



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ISSR-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ  
ΑΝΑΔΕΙΞΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΑ ΥΒΡΙΔΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ  
*CYNODON*»**

**ΚΑΛΑΘΑΚΗ ΣΕΒΑΣΤΗ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
"Εφαρμοσμένη Επιστήμη και Τεχνολογία στη Γεωπονία"**

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2022



## **ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ**

1. ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΤΡΑΝΤΑΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ  
ΙΔΙΟΤΗΤΑ ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΙΔΡΥΜΑ/ΦΟΡΕΑΣ ΕΛΜΕΠΑ
2. ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ  
ΙΔΙΟΤΗΤΑ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΙΔΡΥΜΑ/ΦΟΡΕΑΣ ΕΛΜΕΠΑ
3. ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΒΕΡΒΕΡΙΔΗΣ ΦΙΛΙΠΠΟΣ  
ΙΔΙΟΤΗΤΑ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΙΔΡΥΜΑ/ΦΟΡΕΑΣ ΕΛΜΕΠΑ

**ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΟΥ ΕΛΜΕΠΑ**





## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

**Η** παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Γεωπονίας της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου. Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Τραντά Εμμανουήλ για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του και να προσπαθήσω να φέρω σε πέρας ένα, όπως αποδείχθηκε, δύσκολο έργο. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κ. Νεκτάριο Παναγιώτη και κ. Βερβερίδη Φίλιππο που δέχτηκαν να με αξιολογήσουν στη παρουσίαση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής. Τέλος, αναμφίβολα πολλά ευχαριστώ αξίζουν οι συμφοιτητές μου στο μεταπτυχιακό, Γεώργιος Γαβαλάς, Γεωργία Καρανάσου, Κωνσταντίνος Καλούδης, που πίστεψαν σε μένα και με ενθάρρυναν, όπως επίσης και η Ευδοξία Ευσταθιάδου που υπήρξε το στήριγμα μου και εντός αλλά και εκτός εργαστηρίου όλον αυτόν τον καιρό.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>VI</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	<b>VII</b>
<b>ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ</b> .....	<b>IX</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
1.1 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ .....	2
<b>2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ</b> .....	<b>4</b>
2.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΗΚΟΥΣ ΕΝΙΣΧΥΟΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM, AFLP).....	4
2.2 ΤΥΧΑΙΑ ΕΝΙΣΧΥΟΜΕΝΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΟ DNA (RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA, RAPD).....	5
2.3 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΕΝΙΣΧΥΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ (SEQUENCE-RELATED POLYMORPHISM, SRAP).....	6
2.4 ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΟΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ (DNA AMPLIFICATION FINGERPRINTING, DAF).....	7
2.5 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΑΠΛΩΝ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ (SIMPLE SEQUENCE REPEATS, SSR). .....	8
2.6 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΕΝΤΟΣ ΑΠΛΩΝ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ (INTER-SIMPLE SEQUENCE REPEATS, ISSR). .....	10
2.6.1 ΜΕΛΕΤΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ISSR-PCR .....	14
2.7 ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	16
<b>3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>17</b>
3.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ .....	17
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ. ....	17
3.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ DNA .....	18
3.4 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ISSR. ....	18
3.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ PCR.....	19
3.6 ΟΠΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ.....	19
3.7 ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΤΩΝ ΖΩΝΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΔΕΝΔΡΟΥ. ....	20

<b>4</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>21</b>
4.1	ΕΝΙΣΧΥΣΗ ISSR-PCR.....	21
4.2	ΑΝΑΛΥΣΗ UPGMA ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΔΕΝΔΡΟΥ. ....	27
<b>5</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>29</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι .....</b>	<b>31</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ .....</b>	<b>37</b>
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>39</b>



# ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

**Πίνακας 1:** Οι συντομεύσεις που χρησιμοποιούνται μέσα στο κείμενο και στις Εικόνες / Σχήματα

<b>Σύντμηση</b>	<b>Πλήρες όνομα</b>
<i>AFLP</i>	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
<i>RAPD</i>	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
<i>DAF</i>	<i>DNA Amplification Fingerprinting</i>
<i>SRAP</i>	<i>Sequence-Related Amplification Polymorphism</i>
<i>SSR</i>	<i>Simple Sequence Repeats</i>
<i>ISSR</i>	<i>Inter-Simple Sequence Repeats</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reactions</i>
<i>SNP</i>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<i>UPGMA</i>	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
<i>DNA</i>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Cynodon dactylon* (L.) Pers. είναι ένα θερμόφιλο γρασίδι που χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή ομοιόμορφου και υψηλής ποιότητας χλοοτάπητα, σε δημόσια πάρκα, κήπους κατοικιών, γήπεδα γκολφ και άλλων αθλημάτων. Μερικές από τις περισσότερο επιτυχημένες εμπορικά ποικιλίες αποτελούν υβρίδια μεταξύ των *Cynodon dactylon* X *Cynodon transvaalensis*. Υπάρχουν πολυάριθμες μέθοδοι για την ανάδειξη της γενετικής ποικιλομορφίας στο γρασίδι τύπου βερμούδας. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι οι RAPDs, AFLPs, SRAP, DAF, SSR και ISSR. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε νωπό φυτικό υλικό, από την ποικιλία «Tahoma» που καλλιεργείται στην Ελλάδα, την «Tahoma» που καλλιεργείται στην Ισπανία, την «Tifway 419» που καλλιεργείται στην Ελλάδα, και την «Monaco» που καλλιεργείται στην Ελλάδα, για να αναλυθεί η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ αυτών των 4 τεσσάρων ποικιλιών. Χρησιμοποιήθηκαν δώδεκα ISSR εκκινητές οι οποίοι ενίσχυσαν 327 τμήματα DNA από τα οποία τα 79 (23,8%) ήταν πολυμορφικά. Η ομαδοποίηση κατά UPGMA που έγινε στο πίνακα αλληλόμορφων χώρισε τους υπό έλεγχο γενότυπους σε τρεις κλάδους υποδεικνύοντας ότι η ποικιλία «Tahoma» με προέλευση από την Ελλάδα και την Ισπανία ήταν κατά 94% όμοιες, ενώ η ποικιλία «Tifway 419» χωρίστηκε από την «Tahoma», αν και τα δυο αυτά υβρίδια προέρχονται από όμοια φυτικά είδη. Ομοίως, η ποικιλία «Monaco» χωρίστηκε από τα υβρίδια των *Cynodon dactylon* x *C. transvaalensis*. Σύμφωνα με τα ευρήματα αυτής της μελέτης, οι Μοριακοί Δείκτες ISSR μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς για να διακρίνουμε υβρίδια και ποικιλίες του γένους *Cynodon*.

# ABSTRACT

*Cynodon dactylon* (L.) Pers. is a warm-season turfgrass, originated from Middle East, and it is broadly used for public parks, golf courses, sports fields and home lawns. Some of the most commercially successful cultivars are interspecific hybrids between *Cynodon dactylon* x *C. transvaalensis*. There are numerous DNA profiling methods to detect genetic variation in bermudagrass. The most used for this species are RAPDs, AFLPs, SRAP, DAF, SSR and ISSR. In the current study, fresh leaf tissue was collected from the cultivars ‘Tahoma’ originated from Greece, ‘Tahoma’ from Spain, ‘Tifway 419’ from Greece and ‘Monaco’ from Greece and used to isolate genomic DNA. The extracted DNA was subjected to ISSR-PCR methodology to analyze genetic diversity between these four cultivars. Twelve ISSR primers produced 327 bands of which 79 (23,8%) were polymorphic. Cluster analysis using the UPGMA method grouped the four cultivars into three clusters indicating that ‘Tahoma’ from Spain and Greece were 94% similar, while ‘Tifway 419’ was able to be separated from ‘Tahoma’ even though both hybrids originate from similar parental plant species. Similarly, ‘Monaco’ was clearly distinguished from the *C. dactylon* x *C. transvaalensis* hybrids. Based on the findings of the current research, ISSR markers could successfully be utilized as a method to distinguish *Cynodon* hybrids and varieties.



# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το *Cynodon dactylon* (L.) Pers. [ $2n=4x=36$ ] είναι ένα θερμοφιλο γρασίδι που έχει καταγωγή από την Μέση Ανατολή (Farsani et al. 2012) και χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή ομοιόμορφου και υψηλής ποιότητας χλοοτάπητα, σε δημόσια πάρκα, κήπους κατοικιών, γήπεδα γκολφ και άλλων αθλημάτων (Zhang et al., 2017). Οι Harlan & de Wet (1969), έχουν αναφέρει ότι τα ιθαγενή είδη του *Cynodon* αναπτύσσονται μεταξύ γεωγραφικού πλάτους 45° Νότια και 45° Βόρεια. Αν και κάποιες εμπορικές ποικιλίες γρασιδιού πολλαπλασιάζονται με σπόρο, οι περισσότεροι χλοοτάπητες δημιουργούνται γρήγορα με την άμεση εγκατάσταση έτοιμου χλοοτάπητα που εμπεριέχει στόλונες και ριζώματα (Zhang & Liu, 2018).

Το γενετικό υλικό του γρασιδιού μπορεί να ταυτοποιηθεί μέσω μορφολογικών χαρακτηριστικών, ισοενζυμικών μοτίβων ηλεκτροφόρησης και Μοριακών Δεικτών (Li et al., 2011). Μελέτες έχουν δείξει εκτεταμένες διαφοροποιήσεις στα μορφολογικά χαρακτηριστικά, στα ισοενζυμικά μοτίβα και στα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά (Harlan & de Wet 1969). Οι Μοριακοί Δείκτες έχουν θεωρηθεί μία προτιμώμενη μέθοδος για την ανάδειξη της γενετικής παραλλακτικότητας του γενετικού υλικού του φυτού τα προηγούμενα χρόνια, μιας και αυτές οι μέθοδοι μπορούσαν να εξακριβώσουν τις διαφορές μεταξύ πολύ συγγενικών γενότυπων. Οι διαφορές μεταξύ των φυτών γρασιδιού εντοπίστηκαν με πρότυπα προφίλ γενετικού υλικού (DNA) (Li et al., 2011). Οι Etemadi et al. (2006), αξιολόγησαν την γενετική παραλλακτικότητα του άγριου γρασιδιού *Cynodon dactylon*, που συλλέχθηκε από το Ιράν, βασισμένοι στη τεχνική

Τυχαία Ενισχυόμενο Πολυμορφικό DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD). Επιπρόσθετα, οι διαφορές στο γονιδίωμα μεταξύ των ποικιλιών της περιοχής και άλλων που προήλθαν από διαφορετικές χώρες, εντοπίστηκαν με την τεχνική Πολυμορφισμοί Μήκους Ενισχυόμενων Τμημάτων (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) και την τεχνική Πολυμορφισμοί Ενισχυόμενων Αλληλουχιών (Sequence-Related Amplified Polymorphisms, SRAP) (Li et al., 2011).

### **1.1 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ**

Οι Μοριακοί Δείκτες έχουν πολλά πλεονεκτήματα στην ανάδειξη γενετικής παραλλακτικότητας (Wang et al., 2013) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση γενετικής παραλλακτικότητας ακόμα και σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (SNPs). Ακόμα οι Μοριακοί Δείκτες μπορεί να είναι χρήσιμοι στο πλαίσιο φυλογενετικών αναλύσεων, διότι επιτρέπουν την ανάλυση της γενετικής σύστασης των πληθυσμών, κατατάσσοντας τα μέλη τους σε ταξινομικές ομάδες, όπου ταυτόχρονα φαίνονται οι σχέσεις μεταξύ των ειδών. Επίσης, είναι πολύ βοηθητικοί στη ταυτοποίηση της αυθεντικότητας του γενετικού υλικού. Τα πλεονεκτήματα των Μοριακών Δεικτών με βάση το γενετικό υλικό σε σχέση με άλλου είδους Μοριακούς Δείκτες, προκύπτει από το ότι είναι ουδέτεροι και ανεξάρτητοι σε οποιαδήποτε περιβαλλοντικά στοιχεία ή αναπτυξιακά στάδια (χρονικά και χωρικά ανεξάρτητοι). Σε γενικές γραμμές, οι Μοριακοί Δείκτες με βάση το γενετικό υλικό, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως βασισμένοι στον υβριδισμό ή ως βασισμένοι στη αντίδραση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Μοριακοί Δείκτες όπως οι Τυχαία Ενισχυόμενο Πολυμορφικό DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) (Liang, 2010), Πολυμορφισμοί Εντός Απλών Επαναλαμβανόμενων Αλληλουχιών (Inter-Simple Sequence Repeats, ISSR) (Li et al., 2011; Farsani et al., 2012), Πολυμορφισμοί Απλών Επαναλαμβανόμενων Αλληλουχιών (Simple Sequence Repeats, SSR) (Tan et al., 2010), Δείκτες Αποτυπώματος Ενίσχυσης (DNA-Amplification Fingerprinting, DAF) (Wang et al., 2010), Πολυμορφισμοί Μήκους Ενισχυόμενων Τμημάτων (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) (Qiet et al., 2011) και Πολυμορφισμοί Ενισχυόμενων Αλληλουχιών (Sequence-Related Amplified Polymorphism, SRAP) (Wang et al., 2011), έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των ποικιλιών του γένους *Cynodon* και για την εύρεση γονιδιωματικών

διαφορών μεταξύ των ειδών του γένους *Cynodon* (Wang et al., 2013).

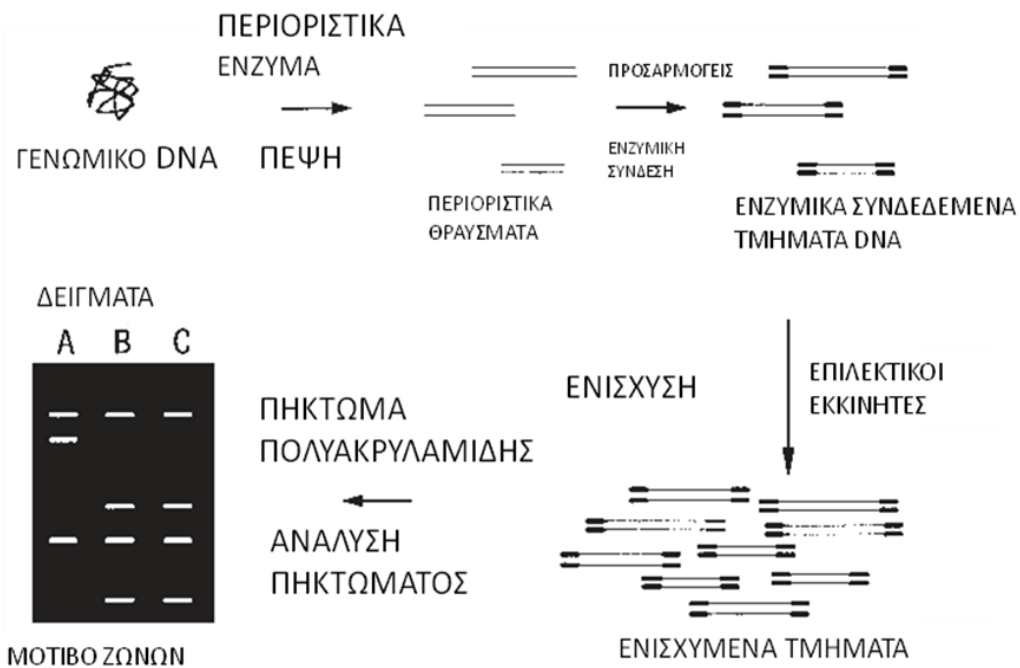
Αρκετές προσπάθειες έχουν πραγματοποιηθεί για να εξετασθεί η γενετική συγγένεια μεταξύ καταχωρήσεων γρασιδιού. Οι Zhang et al. (1999), χρησιμοποίησαν την τεχνική AFLP για να αναδείξουν τους διαφορετικούς γενότυπους γρασιδιού και να εντοπίσουν τη γενετική συγγένεια ανάμεσά τους. Οι Karaca et al. (2002), χρησιμοποίησαν την ίδια τεχνική για να εντοπίσουν τη γενετική διαφοροποίηση ανάμεσα σε ποικιλίες γρασιδιού που χρησιμοποιούνταν για την τροφή ζώων. Οι Wu et al. (2005, 2006), ανέλυσαν τη γενετική παραλλακτικότητα και τη σχέση του *Cynodon transvaalensis* Butt-Davy με το εξαπλοειδές *Cynodon dactylon*, αναλύοντας τη γενετική σχέση μεταξύ Κινέζικων καταχωρήσεων του γένους *Cynodon*, ανάμεσα και μέσα σε διαφορετικά επίπεδα πλοειδίας με τη χρήση της τεχνικής AFLP. Η μέθοδος DAF έχει χρησιμοποιηθεί για να εξετασθεί η συγγένεια ποικιλιών του γένους *Cynodon* από την Αυστραλία (Ho et al., 1997), για να αναδειχθεί η φυλογενετική σχέση μεταξύ των ειδών του *Cynodon* (Assefa et al., 1999) και υβριδίων από διαφορετικά είδη (Caetano-Anolles et al., 1995, 1997) και, επίσης, για να αναλυθεί η γενετική συγγένεια μεταξύ φυτικών τύπων που παρέκλιναν ή που είχαν σχέση με τις αγενώς πολλαπλασιαζόμενες ποικιλίες ‘Tifgreen’ και ‘Tifway’ (Caetano-Anolles et al., 1998). Οι Etemadi et al. (2006), παρουσίασαν ότι η τεχνική RAPD μπορούσε να εντοπίσει τη γενετική παραλλακτικότητα αλλά και συγκεκριμένα επίπεδα πλοειδίας από καταχωρήσεις γρασιδιού. Οι Gulsen et al. (2009), έδειξαν ότι διαφορετικές πολυπλοειδής προσθήκες του γένους *Cynodon*, μπορούν να έχουν υψηλή γενετική παραλλακτικότητα με διαφορετικούς μοριακούς δείκτες. Στη Κίνα οι Livet et al. (2008), ανέλυσαν τη γενετική παραλλακτικότητα από καταχωρήσεις γρασιδιού από νοτιοδυτικές περιοχές της χώρας με την τεχνική ISSR και τη τεχνική SRAP.

## 2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

### 2.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΗΚΟΥΣ ΕΝΙΣΧΥΟΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ (*Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP*)

Η τεχνική AFLP βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση περιοριστικών θραυσμάτων μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), έπειτα από ολική πέψη του γενετικού υλικού (DNA). Αυτή η τεχνική αποτελείται από τρία στάδια: α) πέψη του γενετικού υλικού με περιοριστικά ένζυμα και ενζυμική σύνδεση με προσαρμογέα ολιγονουκλεοτιδίων, β) επιλεκτική ενίσχυση των περιοριστικών θραυσμάτων και γ) ανάλυση σε πήκτωμα των ενισχυμένων τμημάτων (Εικόνα 1). Η αντίδραση της PCR των ομοαδοποιημένων περιοριστικών θραυσμάτων, επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση του προσαρμογέα και της περιοχής περιορισμού ως περιοχές-στόχους για τον υβριδισμό των εκκινητών. Η επιλεκτική ενίσχυση, επιτυγχάνεται με τη χρήση εκκινητών που επιμηκύνονται μέσα στα περιοριστικά θραύσματα, ενισχύοντας μόνο εκείνα τα τμήματα στα οποία η επιμήκυνση των εκκινητών ταιριάζει με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που υπάρχει στις περιοχές περιορισμού. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, ομάδες από τα περιοριστικά θραύσματα ίσως οπτικοποιούνται από την αντίδραση της PCR, χωρίς τη γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη συγκεκριμένη συν-ενίσχυση των υψηλών αριθμών περιοριστικών θραυσμάτων. Ο αριθμός των θραυσμάτων μπορεί να αναλυθεί ταυτόχρονα, όμως, είναι εξαρτημένος από την ανάλυση του ίδιου του συστήματος εντοπισμού. Τυπικά, 50-100 περιοριστικά θραύσματα ενισχύονται και εντοπίζονται σε πήκτωμα μετουσιωμένης πολυακρυλαμίδης. Η τεχνική AFLP αποτελεί μία πολύ δυναμική μέθοδο για τη δημιουργία προφίλ γονιδιωμάτων που μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιοδήποτε γενετικό υλικό, ανεξαρτήτου προέλευσης ή πολυπλοκότητας (Vos et al., 1995).

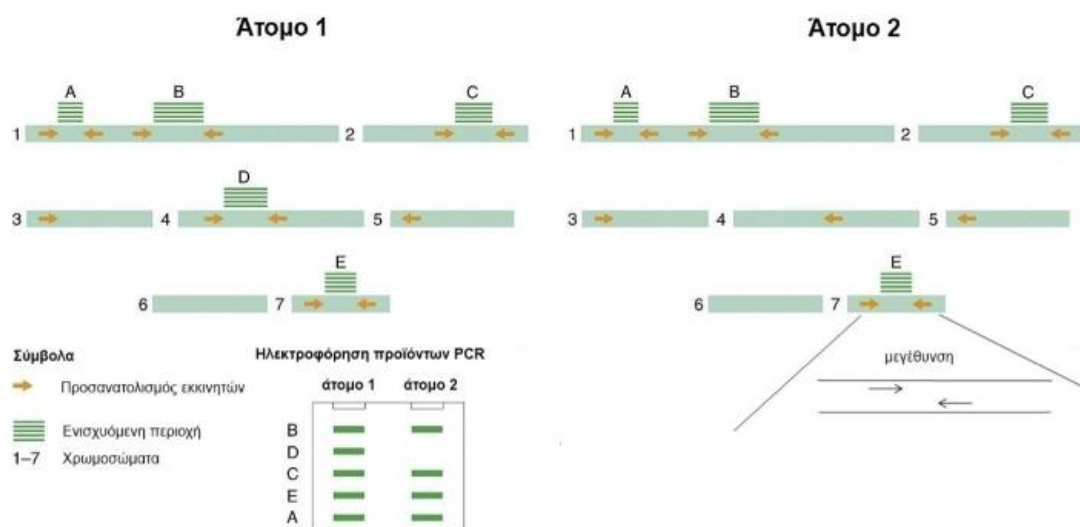




**Εικόνα 1:** Σχηματική απεικόνιση των 4 βασικών βημάτων της τεχνικής AFLP: πέψη, ενζυμική σύνδεση, ενίσχυση και ανάλυση σε πήκτωμα. Το γενωμικό DNA υπόκειται σε πέψη από περιοριστικά ένζυμα και οι προσαρμογείς συνδέονται ενζυμικά στα θραύσματα εκ περιορισμού. Ένα υποσύνολο των απολινωμένων θραυσμάτων ενισχύεται με PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές με επιλεκτικά νουκλεοτίδια στο 3' άκρο. Ο πολυμορφισμός εμφανίζεται με το «τρέξιμο» των ενισχυμένων προϊόντων σε μετουσιωμένο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Blears et al., 1998).

## 2.2 ΤΥΧΑΙΑ ΕΝΙΣΧΥΟΜΕΝΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΟ DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD)

Η τεχνική RAPD είναι ένα είδος αντίδρασης PCR, μόνο που τα τμήματα του γενετικού υλικού που ενισχύονται είναι τυχαία και συνήθως χρησιμοποιείται για την ανάδειξη γενετικής παραλλακτικότητας. Δεν απαιτείται γνώση της αλληλουχίας του γενετικού υλικού, μιας και οι εκκινητές θα υβριδιστούν σε άγνωστες θέσεις στο γονιδίωμα. (Εικόνα 2). Οι Μοριακοί Δείκτες RAPD κάνουν χρήση εκκινητών μήκους 10 νουκεοτιδίων με τυχαία σύνθεση και ενισχύουν τυχαία τμήματα του γενετικού υλικού, με όχι επαναλήψιμο τρόπο. Γενικά, χρησιμοποιούνται για την ανάλυση γενετικής παραλλακτικότητας ενός ατόμου με τη χρήση τυχαίων εκκινητών (Kumar & Gurusubramanian, 2011).



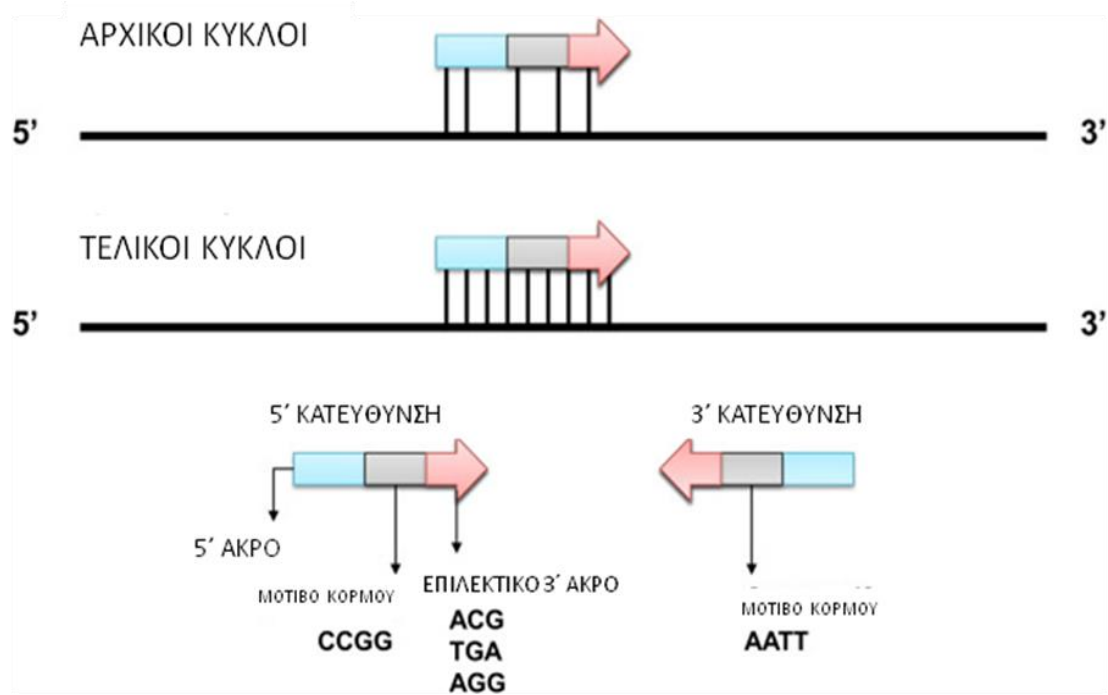
**Εικόνα 2:** Γενικευμένο μοντέλο ανάλυσης με τη τεχνική RAPD (Kumar & Gurusubramanian, 2011).

### 2.3 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΕΝΙΣΧΥΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ (Sequence-Related Amplified Polymorphism, SRAP)

Η τεχνική SRAP είναι μία απλή, οικονομική και αποτελεσματική μέθοδος για την παραγωγή μεγάλων τμημάτων του γονιδιώματος με μεγάλη επαναληψιμότητα (Εικόνα 3). Αυτοί οι Μοριακοί Δείκτες, αρχικά αναπτύχθηκαν για γονιδιοματική σήμανση στο φυτό *Brassica olearacea* (L.) για να ενισχύσουν συγκεκριμένες κωδικές περιοχές του γονιδιώματος με ασαφείς εκκινητές στοχεύοντας εξώνια πλούσια σε GC [Γουανίνη (G), Κυτοσίνη (C)] και υποκινητές, εσώνια και διαχωριστές πλούσια σε AT [Αδενίνη (A), Θυμίνη (T)]. Οι εκκινητές είναι μήκους 17 ή 18 νουκλεοτιδίων και αποτελούνται από αλληλουχίες κορμού η οποίες είναι μήκους 13-14 βάσεων. Οι πρώτες 10 ή 11 βάσεις ξεκινούν στο 5' άκρο και είναι αλληλουχίες «γεμίματος» ('filler' sequence) διατηρώντας καμιά συγκεκριμένη δομή. Αυτές ακολουθούνται από την αλληλουχία CCGC- (στο 5' άκρο) ή -AATT (στο 3' άκρο). Αυτός ο σκελετός ακολουθείται από τρία επιλεκτικά νουκλεοτίδια (τυχαία) στο 3' άκρο. Συνήθως η SRAP είναι μία διαδικασία δύο φάσεων.

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος, που έχει αναφερθεί, για την αποτύπωση των ενισχυμένων τμημάτων, είναι με την απλή μέθοδο παρουσίας/απουσίας (0,1) μέσω της παραδοσιακής ηλεκτροφόρησης και την οπτικοποίηση σε τράπεζα UV. Ενώ αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιείται επανειλημμένα για να μειώσει το κόστος, οι εκκινητές

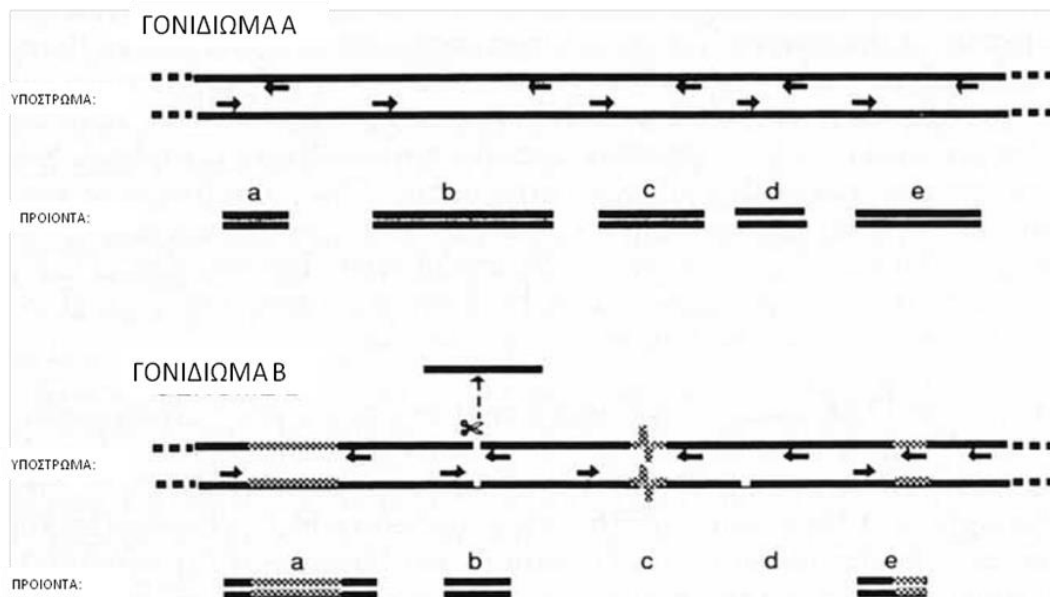
μπορούν να σημανθούν με φθορίζουσα χρωστική και τα ενισχυμένα προϊόντα μπορούν να αριθμηθούν μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Οι Μοριακοί Δείκτες SRAP χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό της γενετικής παραλλακτικότητας σε ποικίλα ταξινομικά επίπεδα, αλλά συνήθως χρησιμοποιούνται για αναλύσεις πληθυσμών διαειδικών και ενδοειδικών υβριδίων (Roberts & Walte, 2014).



**Εικόνα 3:** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της τεχνικής SRAP. Κάθε εκκινητής περιέχει μία τυχαία αλληλουχία στο 5' άκρο και 3 επιλεκτικά νουκλεοτίδια στο 3'. Το μοτίβο κορμού αποτελείται από την αλληλουχία CCGG στον εκκινητή με προσανατολισμό 5' και AATT στον εκκινητή με προσανατολισμό 3', οι οποίοι στοχεύουν σε γονιδιακές περιοχές. Οι αρχικοί κύκλοι της PCR διεξάγονται σε χαμηλή θερμοκρασία υβριδισμού (35 °C) επιτρέποντας λάθη να συμπεριλαμβάνονται στα ενισχυμένα τμήματα. Οι τελικοί κύκλοι διεξάγονται σε υψηλότερη θερμοκρασία υβριδισμού και παράγουν προϊόντα από τα προηγούμεως ενισχυμένα τμήματα (Poczai et al., 2013).

## 2.4 ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΟΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ (DNA Amplification Fingerprinting, DAF)

Η τεχνική DAF χρησιμοποιεί μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση οδηγούμενη από έναν, μικρού μήκους ( $\geq 5$  ζευγάρια βάσεων (bp)), εκκινητή, αυθαίρετης αλληλουχίας, για την ενίσχυση μικρών τμημάτων. Η τεχνική DAF χρησιμοποιεί αυστηρά χαμηλές



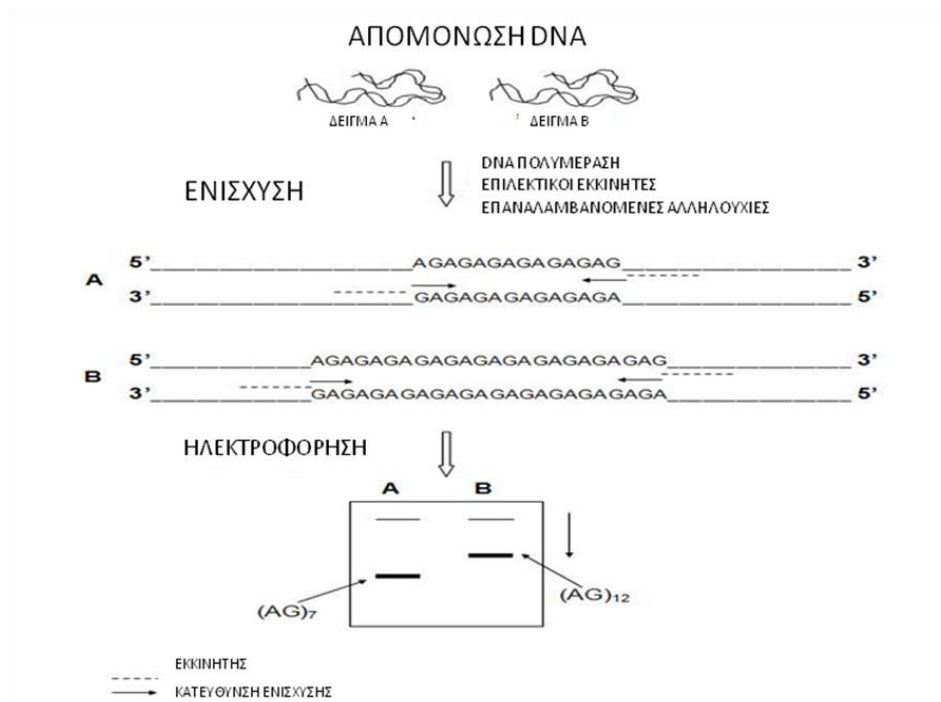
**Εικόνα 4:** Δύο συγγενικά γονιδιώματα ενισχύονται με PCR και έναν ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητή. Τα ενισχυμένα προϊόντα που προκύπτουν, συγκρίνονται. Η ενίσχυση του DNA για το γονιδίωμα A και B παράγει 5 και 3 θραύσματα, αντίστοιχα. Στο γονιδίωμα B, μία προσθήκη μεταξύ των αρχικών περιοχών παράγει ένα μεγαλύτερο τμήμα a, ενώ μία διαγραφή μειώνει το μέγεθος του τμήματος b. Επιπλέον, προσθήκη ενός μεγάλου τμήματος DNA μεταξύ των αρχικών περιοχών, εξαλείφει το θραύσμα c. Μία σημειακή μετάλλαξη σε μία άλλη περιοχή εξαλείφει το τμήμα d. Τελικά, μία προσθήκη ενός τμήματος DNA που υποθάλπει μία αρχική περιοχή, στη σωστή κατεύθυνση μεταξύ δύο υπαρχόντων αρχικών περιοχών μειώνει το μέγεθος του τμήματος e. (Caetano-Anolles et al., 1991).

συνθήκες ενίσχυσης ώστε οι εκκινητές να μπορούν να υβριδιστούν αυθαίρετα σε πολλαπλές περιοχές κάθε αλυσίδας DNA (Εικόνα 4). Αν και η αρχή της σύνθεσης του DNA λαμβάνει χώρα από άκρη σε άκρη στο καλούπι, μόνο οι αλληλουχίες των οποίων οι πρωταρχικές περιοχές είναι αντιπαράλληλες και σε κοντινή απόσταση, θα ενισχυθούν επιτυχώς. Λανθασμένος υβριδισμός μπορεί να συμβεί σε μικρό βαθμό και μπορεί να δώσει δευτερεύοντα ενισχυμένα προϊόντα (Caetano-Anolles et al., 1991).

## 2.5 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΑΠΛΩΝ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ (Simple Sequence Repeats, SSR)

Η τεχνική SSR χρησιμοποιεί απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ως δείκτες DNA. Αυτές οι απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, που καλούνται επίσης και μικροδορυφόροι, υπάρχουν στα περισσότερα γονιδιώματα των φυτών. Οι SSR περιέχουν επαναλήψεις ενός μοτίβου αλληλουχίας μήκους 1-6 ζευγάρια βάσεων. Οι

SSR συχνά υφίστανται μεταλλάξεις, κυρίως λόγω λαθών της DNA πολυμεράσης, η οποία περιέχει τη πρόσθεση ή την αφαίρεση μιας επαναλαμβανόμενης μονάδας (Εικόνα 5). Έτσι, οι αλληλουχίες SSR έχουν υψηλό πολυμορφισμό και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό των γενετικών διαφορών στους πληθυσμούς. Οι αλληλουχίες SSR εντοπίζονται σε γονιδιακές και μη γονιδιακές περιοχές και είναι περιστασιακά μεταγραφόμενες. Η τεχνική SSR στηρίζεται στην ενίσχυση των αλληλουχιών SSR με PCR και οπτικοποίηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης. Η μέθοδος αυτή είναι η πιο συνηθισμένη για τον προσδιορισμό γονότυπων τελευταία 20 χρόνια λόγω του υψηλού επιπέδου πολυμορφισμού, της μεγάλης κατανομής στα περισσότερα γονιδιώματα των φυτών και της ευκολία στη χρησιμότητα (Mason, 2014).

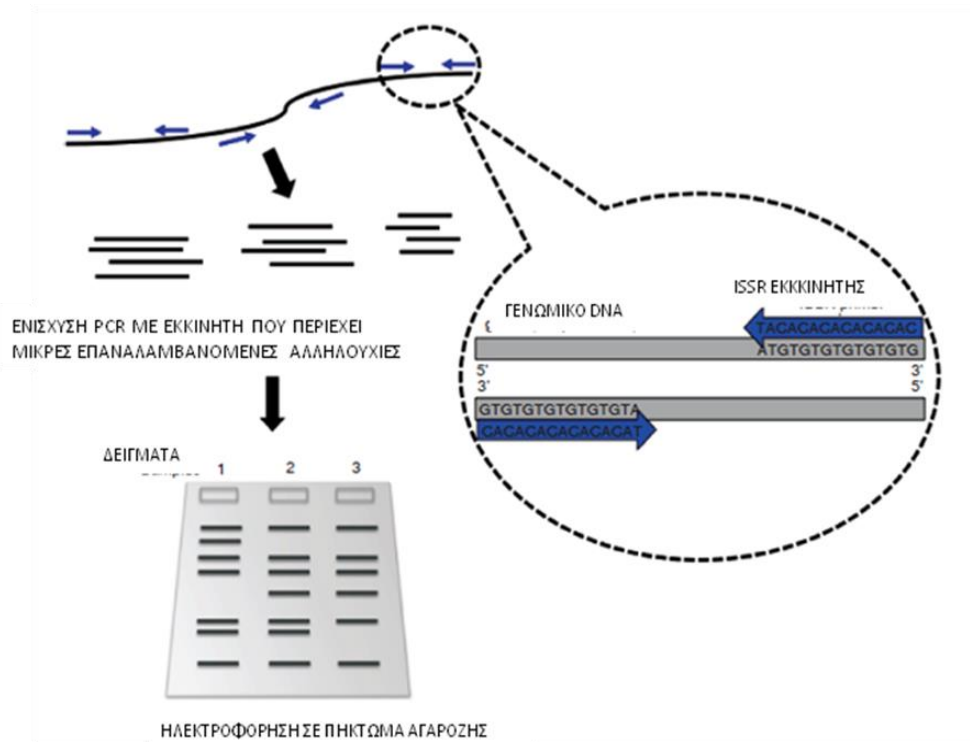


**Εικόνα 5.** Βήματα της τεχνικής SSR. Ως παράδειγμα παρουσιάζεται μία μικροδορυφορική περιοχή με ένα επαναλαμβανόμενο δι-νουκλεοτίδιο βάσης (AG)<sub>n</sub> (Pasqualon, 2013).

## 2.6 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ *ΕΝΤΟΣ* *ΑΠΛΩΝ* *ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ* *ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ* (*Inter-Simple* *Sequence Repeat, ISSR*)

Η τεχνική ISSR περιλαμβάνει τη χρήση εκκινητών που υβριδίζουν στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες για τη δημιουργία πολυτοπικών δεικτών, όχι όμως για την ενίσχυση των μικροδορυφορικών περιοχών, αλλά των ενδιάμεσων περιοχών (Εικόνα 6). Είναι μία απλή και γρήγορη τεχνική που συνδυάζει τα περισσότερα πλεονεκτήματα των μεθόδων SSR και AFLP με την καθολικότητα της μεθόδου RAPD. Οι Μοριακοί Δείκτες ISSR είναι υψηλά πολυμορφικοί και χρησιμοποιούνται σε μελέτες γενετικής παραλλακτικότητας φυλογένειας, γονιδιακής σήμανσης, χαρτογραφήσεις γονιδιωμάτων και εξελικτικής βιολογίας. Οι αλληλουχίες που ενισχύονται με τη τεχνική ISSR-PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση γενετικού υλικού. Εφόσον μία ISSR περιοχή θεωρείται ως μη διατηρητέα περιοχή, αυτή η τεχνική δεν ενδείκνυται για να διακρίνουμε άτομα, αλλά περισσότερο για φυλογενετικές αναλύσεις ή ίσως για την οριοθέτηση ειδών. Η παραλλακτικότητα της αλληλουχίας είναι χαμηλότερη από ότι στη τεχνική SSR-PCR αλλά, όμως, υψηλότερη από ότι οι γονιδιακές αλληλουχίες. Επιπλέον οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες και οι ISSR αλληλουχίες, βοηθούν η μία την άλλη, αφού η μία παράγει εκκινητές για την άλλη και αντιστρόφως (Marwal et al., 2020).

Οι μικροδορυφόροι (microsatellites), είναι περιοχές στο γονιδίωμα που αποτελούνται από μικρού μήκους μοτίβα γενετικού υλικού (DNA), συνήθως μήκους 2-4 νουκλεοτιδίων, που επαναλαμβάνονται πολλές φορές στη σειρά, λ.χ. ....ACACACACACAC.... Συμπερασματικά λοιπόν, οι μοριακοί δείκτες ISSR είναι κομμάτια γενετικού υλικού που φέρουν και στα δύο άκρα τους τέτοιες μικροδορυφορικές αλληλουχίες. Χρησιμοποιούνται εκκινητές που περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, συμπληρωματικές στις μικροδορυφορικές περιοχές στο γονιδίωμα (ISSR εκκινητές), που με τη βοήθεια της PCR, μπορούν να ενισχυθούν τυχαία τμήματα DNA, δεδομένου ότι είναι στο πλαίσιο της του μεγέθους ενίσχυσης της πολυμεράσης, και χρησιμοποιούνται ως Μοριακοί Δείκτες για μελέτες γενετικής παραλλακτικότητας (Ng & Tan, 2015).



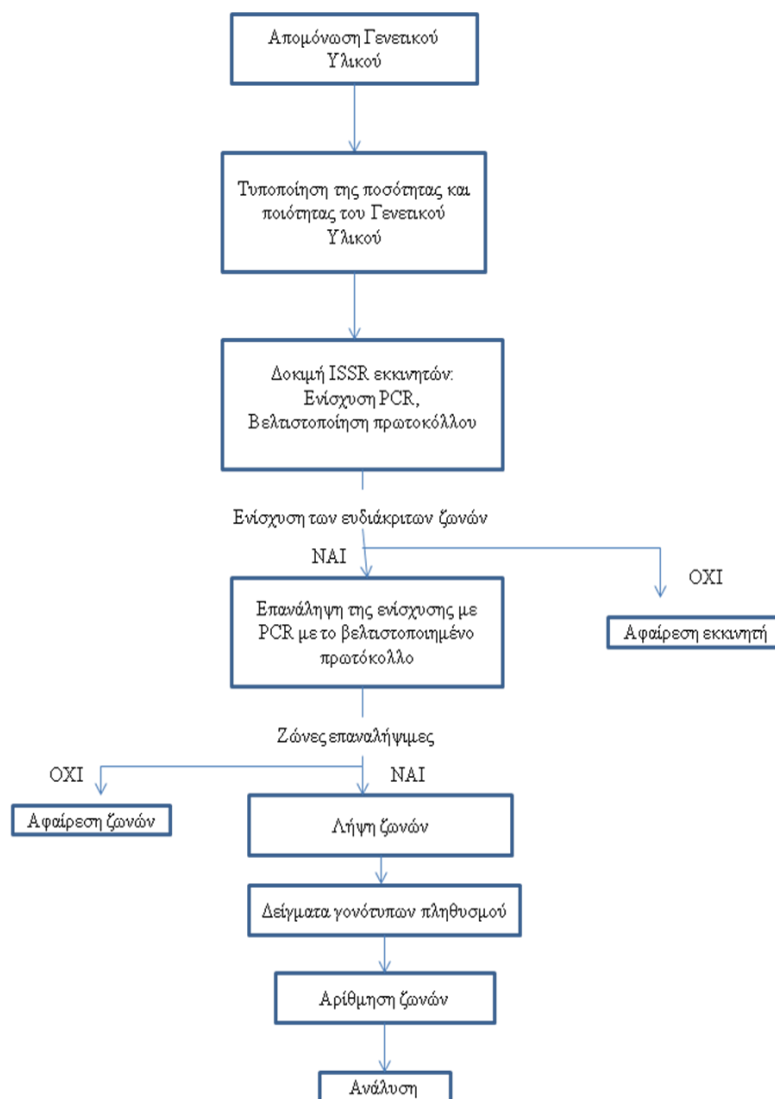
**Εικόνα 6:** Σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας ISSR. Οι εκκινήτες σχεδιάζονται έτσι ώστε να υβριδίζουν στα άκρα των περιοχών με τέτοιο τρόπο, ώστε να ενισχυθούν οι ενδιάμεσες περιοχές (Ng & Tan, 2015).

Για τις περισσότερες μελέτες γενετικής παραλλακτικότητας ένας καλός μοριακός δείκτης καθορίζεται από την υψηλή γενετική ποικιλότητα και την ικανότητα να παράγει πολυτοπικά (multilocus) δεδομένα από το υπό μελέτη γονιδίωμα. Τα ISSR στηρίζονται στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες που είναι υψηλής μεταβλητότητας και κατανομημένες παντού στο γονιδίωμα, έχουν υψηλή επαναληψιμότητα σε σύγκριση με τα RAPDs και κοστίζει λιγότερο σε χρόνο και χρήμα σε σύγκριση με τα AFLPs. Όλα αυτά, κάνουν τους Μοριακούς Δείκτες ISSR μία ιδανική επιλογή για διάφορες μελέτες (Ng & Tan, 2015).

Το κυρίως πλεονέκτημα των μοριακών δεικτών ISSR, είναι ότι δεν απαιτείται η γνώση της αλληλουχίας για την κατασκευή των εκκινήτων. Επιπροσθέτως, οι Μοριακοί Δείκτες ISSR κατανέμονται τυχαία μέσα στο γονιδίωμα. Στα μειονεκτήματα της περιλαμβάνεται η ενίσχυση μη ομόλογων περιοχών με το ίδιο μέγεθος και άρα υπάρχει αδυναμία στο διαχωρισμό τους στο πήκτωμα της αγαρόζης. Όπως και οι Μοριακοί Δείκτες RAPD παρουσιάζουν προβλήματα επαναληψιμότητας (Sarwat, 2012).

Η βασική διαδικασία για να διεξαχθεί ένα πείραμα προσδιορισμού γονότυπου

με ISSR Μοριακούς Δείκτες περιλαμβάνει PCR χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή ISSR με γενωμικό DNA (gDNA) ως υπόστρωμα, ηλεκτροφόρηση σε πάκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης για την οπτικοποίηση των ενισχυμένων προϊόντων, αποτύπωση της παρουσίας/απουσίας των ζωνών και τέλος ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η **Εικόνα 7** συνοψίζει τη γενική διαδικασία για την αξιολόγηση και τη χρησιμοποίηση ενός εκκινητή ISSR για τον προσδιορισμό γονότυπου (Ng & Tan, 2015).



**Εικόνα 7:** Προτεινόμενη διαδικασία για πειράματα προσδιορισμού γονότυπου με ISSR (Ng & Tan, 2015).



Η ποιότητα του γενετικού υλικού που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για ένα πείραμα ISSR είναι σημαντική για την επιτυχία του. Συχνά, δε λαμβάνεται υπόψη στα πειραματικά πρωτόκολλα, όμως, χρειάζεται να απομονωθεί υψηλής ποιότητας γενετικού υλικού και να ποσοτικοποιηθεί. Η διαδικασία της απομόνωσης του γενετικού υλικού εξαρτάται από τη μέθοδο απομόνωσης και τον τύπο του δείγματος. Ίσως να περιέχει ίχνη από κυτταρικά υπολείμματα και συστατικά που πιθανώς να επηρεάζουν τις αντιδράσεις PCR. Ως αποτέλεσμα, πολλές φορές, εμφανίζεται το φαινόμενο να ενισχύονται λιγότερα, ή και καθόλου, τμήματα DNA σε σύγκριση με αυτά που αναμένονται. Επιπροσθέτως, χρησιμοποιώντας μη ρυθμισμένες ποσότητες γενετικού υλικού στις αντιδράσεις PCR, έχει ως αποτέλεσμα ακανόνιστες συγκεντρώσεις ενισχυμένων προϊόντων, επηρεάζοντας τις εντάσεις των ζωνών των δειγμάτων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι συμβατικές μέθοδοι απομόνωσης γενετικού υλικού παρέχουν καλής ποιότητας γενετικού υλικού. Αν όχι, πραγματοποιείται περαιτέρω καθαρισμός. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις του γενετικού υλικού προσαρμόζονται αναλόγως πριν τις αντιδράσεις PCR. Τυπικά, 10-50 ng καλής ποιότητας γενετικού υλικού είναι αρκετά για κάθε αντίδραση (Ng & Tan, 2015).

Ένας εκκινητής ISSR συνήθως είναι μήκους 16-25 ζευγάρια βάσεων (bp) και αποτελείται κυρίως, ή μόνο, από επαναλαμβανόμενα μοτίβα γενετικού υλικού, 2-4 ζευγάρια βάσεων (bp) το κάθε ένα, που είναι συμπληρωματικά στις μικροδορυφορικές περιοχές στο γονιδίωμα. Ανάλογα με τη χρήση, υπάρχουν τρεις τύποι εκκινητών ISSR:

- ✓ μη επιλεκτικοί εκκινητές (ο εκκινητής περιέχει μόνο ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο λ.χ. 5'-(AC)<sub>8</sub>-3')
- ✓ 5'-επιλεκτικοί εκκινητές (ο εκκινητής αποτελείται από ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο με ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια στο 5' άκρο λ.χ. 5'-GA(AC)<sub>8</sub>-3')
- ✓ 3'-επιλεκτικοί εκκινητές (ο εκκινητής περιέχει ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο με ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο λ.χ. 5'-(AC)<sub>8</sub>-AG-3')

Για έρευνες που αξιολογούν γενετική παραλλακτικότητα, προτείνεται να χρησιμοποιηθούν είτε οι 5'-επιλεκτικοί ή οι 3'-επιλεκτικοί ISSR εκκινητές. Οι μη επιλεκτικοί ISSR εκκινητές ίσως να γλιστρήσουν κατά μήκος της συμπληρωματικής μικροδορυφορικής αλληλουχίας κατά τη διάρκεια της

αντίδρασης PCR, παράγοντας ακανόνιστη ενίσχυση σε κάθε κύκλο και έτσι να επηρεάζεται η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων (Ng & Tan, 2015).

Η αντίδραση PCR με ISSR εκκινητές είναι λίγο διαφορετική από τη συνηθισμένη, καθώς αντί για ένα ζευγάρι εκκινητών, χρησιμοποιείται ένας μόνο εκκινητής (Ng & Tan, 2015).

### **2.6.1 ΜΕΛΕΤΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ISSR-PCR**

Οι Farsani et al. (2012), αξιοποίησαν τη τεχνική ISSR-PCR, για να εξετάσουν 27 καταχωρήσεις *Cynodon spp.* στο Ιράν. Ανάμεσά τους βρίσκονταν 23 γενότυποι ήταν του *Cynodon dactylon* και 4 τριπλοειδή υβρίδια *Cynodon dactylon* X *Cynodon transvaalensis* («Tifdwarf», «Tifgreen», «Tifway», «Midlawn»). Χρησιμοποίησαν 14 εκκινητές για να ενισχύσουν τα τμήματα του DNA από τα γονιδιώματα των 27 καταχωρήσεων γρασιδιών. Αυτοί οι 14 εκκινητές ενίσχυσαν 389 θραύσματα από τα οποία τα 313 (80,5%) ήταν πολυμορφικά. Ο δείκτης πολυμορφισμού (PIC) ήταν 0,328, πράγμα που έδειχνε ότι οι περισσότεροι εκκινητές έδιναν σημαντικές πληροφορίες. Η ανάλυση ομαδοποίησης (cluster analysis), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο UPGMA (un-weighted paired group method with arithmetic average) ομαδοποίησε τις καταχωρήσεις σε έξι κυρίως ομάδες, που συμφωνούσαν, ως ένα βαθμό, με τη γεωγραφική προέλευση, τον αριθμό των χρωμοσωμάτων και κάποια μορφολογικά χαρακτηριστικά. Συμπεράνθηκε, ότι υπάρχει μεγάλη γενετική βάση από γρασίδια στο Ιράν και ότι οι μοριακοί δείκτες ISSR είναι αποτελεσματικοί στο να εντοπίζουν τη γενετική παραλλακτικότητα και τη συγγένεια ανάμεσά τους.

Οι Akbari et al. (2018), συνέλλεξαν 48 καταχωρήσεις γρασιδιών από 18 επαρχίες του Ιράν. Μία ξένη ποικιλία γρασιδιού, που είχε προέλευση από τη Καλιφόρνια των ΗΠΑ, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρα. Η μορφολογική παραλλακτικότητα αξιολογήθηκε με βάση 15 μορφολογικά χαρακτηριστικά για να δώσουν πληροφορίες για τις ταξινομικές θέσεις των γρασιδιών στο Ιράν. Τα δεδομένα από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αξιολογήθηκαν για να κατηγοριοποιήσουν όλες τις καταχωρήσεις ως ευαίσθητες στο ψύχος ή ανεκτικές στο ψύχος, χρησιμοποιώντας ιεραρχική ομαδοποίηση με τη μέθοδο του Ward στο πρόγραμμα SPSS. Για να αξιολογήσουν τη γενετική παραλλακτικότητα χρησιμοποίησαν την τεχνική ISSR. Τα

αποτελέσματα που έλαβαν από τη ταξινομική έρευνα υπέδειξαν την ύπαρξη δύο ποικιλιών του *Cynodon dactylon* στο Ιράν: var. *dactylon* (φυτό χωρίς τρίχες) και var. *villosus* (φυτό με τρίχες στα φύλλα στη κάτω πλευρά ή/και στη πάνω, ή στις εξωτερικές πλευρές του κολεού). Και οι 15 εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ενίσχυσαν και έδωσαν ευδιάκριτα και επαναλήψιμα ενισχυμένα τμήματα. Συνολικά, 152 ενισχυμένα τμήματα παράχθηκαν από τα οποία τα 144 (94,73%) ήταν πολυμορφικά. Ο δείκτης πολυμορφισμού (PIC) κυμαινόταν από 0,700 έως 0,928. Ο μέσος όρος του δείκτη πολυμορφισμού (PIC) που πάρθηκε από τους 15 εκκινητές ήταν 0,800. Τα γενετικά δεδομένα τα μετέτρεψαν σε δυαδικό πίνακα δεδομένων. Χρησιμοποίησαν το πρόγραμμα NTSYS-PC για την ανάλυση των δεδομένων. Η ομαδοποίηση έγινε με τη μέθοδο UPGMA και την ανάλυση PCoA (Principal Coordinate Analysis) και ξεχώρισε τις καταχωρήσεις σε έξι κύριες ομάδες. Από τα αποτελέσματα των μορφολογικών και γενετικών διαφοροποιήσεων οι καταχωρήσεις, ομαδοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες: ευαίσθητα στο ψύχος, ημι-ανεκτικά στο ψύχος, και ανεκτικά στο ψύχος.

Οι Li et al. (2011), αξιοποιώντας τη τεχνολογία ISSR-PCR, θέλησαν να εξετάσουν τη γενετική παραλλακτικότητα αλλά και συγγένεια μεταξύ της εμπορικής ποικιλίας «Tift3» και 95 άγριων τύπων γρασιδιού που συλλέχθηκαν από 11 επαρχίες της Κίνας. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, έδειξαν, ότι οι 29 εκκινητές ISSR που χρησιμοποιήθηκαν, έδωσαν 248 ζώνες από τις οποίες οι 242 (97,6%) ήταν πολυμορφικές ζώνες. Όλες οι καταχωρήσεις μπόρεσαν να ομαδοποιηθούν σε 11 ομάδες με τη μέθοδο UPGMA. Οι καταχωρήσεις από τις ίδιες ή γειτονικές περιοχές, γενικά ομαδοποιήθηκαν στην ίδια ομάδα ή υποομάδα. Όμως, μερικές καταχωρήσεις, ήταν πολύ διαφορετικές από την πλειοψηφία. Τα αποτελέσματα αυτά υπέδειξαν ότι οι μοριακοί δείκτες ISSR είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την ανάδειξη γενετικής παραλλακτικότητας ανάμεσα στα άγρια Κινέζικα είδη γρασιδιού.

Οι Huang et al. (2010), μελέτησαν τη γενετική παραλλακτικότητα 55 καταχωρήσεων του *Cynodon dactylon*, χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία ISSR-PCR και 14 διαφορετικούς εκκινητές. Συνολικά παράχθηκαν 236 θραύσματα παράχθηκαν με μεγέθη ενισχυμένων τμημάτων από 200 έως 3.000 ζευγάρια βάσεων. Όλες οι ζώνες ήταν πολυμορφικές, υποδηλώνοντας ένα υψηλό επίπεδο γενετικής παραλλακτικότητας. Οι καταχωρήσεις ομαδοποιήθηκαν σε οκτώ μεγάλες ομάδες μέσω της μεθόδου

UPGMA. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι υπάρχει υψηλό επίπεδο γενετικής παραλλακτικότητας ανάμεσα στις καταχωρήσεις του *Cynodon*.

Οι Wang et al. (2013), χρησιμοποίησαν τις μεθοδολογίες ISSR-PCR και SSR-PCR για να αξιολογήσουν τη γενετική παραλλακτικότητα ανάμεσα σε 33 καταχωρήσεις *Cynodon dactylon* που ανήκουν σε 22 ποικιλίες από τέσσερις διαφορετικές χώρες, στο πλαίσιο της βελτίωσης του γενετικού υλικού των γρασιδιών. Ογδόντα οκτώ ζώνες ενισχύθηκαν από εννέα ζευγάρια εκκινητών SSR και 236 ζώνες από 23 εκκινητές ISSR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 97,7% των ζευγαριών SSR εκκινητών και το 86,9% των ISSR εκκινητών ήταν πολυμορφικοί. Η ανάλυση UPGMA ομαδοποίησε τις 55 καταχωρήσεις σε τρεις ομάδες. Τα αποτελέσματα της ομαδοποίησης που παράχθηκαν από τα δεδομένα ISSR ήταν πολύ κοντά με αυτά των SSR. Η ανάλυση που βασίστηκε στο συνδυασμό των δεδομένων ISSR και SSR ήταν πιο κοντά στη γεωγραφική κατανομή του υπό μελέτη γενετικού υλικού.

Οι Shyan et al. (2014), συνέλλεξαν 15 ποικιλίες διάσπαρτα από τη Μαλαισία και τις ανέλυσαν σε μοριακό επίπεδο με τη τεχνική ISSR-PCR. Συνολικά, ενισχύθηκαν 172 τμήματα DNA με 15 επιλεγμένους εκκινητές ISSR. Υπήρχαν 164 πολυμορφικές ζώνες με ποσοστό πολυμορφισμού 95,3%. Το μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων κυμαινόταν από 120 έως 1.867 ζευγάρια βάσεων. Οι ποικιλίες ομαδοποιήθηκαν σε πέντε κύριες ομάδες σε συντελεστή επιπέδου 0,5 μέσω της ανάλυσης UPGMA. Οι ποικιλίες Satiri και Meleka ομαδοποιήθηκαν ξεχωριστά από το μεταξύ τους υβρίδιο. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι Μοριακοί Δείκτες ISSR είναι μία αποτελεσματική μοριακή μέθοδος για τη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας στο γρασίδι και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε προγράμματα ανάπτυξης ποικιλιών.

## **2.7 ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Στην παρούσα εργασία, επιχειρήθηκε η γονιδιωματική ανάλυση τεσσάρων διαφορετικών δειγμάτων γρασιδιού με την μεθοδολογία Inter-Simple Sequence Repeats-Polymerase Chain Reaction (ISSR-PCR) για την ανάδειξη διαφορών σε 4 γενότυπους *Cynodon spp*, με τη χρησιμοποίηση 12 διαφορετικών εκκινητών. Τα 4 δείγματα επιλέχθηκαν ώστε τα δύο να έχουν πολύ κοντινή συγγένεια μεταξύ τους (ίδια ποικιλία), ενώ τα άλλα δύο ανήκουν σε διαφορετικές ποικιλίες. Αυτό θα βοηθήσει ώστε

να αξιολογηθεί η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη μεθοδολογία στην ανάδειξη γενετικών διαφορών μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών αλλά και η ταυτοποίηση δύο ατόμων που ανήκουν στην ίδια ποικιλία.

## **3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ**

Νωπό φυτικό υλικό (φύλλα) από τις ποικιλίες «Tahoma» που καλλιεργείται στην Ελλάδα (TAH-GR), «Tahoma» που καλλιεργείται από τον επίσημο εξουσιοδοτημένο εμπορικό αντιπρόσωπο για την Ευρώπη στην Ισπανία (TAH-SP), «Tifway» 419 με προέλευση από φυτεία παραγωγής έτοιμου χλοοτάπητα στην Ελλάδα (TIF-GR) και «Monaco» που καλλιεργείται στην Ελλάδα (MON-GR), συλλέχθηκαν από το θερμοκήπιο Ανθοκομίας που βρίσκεται στο αγρόκτημα του ΕΛΜΕΠΑ. Με τη βοήθεια ψαλιδιού, κόπηκαν τα φύλλα από κάθε ποικιλία, ενώ ενδιάμεσα το ψαλίδι πλενόταν με κοινό σαπούνι και νερό για να μην υπάρχει πρόσμιξη του φυτικού υλικού. Τα νωπό φυτικό υλικό από κάθε ποικιλία τοποθετήθηκαν σε σακουλάκια και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο μέχρι να γίνει η απομόνωση του γενετικού υλικού.

### **3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ**

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού από τις 4 ποικιλίες γρασιδιού, αρχικά ζυγίστηκαν προσεκτικά, για τη κάθε μία ξεχωριστά, 100 mg φυτικού υλικού. Το ζυγισμένο φυτικό υλικό τοποθετήθηκε σε γουδί και έγινε πολύ καλή λειοτρίβιση χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο. Το λειοτριβιμένο υλικό μεταφερόταν σε δοχείο 1,5 mL τύπου Eppendorf. Στη συνέχεια η απομόνωση του γενετικού υλικού έγινε με το κιτ της Norgen (Plant/Fungi DNA Isolation Kit, #26200) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Συνοπτικά, στο δοχείο με το λειοτριβιμένο ιστό προστέθηκαν 500 µL από το αντιδραστήριο Lysis buffer L ανακινήθηκε με συσκευή τύπου Vortex και προστέθηκε 1 µL RNase (80 µL). Έπειτα από ανακίνηση το δείγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 10 min. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 100 µL Binding buffer I και έγινε επώαση σε πάγο για 5 min. Έπειτα το υλικό μεταφέρθηκε στο προσροφητικό κολωνάκι

με το διαφανές φίλτρο, που περιέχονταν στο κιτ, και έγινε φυγοκέντρηση για 2 min στις 14.000 rpm. Το δοχείο που πέρασε από το φίλτρο μεταφέρθηκε σε δοχείο 1,5 mL τύπου Eppendorf, προστέθηκαν 600  $\mu$ L 70% αιθανόλη και ανακινήθηκε στη συσκευή Vortex. Στη συνέχεια το υλικό μεταφέρθηκε στο κολωνάκι με το γκρι φίλτρο και έγινε φυγοκέντρηση για 1 min στις 10.000 rpm για τη προσρόφηση του DNA στη μήτρα. Εφόσον είχε περάσει όλο το υγρό από τις προσροφητικές κολώνες, έγινε πλύσιμο της κολώνας με 500  $\mu$ L με το αντιδραστήριο WN με φυγοκέντρηση για 1 min στις 14.000 rpm. Ακολούθησαν δύο πλυσίματα των 500  $\mu$ L με το αντιδραστήριο Wash Solution A με φυγοκέντρηση για 1 min στις 14.000 rpm. Μετά, προστέθηκαν 100  $\mu$ L Elution Buffer B για την έκλυση του γενετικού υλικού με φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 1 min και επιπλέον στις 14.000 rpm για 1 min.

### **3.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ DNA**

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης του γενετικού υλικού των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή NanoDrop. Η μέτρηση δείχνει τη συγκέντρωση του γενετικού υλικού σε νανογραμμάρια ανά μικρόλιτρο (ng/ $\mu$ L). Επίσης το NanoDrop μετράει τη καθαρότητα των δειγμάτων με τους δείκτες A280/A260 και A230/A260. Τα δείγματα DNA αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 20 ng/ $\mu$ L και φυλάχθηκαν στους -20 °C.

### **3.4 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ISSR**

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα ήταν οι gISSR1, gISSR2, gISSR3, gISSR4, gISSR5, gISSR6, gISSR7, gISSR8, gISSR9, gISSR10, gISSR11 και gISSR12 (Πίνακας 1). Από τα πυκνά διαλύματα των εκκινητών gISSR (100  $\mu$ M), έγινε αραιώση 10  $\mu$ M σε αποστειρωμένο νερό.

**Πίνακας 1:** Οι 12 εκφυλισμένοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, με τις εκάστοτε θερμοκρασίες υβριδισμού, τις ζώνες που παράχθηκαν, τις πολυμορφικές ζώνες που εντοπίστηκαν, το ποσοστό πολυμορφισμού και τον δείκτη PIC.

ISSR ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ (Ta °C)	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5' → 3') *ΕΚΦΥΛΙΣΜΕΝΟΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΝΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΩΝ ΖΩΝΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ (%)	ΔΕΙΚΤΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ (POLYMORPHIC INFORMATION CONTENT, PIC)
gISSR1	51 °C	HVHTGTGTGTGTGTGTGT	22	7	31,9	0,35
gISSR2	52 °C	VHVGTTGTGTGTGTGTG	23	3	13	0,18
gISSR3	55 °C	BDBTCCTCCTCCTCCTCC	38	11	28,9	0,32
gISSR4	55 °C	HVHTCCTCCTCCTCCTCC	35	11	31,4	0,34
gISSR5	51 °C	DBDACACACACACACACA	32	9	28,1	0,28
gISSR6	50 °C	HVHCACACACACACACAT	19	5	26,3	0,32
gISSR7	52 °C	BDBCACACACACACACAC	24	5	20,8	0,25
gISSR8	49 °C	DBDACACACACACACAC	27	4	14,8	0,21
gISSR9	53 °C	TCCTCCTCCTCCTCCRY	28	7	25	0,25
gISSR10	49 °C	CACACACACACACACARY	21	4	19	0,23
gISSR11	50 °C	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	36	8	22,2	0,28
gISSR12	48 °C	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	22	5	22,7	0,25
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	-	-	327	79	23,8	0,27

### 3.5 ANTIΔΡΑΣΗ ΤΗΣ PCR

Για την αντίδραση της ISSR-PCR, χρησιμοποιήθηκε το PCR kit της εταιρείας KAPA (KAPA Taq PCR Kit, KK1015). Κάθε αντίδραση έγινε σε κατάλληλο δοχείο 200  $\mu$ L που περιείχε 100 ng DNA, 1X Buffer, 0,2 mM dNTPs, 1  $\mu$ M εκκινητή, 0,5 μονάδες Taq πολυμεράση σε τελικό όγκο 25  $\mu$ L. Οι ενισχύσεις διεξήχθησαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Bio-Rad) με το ακόλουθο πρόγραμμα της αντίδρασης PCR: αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 4 min, 35 κύκλοι που αποτελούνταν από 15 s στους 94 °C, 30 s για υβριδισμό του εκκινητή στην εκάστοτε θερμοκρασία του εκκινητή και 72 °C για 90 s, τελικό πολυμερισμό για 4 min στους 72 °C.

### 3.6 ΟΠΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ

Τα ενισχυμένα τμήματα διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα (TAE) με βρωμιούχο αιθίδιο. Το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης έμεινε για 1,5-2 h στα 100 V. Έπειτα το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε τράπεζα UV για την οπτικοποίηση των ενισχυμένων τμημάτων και φωτογράφιση.

### **3.7 ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΤΩΝ ΖΩΝΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΔΕΝΔΡΟΥ**

Όλες οι ευδιάκριτες διαφορετικές ζώνες για κάθε εκκινήτη αριθμήθηκαν και ορίστηκε η παρουσία ή απουσία για κάθε αξιολογούμενο γενότυπο σε πίνακα Excel. Έπειτα, αυτό το αρχείο Excel μορφοποιήθηκε σε αρχείο κειμένου (.txt), για να μπορέσει να εισαχθεί στο πρόγραμμα MEGA11 ώστε να δημιουργηθεί ο πίνακας γενετικών αποστάσεων. Μετά τη δημιουργία του πίνακα αποστάσεων, έγινε η ανάλυση UPGMA, με ανάλυση Bootstrap με 100 επαναλήψεις για να γίνει η ομαδοποίηση των γενότυπων.

Το κυρίως πλεονέκτημα της ανάλυσης αυτής αποτελεί ότι είναι απλή και γρήγορη (Saitou & Nei, 1987). Σε σύγκριση με τη ανάλυση UPGMA, η Neighbor-Joining αναφέρεται σε μια νέα προσέγγιση για τη κατασκευή ενός φυλογενετικού δένδρου, από ένα πίνακα γενετικών αποστάσεων, που δεν συμπεριλαμβάνει τον αρχαιότερο πρόγονο (άρριζο φυλογενετικό δένδρο), ενώ η UPGMA αναφέρεται σε μια πιο ευθύ προσέγγιση για τη κατασκευή ενός δένδρου που συμπεριλαμβάνεται ο αρχαιότερος πρόγονος (άρριζο φυλογενετικό δένδρο). Επιπροσθέτως, η Neighbor-Joining είναι ανάλυση επαναληπτικής ομαδοποίησης που βασίζεται στο κριτήριο της ελάχιστης εξέλιξης, ενώ η UPGMA είναι ανάλυση συσσωματωτικής ιεραρχικής ομαδοποίησης που βασίζεται στο συσχετισμού του μέσου όρου της ανάλυσης. Ακόμα, για τον αλγόριθμο της Neighbor-Joining οι αποστάσεις χρειάζεται να είναι προσθετικές, δηλαδή η απόσταση μεταξύ δύο κόμβων (ή αλλιώς προγόνων) να είναι το άθροισμα της άκρης των μηκών που τις ενώνει, ενώ για τον αλγόριθμο της UPGMA οι αποστάσεις χρειάζεται να είναι υπερμετρικές, δηλαδή η απόσταση από τον αρχικό κόμβο να είναι ίδια για κάθε κόμβο. Επίσης η Neighbor-Joining επιτρέπει τον άνισο βαθμό εξέλιξης και τα μήκη των κλάδων είναι αναλογικά στο ποσοστό της αλλαγής, ενώ η UPGMA υποθέτει το βαθμό εξέλιξης ίσο και έτσι οι άκρες των κλάδων απεικονίζονται ίσες (ίσο μήκος κλάδου από τη ρίζα στις άκρες) (Pavlopoulos et al., 2010).



## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ISSR-PCR

Οι δώδεκα ISSR εκκινητές παρήγαγαν 327 ζώνες (**Πίνακας 2**) με μέσο όρο 27,25 ζώνες ανά εκκινητή. Από τις 327 ζώνες οι 79 ήταν πολυμορφικές ζώνες με μέσο όρο 6,58 ζώνες ανά εκκινητή. Ο αριθμός των ενισχυμένων ζωνών κυμάνθηκε από 19 (gISSR6) έως 38 (gISSR3). Ο αριθμός των πολυμορφικών ζωνών κυμάνθηκε από 3 (gISSR2) έως 11 (gISSR3 και gISSR4). Το ποσοστό του πολυμορφισμού ήταν στο 23,8% συνολικά. Το μεγαλύτερο ποσοστό πολυμορφισμού το έδειξε ο εκκινητής gISSR4 με ποσοστό 31,4%. Ο μέσος όρος του δείκτη πολυμορφισμού (Polymorphic Information Content, PIC) υπολογίστηκε στο 0,27 για όλους τους εκκινητές και κυμαινόταν από 0,18 (gISSR2) έως 0,34 (gISSR4) (**Πίνακας 6**). Η **Εικόνα 8** παρουσιάζει το μοτίβο ζωνών για τα δείγματα που εξετάστηκαν από τον εκκινητή gISSR7.

**Πίνακας 2:** Οι ζώνες όπως αποτυπώθηκαν στο Excel. Τα 0 και 1 συμβολίζουν την παρουσία/απουσία της ζώνης. Το νούμερο πριν τη παύλα αναφέρεται τον αριθμό του εκκινήτη και το νούμερο μετά τη παύλα αναφέρεται στον αριθμό της ζώνης. Ποικιλία «Tahota» που καλλιεργείται στη Ελλάδα (TAH-GR), ποικιλία «Tahota» που καλλιεργείται από το πιστοποιημένο παραγωγό στην Ισπανία (TAH-SP), «Tifway» 419 με προέλευση από φυτεία παραγωγής έτοιμου χλοοτάπητα στην Ελλάδα (TIF-GR), ποικιλία «Monaco» που καλλιεργείται στην Ελλάδα (MON-GR).

	TAH-GR	TAH-SP	TIF-GR	MON-GR
gISSR1-1	1	1	0	0
gISSR1-2	1	1	1	0
gISSR1-3	1	1	1	1
gISSR1-4	1	1	1	1
gISSR1-5	1	1	0	0
gISSR1-6	1	0	0	0
gISSR1-7	1	1	0	1
gISSR1-8	1	1	0	0
gISSR1-9	0	0	1	1
gISSR2-1	1	1	1	1
gISSR2-2	1	1	1	1
gISSR2-3	1	1	1	1
gISSR2-4	1	1	0	0
gISSR2-5	1	1	1	1
gISSR2-6	1	1	0	1
gISSR2-7	1	1	0	1
gISSR3-1	1	1	0	1
gISSR3-2	1	1	0	0
gISSR3-3	0	0	1	1
gISSR3-4	1	1	1	1
gISSR3-5	1	1	0	0
gISSR3-6	1	1	1	0
gISSR3-7	0	1	0	1
gISSR3-8	0	0	1	0
gISSR3-9	1	1	0	0
gISSR3-10	0	0	1	1
gISSR3-11	1	1	1	1
gISSR3-12	1	1	1	1
gISSR3-13	1	1	1	1
gISSR3-14	0	0	1	0

Συνεχία Πίνακα 2

	TAH-GR	TAH-SP	TIF-GR	MON-GR
gISSR4-1	0	0	0	1
gISSR4-2	0	0	1	1
gISSR4-3	0	1	0	0
gISSR4-4	0	0	0	1
gISSR4-5	0	0	1	0
gISSR4-6	1	1	1	0
gISSR4-7	1	1	1	1
gISSR4-8	1	1	0	0
gISSR4-9	0	0	1	0
gISSR4-10	1	0	0	1
gISSR4-11	1	1	1	1
gISSR4-12	0	1	1	1
gISSR4-13	0	0	0	1
gISSR4-14	1	1	1	0
gISSR4-15	0	0	1	1
gISSR4-16	1	1	1	1
gISSR5-1	1	1	0	1
gISSR5-2	1	1	0	1
gISSR5-3	0	0	0	1
gISSR5-4	1	1	1	1
gISSR5-5	1	1	1	1
gISSR5-6	1	1	1	1
gISSR5-7	1	1	1	0
gISSR5-8	0	0	1	1
gISSR5-9	1	1	1	1
gISSR5-10	1	1	0	0
gISSR5-11	0	0	0	1
gISSR5-12	0	0	0	1
gISSR5-13	0	0	0	1

Συνεχεία **Πίνακα 2**

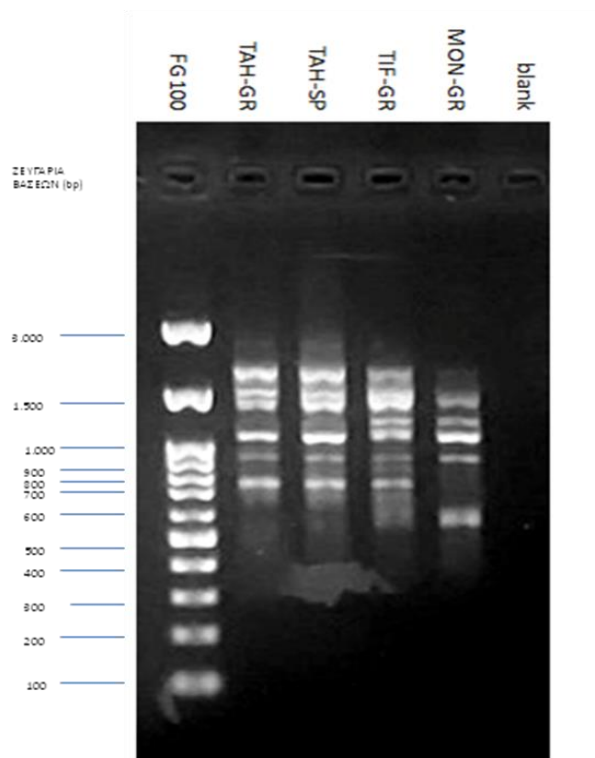
	TAH-GR	TAH-SP	TIF-GR	MON-GR
gISSR6-1	1	1	0	0
gISSR6-2	1	1	1	0
gISSR6-3	1	1	0	0
gISSR6-4	1	1	1	0
gISSR6-5	1	1	1	1
gISSR6-6	1	1	0	0
gISSR6-7	1	1	1	1
gISSR7-1	1	1	1	0
gISSR7-2	1	1	1	0
gISSR7-3	1	1	1	1
gISSR7-4	0	0	1	1
gISSR7-5	1	1	1	1
gISSR7-6	1	1	1	1
gISSR7-7	1	1	1	0
gISSR7-8	0	0	0	1
gISSR8-1	1	1	0	0
gISSR8-2	1	1	1	1
gISSR8-3	1	1	1	1
gISSR8-4	0	0	1	0
gISSR8-5	1	1	0	0
gISSR8-6	0	0	1	1
gISSR8-7	1	1	1	1
gISSR8-8	1	1	1	1
gISSR8-9	1	1	1	1
gISSR9-1	1	1	0	0
gISSR9-2	1	1	0	0
gISSR9-3	0	0	1	1
gISSR9-4	1	1	1	1
gISSR9-5	1	1	1	1
gISSR9-6	1	1	1	1
gISSR9-7	0	0	0	1
gISSR9-8	0	0	1	0
gISSR9-9	1	1	1	1
gISSR9-10	1	1	0	0
gISSR9-11	1	1	0	0

Συνεχία Πίνακα 2

	TAH-GR	TAH-SP	TIF-GR	MON-GR
gISSR10-1	1	1	1	1
gISSR10-2	1	1	1	0
gISSR10-3	1	1	0	0
gISSR10-4	1	1	1	0
gISSR10-5	0	0	1	0
gISSR10-6	1	1	1	1
gISSR10-7	1	1	1	1
gISSR11-1	1	1	1	1
gISSR11-2	1	1	1	1
gISSR11-3	1	1	1	0
gISSR11-4	1	1	1	0
gISSR11-5	1	1	0	0
gISSR11-6	0	0	0	1
gISSR11-7	0	1	0	0
gISSR11-8	1	1	1	1
gISSR11-9	1	1	1	1
gISSR11-10	0	0	0	1
gISSR11-11	1	1	1	0
gISSR11-12	1	1	1	0
gISSR11-13	0	0	1	0
gISSR12-1	1	1	1	1
gISSR12-2	1	1	1	1
gISSR12-3	1	1	1	1
gISSR12-4	1	0	1	1
gISSR12-5	1	1	0	0
gISSR12-6	0	0	0	1
gISSR12-7	0	0	1	0
gISSR12-8	1	1	1	0

**Πίνακας 3:** Ο δείκτης πολυμορφισμού PIC

Εκκινητές ISSR	PIC (Polymorphic information content)
gISSR1	0,35
gISSR2	0,18
gISSR3	0,32
gISSR4	0,34
gISSR5	0,28
gISSR6	0,32
gISSR7	0,25
gISSR8	0,21
gISSR9	0,25
gISSR10	0,23
gISSR11	0,28
gISSR12	0,25
Σύνολο	0,27



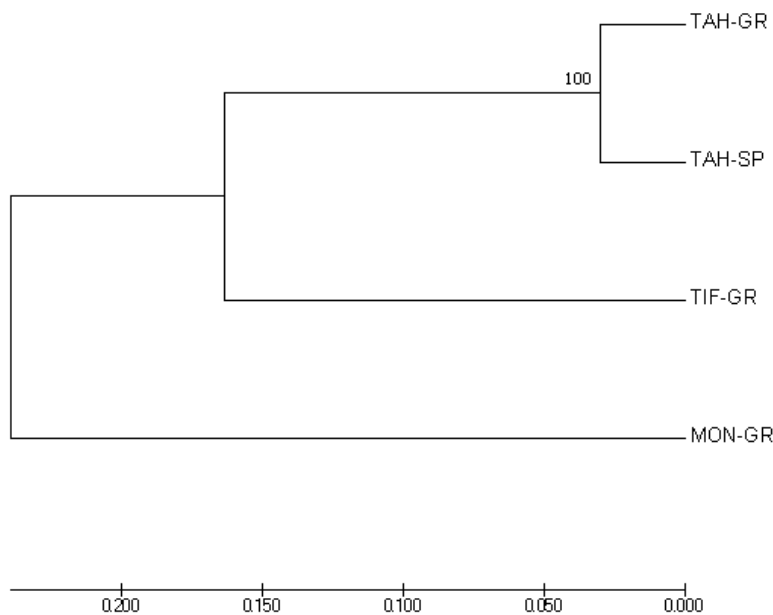
**Εικόνα 8:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR7. FG100, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό

## 4.2 ΑΝΑΛΥΣΗ UPGMA ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΔΕΝΔΡΟΥ

Ο πίνακας γενετικών αποστάσεων χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η ομαδοποίηση των γενότυπων με βάση τη μέθοδο UPGMA στο πρόγραμμα MEGA11. Το φυλογενετικό δένδρο που κατασκευάστηκε από την ανάλυση αυτή παρουσίασε τη γενετική ομοιότητα ή διαφορετικότητα των υπό μελέτη ποικιλιών.

Το φυλογενετικό δένδρο που δημιουργήθηκε με τα δεδομένα που εισάχθηκαν από την ανάλυση ISSR αναπαριστά τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ποικιλιών που μελετήθηκαν (Εικόνα 9). Οι οριζόντιες γραμμές είναι οι κλάδοι του δένδρου και αναπαριστούν τις εξελικτικές γενεαλογίες που άλλαξαν στο χρόνο. Οι κάθετες γραμμές αναπαριστούν τους κόμβους ή αλλιώς το κοινό πρόγονο που μοιράζονται οι ποικιλίες που μελετήθηκαν. Το φυλογενετικό δένδρο που δημιουργήθηκε είναι *άρριζο*, δηλαδή δεν δίνει στοιχεία για τον αρχαιότερο κόμβο.

Οι ποικιλίες TAH-GR και TAH-SP μοιράζονται ένα κοινό κόμβο ή πρόγονο ο οποίος κατά τη διάρκεια της εξέλιξης χωρίστηκε σε δυο νέες γενεαλογικές γραμμές. Το ίδιο παρατηρούμε και για τις TIF-GR και MON-GR. Ένας κοινός πρόγονος διαχωρίστηκε σε δυο νέες γενεαλογικές γραμμές. Η ποικιλία TIF-GR μοιράζεται ένα κοινό πρόγονο με τις ποικιλίες TAH-GR και TAH-SP και, επομένως, είναι πιο κοντά συγγενικά με εκείνες, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο, εφόσον η TIF-GR αποτελεί υβρίδιο του *Cynodon dactylon* X *C. transvaalensis*, όπως επίσης και οι TAH-GR και TAH-SP. Η MON-GR είναι πολύ πιο μακρινή συγγενικά από τις TAH-GR και TAH-SP σε σχέση με την TIF-GR που όπως απεικονίζεται έχει περισσότερη συγγένεια. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο αρχαιότερος πρόγονος όλων των ποικιλιών, που μελετήσαμε, δεν απεικονίζεται, διότι δεν υπάρχουν πληροφορίες για αυτόν.



**Εικόνα 9:** Φυλογενετικό δένδρο που δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας την ανάλυση UPGMA, των ποικιλιών TAH-GR, TAH-SP, TIF-GR και MON-GR. Οι τιμές στους κόμβους είναι οι τιμές αξιοπιστίας Bootstrap για 100 επαναλήψεις. Ποικιλία «Tahoma» που καλλιεργείται στη Ελλάδα (TAH-GR), ποικιλία «Tahoma» που καλλιεργείται από το πιστοποιημένο παραγωγό στην Ισπανία (TAH-SP), «Tifway» 419 με προέλευση από φυτεία παραγωγής έτοιμου χλοοτάπητα στην Ελλάδα (TIF-GR), ποικιλία «Monaco» που καλλιεργείται στην Ελλάδα (MON-GR).

Συμπερασματικά, οι TAH-GR και TAH-SP μοιάζουν πολύ γενετικά μεταξύ τους, αν και δεν βγήκαν γενετικά ταυτόσημες με βάση τους 12 ISSR εκκινήτες. Οι οποιεσδήποτε που εμφανίστηκαν διαφορές μπορεί να μην είναι πραγματικές. Οι TAH-GR και TAH-SP είναι αρκετά πιο κοντά συγγενικά με τη ποικιλία TIF-GR σε σχέση με τη MON-GR, η οποία είναι συγκρίσιμα μακρινή σε συγγένεια από τις υπόλοιπες τρεις.



## 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι οι Μοριακοί Δείκτες ISSR εντόπισαν ικανοποιητικό πολυμορφισμό ανάμεσα στις υπό μελέτη ποικιλίες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς για την αξιολόγηση και το χαρακτηρισμό μεταξύ των ειδών του γένους *Cynodon*. Αυτό αποδεικνύεται και από άλλες μελέτες που έχουν διεξαχθεί με Μοριακούς Δείκτες ISSR (Farsani et al., 2012) αλλά και από μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί Μοριακοί Δείκτες, όπως οι AFLPs (Wu et al., 2005; 2006) κτλ.

Ο δείκτης πολυμορφισμού (PIC) και το ποσοστό του πολυμορφισμού που υπολογίστηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για να μετρηθεί η ικανότητα ενός δείκτη να αναδείξει τη γενετική παραλλακτικότητα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία  $PIC > 0,5$  αναφέρεται σε ένα ISSR-εκκινητή με υψηλή ικανότητα πολυμορφισμού. Όταν η τιμή PIC είναι  $0,5 > PIC > 0,25$  ο εκκινητής έχει μέτρια ικανότητα και όταν  $PIC < 0,25$  ο εκκινητής έχει μικρή ικανότητα ανάδειξης γενετικής παραλλακτικότητας (Xie et al., 2010). Οι τιμές PIC που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη ήταν από 0,18 έως 0,35 τιμές που χαρακτηρίζουν του εκκινητές ISSR μέτριας ικανότητας.

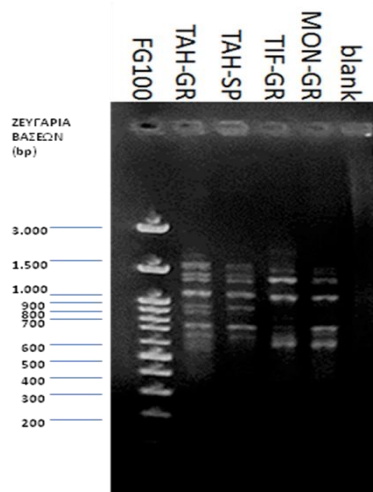
Μία από τις πιο κοινές μεθόδους για την δημιουργία παραλλακτικότητας στο γρασίδι, είναι η δημιουργία υβριδίων (Burton, 1993). Στη παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν, για γενετική παραλλακτικότητα, τέσσερις ποικιλίες (TAH-GR, TAH-SP, TIF-GR και MON-GR) εκ των οποίων η TAH-GR αποτελεί υβρίδιο των *C. dactylon* X *C. transvaalensis*. Η τελευταία ομαδοποιήθηκε μαζί με τη ποικιλία TAH-SP που προέρχεται από το πιστοποιημένο παραγωγό στην Ισπανία και διαφέρει κατά πολύ γενετικά από τις TIF-GR και MON-GR. Οι περισσότερες ποικιλίες γρασιδιού είναι διαειδικά υβρίδια ανάμεσα στα *C. dactylon* X *C. transvaalensis* (Farsani et al., 2012). Διαειδικά υβρίδια είναι η διασταύρωση δύο ατόμων από το ίδιο γένος (Khan & Croser, 2004).

Η ανάλυση UPGMA έδειξε αυτό που ήταν αναμενόμενο από την ανάλυση ISSR, ότι υπάρχει μεγάλη γενετική ομοιότητα μεταξύ των ποικιλιών, ενώ διαφέρουν αρκετά σύμφωνα με τις πληροφορίες που μας παρέχουν τα μήκη των κλάδων.

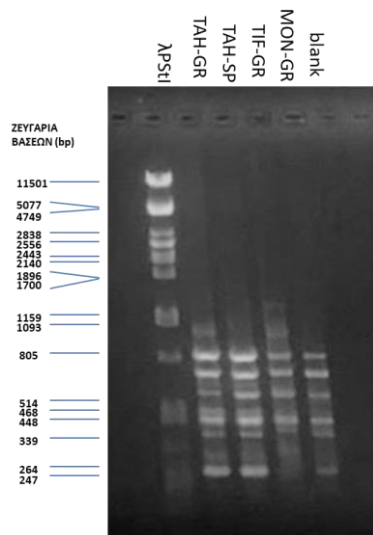
Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα που λάβαμε από αυτή τη μελέτη έδειξαν ότι ανάμεσα στις ποικιλίες που εξετάστηκαν υπάρχει πολυμορφισμός ανάμεσα στις

ποικιλίες TAH-GR, TAH-SP, TIF-GR και MON-GR. Ύστερα από τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος, μπορεί να ειπωθεί ότι οι Μοριακοί Δείκτες ISSR είναι ένα αρκετά καλό εργαλείο για την ανάδειξη γενετικής παραλλακτικότητας σε καλλιεργούμενες ποικιλίες και υβρίδια του γένους *Cynodon*.

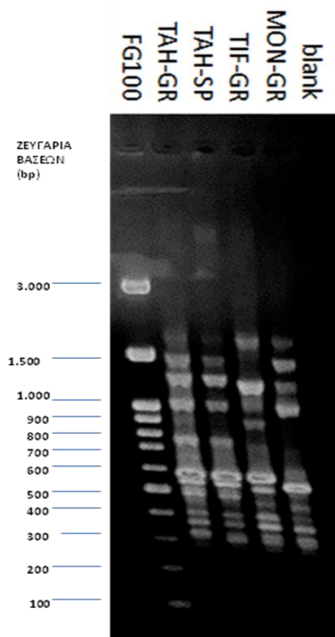
# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι – ΤΑ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΖΩΝΩΝ ΤΩΝ 12 ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ



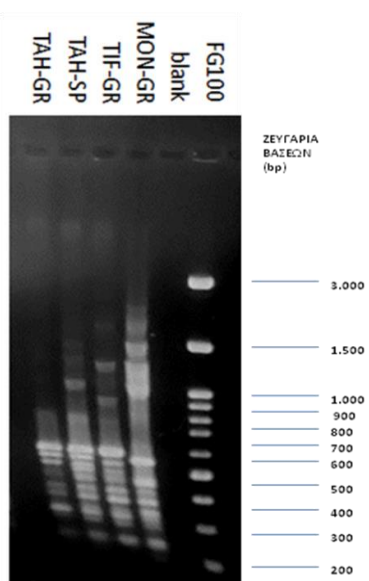
**Εικόνα 10:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR1. FG100, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό



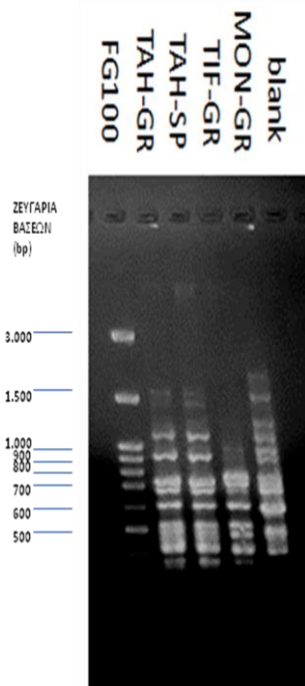
**Εικόνα 11:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR2. λPStI, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό



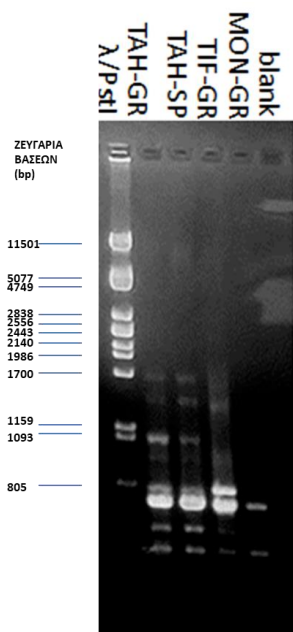
**Εικόνα 12:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR3. FG100, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό



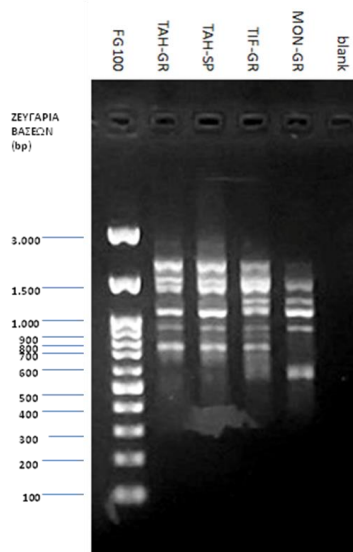
**Εικόνα 13:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR4. FG100, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό



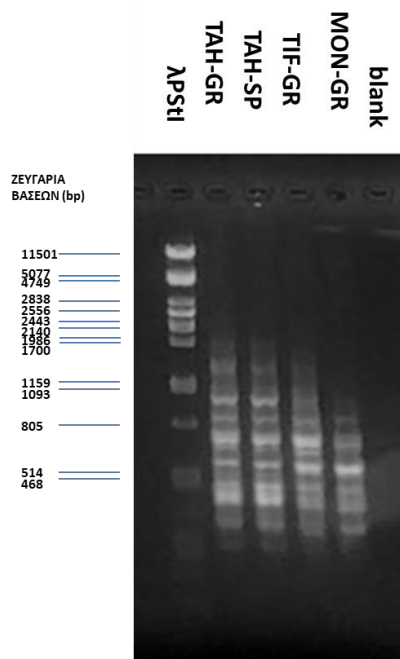
**Εικόνα 14:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR5. FG100, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό



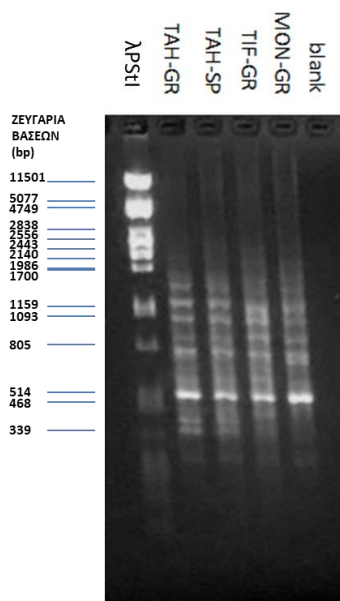
**Εικόνα 15:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR6. λPstI, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό



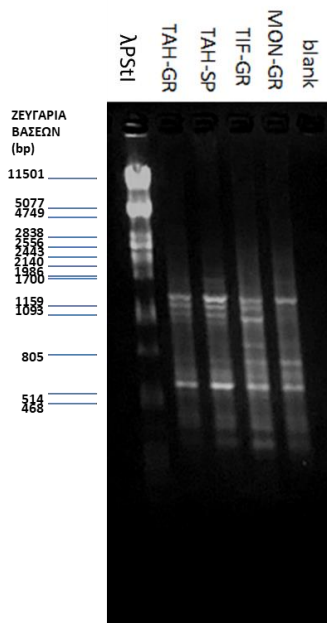
**Εικόνα 16:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR7. FG100, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό



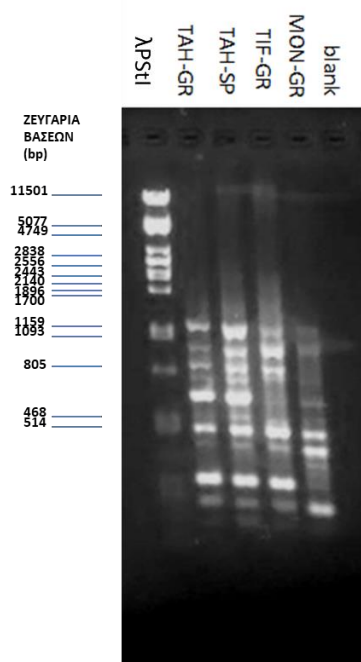
**Εικόνα 17:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR8. λPStI, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό



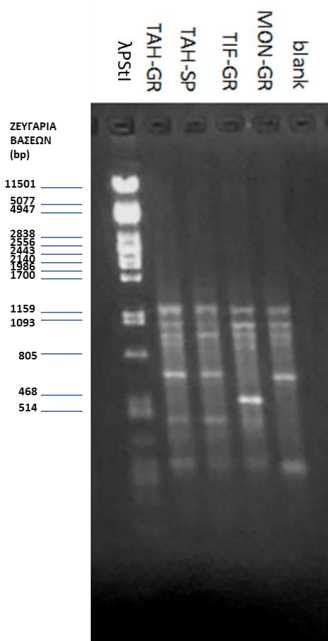
**Εικόνα 18:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR9. λPstI, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό



**Εικόνα 19:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR10. λPstI, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό



**Εικόνα 20:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR11. λPstI, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό



**Εικόνα 21:** Ενδεικτικό προφίλ των ζωνών που παράχθηκαν από τον εκκινητή gISSR12. λPstI, μάρτυρας γνωστών μεγεθών, blank, αρνητική PCR με νερό



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ – ΠΕΡΙΛΗΨΗ

## ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ

30<sup>ο</sup> Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών

9 – 13 Μαΐου, 2022

«Οι Προκλήσεις της Κλιματικής Αλλαγής στον Τομέα των Οπωροκηπευτικών»

### ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ISSR-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΥΒΡΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΓΡΑΣΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Cynodon*

Σ. Καλαθάκη<sup>1</sup>, Π. Νεκτάριος<sup>2</sup>, Φ. Βερβερίδης<sup>1,3</sup>, Ε. Τραντάς<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας, Εργαστήριο Βιολογικών και Βιοτεχνολογικών Εφαρμογών, Εσταυρωμένος, 71410, Ηράκλειο Κρήτης

<sup>2</sup> Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας, Εργαστήριο Ποιότητας και Ασφάλειας Αγροτικών Προϊόντων, Τοπίου και Περιβάλλοντος, Εσταυρωμένος, 71410, Ηράκλειο Κρήτης

<sup>3</sup> Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο, Ινστιτούτο Αγροδιατροφής και Επιστημών Ζωής, 71410, Ηράκλειο Κρήτης  
[sevasti114@gmail.com](mailto:sevasti114@gmail.com)

Το *Cynodon dactylon* (L.) Pers. είναι το πιο σημαντικό είδος του γένους *Cynodon*, λόγω της εκτεταμένης χρήσης του για την σύσταση χλοοτάπητων στην αρχιτεκτονική τοπίου, την κηποτεχνία και σε αθλητικές επιφάνειες. Η μακροσκοπική διάκριση ειδών του *Cynodon* σε επίπεδο ποικιλίας είναι δυσχερής και οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών μεταβάλλονται ανάλογα με τις περιβαλλοντικές, κλιματολογικές και διαχειριστικές συνθήκες, αυξάνοντας την αβεβαιότητα της ταυτοποίησης. Είναι σημαντική η διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης μοριακών μεθοδολογιών, προκειμένου να διαπιστωθούν οι γονιδιωματικές διαφορές μεταξύ ποικιλιών οι οποίες θα εξασφαλίζουν την ικανή και ασφαλή ταυτοποίηση. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε γονιδιωματική ανάλυση τεσσάρων διαφορετικών δειγμάτων γρασιδιού του γένους *Cynodon* με χρήση της μεθοδολογίας Intergenic Simple Sequence Repeats-Polymerase Chain Reaction (ISSR-PCR) με τη χρησιμοποίηση 12 διαφορετικών εκκινητών, για την ανάδειξη διαφορών, που θα οδηγούσαν σε ασφαλή ταυτοποίηση. Παραλήφθηκε ζωντανός ιστός (φύλλα) από 4 καλλιεργούμενες ποικιλίες και υβρίδια του γένους *Cynodon* και συγκεκριμένα: α) Υβρίδιο *C. dactylon* x *C. tranvaalensis* cv Tahoma που καλλιεργείται στην Ελλάδα (TAH-GR), β) Υβρίδιο *C. dactylon* x *C. tranvaalensis* cv Tahoma που καλλιεργείται

από τον επίσημο εξουσιοδοτημένο εμπορικό αντιπρόσωπο για την Ευρώπη του υβριδίου στην Ισπανία (TAH-SP), γ) Υβρίδιο *C. dactylon* x *C. tranvaalensis* cv Tifway 419 (TIF-GR) με προέλευση από φυτεία παραγωγής έτοιμου χλοοτάπητα στην Ελλάδα και δ) *C. dactylon* cv Monaco (MON-GR) που καλλιεργείται στην Ελλάδα. Έγινε απομόνωση του γενετικού υλικού και χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων με τη μέθοδο ISSR-PCR, τα οποία διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Όλες οι αντιδράσεις με τους οκτώ διαφορετικούς εκκινητές στις δυο ποικιλίες TAH-GR και TAH-SP, έδειξαν ταύτιση του ηλεκτροφορητικού προτύπου. Αντίθετα, οι ποικιλίες TIF-GR και MON-GR, εμφάνισαν διαφορές σε σύγκριση με τις TAH-GR και TAH-SP και στους δώδεκα εκκινητές υποδεικνύοντας ότι η χρήση της μεθοδολογίας ISSR-PCR μπορεί να είναι αποτελεσματική στη γενετική διάκριση και ταυτοποίηση μεταξύ των υβριδίων και των ποικιλιών του γένους *Cynodon*.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akbari M., Salehi H., Niaz A., 2018. Evaluation of Diversity Based on Morphological Variabilities and ISSR Molecular Markers in Iranian *Cynodon dactylon* (L.) Pers. Accession to Select and Introduce Cold-Tolerant Genotypes. *Molecular Biotechnology*, 60, 259-270
- Assefa S., Taliaferro CM., Anderson MP., de los Reyes BG., Edwards RM., 1999. Diversity among *Cynodon* accessions and taxa based on DNA amplification fingerprinting. *Genome*, 42, 465-474
- Bleas MJ., De Granolis SA., Lee H., Trevors JT., 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 99-114
- Burton GW., Janick J., Simons JE., 1993. African Grasses. Eds; Wiley: New York, NY, USA, 294-298
- Caetano-Anolles G., Bassam BJ., Gresshoff PM., 1991. DNA Amplification Fingerprinting: A strategy for Genome Analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(4), 294-307
- Caetano-Anolles G., Callahan LM., Gresshoff PM., 1997. The origin of bermudagrass (*Cynodon*) off-types inferred by DNA amplification fingerprinting. *Crop Sciences*, 37, 81-87
- Caetano-Anolles G., Callahan LM., Williams PE., Weaver KR., Gresshoff PM., 1995. DNA amplification fingerprinting analysis of bermudagrass (*Cynodon*): Genetic relationship between species and interspecific crosses. *Theoretical Applications of Genetics*, 94, 228-235
- Caetano-Anolles G., 1998b. Genetic instability of bermudagrass (*Cynodon*) cultivars 'Tifgreen' and 'Tifdwarf' detected by DAF and ASAP analysis of accessions and off-types. *Euphytica*, 101, 165-173
- Cheng T., Wang D., Wang Y., Zhang S., Zhang C., Liu S., Xi Y., Sun F., 2018. Identification and functional characterization of a MAX2 ortholog from switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 106-114

- Etemadi N., Sayed-Tabatabaei BE., Zamanni Z., Razmjoo KH., Khalighi A., Lessani H., 2006. Evaluation of diversity among *Cynodon dactylon* (L.) Pers. using RAPD markers. International Journal of Agriculture and Biology, 1560-8530
- Farsani TM., Etemadi N., Sayed-Tabatabaei BE., Talebi M., 2012. Assessment of genetic diversity of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) using ISSR markers. International Journal of Molecular Sciences, 13, 383-392
- Gulsen O., Sever-Mutlu S., Mutlu N., Tuna M., Karaguzel O., Sheraman RC., Riordan TP., Heng-Moss TM., 2009. Polyploidy creates higher diversity among *Cynodon* accessions as assessed by molecular markers. Theoretical Applications of Genetics, 118, 1309-1319
- Harlan JR., de Wet JMJ., 1969. Sources of variation in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. Crop Sciences, 9, 774-778
- Ho CY., McMaugh CY., Wilton AN., McFarlane IJ., MacKinley AG., 1997. DNA amplification variation within cultivars of turf-type couch grasses (*Cynodon sp.*). Plant Cell Replication, 16, 797-801
- Huang C., Lie G., Bai C., Wang W., 2014. Genetic Analysis of 430 Chinese *Cynodon dactylon* assessment using Sequence-Related Amplified Polymorphism Markers. International Journal of Molecular Sciences, 15, 19134-19146
- Huang CQ., Liu GD., Bai CJ., Wang WQ., Zhou SY., Yu DQ., 2010. Estimation of genetic variation in *Cynodon dactylon* accessions using the ISSR technique. Biochemical Systematics and Ecology, 38, 993-999
- Karaca M., Saha S., Zipf A., Jenkins JA., Lang DJ., 2002. Genetic diversity among forage bermudagrass (*Cynodon sp.*): Evidence from chloroplast and nuclear DNA fingerprinting. Crop Sciences, 42, 2118-2127
- Khan TN., Croser JS., 2004. PEA Overview. Encyclopedia of grain science, 418-427
- Kumar NS., Gurusubramanian G., 2011. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. Science Vision 11(3), 116-124
- Liang HM., 2010. Analysis on different populations of *Cynodon dactylon* by RAPD. Acta Prataculturae Sinica, 19, 258-262

- Li H., Liu L., Lou Y., Hu T., Fu J., 2011. Genetic diversity of Chinese natural bermudagrass (*Cynodon dactylon*) germplasm using ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, 127, 555-561
- Liu W., Li XQ., Zhang F., Ma X., Fan Y., 2007. Genetic diversity of bermudagrass accessions in south-west by ISSRs molecular markers and geographic provenance. *Acta Prataculturae*, 16(3), 55-61
- Li XY., Li J., Zhao ZJ., Yang F., Fu QW., Liu HS., Wang DD., Yang YC., Wang RY., 2014. Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) for studying genetic diversity and population structure of plants and other living organisms: A protocol. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 24(5), 1478-1486
- Marwal A., Guar RK., 2020. Molecular markers: tools for genetic analysis. *Animal Biotechnology*, 2, 353-372
- Mason AS., 2014. SSR Genotyping. *Methods in Molecular Biology*, 1245, 77-89
- Ng WL., Tan SG., 2015. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right?. *ASM Science Journal*, 9(1), 30-39
- Pasqualon A., 2013. Cultivar identification and varietal traceability in processed foods: A molecular approach. *Nova Biomedical*, 83-105
- Patton AJ., Hardelebeck GA., Williams DW., Reicher ZJ., 2004. Establishment of bermudagrass and zoysiagrass by seed. *Crop Sciences*, 44, 2160-2167
- Pavlopoulos G., Soldatos TG., Barbosa-Silva A., Schneider R., 2010. A reference guide for tree analysis and visualization. *BioData Mining*, 3(1)
- Poczai P., Laos M., Cseh A., Bell NF., Hyvonen J., Varga I., 2013. Advances in plant gene-targeted and functional markers: A review. *Plant Methods*, 9(1), 6
- Qi XF., Zhang XQ., Ling Y., Chen SY., Liu W., 2011. Genetic diversity of wild *Cynodon dactylon* germplasm detected by AFLP markers. *Acta Prataculturae Sinica*, 19, 155-161
- Robarts DWH., Wolfe AD., 2014. Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) Markers: A potential resource for studies in plant molecular biology. *Applications in Plant Sciences*, 2(7), 1400017
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425

- Sarwat M., 2012, ISSR: A reliable and cost-effective technique for detection of DNA polymorphism. *Methods in Molecular Biology*, 862, 103-121
- Shyan YS., Juraimi AS., Rafii MY., Sheibanimofrad M., Alam MA., Valdim MK., Hakim MA., 2014. Genetic Divergence of Bermudagrass (*Cynodon spp.*) Population Using ISSR Markers. *Life Science Journal*, 11(6)
- Tan CC., Wu YQ., Taliaferro CM., Anderson MP., Tauer C., Samuels T., 2010. Development of simple sequence repeat markers for bermudagrass from its expressed sequence tag sequences and preexisting sorghum SSR markers. *Molecular Breeding*, 27, 1-8
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van den Lee T., Harnes M., Frijters M., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. AFLP: a new technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414
- Wang Z., Liao L., Yuan X., Guo H., Guo A., Liu J., 2013. Genetic diversity analysis of *Cynodon dactylon* (bermudagrass) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46, 108-115
- Wang ZY., Liao L., Yuan XJ., Guo AG., Liu JX., 2011. Genetic relationships of bermudagrass (*Cynodon dactylon* var. *dactylon*) from different countries revealed by SRAP analysis. *African Journal of Biotechnology*, 10, 17106-17115
- Wang Z., Wu YQ., Martin DJ., Gao HW., Samuels T., Tan CC., 2010. Identification of vegetatively propagated turf bermudagrass cultivars using simple sequence repeat marker. *Crop Sciences*, 50, 2103-2111
- Wu YQ., Taliaferro CM., Bai GH., Anderson MP., 2005. Genetic diversity of *Cynodon transvaalensis* Butt-Davy and its relatedness to hexaploid *C. dactylon* (L.) Pers. as indicated by AFLP markers. *Crop Sciences*, 45, 848-853
- Wu YQ., Taliaferro CM., Bai GH., Marlin DL., Anderson JA., Anderson MP., Edwards RM., 2006. Genetic analysis of Chinese *Cynodon* accessions by flow cytometry and AFLP markers. *Crop Sciences*, 46, 917-926
- Xie W., Zhang X., Cai H., Liu W., Peng Y., 2010. Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 740-749

- Yi YJ., Zhang XQ., Huang LK., Ling Y., Ma X., Liu W., 2008. Genetic variety of wild bermudagrass germplasm using SRAP marker. *Heredity Chinese*, 30(1), 94-100
- Zhang B., Liu J., 2018. Molecular cloning and sequence variance analysis of the TEOSINTE BRANCHED1 (TB1) gene in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.]. *Journal of Plant Physiology*, 229, 142-150
- Zhang LH., Ozias-Akins P., Kochert G., Kresovich S., Dean R., Hanna W., 1999. Differentiation of bermudagrass (*Cynodon sp.*) genotypes by AFLP analysis. *Theoretical Applications of Genetics*, 98, 895-902
- Zhang Y., Xu S., Liu J., Zhao Y., Liu J., 2017. Genetic diversity and population structure of Chinese natural bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] germplasm based on SRAP markers. *Plos One*, 12

