημιουργήθηκε και είχε δείκτη το μέγεθος του στην ηλεκτροφόρηση (π.χ τμήμα μεγέθους 400 bp από το ολιγονουκλεοτίδιο OPA01 συμβολίστηκε σαν μοριακός δείκτης OPA01₄₀₀).

Όλα τα φυτά ελέγχθηκαν για την παρουσία ή απουσία των τμημάτων που έδινε κάθε ολιγονουκλεοτίδιο. Η παρουσία τμήματος DNA του ίδιου μεγέθους σημειώθηκε με + και η απουσία με - . Όλα αυτά τα αποτελέσματα μπήκαν σε πίνακα μοριακών δεδομένων και έγινε στατιστική ανάλυση για τον υπολογισμό της γενετικής ποικιλομορφίας, της γενετικής απόστασης και των πολυμορφισμών (Nei, 1978, Nei and Li, 1979) με βάση τις φαινοτυπικές συχνότητες των μοριακών δεικτών.

5.2. Ανάλυση RAPD

24 φυτά αγγουριού ελέγχθησαν για την εύρεση γενετικής ποικιλομορφίας με τη μεθοδολογία RAPD, με τη διαφορά ότι ενώ το πρωτόκολλο αναφέρει τον έλεγχο με 1 ολιγονουκλεοτίδιο τη φορά, χρησιμοποιήθηκαν 4 ολιγονουκλεοτίδια ανά αντίδραση. Αυτό έγινε για να αυξηθεί η πιθανότητα να βρεθεί ποικιλομορφία.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των 30 φυτών της ποικιλίας Kalivia που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

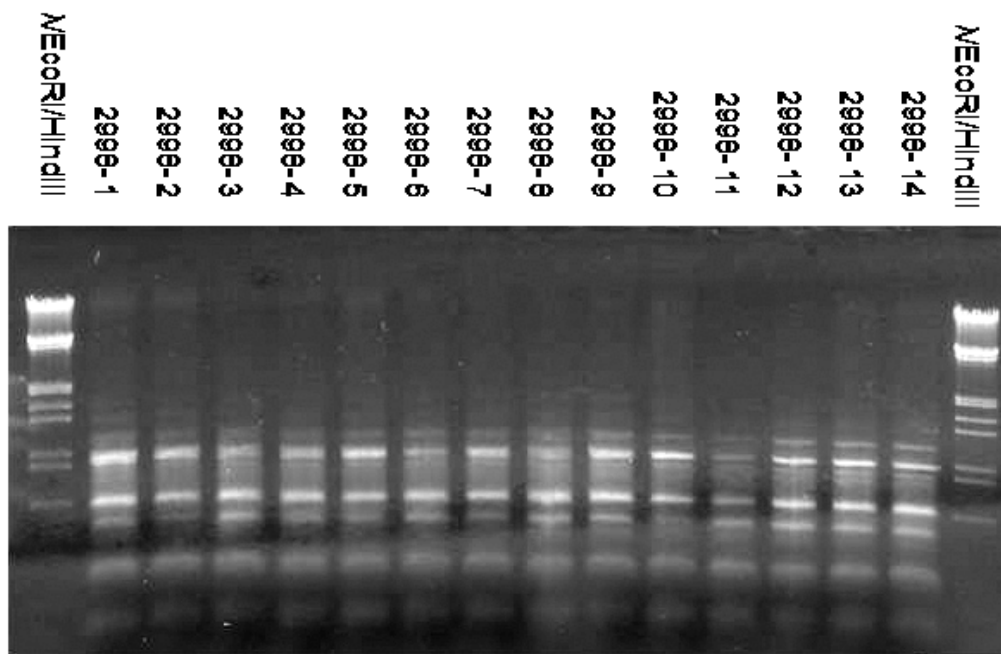
Πίνακας 7. Μορφολογικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας Kalivia (- απουσία, + παρουσία).

ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΤΩΝ	ΤΡΙΧΩΜΑ ΚΑΡΙΟΥ	ΧΡΩΜΑ ΤΡΙΧΩΝ	ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΤΡΙΧΩΝ		ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΡΙΧΩΝ	ΕΥΠΑΘΕΙΑ <i>Podosphaera xanthii</i>	ΧΡΩΜΑ ΑΩΡΟΥ ΚΑΡΙΟΥ	ΧΡΩΜΑ ΩΡΙΜΟΥ ΚΑΡΙΟΥ
			few	many				
2998-1	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-2	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-3	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-4	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-5	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-6	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-7	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-8	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-9	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-10	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-11	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-12	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-13	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-14	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-15	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-16	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-17	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-18	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-19	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-20	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-21	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-22	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-23	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-24	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-25	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-26	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-27	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-28	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-29	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW
2998-30	+	black	-	+	small	+	GREEN	YELLOW

5.3. Αποτελέσματα Ηλεκτροφόρησης του DNA

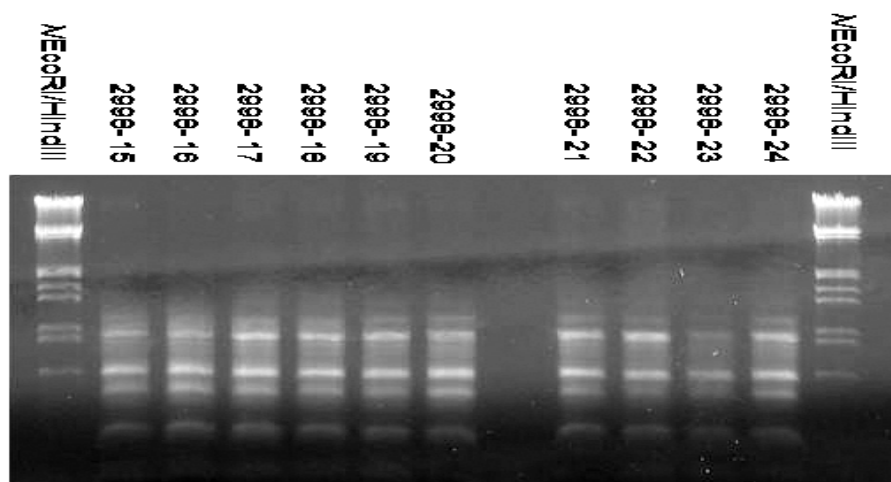
Στις εικόνες που βρίσκονται στο παρακάτω κείμενο της παρούσας εργασίας, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, για την εκτίμηση της ποιότητας και της ποσότητας των εκχυλίσεων DNA.

RAPDs with OPA1, OPA2, OPA3, OPA4, MgCl₂ 3mM



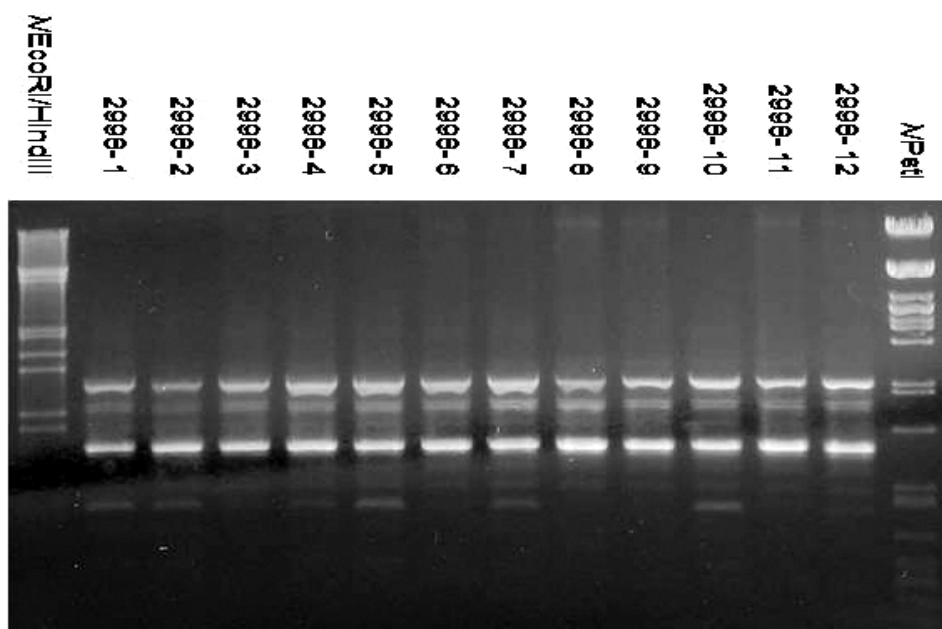
Εικόνα 8. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

RAPDs with OPA1, OPA2, OPA3, OPA4, MgCl₂ 3mM



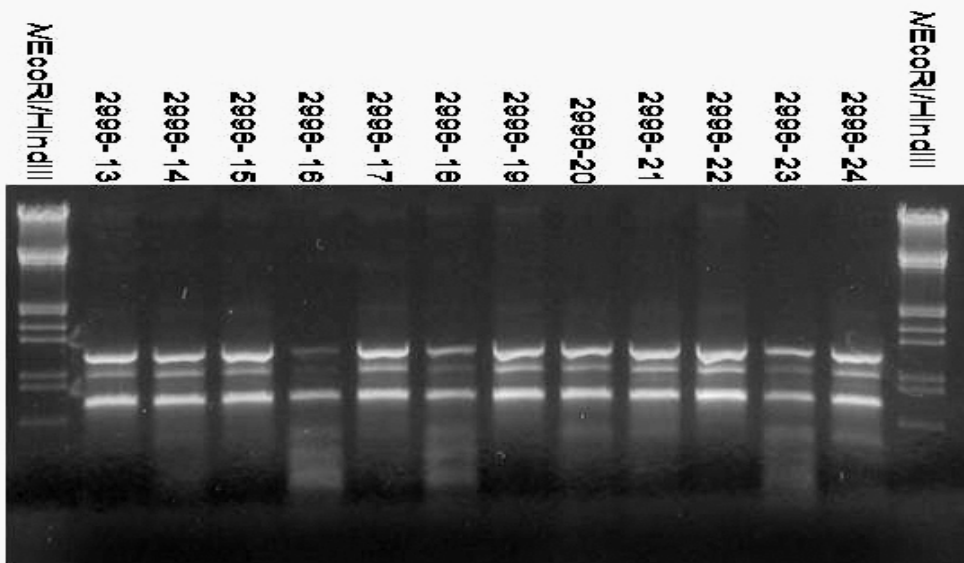
Εικόνα 9. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

RAPDs with OPA5, OPA6, OPA7, OPA8, MgCl₂ 3mM



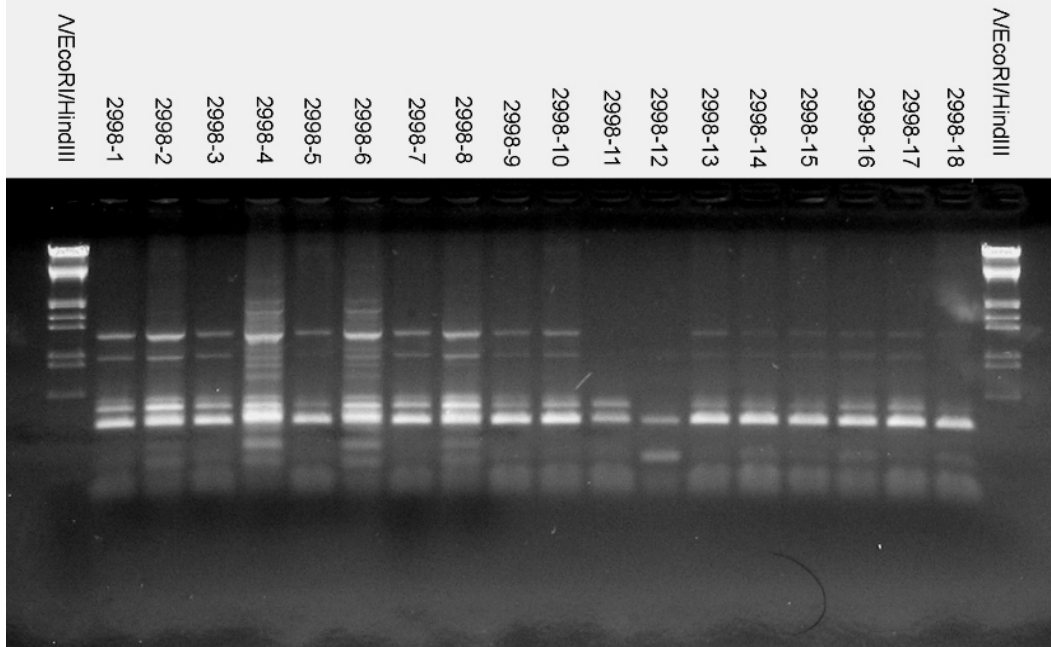
Εικόνα 10. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

RAPDs with OPA5, OPA6, OPA7, OPA8, MgCl₂ 3mM



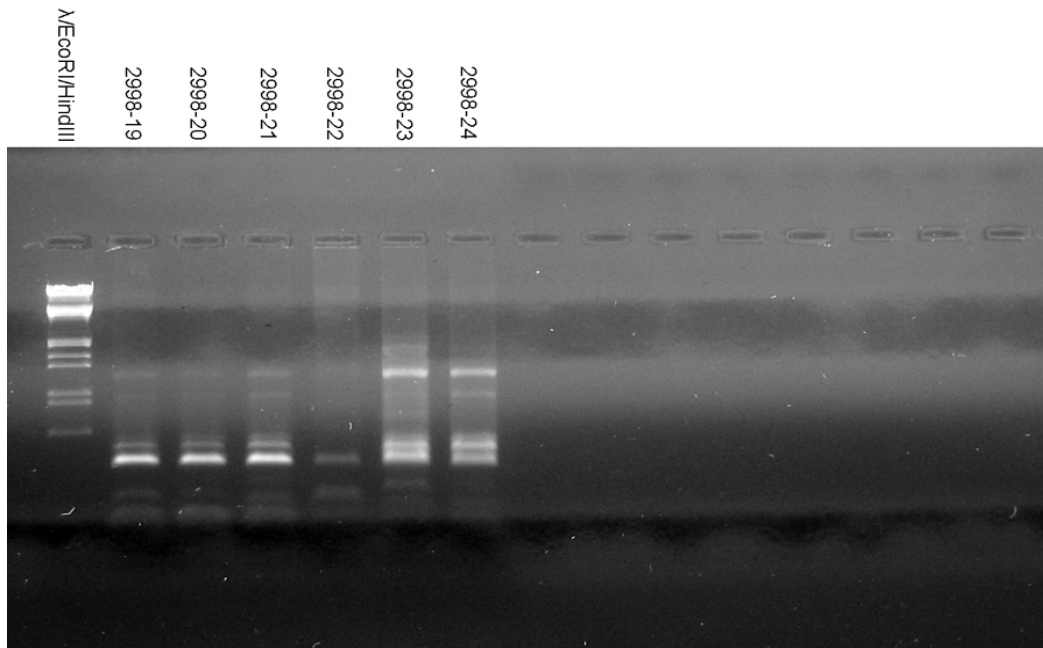
Εικόνα 11. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

RAPDs with OPA9, OPA10, OPA11, OPA12 MgCl₂ 3mM



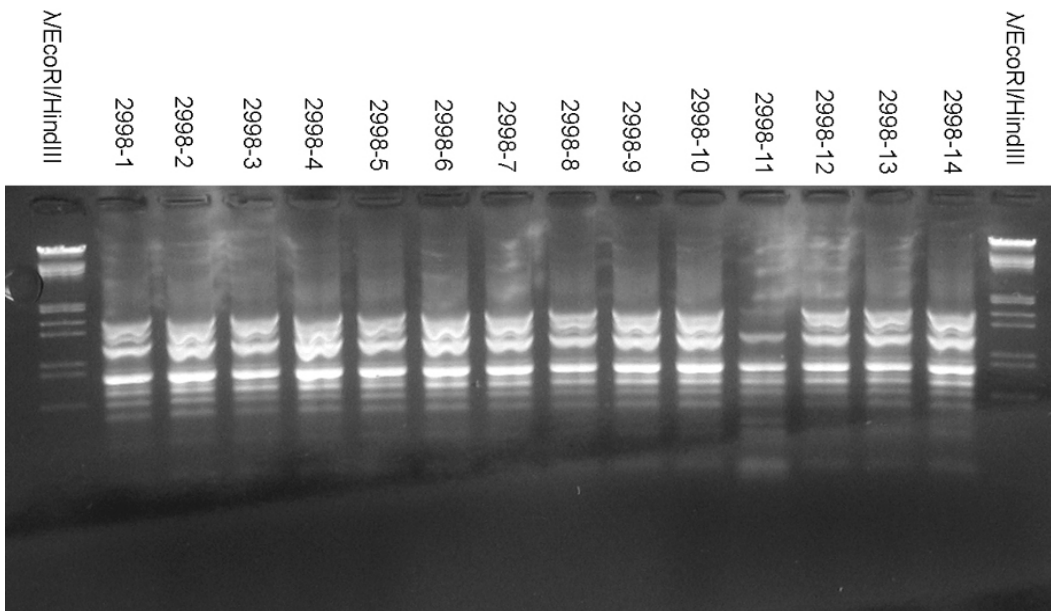
Εικόνα 12. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

RAPDs with OPA9, OPA10, OPA11, OPA12 MgCl₂ 3mM



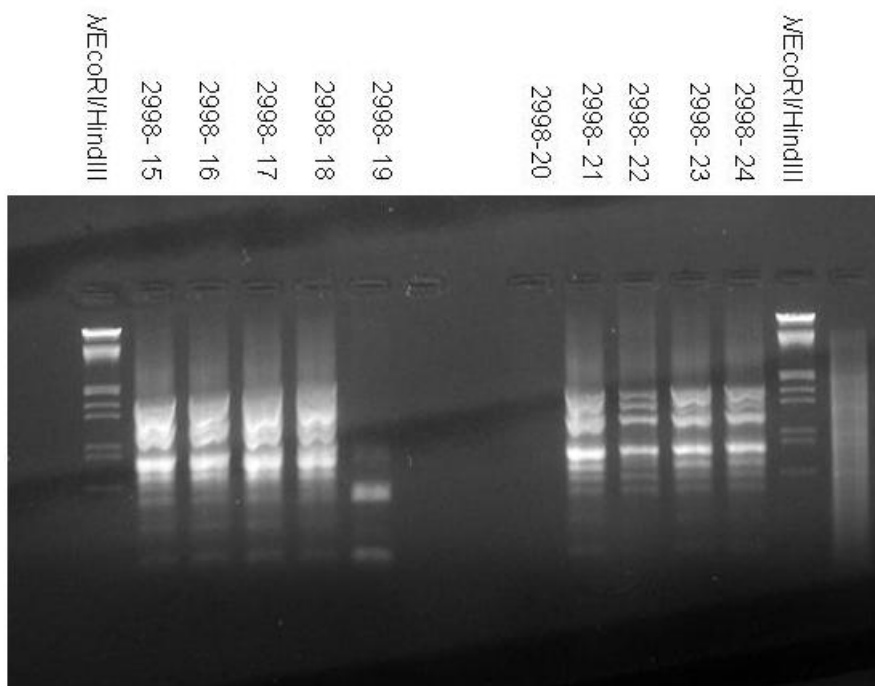
Εικόνα 13. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

RAPDs with OPA 13, OPA14, OPA15, OPA16, MgCl₂ 3mM



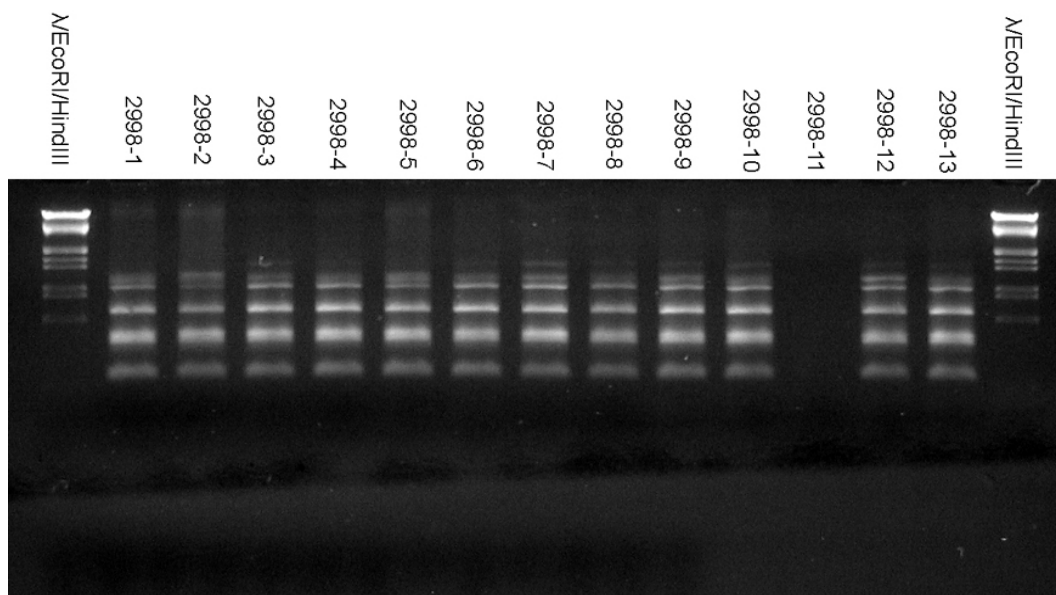
Εικόνα 14. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

RAPDs with OPA13, OPA14, OPA15, OPA16, MgCl₂ 3mM



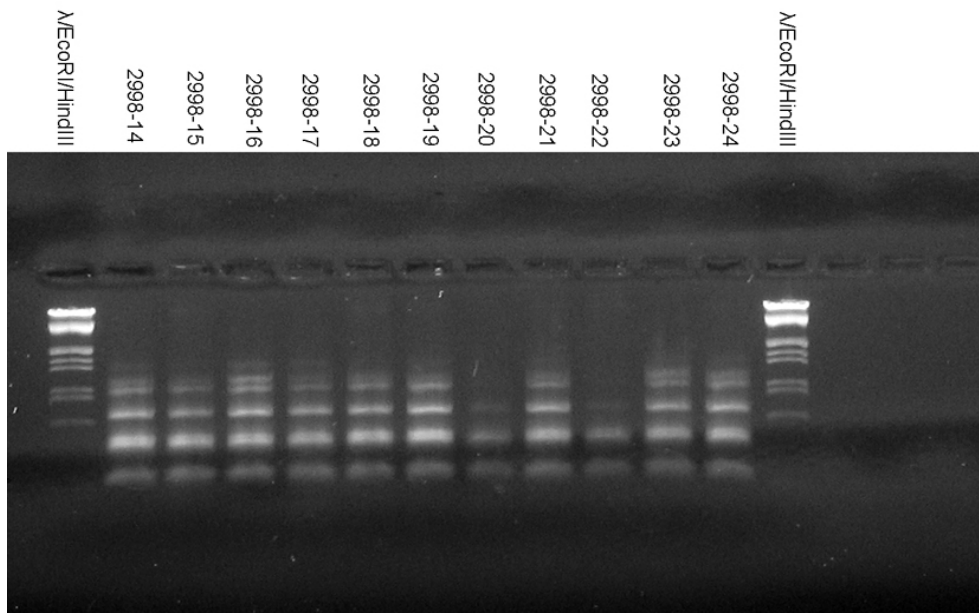
Εικόνα 15. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

RAPDs with OPA17, OPA18, OPA19, OPA20, MgCl₂ 3mM



Εικόνα 16. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

RAPDs with OPA17, OPA18, OPA19, OPA20, MgCl2 3mM



Εικόνα 17. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

Πίνακας 8. Μοριακοί δείκτες που ανιχνεύθηκαν σε κάθε ένα από τα 24 άτομα της ποικιλίας Kalivia, για τις πέντε τετράδες ΟΡΑ (ΣΕΙΡΑ_1, ΣΕΙΡΑ_2, ΣΕΙΡΑ_3, ΣΕΙΡΑ_4, ΣΕΙΡΑ_5) (+ = παρουσία, - = απουσία).

ΣΕΙΡΑ ΟΡΑ	ΦΥΤΑ	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
ΣΕΙΡΑ_1	Μέγεθος ζώνης	ΠΑΡΟΥΣΙΑ/ΑΠΟΥΣΙΑ ζώνης																							
	1200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	960	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	450	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ΣΕΙΡΑ ΟΡΑ	ΦΥΤΑ	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
ΣΕΙΡΑ_2	Μέγεθος ζώνης	ΠΑΡΟΥΣΙΑ/ΑΠΟΥΣΙΑ ζώνης																							
	1160	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	950	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	700	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
ΣΕΙΡΑ ΟΡΑ	ΦΥΤΑ	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
ΣΕΙΡΑ_3	Μέγεθος ζώνης	ΠΑΡΟΥΣΙΑ/ΑΠΟΥΣΙΑ ζώνης																							
	1300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	850	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	750	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	320	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
250	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
ΣΕΙΡΑ ΟΡΑ	ΦΥΤΑ	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
ΣΕΙΡΑ_4	Μέγεθος ζώνης	ΠΑΡΟΥΣΙΑ/ΑΠΟΥΣΙΑ ζώνης																							
	1400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+	+
	1200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+	+
	810	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+
	650	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+
	560	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+
450	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+	
ΣΕΙΡΑ ΟΡΑ	ΦΥΤΑ	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
ΣΕΙΡΑ_5	Μέγεθος ζώνης	ΠΑΡΟΥΣΙΑ/ΑΠΟΥΣΙΑ ζώνης																							
	1020	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	940	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	620	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	450	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές μέθοδοι ανίχνευσης της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των φυτών ενός πληθυσμού, σε μελέτες που αφορούν κατ' αρχήν στη μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών του πληθυσμού και εν συνεχεία στην δημιουργία, καταγραφή και μελέτη των μοριακών δεικτών. Μια από αυτές τις προσεγγίσεις είναι και η ανάλυση με μοριακούς δείκτες RAPD, που αποδεδειγμένα αποτελεί επιτυχή μέθοδο για το σκοπό της παρούσας μελέτης (Φανουράκης, 2002). Οι μοριακοί δείκτες είναι χρήσιμοι για τη μελέτη της κληρονομικότητας και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών μιας και αξιοποιούν τον πολυμορφισμό που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA χωρίς να υπάρχει αναγκαία επίπτωση στα προϊόντα που τυχόν κωδικοποιούν. Επιπλέον δεν εξαρτώνται ούτε από τα αναπτυξιακά στάδια του φυτού, ούτε και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και δύνανται να καλύψουν ολόκληρο το γονιδίωμα σε προβλεπόμενες ή μη γενετικές αποστάσεις.

Οι δείκτες RAPD συμπεριφέρονται σαν κυρίαρχοι χαρακτήρες, εμφανίζονται σε ομόζυγη ή ετερόζυγη κατάσταση στην επόμενη γενιά που περιέχει τον αλληλόμορφο που ενισχύεται και δεν εμφανίζεται στη γενιά που είναι ομόζυγη για το αλληλόμορφο που δεν ενισχύεται (Kapteyn and Simon, 2002). Εξάλλου, η φύση των μοριακών δεικτών εξαρτάται άμεσα από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αξιοποίησή τους σε προγράμματα ταυτοποίησης και πιστοποίησης γενετικού υλικού. Η χρησιμότητα των δεικτών RAPD στη συγκεκριμένη εργασία εμφανίζεται στο μέγιστο βαθμό της, διότι στο αγγούρι παρατηρείται ύπαρξη πολλών αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο, υψηλός συντελεστής κληρονομικότητας (φαινότυπος σταθερός κάτω από ποικίλες συνθήκες περιβάλλοντος), διασπορά και ισοκατανομή σε όλο το γονιδίωμα, και ισχύει η απλή κληρονομικότητα (έλεγχος από δυο γόνους, όπου ο ένας είναι πλήρως επικρατής και ο άλλος είναι μερικώς επικρατής) (Χατζόπουλος, 2001). Ένα μειονέκτημα της χρήσης των RAPD είναι η μερική επαναληψιμότητα λόγω: α) της διαφορετικής μεθοδολογίας που χρησιμοποιείται για την απομόνωση του DNA, β) των διαφορετικών πολυμερασών που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR και γ) οι διαφορετικές συσκευές που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR (Penner *et al.*, 1993). Εντούτοις, στο παρόν πείραμα, τα αποτελέσματα ήταν σταθερά και επαναλήψιμα διότι χρησιμοποιήθηκε η ίδια πολυμεράση και η ίδια συσκευή PCR και για την απομόνωση του DNA ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο απομόνωσης (μέθοδος με CTAB), παρόλο που

συχνά είναι μη επαναλήψιμα ακόμα και όταν χρησιμοποιείται η ίδια συσκευή ή η ίδια πολυμεράση.

Το πρώτο βήμα της παρούσας μελέτης ήταν η καταγραφή ποιοτικών μορφολογικών χαρακτηριστικών που ελέγχονται είτε από ένα γονίδιο (π.χ. πικρότητα), είτε από δυο γονίδια (π.χ. το χρώμα του ώριμου και του άωρου καρπού, ο τύπος του άνθους, η ανθεκτικότητα ή η ευπάθεια στο ωίδιο κ.τ.λ.). Τα παραπάνω ποιοτικά χαρακτηριστικά δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον, ταξινομούνται σε ξεχωριστές φαινοτυπικές κατηγορίες, η κληρονομικότητα τους ακολουθεί τους νόμους του Mendel, και παρουσιάζουν ασυνεχή παραλλακτικότητα (Φανουράκης, 2005). Σε όλα τα άτομα που μελετήθηκαν δεν παρουσιάστηκε καμία ποικιλομορφία μεταξύ των φαινοτυπικών τους χαρακτηριστικών (Πίνακας 7).

Το δεύτερο βήμα της παρούσας μελέτης ήταν η καταγραφή σε επίπεδο γενετικού υλικού, της ποικιλομορφίας μεταξύ ατόμων της ποικιλίας. Κάθε τμήμα DNA που ανιχνεύθηκε αποτελεί μοριακό δείκτη και όλα τα φυτά ελέγχθηκαν για την παρουσία ή απουσία δεικτών. Ο πολυμορφισμός μεταξύ των ατόμων εκδηλώνεται με τις διαφορές του προτύπου των ζωνών DNA στην ηλεκτροφόρηση και μπορεί να οφείλεται είτε σε αλλαγές βάσεων της θέσης υβριδισμού, καθιστώντας τη μη αναγνωρίσιμη από τον εκκινητή, είτε σε προσθήκες ή αφαιρέσεις τμημάτων DNA που διαφοροποιούν το μέγεθος της αλληλουχίας που ενισχύεται, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται διαφορετικές ζώνες στην ηλεκτροφόρηση.

Για την εύρεση ή όχι γενετικής παραλλακτικότητας με την εφαρμογή της μεθοδολογίας των RAPD μεταξύ των 24 ατόμων χρησιμοποιήθηκαν 20 δεκαμερή ολιγονουκλεοτίδια σε τετράδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν παρατηρείται καμία ποικιλομορφία στα άτομα της συγκεκριμένης ποικιλίας, δηλαδή παρατηρήθηκε απόκλιση του προτύπου των ζωνών DNA στην ηλεκτροφόρηση μεταξύ των υπό μελέτη ατόμων στους μοριακούς δείκτες που ανιχνεύθηκαν (εικόνες 10, 11, 12, 13, 15).

Η παραλλακτικότητα των μοριακών δεικτών που παρατηρήθηκε με τη χρήση RAPD, δεν φαίνεται να συμφωνεί με την ομοιομορφία που παρατηρήθηκε και στην καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών της ποικιλίας Καλύβια. Το τελευταίο φαίνεται να συμφωνεί και με τα αποτελέσματα των Bernet, *et. al.* (2003)

που προσπάθησαν να ξεχωρίσουν 36 διαφορετικές ποικιλίες αγγουριού με χρήση μοριακών δεικτών RAPD και των Staub J., Fanourakis N., Lopez-Sese A. (2003), που χρησιμοποίησαν τους δείκτες αυτούς για ανίχνευση ποικιλομορφίας σε κρητικές ποικιλίες πεπονιού. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην ενίσχυση περιοχών του DNA οι οποίες δεν συμμετέχουν στην δημιουργία των υπό εξέταση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

Η παραπάνω τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν στην ταξινόμηση, πιστοποίηση και ταυτοποίηση ποικιλιών και ειδικότερα σε περιπτώσεις παραδοσιακών ποικιλιών. Στη χώρα μας υπάρχει ένας πολύ μεγάλος αριθμός διαφορετικών ονομασιών για ποικιλίες αγγουριού που μπορεί να είναι ίδιες. Έτσι, με τη μεθοδολογία αυτή είναι δυνατό να εκτιμηθεί εάν και κατά πόσο οι διάφορες ποικιλίες που συναντώνται από περιοχή σε περιοχή, αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ποικιλίες ή εάν αυτή η διαφορετικότητα στα μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι αποτέλεσμα των περιβαλλοντικών συνθηκών. Η ανάλυση μπορεί να γίνει σε ποικιλίες που χωροθετούνται σε περιοχές σχετικά απομακρυσμένες αλλά και σε περιοχές κοντινές (Φανουράκη, 2002 και Χατζόπουλος, 2001). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας θα μπορούσαν να είναι η αρχή για την εύρεση μεθοδολογιών για την ταυτοποίηση της γενετικής καθαρότητας και άλλων ποικιλιών αγγουριάς στην Ελλάδα.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

1. Benneth G. and Smith C.A.B., 1976. A note on genetic distance. *Ann. Human Genet.* 21:254-276
2. Bernet P.G., Bramardi S., Calvache D., Carbonell A.E. and Asins M.J., 2003. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding* 122(2):146-152.
3. Benter T., Papadopoulos S., Pape M., Manns M., Poliwoda H., 1995. Optimization and reproducibility of random amplified polymorphic DNA in human. *Anal Biochem.* 230(1):92-100.
4. Botstein et al., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.*;32(3):314-31
5. Bradeen J.M., Staub J.E., Wye C., Antonise R. and Peleman J., 2001. Towards an expanded and integrated linkage map of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genome* 44: 111–119
6. Chen J., Civerolo E. L., Jarret R. L., Van Sluys M.A., de Oliveira M. C., 2005. Genetic Discovery in *Xylella fastidiosa* through Sequence analysis of selected Randomly Amplified Polymorphic DNAs. *Current Microbiology*, Vol. 50, p:78–83
7. Deragon J.M., Landry B.S., 1992. RAPD and other PCR-based analyses of plant genomes using DNA extracted from small leaf disks. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol 1, p:175-180
8. Fanourakis N.E., and Simon P.W., 1987. Analysis of genetic linkage in the cucumber. *J. Hered.* 78: 238–242.
9. Fanourakis N., Pavlikaki H. and Navarro C.P., 2004. Genetic relationships of different Greek landraces of cucumber. In press
10. Ghany E. and Zaki A., 2003. DNA Sequences of RAPD Fragments in the Egyptian cotton *Gossypium barbadense*. *African Journal of Biotechnology* Vol.2 (5), p: 129-132
11. Hearne CM, Ghosh S, Todd JA, 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.* 1992 (8):288-94

12. Hu J., van Eysden J. and Quiros C.F., 1995. Generation of DNA-based markers in specific genome regions by two- primer RAPD reactions. Cold Spring Harbor, Vol 4, p:346-351
13. Hulbert S.H. and Bennetzen J., 1991. Recombination at the *Rp1* locus of maize. *Mo Gen Genet* 226:377-382.
14. Kapteyn J. and Simon J.E., 2002. The use of RAPDs for assessment of identity, diversity, and quality of *Echinacea sp.* In: J. Janick and A. Whipkey (eds.), Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA. p. 509–513
15. Kennard W.C., Staub J.E., Poetter K., Dijkhuizen A., Meglic V., and Havey M.J., 1994. Linkage among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. *Theor. Appl. Genet.* 89: 92–98.
16. Knerr L.D. and Staub J.E., 1992. Inheritance and linkage relationships of isozyme loci in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 84:217-224.
17. Koo D.H., Choi H.W., Cho J., Hur Y., and Bang J.W., 2005. A high-resolution karyotype of cucumber (*Cucumis sativus* L.) revealed by C-banding, pachytene analysis, and RAPD-aided fluorescence in situ hybridization. *Genome* 48: 534–540
18. Landegren *et al.*, 1988. DNA diagnostics - molecular techniques and automation. *Science.*;242(4876):229-37
19. Lopez-Sese A.I., Staub J., 2003. Genetic analysis of Spanish melon (*Cucumis melo* L.) germplasm using a standardized molecular-marker array and geographically diverse reference accessions. *Theor Appl Genet.* 108(1):41-52. Epub 2003 Sep 19.
20. Lopez-Sese A.I., Staub J. E., 2003. Genetic analysis of Spanish melon (*Cucumis melo* L.) germplasm, using a standardized molecular-marker array and geographically diverse reference accessions. *Theor. Appl. Genet.* 108:41–52
21. Meglic V. and Staub J.E. , 1993. Molecular genetic markers and their legal relevance for cultigen discrimination: A case study in cucumber. *Hort Technology* 3:291-300.

22. Nitsch et. al., 1952. Plant hormones in the development of fruits. Q Rev Biol.;27(1):33-57.
23. Peirce L.C., 2004. Vegetables. Characteristics, Production and Marketing. John Wiley and Sons Inc., NY, USA.
24. Penner, Kim, Laroche, 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. PCR Methods Appl.;2(4):341-5
25. Poetter K. F., Staub J. E., 2002. Molecular linkage analysis in cucumber. Agricultural research service, Madison.
26. Pushpendra et al., 2002.
27. Stam J.G., et. al., 1993. Purification and characterization of DNA polymerases from *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol.;61(2):243-53
28. Staub J.E., Fanourakis N., Lopez-Sese A.I., 2003. Genetic Diversity In Melon (*Cucumis melo* L.) Landraces From The Island Of Crete As Assessed By Random Amplified Polymorphic DNA And Simple Sequence Markers. Euphytica. 136:151-166
29. Staub J., Serquen F. and Bacher J., 1996. Genetic map construction and map merging in cucumber. Proceedings of the Vith Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding. Spain.
30. Staub J., Dean R., Joobeur T., Wang Y-H., 2005. Genome Mapping, Molecular Markers and Genetic Engineering for Cucurbit Improvement in Plant Breeding Reviews. American Society For Horticultural Science.
31. Thomas H. and Staub J. E., 1999. Genetic variation in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) as assessed by random amplified polymorphic DNA. Genetic Resources and Crop Evolution 46(4):337-350
32. Vos et al., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res.;23(21):4407-14
33. Welsh J. and McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res.;18(24):7213-8
34. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, Vol. 18, No. 22 6531

Ελληνική Βιβλιογραφία

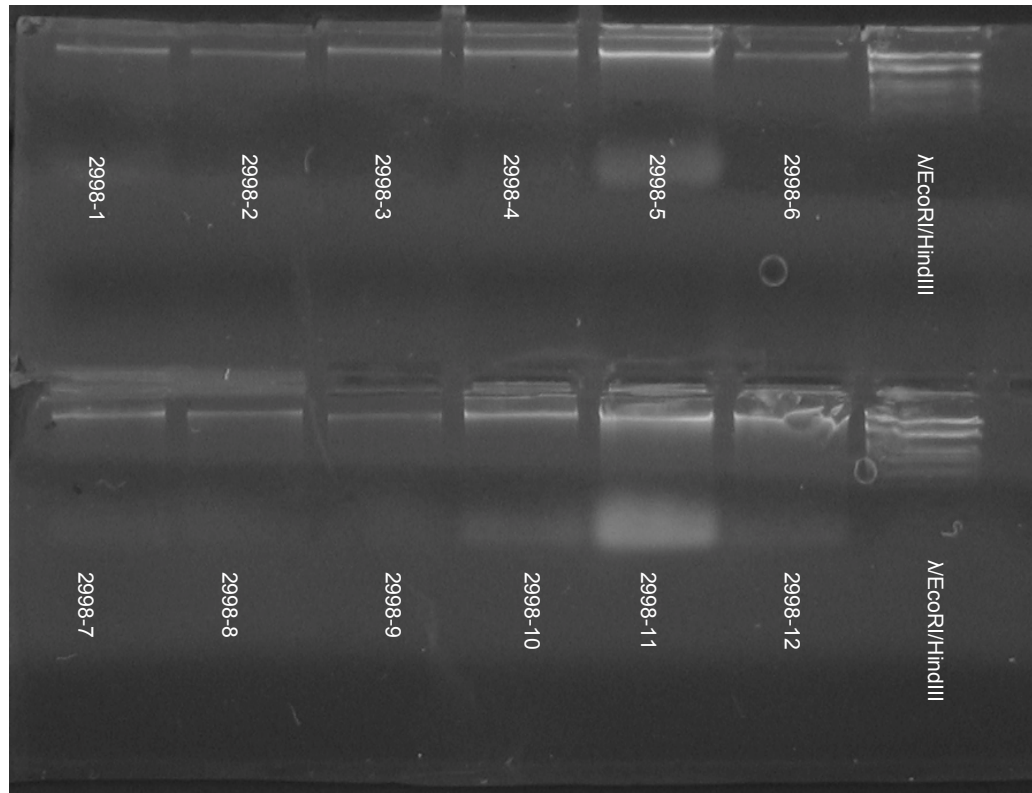
1. Κανάκης Α.Γ., 2005. Γενική Λαχανοκομία. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα.
2. Λουλακάκης Κ.Α., 2002. Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας Φυτών. ΣΤΕΓ, ΑΤΕΙ Ηρακλείου, Ηράκλειο.
3. Παναγόπουλος Χ. Γ., "Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών"
4. Φανουράκης Ν., 2002. Γενετική Βελτίωση Φυτών. Εκδόσεις Ιών, Αθήνα.
5. Φανουράκης Ν., 2005. Εργαστήρια Βελτίωσης Φυτών. ΣΤΕΓ, ΑΤΕΙ Ηρακλείου, Ηράκλειο.
6. Χατζόπουλος Π., 2001. Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Διαδίκτυο

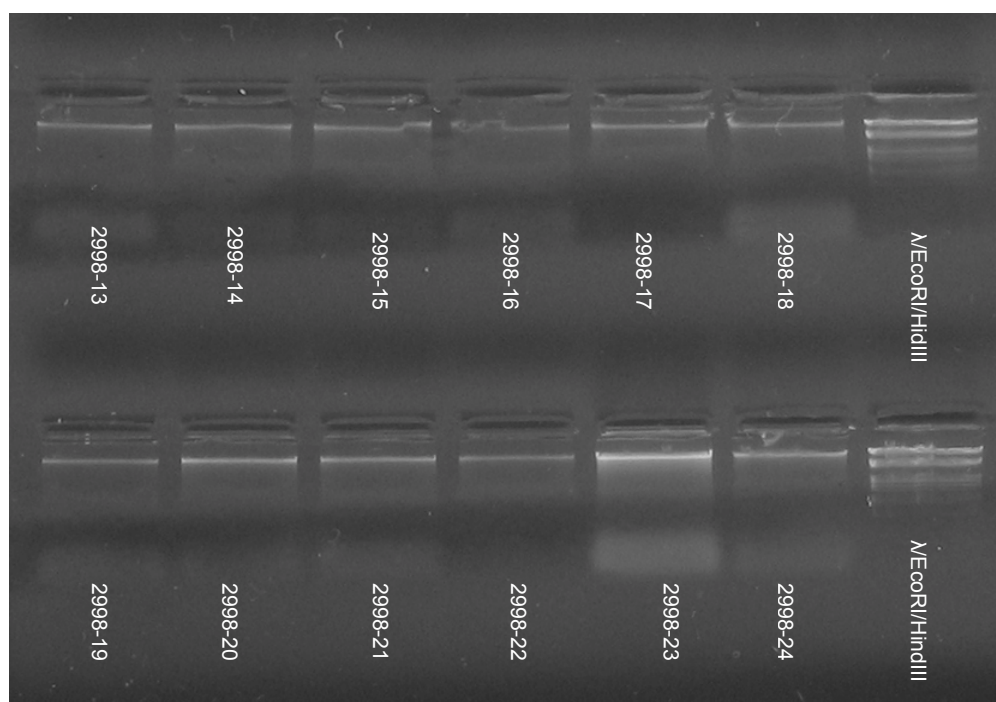
1. <http://www.biotoools.net/eng/technica/t31.htm>
2. <http://avery.rutgers.edu/WPPS/studentprojects/htm>
3. <http://www.ars.usda.gov/Research/docs/htm>
4. <http://www.hort.wisc.edu/usdavrucru/Staub/rapds/html>

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Στο παρόν παράρτημα παρατίθενται οι φωτογραφίες των πυκτωμάτων αγαρόζης που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Φαίνονται τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των απομονωθέντων DNAs των φυτών *cucumis sativus* var. *Kalivia*.



Εικόνα I. Τα απομονωμένα DNAs από κοτυληδόνες φυτών της πρώτης δωδεκάδας που υπήρχαν στο θερμοκήπιο.



Εικόνα II. Τα απομονωμένα DNAs από κοτυληδόνες φυτών της δεύτερης δωδεκάδας που υπήρχαν στο θερμοκήπιο.