

ΑΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

**Προσδιορισμός της γενετικής ποικιλομορφίας και
διαχωρισμός ζυγωτικών από νουκελλικά σπορόφυτα
εσπεριδοειδών με την χρήση δεικτών AFLP.**



ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ Μ. ΒΛΑΧΑΚΗΣ
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΑΝΔΡΕΑΣ Γ. ΝΤΟΥΛΗΣ, PhD

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εισηγητή καθηγητή μου, Δρ. Ανδρέα Ντούλη, για την καθοδήγησή του, την αμέριστη βοήθειά του και τη συνεχή υποστήριξή του στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στο πρόσωπο του Δρ. Ευτύχιο Πρωτοπαπαδάκη ο οποίος μας προσέφερε το φυτικό υλικό, της εργασίας αυτής και μας βοήθησε με τις πολύτιμες υποδείξεις του.

Ευχαριστώ ακόμα την ερευνητική ομάδα (Emad Jaber, Δημήτριο Μήλιο και Μαρία Πικράκη) του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας φυτών του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας για την συμπαράστασή τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την ηθική και οικονομική υποστήριξή τους.

Γεώργιος Βλαχάκης

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	6
1.1. Προέλευση, ιστορία της καλλιέργειας.....	6
1.2. Ταξινομική περιγραφή ποικιλιών Εσπεριδοειδών.....	7
1.3. Περιγραφή χαρακτηριστικών επιλεγμένων ποικιλιών.....	10
1.3.1. Νεραντζιά cv. <i>Brazillian (Citrus aurantium)</i>	10
1.3.2. Πορτοκαλιά cv. <i>Mariquite (Citrus sinensis)</i>	10
1.3.3. <i>Clausellina Satsuma (Citrus unshiu)</i>	10
1.3.4. Κλημεντίνη cv. <i>marisol (Citrus climentina)</i>	11
1.3.5. Κιτριά cv. <i>Diamante (Citrus medica)</i>	11
1.3.6. Λεμονιά (<i>Citrus limon var Zambettakis</i>).....	11
1.3.7. Λιμεττιά (<i>Citrus aurantifolia cv. Mexican</i>).....	12
1.3.8. Περγαμότο (<i>Citrus bergamia</i>).....	12
1.3.9. Βολκαμεριάνα (<i>Citrus Volkameriana</i>).....	13
1.3.10. <i>Citranges Carrizo (Poncirus trifoliata x Citrus sinensis)</i>	13
1.3.11. <i>Citrumelos (Poncirus trifoliata x Citrus paradisi)</i>	14
1.4. Πολυεμβρυονία-απόμειξη στα εσπεριδοειδή.....	14
1.5. Σημασία της απόμειξης στην καλλιέργεια των εσπεριδοειδών.....	15
1.6. Μοριακοί δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ταξινόμηση των εσπεριδοειδών.....	17
1.7. Δείκτες AFLP στα εσπεριδοειδή.....	19
1.8. Μεθυσίωση.....	20
1.9. Σκοπός της εργασίας.....	23
2. Υλικά και μέθοδοι.....	26
2.1. Συλλογή και αποθήκευση φυτικού υλικού.....	26
2.2. Υλικά και μέθοδος για την εκχύλιση του DNA.....	26
2.3. Φθοριζομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA.....	27
2.4. Ανάλυση φθοριζόντων πολυμορφισμών μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA (fluorescent AFLP: fAFLP).....	27
2.4.1. Πέψη του γενωμικού DNA.....	27
2.4.2. Αιγοποίηση (μάτισμα) των προσαρμοστών.....	28
2.4.3. Προ-επιλεκτική ενίσχυση (PCR).....	29
2.4.4. Επιλεκτική ενίσχυση (PCR).....	30
2.4.5. Ανάλυση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	31
2.5. MSAP Ανάλυση (Methylation-sensitive amplification polymorphism).....	31
2.6. Ανάλυση δεδομένων.....	33
3. Αποτελέσματα.....	34

3.1. Προσδιορισμός των γενετικών σχέσεων των γονέων.....	34
3.2. Διαχωρισμός νουκελλικών από ζυγωτικούς απογόνους.....	38
3.3. MSAP ανάλυση.	47
4. Συμπεράσματα και συζήτηση.....	50
4.1. Προσδιορισμός των γενετικών σχέσεων των γονέων.....	50
4.2. Διαχωρισμός των νουκελλικών από τα ζυγωτικά σπορόφυτα.	52
4.3. MSAP ανάλυση.	57
Βιβλιογραφία.....	58
I. Ελληνική Βιβλιογραφία.....	58
II. Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....	59

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1. Ταξινόμηση του γένους <i>Citrus</i> κατά το σύστημα W.T. Swingle, 1943.	8
Πίνακας 2. Παραδείγματα υβριδίων μεταξύ ειδών εσπεριδοειδών.....	9
Πίνακας 3. Γονείς των εσπεριδοειδών που χρησιμοποιήσαμε και οι διασταυρώσεις τους.	25
Πίνακας 4. Αριθμός πολυμορφικών τόπων ανά οικογένεια.	39
Πίνακας 5. Μοναδικοί τόποι απογόνων πατρικής προέλευσης.....	40
Πίνακας 6. Ανασυνδυασμένοι τόποι AFLP των απογόνων.....	41
Πίνακας 7. Μοναδικοί τόποι πατρικής προέλευσης στους απογόνους.	44
Πίνακας 8. Ανασυνδυασμένοι τόποι AFLP των απογόνων – δεύτερη ομάδα. ...	45
Πίνακας 9. Τόποι μητρικής προέλευσης που δεν ενισχύονται στους νουκελλικούς απογόνους.	46
Πίνακας 10. Ενισχυμένοι τόποι AFLP παραγόμενοι από τα δύο ισοσχιζομερή περιοριστικά ένζυμα.	49

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της MSAP ανάλυσης δειγμάτων DNA (προσαρμογή από τον Baurens F.C. 2003).	22
Εικόνα 2. Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που αποκτήθηκε από τον αυτοπονημένο αλληλουχητή της Li-Cor IR2, και απεικονίζει μοριακά αποτυπώματα διάφορων εσπεριδοειδών που παρήχθησαν με φθορίζοντες δείκτες AFLP (L=πρότυπα μεγέθη).	35
Εικόνα 3. Δενδρογράμμα των γονέων από τον αλγόριθμο UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average clustering) με βάση τα δεδομένα της ανάλυσης AFLP.	37
Εικόνα 4. Δενδρογράμμα των δύο οικογενειών της δεύτερης ομάδας που παράχθηκε από τον αλγόριθμο UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average clustering) με βάση τα δεδομένα της ανάλυσης AFLP.	43
Εικόνα 5. Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που αποκτήθηκε από τον αυτοπονημένο αλληλουχητή της Li-Cor IR2, και απεικονίζει μοριακά αποτυπώματα τεσσάρων ατόμων που παρήχθησαν με την MSAP ανάλυση (M1: Μητρικό φυτό υποκείμενο 12, M2: Μητρικό φυτό 1452, P: Πατρικό φυτό Νεραντζιά, N1: Νουκελλικό φυτό υποκείμενο 12 X Νεραντζιά και L: Πρότυπο μέγεθος).	48

1. Εισαγωγή.

1.1. Προέλευση, ιστορία της καλλιέργειας.

Το γένος εσπεριδοειδή ανήκει στη οικογένεια Rutaceae, υπό-οικογένεια Aurantoideae. Αυτή η οικογένεια περιέχει πολλά εδώδιμα είδη, μερικοί μακρινοί συγγενείς όπως τα white Sapote (*Casimiroa edulis Llave & Lex.*) και Wampee (*Clausena lansium Skeels*).

Το κέντρο της ποικιλομορφίας για τα εσπεριδοειδή κυμαίνεται από τη βορειοανατολική Ινδία, ανατολικά μέσω του αρχιπελάγους της Μαλαισίας, βόρεια προς την Κίνα και Ιαπωνία και νότια ως την Αυστραλία (Moore 2001). Τα γλυκά πορτοκάλια πιθανώς προέκυψαν στην Ινδία, το trifoliate πορτοκάλι και το μανταρίνι στην Κίνα, και οι όξινοι τύποι εσπεριδοειδών στη Μαλαισία. Οι ακριβείς διαδρομές της διασποράς των εσπεριδοειδών από την προέλευσή τους είναι άγνωστες (Moore 2001). Παρόλο αυτά, τα πορτοκάλια και τα rummelos αναφέρθηκαν στην κινεζική λογοτεχνία το 2400 Π.Χ., και αργότερα αναφέρθηκαν τα λεμόνια στις σανσκριτικές γραφές (800 Π.Χ.). Ο Θεόφραστος, ο πατέρας της βοτανικής, έδωσε μια ταξινομική περιγραφή του κίτρου το 310 Π.Χ., ταξινομώντας το με το όνομα μήλο ως *medica Malus* ή *persicum Malus*. Κατά τους πρώτους χρόνους του χριστιανισμού και έκτοτε, ο όρος "εσπεριδοειδή" προέκυψε από την ελληνική λέξη για τους κώνους των κέδρων, "Kedros". Αυτή τη στιγμή, τα εσπεριδοειδή έχουν διαδοθεί σε όλη την Ασία, τη βόρεια Αφρική, και την Ευρώπη κατά μήκος των εμπορικών δρόμων.

Οι Κολόμβος, Ponce de Leon, και Juan de Grijanla μετέφεραν τα διάφορα εσπεριδοειδή στο νέο κόσμο προς το τέλος του 14^{ου} αιώνα. Οι πορτογάλοι πιθανόν τον 16^ο αιώνα παρουσίασαν στην Ευρώπη περισσότερους από ένα ανώτερους τύπους του γλυκού πορτοκαλιού. Παρόλο αυτά, στην Κίνα και στην Ιαπωνία καλλιεργούσαν τα μανταρίνια από τους αρχαίους χρόνους, οι πρώτες ποικιλίες μανταρινιάς μεταφέρθηκαν στην Αγγλία το 1805 από τον Abraham Hume και από εκεί στη συνέχεια διαδόθηκαν στην περιοχή της Μεσογείου (Moore 2001). Όλα τα εσπεριδοειδή εκτός του trifoliate είναι πολύ ευαίσθητα στον παγετό με αποτέλεσμα η καλλιέργεια των εσπεριδοειδών, στα περισσότερα τμήματα της Ευρώπης, δεν είναι δυνατή. Οι καλλιέργεια των εσπεριδοειδών διαδόθηκε ευρύτατα στη Φλόριδα των ΗΠΑ προς το τέλος του 17^{ου} αιώνα, όταν έγιναν οι πρώτες εμπορικές αποστολές. Την ίδια περίοδο, τα εσπεριδοειδή

εισήχθησαν στην Καλιφόρνια, αν και άρχισε πολύ αργότερα η εμπορική παραγωγή στην Αμερικανική δύση.

1.2. Ταξινομική περιγραφή ποικιλιών Εσπεριδοειδών.

Τα εσπεριδοειδή ανήκουν στην οικογένεια Rutaceae, στην υποοικογένεια Aurantioideae, στην φυλή Citrae και στην υποφυλή Citrinae (Reuther, et. al.1967). Η υποοικογένεια Aurantioideae περιλαμβάνει το γένος *Citrus* και άλλα 32 συγγενή προς αυτό γένη. Τα είδη που ανήκουν στα Aurantioideae είναι δέντρα ή θάμνοι (σπάνια ποώδη) αειθαλή, με εξαίρεση τα γένη *Poncirus*, *Eagle*, *Feronia* καθώς και 3 είδη του γένους *Clausena* και ενός του γένους *Murraya*, που είναι φυλλοβόλα (Βασιλακάκης, 1996). Σήμερα υπάρχουν δύο κύρια συστήματα ταξινομήσεως του γένους *Citrus*, το σύστημα κατά W.T. Swingle και το σύστημα κατά T. Tanaka. Στο ταξινομικό σύστημα Swingle (1943) που θα ακολουθήσουμε το γένος *Citrus* ταξινομείται σε δύο υπογένη, το υπογένος *Citrus* ή *Eucitrus* και το υπογένος *Papeda*. Στα υπογένη αυτά υπάγονται 16 είδη, δέκα στο *Citrus* και έξι στο *Papeda*. Τα είδη αυτά διακρίνονται εύκολα από τους χαρακτήρες των φύλων, των ανθέων και των καρπών (Ποντίκης 1993). Αντιθέτως ο Tanaka που κατατάσσει τα εσπεριδοειδή σε 163 είδη (Πρωτοπαπαδάκης, 2004). Στον Πίνακα 1 περιέχεται η ταξινόμηση του γένους *Citrus* κατά το σύστημα του W. T. Swingle (1943).

Εκτός από τα κύρια παραπάνω είδη υπάρχουν και υβρίδια μεταξύ των διάφορων ειδών των εσπεριδοειδών. Τα περισσότερα είδη του γένους *Citrus* διασταυρώνονται μεταξύ τους καθώς και με τα είδη των *Poncirus* και *Fortunella*. Παρά την ευκολία με την οποία τα είδη των εσπεριδοειδών μπορούν να διασταυρώνονται οι προσπάθειες των βελτιωτών να δημιουργήσουν νέες ποικιλίες δεν έχουν αποδώσει, εκτός μερικών εξαιρέσεων (Βασιλακάκης, 1996). Ο Πίνακα 2 περιέχει παραδείγματα υβριδίων του γένους *Citrus*.

Επίσης τα εσπεριδοειδή υφίστανται μεταλλάξεις σχετικά εύκολα. Αυτές εμφανίζονται είτε πάνω στο δέντρο ως οφθαλμικές, είτε στα σπορόφυτα ως μεταλλάξεις του μητρικού ιστού των σπερμοβλαστών. Παράδειγμα αυτών των μεταλλάξεων είναι οι ποικιλίες που ανήκουν στην ομάδα Clementine (κλημεντίνη) και οι περισσότερες Satsuma (Βασιλακάκης, 1996).

Πίνακας 1. Ταξινόμηση του γένους *Citrus* κατά το σύστημα W.T. Swingle, 1943.

Γένος	Υπογένη	Είδη	
		Λατινικό όνομα	Κοινό όνομα
<i>Citrus</i>	<i>Citrus</i> ή <i>Eucitrus</i>	<i>Medica</i> <i>Limon</i> <i>Aurantifolia</i> <i>Aurantium</i> <i>Sinensis</i> <i>Reticulata</i> <i>Grandis</i> <i>Paradisi</i> <i>Indica tachibana</i>	Κιτριά Λεμονιά Λιμεττιά Νεραντζιά Πορτοκαλιά Μανταρινιά Φράππα Βοτρυόκαρπος
	<i>Papeda</i>	<i>Ichagensis</i> <i>Latipes</i> <i>Micrantha</i> <i>Celebica</i> <i>Macroptera</i> <i>Hystrix</i>	

Πίνακας 2. Παραδείγματα υβριδίων μεταξύ ειδών εσπεριδοειδών.

Κοινό όνομα	Γονείς (είδη που διασταυρώθηκαν)
Περγαμόντο	<i>Citrus aurantifolia x Citrus aurantium</i>
Citranges	<i>Citrus sinensis x Poncirus trifoliata</i>
Tangelos	<i>Citrus reticulata x Citrus paradisi</i>
Citremquats ή Citrangequats	<i>Poncirus Trifoliata x F. margarita</i>

1.3. Περιγραφή χαρακτηριστικών επιλεγμένων ποικιλιών.

1.3.1. Νεραντζιά cv. Brazillian (*Citrus aurantium*)

Το δένδρο κυμαίνεται σε ύψος από 3 έως 9 μέτρα και έχει ομαλό καφετί φλοιό. Τα φύλλα είναι αρωματικά, συνήθως ωσειδή (Morton, 1987). Τα ιδιαίτερα ευώδη άνθη, που αναπτύσσονται μεμονωμένα ή σε συστάδες στις μασχάλες των φύλλων, φέρουν 5 λεπτά, λευκά πέταλα που περιβάλλουν μέχρι 24 κίτρινους στήμονες (Morton, 1987). Ο καρπός είναι χρώματος πορτοκαλί ως κοκκινωπού, όταν υπερωριμάσει. Αντέχει στα βαριά εδάφη επίσης δείχνει ικανοποιητική αντοχή στο ασβέστιο.

1.3.2. Πορτοκαλιά cv. Mariquite (*Citrus sinensis*).

Η πορτοκαλιά Mariquite ανήκει στα ομφαλοφόρα πορτοκάλια. Είναι όψιμη ποικιλία, μπορεί να συγκομισθεί μέχρι τέλος Μαΐου. Ξεχωρίζουν από τις άλλες ποικιλίες για τα μεγάλα φύλλα. Τα φύλλα είναι στιλπνά, σχήματος ωσειδούς, μήκους 7,5 με 10 εκατοστά, έχουν μίσχο 1,5 με 2,5 εκατοστά, και μικρό πτερύγιο. Τα ευώδη λευκά άνθη της πορτοκαλιάς φέρουν 4-5 σέπαλα, 4-5 πέταλα και 20 έως 25 στήμονες με ευδιάκριτους κίτρινους ανθήρες. Η σάρκα των καρπών είναι κίτρινη-πορτοκαλί, αποτελείται από 10-14 τμήματα τα οποία διαχωρίζονται εύκολα μεταξύ τους. Σε κάθε τμήμα μπορούν να υπάρξουν 2 έως 4 σπέρματα (Morton, 1987).

1.3.3. Clausellina Satsuma (*Citrus unshiu*).

Η Clausellina δημιουργήθηκε στην Ισπανία το 1962 από μια μεταλλαγή των οφθαλμών του Satsuma Owari. Είναι πρώιμη ποικιλία με καρπό χωρίς κουκούτσια. Καμία ποικιλία μανταρινιάς δεν έχει μεγαλύτερη αντοχή στο ψύχος από αυτήν, ιδιαίτερα όταν είναι εμβολιασμένη πάνω στην Τρίφυλλη πορτοκαλιά (Πρωτοπαπαδάκης, 1992). Σαν δέντρο είναι μικρού μεγέθους, βραδείας αναπτύξεως, συνήθως πλαγιόκλαδη και κρεμοκλαδής, σχεδόν χωρίς αγκάθια και με αραιό φύλλωμα. (Πρωτοπαπαδάκης, 1992). Ο καρπός της σατσούμα έχει μικρό έως μεγάλο μέγεθος, σχήμα ημισφαιρικό, πλακέ και μερικές φορές μικρό λαιμό. Κατά τη ωρίμανση έχει χρώμα πορτοκαλί, αλλά συνήθως είναι ώριμη

προτού αναπτυχθεί ο χρωματισμός αυτός. Ο φλοιός είναι λεπτός, δερματώδης, μέτρια λείος και φέρει μεγάλους αιλεοφόρους αδένες (Ποντίκης, 1993).

1.3.4. Κλημεντίνη cv. marisol (*Citrus climentina*).

Υπερπρώιμη ποικιλία κλημεντίνης, προήλθε από την κλημεντίνη Oronai με μετάλλαξη. Είναι ζωηρό ορθόκλαδο δένδρο με μικρά-μέτρια αγκάθια. Σε σχέση με τις άλλες κλημεντίνες κάνει μεγαλύτερους καρπούς και τα ποσοστά κιτρικού οξέος είναι υψηλότερο.

Η Marisol είναι μια νέα πρώιμη ποικιλία με ικανοποιητικό μέγεθος, καλό χρωματισμό, αλλά δυστυχώς οι καρποί της παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά οξέων (Πρωτοπαπαδάκης, 2004).

1.3.5. Κιτριά cv. Diamante (*Citrus medica*).

Έχει στενή συγγένεια με την λεμονιά, με την οποία έχει διασταυρωθεί και έδωσε πολλά άτομα με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά. Τόσο οι καρποί όσο και τα φύλλα της κιτριάς είναι μεγαλύτερα από εκείνα της λεμονιάς (Βασιλακάκης, 1996).

Ο καρπός της έχει μεγάλο μέγεθος, σχήμα ωοειδές έως ελλειπτικό και πλατιά θηλή ενώ το βάρος των καρπών ποικίλλει από ένα μέχρι δύο κιλά. Ο φλοιός είναι πολύ παχύς, σαρκώδης, λείος και με χρώματα, κατά την ωρίμανση, λεμονοκίτρινο. Το ενδοκάρπιο έχει χυμό ξινό. Σαν δένδρο έχει μικρό μέγεθος, μέτριο αριθμό αγκαθιών (μερικά μεγάλα και ισχυρά) και είναι πλαγιόκλαδη. Οι οφθαλμοί, τα άνθη και οι νέες βλαστήσεις χαρακτηρίζονται από χρωματισμό ιώδη (Πρωτοπαπαδάκης, 1987).

1.3.6. Λεμονιά (*Citrus limon var Zambettakis*).

Το δένδρο της λεμονιάς φθάνει σε ύψος μέχρι τα 3-6 μέτρα (Morton, 1987). Οι νεαροί βλαστοί είναι λείοι, με τριγωνική διατομή και ιώδους χρώματος. Είναι ζωηροί και επεκτείνονται προς τα έξω περισσότερο από ότι των άλλων

εσπεριδοειδών. Φέρει αγκάθια και φλοιό γκριζου χρώματος (Βασιλακάκης, 1996). Τα απαλά ευώδη άνθη μπορεί να είναι απομονωμένα ή να υπάρχουν 2 ή περισσότερα συγκεντρωμένα στη μασχάλη των φύλλων (Morton, 1987).

Η λεμονιά είναι το πιο ευαίσθητο εσπεριδοειδές στις χαμηλές θερμοκρασίες. Θερμοκρασίες -5° έως -7°C προκαλούν μεγάλη ζημιά στο ξύλο της λεμονιάς.

Η λεμονιά Zambettakis σε σχέση με τις άλλες ποικιλίες δίδει το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής της τους καλοκαιρινούς μήνες. Η ποικιλία αυτή δημιουργήθηκε από τον καθηγητή Ζαμπεττάκη (Πρωτοπαπαδάκης, 1994).

1.3.7. Λιμεττιά (*Citrus aurantifolia* cv. Mexican)

Τα δένδρα είναι μέσου μεγέθους, με θαμνώδη ανάπτυξη, λεπτούς βλαστούς και πολλά μικρά αγκάθια. Τα φύλλα είναι μικρά, χρώματος ωχρό-κίτρινου (Βασιλακάκης, 1996). Τα ασθενώς ευώδη ή άοσμα άνθη είναι είτε μεμονωμένα είτε συγκεντρωμένα σε 2 έως 7. Έχουν 4 έως 6 στενόμακρα πέταλα λευκού χρώματος και 20-25 δεσμίδες λευκών στημόνων με κίτρινους ανθήρες (Morton, 1987). Ο καρπός είναι πολύ μικρός σε μέγεθος, στρογγυλός σε σχήμα ή λίγο ελλειπτικός. Μερικές φορές συνοδεύεται από πολύ μικρό λαιμό και συνήθως από μικρή θηλή. Ο φλοιός είναι πολύ λεπτός, λείος, δερματώδεις και πρασινοκίτρινος κατά την ωρίμανση των καρπών. Η σάρκα είναι πρασινοκίτρινη, τρυφερή, χυμώδης και πολύ ξινή με διακριτικό άρωμα. Από όλα τα εσπεριδοειδή θεωρείται το πλέον ευαίσθητο στις χαμηλές θερμοκρασίες γι' αυτό καλλιεργείται στις χώρες με θερμό κλίμα Μεξικό, Κούβα και Αραβική Χερσόνησος (Πρωτοπαπαδάκης, 2004).

1.3.8. Περγαμότο (*Citrus bergamia*)

Η προέλευση καθώς και η γενετική σύσταση του είδους αυτού είναι άγνωστη και καλλιεργείται στην περιοχή Καλαβρία της Ιταλίας για την παραγωγή αιθέριων ελαίων. Θεωρούνταν γενικά ως υβρίδια Νεραντζιάς x Λεμονιάς ή λιμεττιάς. Οι καρποί τους διακρίνονται για το ευχάριστο και διακριτικό άρωμά τους, γι' αυτό χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην αρωματοποιία και την ζαχαροπλαστική (Πρωτοπαπαδάκης, 2004).

Το δένδρο είναι μέσης ζωηρότητας, πλαγιόκλαδο, χωρίς αγκάθια και όταν αναπτυχθεί πλήρως είναι μικρού-μεσαίου μεγέθους (Βασιλακάκης, 1996). Οι καρποί του έχουν μικρό έως μέτριο μέγεθος, σχήμα ωοειδές ή αχλαδόμορφο, μικρό ομφαλό και συνοδεύεται συνήθως από το στύλο του υπέρου. Ο φλοιός το καρπού μετρίως λεπτός και λείος ή μετρίως τραχύς. Η σάρκα έχει χρώμα χρυσαφί με γεύση πολύ όξινη και πικρή, είναι πολύ χυμώδης και φέρει πάρα πολλά σπέρματα (Βασιλακάκης 1996). Σε ορισμένες περιπτώσεις το χρησιμοποιούν σαν υποκείμενο (Πρωτοπαπαδάκης, et al. 2001).

1.3.9. Βολκαμεριάνα (*Citrus Volkameriana*).

Είναι ένα φυσικό υβρίδιο της λεμονιάς. Η βολκαμεριάνα έχει μεγάλη ανεκτικότητα στα ασβεστώδη εδάφη και μέτρια ανεκτικότητα στο κρύο και την αλατότητα (Πρωτοπαπαδάκης, 2004 και Πρωτοπαπαδάκης, Αγγελάκης 1983).

1.3.10. Citranges Carrizo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*).

Είναι διγενερικά υβρίδια του *P. trifoliata* με την πορτοκαλιά. Η επίδραση του *P. trifoliata* είναι εμφανής στα citranges και αυτό φαίνεται από το τρίφυλλο των φύλλων τους, από την οξύτητα και στυφάδα των καρπών τους και από την ανθεκτικότητα των δένδρων στο ψύχος. Η επίδραση της πορτοκαλιάς φαίνεται από το αείφυλλο των δένδρων, αν και μερικά είναι ημιφυλλοβόλα, και από τη μεγαλύτερη ζωηρότητα τους. Το μεγάλο της μειονέκτημα είναι η ευαισθησία στο υοειδές exocortis (Πρωτοπαπαδάκης, 2004). Τα πιο γνωστά από τα Citranges είναι τα Troyer και Carrizo, τα C-32 και C-35, ενώ λιγότερο γνωστά είναι τα Rusk, Morton και Benton. Τα υβρίδια της ομάδας αυτής είχαν επιτυχία ως υποκείμενα, από τότε που tristeza εξαπλώθηκε.

Γενικώς τα Citranges δημιουργούν δένδρα μέσης έως ζωηρής ανάπτυξης, με υψηλή απόδοση (παραγωγή) και καρπούς καλής ποιότητας. Η ποιότητα των καρπών είναι όμοια με εκείνη όταν το υποκείμενο είναι νεραντζιά.

1.3.11. Citrumelos (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*).

Τα Citrumelos μοιάζουν με τα citranges. Απ'αυτά το Sacaton παράγει μεγάλο αριθμό σπόρων, που περιέχουν μόνο νουκελλικά έμβρυα και επομένως παράγουν της ίδιας γενετικής συστάσεως F1 σπορόφυτα σε μεγάλο αριθμό, ως το Troyer citrange (Πρωτοπαπαδάκης, Αγγελάκης 1983). Τα δένδρα χαρακτηρίζονται από το στενό ανάστημά τους με τους όμορφους κλάδους. Τα φύλλα τους είναι τρίφυλλα με ανοιχτό πράσινο χρώμα. Η αντοχή των citrumelos στις χαμηλές θερμοκρασίες υποδεικνύονται από τον Bernhard Voss περίπου μέχρι τους -15°C .

1.4. Πολυεμβρυονία-απόμειξη στα εσπεριδοειδή.

Πολυεμβρυονία είναι η δημιουργία δύο ή περισσότερων εμβρύων μέσα σε ένα σπέρμα και εξαρτάται από το είδος και την ποικιλία (Βασιλακάκης, 1996). Στα εσπεριδοειδή, τα υπεράριθμα έμβρυα παράγονται κατά δύο τρόπους: α. Από σωματικά κύτταρα του νούκελλου (απομικτικά έμβρυα τα οποία βρίσκονται έξω από τον εμβρυόσακκο) και β. Δια της παραγωγής δυο ή περισσότερων ζυγωτικών εμβρύων, είτε δια διαίρεσεως ενός γονιμοποιημένου ωοκυττάρου, ή από δύο ή περισσότερους λειτουργικούς εμβρυόσακκους σε μια σπερματική βλάστη (Ποντίκης, 1993). Έτσι οι περισσότερες πολυεμβρυονικές ποικιλίες θεωρούνται απομικτικές σε αντίθεση με τις μονοεμβρυονικές ποικιλίες που είναι ζυγωτικές (García, 1999).

Στα εσπεριδοειδή, ο πρώτος τρόπος παραγωγής εμβρύων σε ένα σπέρμα είναι ο πιο συνήθης. Τα έμβρυα σε ένα πολυεμβρυονικό σπέρμα διαφέρουν σε μέγεθος και σχήμα, ο δε μέσος όρος του αριθμού των παραγόμενων σποριόφυτων κατά σπέρμα συνήθως είναι πολύ μικρότερος από το σύνολο των εμβρύων (Ποντίκης, 1993). Μετά την σπορά των πολυεμβρυονικών σπερμάτων, φυτρώνουν μερικά από τα έμβρυα και συνήθως μόνο τα μεγαλύτερα (εκτός αν γίνει τεχνητή καλλιέργεια σε θρεπτικό υγρό, για να φυτρώσουν όλα) αλλά τα ζυγωτικά δεν είναι κατά ανάγκη τα μεγαλύτερα. Αυτό οφείλεται στο ότι τα ζυγωτικά έμβρυα αναπτύσσονται με βραδύτερο ρυθμό από τ'απομικτικά και έτσι δεν προλαβαίνουν να γίνουν αρκετά μεγάλα (ανώνυμος).

Αλλά σε μία εργασία που έκανε ο Γάλλος Κασέν (Cassin) στο Μαρόκο, βρήκε μέσον όρο εμβρύων κατά σπέρμα νεραντζιάς μόνο 1,38. Άρα, μεγάλο ποσοστό από τα σπέρματα της νεραντζιάς είναι μονοεμβρυονικά. Όμως το 85% των σποριόφυτων της

νεραντζιάς είναι απομικτικής προέλευσης. Κι' αυτό δεν εξηγείται παρά αν παραδεχτούμε ότι, τα μονοεμβρυονικά αυτά σπέρματα περιέχουν μόνο απομικτικά έμβρυα και ότι το ζυγωτικό τους πυρώθηκα ή απορροφήθηκε (ανώνυμος). Γι' αυτό με επιμελημένη διαλογή των ισχυρότερων και τυπικότερων σποριόφυτων, μπορούμε να έχουμε τελείως ομοιόμορφα υποκείμενα για μπόλιασμα.

Υπάρχουν τρεις τρόποι για την δημιουργία των απομικτικών εμβρύων, η σποροφυτική απόμιξη όπου τα έμβρυα δημιουργούνται απευθείας από τα σποροφυτικά κύτταρα (νουκελλικά κύτταρα) τα οποία βρίσκονται έξω από τον εμβρυόσακκο, σε αντίθεση με τους άλλους δύο τρόπους την διπλοσπορία και την αποσπορία όπου εμπλέκονται στις τροποποιήσεις της θηλυκής γαμετοφυτικής επέκτασης και περιγράφονται ως γαμετοφυτική απόμιξη (Spielman, 2003). Πολλά μέλη του γένους *Citrus* και μερικοί κοντινοί συγγενείς που ανήκουν στην οικογένεια Rutaceae παράγουν απομικτικά έμβρυα μέσω των νουκελλικών κυττάρων (σποροφυτική απόμιξη) (Garcia, 1999).

Τα νουκελλικά έμβρυα (απομικτικά) προέρχονται από κυτταροδιαίρεσεις που γίνονται μέσα στον σπερματικό πυρήνα (νούκελλο), καθώς ο υπόλοιπος σπερματικός πυρήνας και το ενδοσπέρμιο απορροφούνται από αυτά, βρίσκονται τελικά όλα, μαζί με το ζυγωτικό, μέσα στα περιβλήματα (σπέρμα) (ανώνυμος).

Καθώς τα νουκελλικά έμβρυα δημιουργούνται χωρίς σύζευξη ανδρικού με θηλυκού γαμέτη, αλλά από μιτωτική διαίρεση των νουκελλικών κυττάρων όπου οι αρσενικοί γαμέτες δεν λαμβάνουν μέρος στην δημιουργία τους, τα νουκελλικά σποριόφυτα είναι γενετικά ταυτόσημα με το μητρικό φυτό (Garcia, 1999).

1.5. Σημασία της απόμιξης στην καλλιέργεια των εσπεριδοειδών.

Η απόμιξη μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στην βελτίωση των φυτών, ένας από αυτούς είναι η παραγωγή σπόρων υβριδίων. Η παραγωγή υβριδίων είναι πολύ πολύπλοκη και πολυέξοδη, για τον λόγο ότι απαιτεί πολλές διασταυρώσεις κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (Grimanelli, 2001). Η χρήση της απόμιξης μπορεί να μειώσει το κόστος της παραγωγής σπόρων και να επιτρέψει στους καλλιεργητές να αποθηκεύσουν σπόρους από την καλλιέργεια των υβριδίων για την επόμενη καλλιεργητική περίοδο και

να διατηρήσουν τα πλεονεκτήματα των υβριδίων που κανονικά χάνονται στην επόμενη γενιά λόγω της διάσχισης των γονιδίων (Grimanelli, 2001).

Τα νουκελλικά έμβρυα έχουν πολύ σημαντικές συνέπειες για την εξέλιξη, την αναπαραγωγή και την καλλιέργεια των εσπεριδοειδών. Η διάδοση των υποκειμένων των εσπεριδοειδών εξαρτάται από την παραγωγή κλωνικών φυτών από τα νουκελλικά σπορόφυτα. Οι περισσότερες ποικιλίες υποκειμένων που χρησιμοποιούνται είναι πολυεμβρυονικές και παράγουν σπόρους που περιέχουν νουκελλικά και ζυγωτικά έμβρυα (García, 1999). Αν οι εμβολιασμοί των φυτών γίνουν σε υποκείμενα που προέρχονται από τα ζυγωτικά σποριόφυτα τότε ίσως να επηρεάσουν την απόδοση τους. Έτσι, σε ένα πρόγραμμα παραγωγής υποκειμένων, θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη η παραγωγή υποκειμένων από απομικτικούς σπόρους (García, 1999).

Στα εσπεριδοειδή, ο αγενής πολλαπλασιασμός θα μπορούσε να γίνεται με σπορά για την παραγωγή κλωνικών φυτών, τα οποία δεν θα είναι φορείς ιώσεων, και αυτό πραγματοποιείται με την καλλιέργεια των απομικτικών εμβρύων. Αυτό, για τους γενετιστές, είναι ένας στόχος (απραγματοποίητος μέχρι τώρα) που ασχολούνται με τα άλλα οπωροφόρα (ανώνυμος).

Το κύριο πρόβλημα, το οποίο περιορίζει αυτή την προοπτική, είναι ότι τα σπορόφυτα που βρίσκονται σε νεαρό στάδιο είναι πολύ δύσκολο αν όχι αδύνατο να τα ξεχωρίσουμε μακροσκοπικά σε γαμικά ή απομικτικά. Μόνο στην περίπτωση που ένας από τους δύο γονείς είναι *Poncirus trifoliata* (τρίφυλλη πορτοκαλιά) τότε και μόνο διακρίνουμε αν ένα από τα φυτά που θα αναπτυχθούν είναι γαμικό, δεδομένου ότι θα έχει φύλλο σύνθετο (Πετούσης, 2002). Έτσι πολύ φυτωριούχοι εκμεταλλεζόμενοι την ιδιότητα των απομικτικών σπερμάτων να δίδουν ομοιόμορφα φυτά τόσο μεταξύ τους όσο και με το μητρικό φυτό, τα καλλιεργούσαν με αποτέλεσμα όμως να υπήρχαν φυτά τόσο στο φυτώριο όσο και στο χωράφι αργότερα, άλλοτε σε μεγαλύτερο και άλλοτε σε μικρότερο ποσοστό που ήταν ανομοιόμορφα (Πετούσης, 2002).

Από την άλλη οι μοριακοί δείκτες είναι αρκετά επαρκείς και δυναμικό εργαλείο στη διασταύρωση των φυτών αφού επιτρέπουν την γενετική ανάλυση των ποσοτικών χαρακτηριστικών και την προεπιλογή των επιθυμητών γονοτύπων (García, 1999). Ο Lugo (1995) χρησιμοποίησε την τεχνική των μικροδορυφόρων για την αναγνώριση των

ζυγωτικών από τα απομικτικά σποριόφυτα των οποίων μητρικό φυτό ήταν το *C. volkammeriana*.

Αν η μοριακή γνώση των γονιδίων που εμπλέκονται στην έναρξη και το έλεγχο της απόμιξης ήταν διαθέσιμη, τότε θα μπορούσαμε να τα μεταφέρουμε, στις καλλιέργειες που μας ενδιαφέρουν, μέσω μοριακού μετασχηματισμού (García, 1999).

1.6. Μοριακοί δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ταξινόμηση των εσπεριδοειδών.

Στο παρελθόν οι μελέτες που αφορούσαν τις φυλογενετικές σχέσεις εντός και μεταξύ του γένους και των ειδών των εσπεριδοειδών περιλάμβαναν μόνο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους (Nicolosi, 2000).

Την εποχή του 1970 άρχισαν να γίνονται οι πρώτες ταξινομήσεις με την χρήση βιοχημικών χαρακτηριστικών με τους Barrett και Rhodes καθώς και να εφαρμόζεται η μέθοδος των ισοενζύμων για την ταξινόμηση των εσπεριδοειδών (επισκόπηση στο Πρωτοπαπαδάκης, 2004).

Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές μέθοδοι ταξινόμησης των εσπεριδοειδών αλλά οι πιο σύγχρονες είναι αυτές της χρήσης μοριακών δεικτών. Οι μοριακοί δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί στη ταξινόμηση των εσπεριδοειδών κατά την Moore 2001 είναι :

- Η επαναλαμβανόμενη απλή ακολουθία (ISSR): Ενίσχυση PCR του DNA χρησιμοποιώντας ένα μόνο εκκινητή που αποτελείται από μια ακολουθία μικροδορυφόρων όπως ο (CA)₈ που προσφύεται στο 5' ή στο 3' άκρο από δύο ή τέσσερα αυθαίρετα νουκλεοτίδια.
- Οι μικροδορυφόροι (SSR): Σύντομες επαναλαμβανόμενες ακολουθίες νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται είτε ραδιενεργά σημασμένοι για την υβριδοποίηση τους με το περιορισμένο DNA εσπεριδοειδών είτε ως χωριστοί εκκινητές στην αντίδραση της PCR.
- Οι τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD): Παραγωγή ενός χαρακτηριστικά κυρίαρχου δείκτη μέσω της χρήσης ενός απλού, δεκαμερούς, τυχαία υβριδίζοντος εκκινητή σε μια απλή αντίδραση PCR.

- Ο πολυμορφισμός μήκους περιορισμένων τμημάτων DNA (RLFP): Διαφορές στο μέγεθος των ζωνών μετά από την κοπή του DNA με ένα συγκεκριμένο ένζυμο περιορισμού, ηλεκτροφόρηση και υβριδοποίηση σε μεμβράνη με έναν συγκεκριμένο ιχνηλάτη.
- Ενισχυμένη περιοχή χαρακτηρισμένης ακολουθίας (SCAR): Μια απλή πολυμορφική ζώνη, που ενισχύεται από συγκεκριμένους εκκινητές. Προέρχεται από μετατροπή δεικτών RAPD ή AFLP.

Σε κάθε περίπτωση η ταξινόμηση των εσπεριδοειδών είναι πολύπλοκη, αμφισβητούμενη και σε κατάσταση αμφιβολίας, κυρίως λόγω της σεξουαλικής συμβατότητας ανάμεσα στα εσπεριδοειδή και τα συγγενή γένη, της υψηλής συχνότητας των μεταλλαγών στους οφθαλμούς, της μεγάλης ιστορίας της καλλιέργειας και της ευρείας διασπορά τους (Nicolosi, 2000). Ο Scora (1975) και οι Barrett και Rhodes (1976) υποστήριξαν ότι υπάρχουν μόνο τρία βασικά είδη εσπεριδοειδών μέσα στο υπογένος των εσπεριδοειδών τα *C. medica*, *C. reticulata* και *C. maxima* καθώς τα υπόλοιπα είδη μέσα στο υπογένος ισχυρίζονται ότι προέρχονται από διασταυρώσεις ανάμεσα σ'αυτά τα τρία είδη ή μεταξύ αυτών και των ειδών του υπογένους *Papeda* (Federici, 1998). Κατά τον Nicolosi (2000) ο Scora πρόσθεσε αργότερα ένα ακόμα βασικό είδος το *C. halimii*.

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότεροι ερευνητές χρησιμοποιούν τους μοριακούς δείκτες για τον προσδιορισμό της φυλογενετικής και την γενετικής καταγωγή πολλών φυτών συμπεριλαμβανομένων και των εσπεριδοειδών. Αρχικά οι μοριακοί δείκτες RAPD χρησιμοποιήθηκαν ευρέως για το λόγο ότι η τεχνική αυτή είναι πιο απλή και κοστίζει λιγότερο απ'ότι η τεχνική των RFLPs (Nicolosi, 2000). Ο Federici (1998) χρησιμοποίησε δείκτες RAPD σε συνδυασμό με δείκτες RLFP για τον προσδιορισμό της φυλογενετικής σχέσης ανάμεσα στο γένος *Citrus* και συγγενών γενών. Ο Nicolosi (2000) χρησιμοποίησε διάφορους μοριακούς δείκτες (RAPD, RFLP και ανάλυση χλωροπλαστικού DNA) για τον προσδιορισμό της φυλογένεσης των εσπεριδοειδών και της γενετικής προέλευσης σημαντικών ειδών των εσπεριδοειδών. Πολλοί άλλοι ερευνητές έχουν ασχοληθεί με συγκεκριμένα είδη εσπεριδοειδών όπως ο Πρωτοπαπαδάκης (1998) που χρησιμοποίησε την τεχνική των ισοενζύμων για την άντληση πληροφοριών όσο αναφορά την γενετική ποικιλομορφία των

καλλιεργούμενων ειδών του *Citrus medica*, ο Matteo (1998) που χαρτογράφησε το γένωμα των *C. aurantium* και *C. latipes* με την χρήση των AFLP, RAPD και RFLP, ο Coletta (1998) για να μελετήσει την γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των μανταρινιών με RAPD καθώς και ο Breto (2001) για να διαφοροποιήσει τις ποικιλίες της Κλημεντίνης (*C. clementina*) με τη χρήση των RAPD, AFLP, ISSR και SSR. Επίσης μοριακοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν από τον Guo (2001) για τον μοριακό χαρακτηρισμό σωματικών υβριδίων των *C. reticulata* και *Poncirus trifoliata* χρησιμοποιώντας δείκτες RAPD και AFLP, καθώς και από τον Fu (2004) για την ανάλυση, μέσω δεικτών AFLP και PCR-RFLP, των σωματικών υβριδίων των *C. aurantium* και *Poncirus trifoliata*.

1.7. Δείκτες AFLP στα εσπεριδοειδή.

Ο πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA (amplified fragment length polymorphisms AFLP) είναι μια σχετικά νέα τεχνική μοριακής ταυτοποίησης που μπορεί να εφαρμοστεί σε DNA οποιασδήποτε πηγής ή πολυπλοκότητας (Blears, 1998). Αυτή η σχετικά νέα τεχνική ταυτοποίησης του DNA σχεδιάστηκε και εφαρμόστηκε από τον Vos (1995) και βασίζεται στη επιλεκτική PCR ενίσχυση τμημάτων που προκύπτουν από τη δράση περιοριστικών ενζύμων στο συνολικό γενωμικό DNA. Η τεχνική AFLP μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε δείγματα DNA συμπεριλαμβανομένων των DNA ανθρώπων, ζώων, φυτών και μικροβίων (Blears, 1998).

Οι μοριακοί δείκτες AFLP είναι μια τεχνική μοριακών αποτυπωμάτων DNA που εντοπίζει περιορισμένα τμήματα DNA, μοιάζει με την τεχνική RFLP, η ομοιότητα αυτή είναι και ο λόγος της ονομασίας AFLP, αλλά με την σημαντική διαφορά ότι αντί της υβριδοποίησης κατά Southern, στα AFLP, χρησιμοποιείται η ενίσχυση PCR για την ανίχνευση των τμημάτων περιορισμού (Vos, 1995). Ο Vos (1995) καταλήγει στα συμπεράσματα ότι η τεχνική AFLP παρέχει έναν αποδοτικό τρόπο έτσι ώστε να ενισχυθεί ταυτόχρονα μεγάλος αριθμός τμημάτων, τα ενισχυμένα τμήματα προέρχονται από τα τμήματα περιορισμού. Ο αριθμός των τμημάτων που αποκτήθηκαν αυξανόταν όσο αυξανόταν και το μέγεθος του γενώματος και αντιστοιχούσε με αυτό που

αναμενόταν θεωρητικά και τα εκλεκτικά νουκλεοτίδια στις άκρες των εκκινητών μείωσαν τον αριθμό των ζωνών ακριβώς όπως αναμενόταν.

Υπάρχει ένας εκτενής αριθμός εφαρμογών για αυτό το ουσιαστικά καθολικό σύστημα δεικτών όπως η ανάλυση των μοριακών αποτυπωμάτων DNA, η χαρτογράφηση του DNA καθώς και η διερεύνηση μικροοργανισμών.

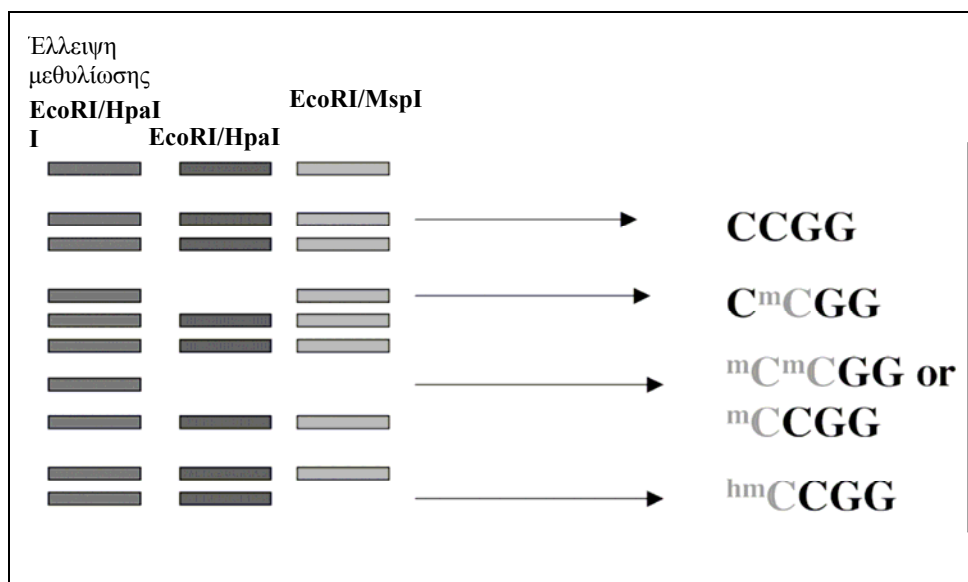
Στα εσπεριδοειδή, όπως προαναφέραμε στο παραπάνω κεφάλαιο, οι μοριακοί δείκτες AFLP σε συνδυασμό με άλλες μοριακές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή γενετικών χαρτών από τον Matteo (1998) ο οποίος μάλιστα αναφέρει ότι η τεχνική AFLP μέχρι τώρα είναι η πιο αποδοτική τεχνική για την παραγωγή πολυμορφικών δεικτών στα εσπεριδοειδή. Τα AFLP, επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί για διαφοροποίηση ποικιλιών από τον Breto (2001) ενώ από τους Guo (2001) και Fu (2004) έχουν χρησιμοποιηθεί για τον μοριακό χαρακτηρισμό σωματικών υβριδίων τα οποία παράχθηκαν από την σύντηξη πρωτοπλαστών εσπεριδοειδών.

Σ' αυτή την εργασία θα παρουσιάσουμε την τεχνική των AFLPs όπως την χρησιμοποιήσαμε για τον διαχωρισμό της καταγωγής υβριδίων εσπεριδοειδών που προέρχονται από τεχνητή διασταύρωση γνωστών ποικιλιών από τους γονείς που διασταυρώθηκαν καθώς και τον διαχωρισμό των ζυγωτικών από τα απομικτικά φυτά.

1.8. Μεθυλίωση.

Η μεθυλίωση του DNA είναι γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαριωτικούς οργανισμούς (Xiong, 1999). Επίσης η μεθυλίωση του DNA είναι ένα σημαντικό φαινόμενο διότι προκαλεί επιγενετικά και ματαλλαξογόνα φαινόμενα τα οποία προκαλούν διαφορετική γονιδιακή έκφραση, κυτταρική διαφοροποίηση, απενεργοποίηση της χρωματίνης, γονιδιακό αποτύπωμα και καρκινογένεσις Mingliang (2000). Σ' αυτή την εργασία χρησιμοποιήσαμε την ανάλυση MSAP (methylation sensitive amplification polymorphisms) η οποία είναι βασισμένη στην τεχνική AFLP. Η τεχνική αυτή ανιχνεύει διαφοροποιήσεις στην μεθυλίωση τμημάτων DNA μεταξύ των ειδών καθώς και του ποσοστού μεταφοράς του προτύπου της μεθυλίωσης από τους γονείς στα υβρίδια. Ένα συγκεκριμένο ερώτημα μεγάλου ενδιαφέροντος είναι το κατά πόσο στα απομικτικά σπορόφυτα έχει μεταφερθεί το πρότυπο μεθυλίωσης DNA της μητέρας.

Η μεθυλίωση του DNA, στους ευκαριωτικούς οργανισμούς, ειδικά αυτής της κιτοσίνης στη θέση 5 (5^mC) έχει ληφθεί υπό αξιολογούμενης προσοχής τα τελευταία χρόνια Xiong (1999). Η ανάλυση MSAP βασίζεται στα ισοσχιζομερή ένζυμα (HpaII και MspI) που διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους στη μεθυλίωση της αλληλουχίας αναγνώρισης τους. Βασισμένοι στο γεγονός ότι τα περισσότερα 5^mC απαντώνται στη αλληλουχία νουκλεοτιδίων CG, δύο περιοριστικά ένζυμα χρησιμοποιούνται τα HpaII και MspI για τον προσδιορισμό της μεθυλίωσης της κιτοσίνης. Και τα δύο ένζυμα αναγνωρίζουν την αλληλουχία 5'-CCGG-3' όμως το ένζυμο HpaII είναι ανενεργό στη περίπτωση όπου η μία ή και οι δύο κιτοσίνες είναι πλήρως μεθυλιωμένες ενώ το ένζυμο MspI διαχωρίζει την μεθυλίωση της δεύτερης κιτοσίνης (C^mCCGG) αλλά όχι της πρώτης (mCCGG) Echeverria (2001). Στον παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1) απεικονίζονται οι θεωρητικές ενισχύσεις σε αντιστοιχία με τη μεθυλίωση των τμημάτων CCGG.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της MSAP ανάλυσης δειγμάτων DNA (προσαρμογή από τον Baurens F.C. 2003).

1.9. Σκοπός της εργασίας

Μετά από γονιμοποίηση μερικών ειδών στα εσπεριδοειδή έχουμε παραγωγή τόσο νουκελλικών όσο και ζυγωτικών εμβρύων. Σε νεαρή ηλικία δεν είναι δυνατός ο διαχωρισμός μεταξύ τους με αποτέλεσμα ο φυτωριούχος να δεσμεύει πόρους μέχρι τα δένδρια να ξεπεράσουν την μακρά φάση νεανικότητας όπου και τελικά αρχίζουν να διαφοροποιούνται τα νουκελλικά από τα ζυγωτικά σπορόφυτα. Έτσι, η ταυτοποίηση τους βάση των μορφολογικών χαρακτηριστικών μπορεί να γίνει όταν τα φυτά έχουν ηλικία πάνω από 5-6 χρόνων και αρχίζουν να δίδουν παραγωγή. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να επιλυθεί με την γενετική ταυτοποίησή τους, σε μικρή ηλικία, με την χρήση των μοριακών δεικτών. Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να γνωρίζουμε από ποια έμβρυα προέρχονται τα σποριόφυτα (νουκελλικά ή ζυγωτικά) όταν αυτά βρίσκονται ακόμα στο σπορείο πριν φυτευτούν στην οριστική τους θέση στον αγρό.

Σ'αυτή την εργασία χρησιμοποιήσαμε τους μοριακούς δείκτες AFLP για να διαχωρίσουμε νουκελλικά από ζυγωτικά φυτά. Επίσης χρησιμοποιήσαμε την ίδια τεχνική για να εκτιμήσουμε την έκταση της μεταφοράς των αντιστοιχών γονικών γονιδιωμάτων από τους γονείς προς τα παιδιά (ξεχωριστά για τα ζυγωτικά και για τα νουκελλικά). Επίσης ένα άλλο ερώτημα που θα προσπαθήσουμε να απαντήσουμε είναι αν υπάρχει πλήρης ταύτιση του γενετικού αποτυπώματος του νουκελλικού απογόνου με το μητρικό γονέα. Τέλος θα κάνουμε μια πρώτη εκτίμηση στην αλλαγή της μεθυσίας κατά την διάρκεια των δυο διαφορετικών τρόπων αναπαραγωγής στα εσπεριδοειδή.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε 50 ατομικά δένδρα (δείγματα) εσπεριδοειδών τα οποία τα χωρίσαμε σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τους γονείς και τους απογόνους τους και στην οποία δεν γνωρίζαμε αν οι απόγονοι προέρχονται από ζυγωτικό ή νουκελλικό έμβρυο. Σ'αυτή την ομάδα η νεραντζιά ήταν το μητρικό δένδρο σε όλες τις διασταυρώσεις. Στη δεύτερη ομάδα έχει γίνει η αναγνώριση των ζυγωτικών και των νουκελλικών παιδιών βάση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών και είχαν ταυτοποιηθεί στην βάση του ισοένζυμικών τους χαρακτηριστικών από τον Δρ. Ευτύχιο Πρωτοπαπαδάκη. Σ'αυτή την ομάδα η νεραντζιά έχει το ρόλο του πατρικού φυτού ενώ δυο άλλα δένδρα χρησιμοποιήθηκαν σαν μητρικά. Όταν λήφθηκαν δείγματα προς ανάλυση όλα τα δένδρα-απόγονοι είχαν ηλικία άνω των δέκα ετών.

Στον Πίνακα 3 φαίνεται αναλυτικά ο βελτιωτικός σχεδιασμός από τον οποίο προήλθαν οι δύο ομάδες εσπεριδοειδών που χρησιμοποιήθηκαν στην τρέχουσα έρευνα.

Το υποκείμενο 12 είναι ένα τοπικό υποκείμενο που ανήκει στην ομάδα των *Citrus limonomedica*, ενώ το 1452 είναι το Citrumelo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*).

Πίνακας 3. Γονείς των εσπεριδοειδών που χρησιμοποιήσαμε και οι διασταυρώσεις τους.

Πρώτη ομάδα		
♀	♂	♀ X ♂
Νεραντζιά (Brazilian)	Πορτοκαλιά (Mariquito)	Νεραντζιά X Πορτοκαλιά N1
		Νεραντζιά X Πορτοκαλιά N2
		Νεραντζιά X Πορτοκαλιά N3
		Νεραντζιά X Πορτοκαλιά N4
		Νεραντζιά X Πορτοκαλιά N5
	Λεμονιά (var Zambetakis)	Νεραντζιά X Λεμονιά N1
		Νεραντζιά X Λεμονιά N2
	Carrizo	Νεραντζιά X Carrizo
		Νεραντζιά X Carrizo N22
	Κλημεντίνη (Marisol)	Νεραντζιά X Κλημεντίνη
		Νεραντζιά X Κλημεντίνη N1
	Σατσούμα	Νεραντζιά X Σατσούμα
	Κιτριά (Diamante)	Νεραντζιά X Κιτριά
	Λιμεττιά (Mexican)	Νεραντζιά X Lime
Βολκαμεριάνα	Νεραντζιά X Βολκαμεριάνα	
Περγαμόντο	Νεραντζιά X Περγαμόντο	
Citrumelo	Νεραντζιά X Citrumelo	
Δεύτερη ομάδα		
♀	♂	♀x♂
Υποκείμενο 12	Νεραντζιά	Νουκελλικό Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά N1
		Νουκελλικό Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά N2
		Νουκελλικό Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά N3
		Νουκελλικό Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά N4
		Ζυγωτικό Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά N1
		Ζυγωτικό Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά N2
		Ζυγωτικό Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά N3
		Ζυγωτικό Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά N4
		Ζυγωτικό Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά N5
		Ζυγωτικό Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά N6
1452		Νουκελλικό 1452 x Νεραντζιά N1
		Νουκελλικό 1452 x Νεραντζιά N2
		Νουκελλικό 1452 x Νεραντζιά N3
		Νουκελλικό 1452 x Νεραντζιά N4
		Ζυγωτικό 1452 x Νεραντζιά N1
		Ζυγωτικό 1452 x Νεραντζιά N2
	Ζυγωτικό 1452 x Νεραντζιά N3	
	Ζυγωτικό 1452 x Νεραντζιά N4	
	Ζυγωτικό 1452 x Νεραντζιά N5	

2. Υλικά και μέθοδοι.

2.1. Συλλογή και αποθήκευση φυτικού υλικού.

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήσαμε προέρχεται από το Ινστιτούτο Υποτροπικών Φυτών και Ελιάς στα Χανιά (Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.). Τα δένδρα ανήκουν στην Εθνική Συλλογή Πολλαπλασιαστικού Υλικού Εσπεριδοειδών που διατηρείται από τον Δρ Ε. Πρωτοπαπαδάκη.. Συλλέξαμε νεαρά (εκπτυσόμενα) φύλλα από υβρίδια εσπεριδοειδών τα οποία προήλθαν από τεχνητή γονιμοποίηση (βελτιωτής Δρ. Ε. Πρωτοπαπαδάκης) καθώς και από τα γονικά δένδρα. Αμέσως μετά την κοπή τα φύλλα βυθίστηκαν σε υγρό άζωτο, αφού πρώτα τα τυλίξαμε με αλουμινόχαρτο με επιγραφή, μέχρι την μεταφορά τους στο Ηράκλειο όπου τα αποθηκεύσαμε στους -80°C μέχρι να τα χρησιμοποιήσουμε για την εκχύλιση του DNA.

2.2. Υλικά και μέθοδος για την εκχύλιση του DNA.

Το ολικό γονιδιωματικό DNA από τα νεαρά φύλλα των εσπεριδοειδών εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας το Plant Mini Kit της QIAGEN ακολουθώντας το πρωτόκολλο της ίδιας εταιρίας. Τα δείγματα λειοτριβήθηκαν με την βοήθεια υγρού αζώτου σε γουδιά απολυμασμένα με αιθανόλη και αποστειρωμένα στον κλίβανο. Στην λιοτρίβηση χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα τι φορά και αφού είχαν αφαιρεθεί από τα νεαρά φύλλα το κεντρικό νεύρο και τυχών προσβολές από έντομα π.χ. προνύμφες φυλλοκνήστη. Το κρίσιμο σημείο στο στάδιο αυτό ήταν να μην ξεπαγώσει το φυτικό υλικό και για το λόγο αυτό η παροχή υγρού αζώτου ήταν συνεχείς (σε αντίθετη περίπτωση υπάρχει ενδεχόμενο αποικοδόμησης και συμπλοκοποίησης του γενωμικού DNA). Στη συνέχεια όταν ο ιστός είχε αλεστεί και δημιούργησε μια καλή ομογενή σκόνη ζυγίσαμε περίπου 100 mg από το κάθε δείγμα προσέχοντας και σ' αυτό το στάδιο να μην ξεπαγώσουν τα δείγματα μας. Ακολουθώντας το πρωτόκολλο της QIAGEN προχωρήσαμε στην εκχύλιση του DNA των δειγμάτων.

Μετά την εκχύλιση το DNA αναλύθηκε σε διαγνωστικό πήκτωμα αγαρόζης 0,8%. Χρησιμοποιήθηκαν 20 μl DNA από το κάθε δείγμα μαζί με 4 μl ρυθμιστικό διάλυμα (6%) για περίπου μια ώρα έτσι ώστε να διαπιστώσουμε αν το DNA των δειγμάτων μας είχε αποδομηθεί. Η ανάλυση αυτή κρίθηκε αναγκαία γιατί η επαναληψιμότητα των

δεικτών AFLP εξαρτάται από την ποιότητα του γονιδιωματικού DNA που χρησιμοποιείται.

2.3. Φθοριζομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιήθηκε στο φθοριζόμετρο FluorometerTD-700 χρησιμοποιώντας την χρωστική Hoechst 33258 και καμπύλη αναφοράς. Το φθοριζόμετρο ήταν προγραμματισμένο να αποδίδει την συγκέντρωση του DNA σε ng/μl. Για το προσδιορισμό της συγκέντρωσης χρησιμοποιήσαμε 1 μl DNA από κάθε δείγμα σε 99 μl διαλύματος (90 ml απιονισμένο νερό, 10 ml TAE και 10 μl Hoechst 33258).

2.4. Ανάλυση φθοριζόντων πολυμορφισμών μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA (fluorescent AFLP: fAFLP).

2.4.1. Πέψη του γενωμικού DNA.

Η πέψη του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε σε 150 ng DNA από κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας δύο περιοριστικά ένζυμα τα EcoRI και MseI.

Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 30 μl από τα οποία περιλάμβαναν 10x από το one-for-all-buffer [100 mM Tris-acetate (pH 7.5), 100 mM magnesium acetate και 500 mM potassium acetate] (Amersham), 4 U από το ένζυμο EcoRI (Pharmacia) και 4 U από το ένζυμο MseI (NewEngland BioLabs), ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώθηκε με αραιωμένο DNA των δειγμάτων με αραιώση ανάλογα την συγκέντρωση του DNA έτσι ώστε να έχουμε 150 ng DNA και απιονισμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί ο όγκος των 30 μl. Η πέψη πραγματοποιήθηκε στους 37 °C για δύο ώρες.

Το ένζυμο EcoRI είναι σπάνιας κοπής ενώ το ένζυμο MseI είναι συχνής κοπής για το λόγο ότι το ένζυμο MseI έχει ακολουθία αναγνώρισης TTAA την οποία συναντάμε πιο συχνά στο γονιδίωμα των ευκαριωτικών κυττάρων. Από τον συνδυασμό αυτών των ενζύμων παράγονται τρεις τύποι περιορισμένων τμημάτων:

- I. Τμήματα που κόβονται με το περιοριστικό ένζυμο σπάνιας κοπής EcoRI και στις δύο άκρες (EcoRI-EcoRI).

II. Τμήματα που κόβονται με το περιοριστικό ένζυμο συχνής κοπής MseI και στις δύο άκρες (MseI-MseI).

III. Τμήματα που έχουν κοπεί από το σπάνιας EcoRI κοπής και από το συχνής κοπής MseI περιοριστικό ένζυμο (EcoRI-MseI).

Περισσότερο από το 90% των τμημάτων αναμένονται να έχουν κοπή και στις δύο άκρες από το περιοριστικό ένζυμο συχνής κοπής MseI, τα τμήματα EcoRI-MseI θα είναι περίπου διπλάσια από αυτά των EcoRI-EcoRI (Vos 1995).

2.4.2. Λιγοποίηση (μάτισμα) των προσαρμοστών.

Χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικούς δίκλωνους προσαρμοστές οι οποίοι σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να αποφύγουμε την αναδημιουργία των περιορισμένων περιοχών, ένα για τα κολλώδη άκρα του EcoRI και ένα άλλο για τα κολλώδη άκρα του MseI. Ο προσαρμοστής του EcoRI αποτελείται από το συνδυασμό δύο ολιγονουκλετιδίων: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' και 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5' και ο προσαρμοστής του MseI αποτελείται και αυτός από άλλα δύο ολιγονουκλεοτίδια τα οποία είναι: 5'-TACTCAGGACTCAT-3' και 3'-GAGTCCTGAGTAGCAG-5'.

Αυτούς τους δύο δίκλωνους προσαρμοστές τους επιδέσαμε στα κολλώδη άκρα των τμημάτων περιορισμού με την λιγάση DNA T4 προσθέτοντας στα προϊόντα της πέψης 10μl του μίγματος που περιείχε 5μM του EcoRI προσαρμοστή, 50μM του MseI προσαρμοστή, 100mM ATP, 10x one for all buffer (Amersham), 1U DNA T4 λιγάση (New England BioLabs) και απιονισμένο νερό μέχρι τον όγκο των 10μl. Η αντίδραση της λιγοποίησης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37⁰C για τρεις ώρες και αμέσως μετά στους 65 ⁰C για πέντε λεπτά έτσι ώστε να σταματήσει η δράση της λιγάσης. Τα προϊόντα της λιγοποίησης αραιώθηκαν προσθέτοντας 160 μl TE στη κάθε αντίδραση (αραιώση1:5) και τα αποθηκεύσαμε στους -20 ⁰C.

Η λιγοποίηση (επίδεση) δεν αποκαθιστά την αρχική ενζυμική περιοχή περιορισμού αλλά λόγω της αλλαγής των βάσεων ενσωματώνεται η ακολουθία των προσαρμοστών, αυτή η αλλαγή στην περιοχή αναγνώρισης αποτρέπει την κοπή μετά την δράση της

λιγάνσης, επιτρέποντας στις αντιδράσεις περιορισμού και λιγοποίησης να εκτελεστούν στον ίδιο σωλήνα (Blears 1998).

2.4.3. Προ-επιλεκτική ενίσχυση (PCR).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε στην τεχνική AFLP, για την προ-επιλεκτική ενίσχυση, αποτελούνται από τρία τμήματα ακολουθιών DNA. Πρώτο την περιοχή στο 5' άκρο που είναι συμπληρωματική στον προσαρμοστή, δεύτερο την ακολουθία των περιοχών περιορισμού και τρίτο ένα επιλεκτικό νουκλεοτίδιο στο 3' άκρο το οποίο για τον εκκινητή EcoRI είναι το A και για τον εκκινητή MseI είναι το C. Με αυτή την προ-επιλεκτική ενίσχυση θα ενισχυθεί μόνο ένα υποσύνολο των τμημάτων αυτών δηλαδή αυτά που θα έχουν πέρα από την περιοχή περιορισμού το επιπλέον επιλεκτικό νουκλεοτίδιο.

Αυτό το στάδιο βασίζεται στην αντίδραση της PCR χρησιμοποιώντας τους προαναφερόμενους εκκινητές, ενισχύοντας μόνο τα επιθυμητά τμήματα που θα φέρουν το επιπλέον νουκλεοτίδιο. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε 20 μl τα οποία περιείχαν 10x Red Taq DNA polymerase buffer, 25 mM MgCl₂, 10mM dNTPs (New England BioLabs), 0,6 μl εκκινητή EcoRI+A 50ng/μl, 0,6 μl εκκινητή MseI+C 50ng/μl, 1U Red Taq Polymerase, 5μl από το περιορισμένο και λιγοποιημένο DNA και απιονισμένο νερό μέχρι τον όγκο των 20 μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε μηχανή PCR της Perkin Elmer (9600 thermocycler) στους 94⁰C για 30 δευτερόλεπτα, για 23 κύκλους στους 94⁰C για 30 δευτερόλεπτα, στους 56⁰C για 30 δευτερόλεπτα και στους 72⁰C για 60 δευτερόλεπτα τέλος στους 72⁰C για 300 δευτερόλεπτα. Από τα 20 μl της αντίδρασης αναλύσαμε τα 5 μl σε διαγνωστικό πήκτωμα αγαρόζης 1.25% έτσι ώστε να διαπιστώσουμε αν είχαμε προϊόντα ενίσχυσης. Τα υπόλοιπα 15 μl της αντίδρασης τα αραιώσαμε 10 φορές με 0.1x TE και τα αποθηκεύσαμε στους -20 ⁰C.

Η προ-επιλεκτική ενίσχυση μειώνει τη γενική πολυπλοκότητα του μίγματος μέχρι 16 φορές, επιτρέποντας στην επιθυμητή ακολουθία να γίνει κυρίαρχη στο μίγμα (Blears 1998).

2.4.4. Επιλεκτική ενίσχυση (PCR).

Για την επιλεκτική ενίσχυση χρησιμοποιήθηκαν δύο συνδυασμοί εκκινητών οι οποίοι πέρα από την συμπληρωματικότητα τους στο προσαρμοστή και την περιοχή περιορισμού περιέχουν και τρία επιπλέον νουκλεοτίδια στο 3' άκρο τους. Για τον εκκινητή EcoRI χρησιμοποιήσαμε τα επιλεκτικά νουκλεοτίδια AGC και για τους δύο συνδυασμούς εκκινητών ενώ για τον εκκινητή MseI χρησιμοποιήσαμε τα CAG για τον πρώτο συνδυασμό και CCA για τον δεύτερο συνδυασμό. Έτσι θα ενισχυθούν μόνο τα τμήματα που θα έχουν αυτά τα επιπλέον νουκλεοτίδια. Επιπλέον ο εκκινητής EcoRI+AGC ήταν σημασμένος με την φθορίζουσα ουσία IRDye800. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε 20 μl τα οποία περιείχαν 10x Red Taq DNA polymerase buffer, 25 mM MgCl₂, 10mM dNTPs (New England BioLabs), 0,1 μl εκκινητή EcoRI+AGC 50ng/μl, 0,6 μl εκκινητή MseI+(CAG και CCA) 50ng/μl, 1U Red Taq Polymerase, 5μl από την προ-επιλεκτική ενίσχυση και απιονισμένο νερό μέχρι τον όγκο των 20 μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στο PCR μηχάνημα της Perkin Elmer 9600 thermocycler όπως περιγράφεται στο άρθρο του Vos (1995).

Από τα 20 μl της αντίδρασης αναλύθηκαν τα 5 μl σε διαγνωστικό πήκτωμα αγαρόζης 1,25% για να ελεγχθεί εάν υπήρχαν προϊόντα ενίσχυσης.

Αν και τα τμήματα που κόβονται μόνο από το συχνό περιοριστικό ένζυμο (π.χ. τμήματα MseI-MseI) είναι τα κυρίαρχα είδη (> 90%), τελικά ενισχύονται κατά προτίμηση τα τμήματα που έχουν κοπεί και από τα δύο ένζυμα (δηλ. τμήματα EcoRI-MseI). Υπάρχουν δύο λόγοι για αυτή την αποδοτικότητα: (I) Ο εκκινητής που είναι συμπληρωματικός στη σπάνια περιοχή περιορισμού και στον αντίστοιχο προσαρμογέα (δηλαδή εκκινητής EcoRI) έχει υψηλότερη θερμοκρασία υβριδισμού από τον εκκινητή του συχνού περιοριστικού ενζύμου (δηλαδή του εκκινητή MseI) και (II) τα τμήματα που έχουν κοπεί και από τα δύο ένζυμα (δηλαδή εκκινητές EcoRI-MseI) ενισχύονται χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικούς εκκινητές (δηλαδή εκκινητές MseI και EcoRI) που αποτρέπει το σχηματισμό επαναλήψεων στις άκρες. Η ένωση της βάσης στα άκρα των τμημάτων διαμορφώνει μια δομή μίσχος-βρόχος που ανταγωνίζεται με την υβριδοποίηση των εκκινητών. Οι περισσότερες τεχνικές πέψης περιορισμού παράγουν τέτοια πολύ σύνθετα πρότυπα όπου οι διαφορές τους δεν μπορούν

να διακριθούν (λόγω του πολύ μεγάλου αριθμού των τμημάτων περιορισμού). Εντούτοις, με την αύξηση της αποδοτικότητας του συμπληρωματικού εκκινητή στο σπάνιο περιοριστικό τμήμα, μόνο ένα μικρό υποσύνολο των τμημάτων (< 10%) ενισχύεται αποτελεσματικά (δηλ. μόνο τα τμήματα EcoRI-MseI) έτσι ώστε να αποκαλυφθεί ο πολυμορφισμός.

2.4.5. Ανάλυση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Για την τελική ανάλυση των AFLP στα 15 μl του μίγματος της επιλεκτικής ενίσχυσης προσθέσαμε τον ίδιο όγκο βαφής φορμαμίδης και στη συνέχεια τα αφήσαμε σε θερμοκρασία 94°C για τρία λεπτά για να μετουσιωθούν. Έτσι αποτρέπεται ο σχηματισμός των διπλών ζωνών στο πήκτωμα λόγω της άνισης κινητικότητας των δύο κλώνων των ενισχυμένων τμημάτων, έτσι μόνο το ένα σκέλος αναλύεται. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης (8%) αναλύεται στο Εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) στον αυτοποιημένο αλληλουχητή της Li-Cor IR2. Το πήκτωμα έτρεξε σε 1x TBE με σταθερές συνθήκες 40 W, 40 mA και στα 1500 V για τρεις ώρες. Τόσο η διαχείριση της ηλεκτροφόρησης όσο και η συλλογή της εικόνας του πηκτώματος διαχειρίζονται μέσω του λογισμικού της Licor Eseq.

2.5. MSAP Ανάλυση (Methylation-sensitive amplification polymorphism).

Η ανάλυση της μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκε μόνο στα δείγματα της δεύτερης ομάδας. Η μέθοδος αυτή προσαρμόστηκε στις δικές μας απαιτήσεις βάση του πρωτοκόλλου που χρησιμοποίησε η Cervera (2002). Κάθε δείγμα, αναλύθηκε χρησιμοποιώντας δύο συνδυασμούς περιοριστικών ενζύμων την φορά, τα EcoRI/HpaII και EcoRI/MspI. Η πέψη πραγματοποιήθηκε με 150 ng DNA με τα ένζυμα EcoRI και HpaII σε όγκο 30 μl από τα οποία περιλαμβάνονται 10x από το one for all buffer, 4 U του ενζύμου EcoRI και 3 U του ενζύμου HpaII για δύο ώρες στους 37 °C. Η πέψη με το δεύτερο συνδυασμό περιοριστικών ενζύμων πραγματοποιήθηκε ακριβώς με τον ίδιο τρόπο με την διαφορά ότι στη θέση του ενζύμου HpaII χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο MspI (3 U).

Αμέσως μετά την πέψη προχωρήσαμε κατευθείαν στην λιγοποίηση όπου χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικούς δίκλωνους προσαρμοστές ,για να αποφύγουμε την αναδημιουργία των περιορισμένων περιοχών, ο πρώτος προσδενόταν στα κολλώδη άκρα του EcoRI και ο δεύτερος στα κολλώδη άκρα των HpaII/MspI. Ο προσαρμοστής του EcoRI αποτελείται από το συνδυασμό δύο ολιγονουκλεοτιδίων: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' και 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5' και ο προσαρμοστής των HpaII/MspI αποτελείται και αυτός από άλλα δύο ολιγονουκλεοτιδία τα οποία είναι: 5'-GACGATGAGTCTCGAT-3' και 3'-TACTCAGAGCTAGC-5'. Αυτούς τους δύο δίκλωνους προσαρμοστές τους επιδέσαμε στα κολλώδη άκρα των τμημάτων περιορισμού με την λιγάση DNA T4 προσθέτοντας στα προϊόντα της πέψης 10 μl του μίγματος που περιείχε 5 μM του EcoRI προσαρμοστή, 50μM των HpaII/MspI προσαρμοστή, 100 mM ATP, 10x one for all buffer, 1 U DNA T4 λιγάση και απιονισμένο νερό μέχρι τον όγκο των 10μl. Η αντίδραση της λιγοποίησης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37⁰C για τρεις ώρες και αμέσως μετά στους 65 ⁰C για πέντε λεπτά έτσι ώστε να σταματήσει η δράση της λιγάσης. Τα προϊόντα της λιγοποίησης αραιώθηκαν προσθέτοντας 160 μl 0.1x TE στη κάθε αντίδραση (αραιώση1:5) και αποθηκεύτηκαν στους -20 ⁰C.

Για την προ-επιλεκτική ενίσχυση χρησιμοποιήσαμε ένα μίγμα το οποίο περιείχε 5μl από το περιορισμένο και λιγοποιημένο DNA, 10x Red Taq DNA polymerase buffer, 25 mM MgCl₂, 10mM dNTPs, 0,6 μl εκκινητή EcoRI+A 50ng/μl, 0,6 μl εκκινητή HpaII/MspI+A 50ng/μl, 1U Red Taq Polymerase και απιονισμένο νερό μέχρι τον όγκο των 20 μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στην μηχανή PCR της Perkin Elmer 9600 thermocycler στους 94⁰C για 30 δευτερόλεπτα, για 23 κύκλους στους 94⁰C για 30 δευτερόλεπτα, στους 56⁰C για 30 δευτερόλεπτα και στους 72⁰C για 60 δευτερόλεπτα τέλος στους 72⁰C για 300 δευτερόλεπτα. Από τα 20 μl της αντίδρασης αναλύθηκαν τα 5 μl σε διαγνωστικό πήκτωμα αγαρόζης 1.25% έτσι ώστε να διαπιστώσουμε αν είχαμε προϊόντα από την αντίδραση. Στη συνέχεια αραιώσαμε τα προϊόντα της PCR 10 φορές με 0,1x TE.

Για την επιλεκτική ενίσχυση χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικούς εκκινητές ο ένας για τον προσαρμοστή του EcoRI και ο άλλος για τον προσαρμοστή των HpaII/MspI. Για τον εκκινητή του EcoRI χρησιμοποιήσαμε τρία επιπλέον νουκλεοτιδία τα AGC και

για τον εκκινητή των HpaII/MspI χρησιμοποιήσαμε επίσης τρία επιπλέον νουκλεοτίδια τα AAT. Ο εκκινητής του EcoRI+AGC ήταν σημασμένος με την φθορίζουσα ουσία IRDye800. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε 20 μl τα οποία περιείχαν 10x Red Taq DNA polymerase buffer, 25 mM MgCl₂, 10mM dNTPs, 0,1 μl εκκινητή EcoRI+AGC 50ng/μl, 0,6 μl εκκινητή HpaII/MspI+AAT 50ng/μl, 1U Red Taq Polymerase, 5μl από την προ-επιλεκτική ενίσχυση και απιονισμένο νερό μέχρι τον όγκο των 20 μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στην μηχανή PCR της Perkin Elmer 9600 thermocycler όπως περιγράφεται στο άρθρο του Vos (1995). Από τα 20 μl της αντίδρασης αναλύθηκαν τα 5 μl σε διαγνωστικό πήκτωμα αγαρόζης 1,25% για να διαπιστώσουμε αν έχουμε προϊόντα από την αντίδραση της PCR.

Στα 15 μl του μίγματος της επιλεκτικής ενίσχυσης προσθέσαμε τον ίδιο όγκο βαφής φορμαμίδης και στη συνέχεια τα αφήσαμε σε θερμοκρασία 94⁰C για τρία λεπτά για να μετουσιωθούν. Η τελική ανάλυση των methylation sensitive AFLP έγινε όπως και για τα κλασσικά AFLP.

2.6. Ανάλυση δεδομένων.

Τα δεδομένα των αποτελεσμάτων της τεχνικής AFLP και της ανάλυσης MSAP συλλέχθηκαν και καταγράφηκαν κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρισης υπό την μορφή εικόνας TIFF στο Εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ). Η επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας Ηρακλείου. Τα ενισχυμένα τμήματα των AFLP και MSAP καταγράφηκαν σαν παρόντα (1) ή απόντα (0) και αποθηκεύτηκαν σε μια μήτρα δυαδικών δεδομένων. Βάση αυτής της μήτρας δημιουργήσαμε το δένδρογραμμα συγγένειας των ειδών που χρησιμοποιήσαμε ως γονείς μη περιλαμβάνοντας τους απογόνους της F1 γενιάς. Για τον διαχωρισμό των νουκελλικών από τους ζυγωτικούς απογόνους προσμετρήσαμε τους πολυμορφισμούς εντός κάθε οικογένειας ξεχωριστά (μητρικό, πατρικό δένδρο και απόγονοι F1 γενιάς).

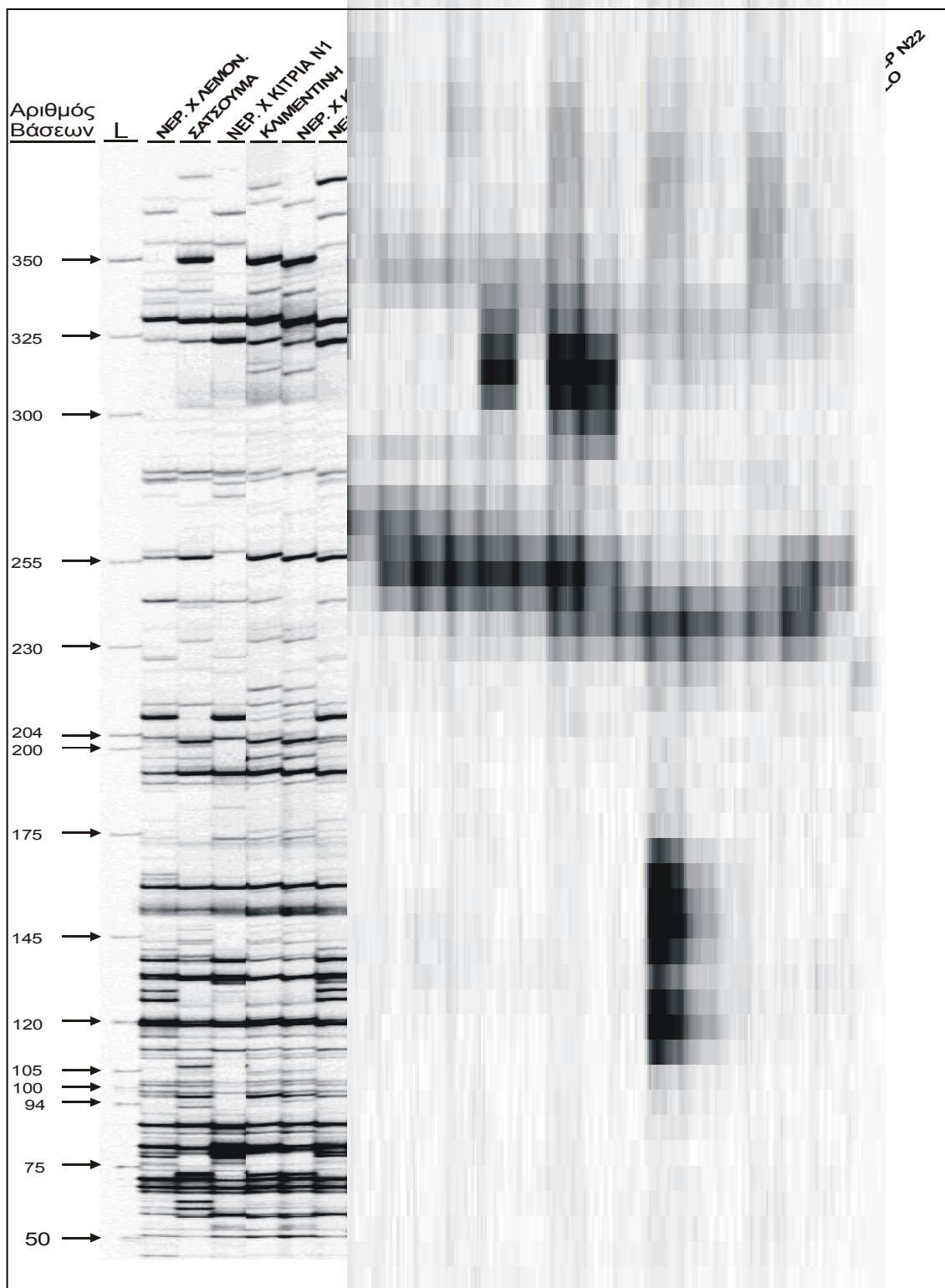
3. Αποτελέσματα.

3.1. Προσδιορισμός των γενετικών σχέσεων των γονέων.

Για τον προσδιορισμό της γενετικής καταγωγής των εσπεριδοειδών χρησιμοποιήσαμε δύο συνδυασμούς εκκινητών (E+AGC/M+CAG και E+AGC/M+CCA) οι οποίοι αποκάλυψαν 97 συνολικούς μοριακούς τύπους AFLP από τους οποίους προσμετρήσαμε 56 ισχυρούς πολυμορφικούς τύπους AFLP. Το μέγεθος των τύπων AFLP που προσμετρήσαμε κυμαίνονται από 50 έως 400 bp. Η Εικόνα 2 παρουσιάζει μια αντιπροσωπευτική εικόνα πηκτώματος πολυακρυλαμίδης ορισμένων ατόμων που ενισχύθηκαν με το συνδυασμό εκκινητών E+AGC/M+CAG.

Το επί τοις εκατό ποσοστό των πολυμορφικών τύπων AFLP (σε σχέση με τους συνολικούς τύπους που έδωσαν και οι δύο συνδυασμοί εκκινητών) είναι 57,7%. Το μεγαλύτερο ποσοστό πολυμορφικών τύπων το παρουσιάζει ο συνδυασμός εκκινητών E+AGC/M+CCA με 59,2% ενώ ο συνδυασμός εκκινητών E+AGC/M+CAG έχει 56,2%.

Βρέθηκαν μερικά τμήματα που ήταν εξειδικευμένα σε ορισμένα είδη μεταξύ μόνο των γονέων (δηλ. παρουσιάστηκαν μόνο σε έναν από αυτούς). Τα εξειδικευμένα (μοναδικά) αυτά ενισχυμένα τμήματα βρέθηκαν μόνο στο συνδυασμό εκκινητών E+AGC/M+CCA. Τα είδη αυτά είναι τα Υποκείμενο 12 με

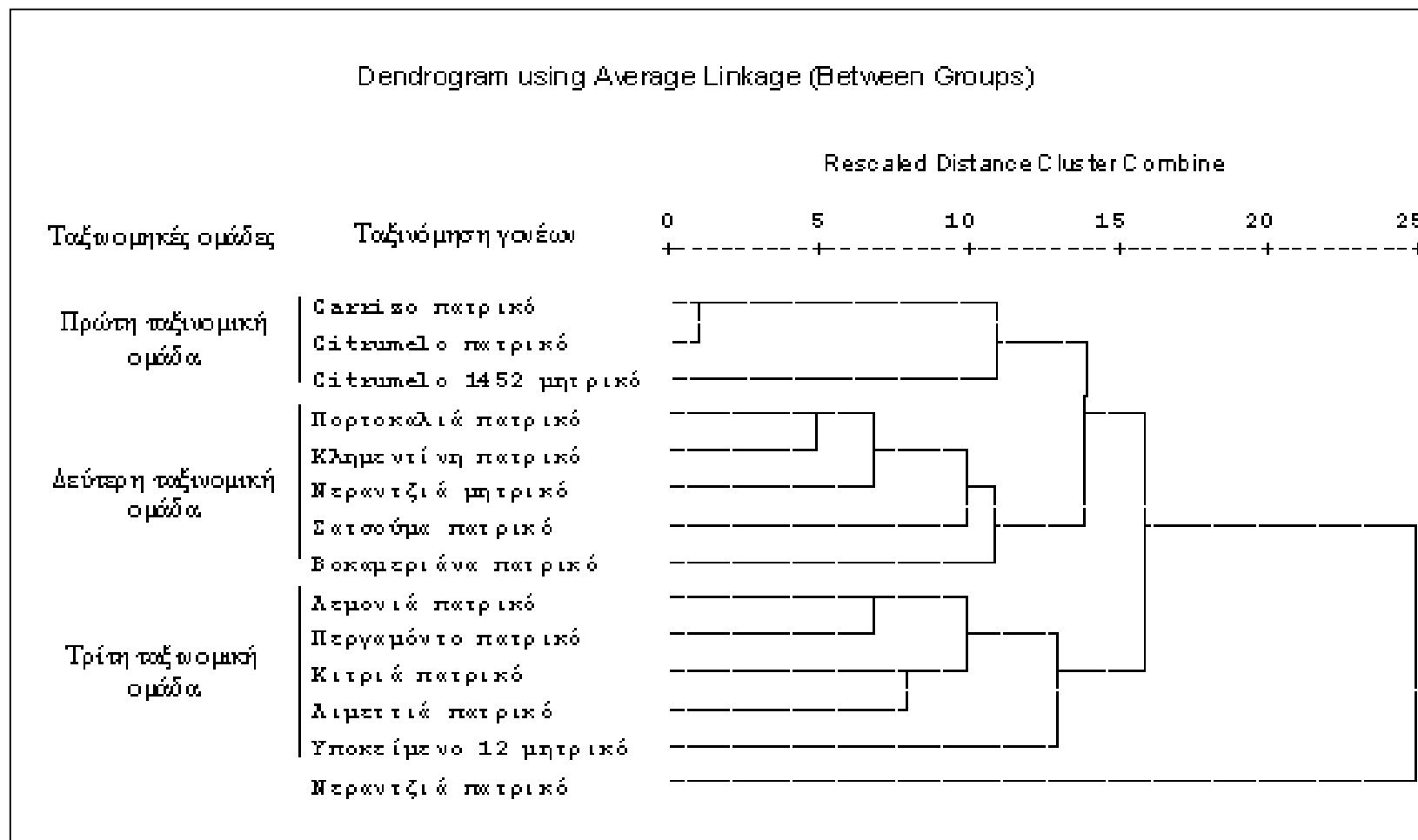


Εικόνα 2. Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που αποκτήθηκε από τον αυτοπονημένο αλληλουχητή της Li-Cor IR2, και απεικονίζει μοριακά αποτυπώματα διάφορων εσπεριδοειδών που παρήχθησαν με φθορίζοντες δείκτες AFLP (L=πρότυπα μεγέθη).

συνολικά ένα τμήμα, ο μητρικός γονέας Νεραντζιά Brazillian με ένα τμήμα και Λιμεττιά Mexican με ένα τμήμα επίσης. Εκτός αυτών των μοναδικών τμημάτων παρατηρήσαμε ότι ο αρσενικός γονέας Νεραντζιά της δεύτερης ομάδας δεν έχει οκτώ συνολικά ενισχυμένα τμήματα ενώ όλοι οι υπόλοιποι γονείς έχουν ενισχύσει τα αντίστοιχα τμήματα.

Τα δεδομένα της ανάλυσης AFLP χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία ενός δενδρογράμματος που περιλαμβάνει μόνο τους γονείς. Χρησιμοποιήσαμε τον συντελεστής ομοιότητας Ζακάρ (Jaccard) για την ομαδοποίηση των δεδομένων με βάση τον αλγόριθμο UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average clustering). Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS και η πολυμεταβλητή διαδικασία ανάλυσης κατ' ομάδας (CLUSTER). Το δενδρογράμμα αυτό απεικονίζεται στην Εικόνα 3.

Από το δενδρογράμμα της Εικόνας 3 μπορούμε να διαχωρίσουμε τρεις ομάδες που σχηματίζουν οι γονείς εκτός από την Νεραντζιά της δεύτερης ομάδας, που χρησιμοποιήθηκε ως πατρικός γονέας, η οποία διαχωρίζεται απ' όλα τα υπόλοιπα και απέχει φυλογενετικά περισσότερο. Στην πρώτη ομάδα κατατάσσονται το Carrizo και τα δύο Citrumelo τα οποία έχουν κοινό τον ένα γονέα το *Poncirus trifoliata*. Στην δεύτερη ομάδα κατατάσσονται η Πορτοκαλιά, η Νεραντζιά, η Κλημεντίνη, η Σατσούμα και η Βολκαμεριάνα. Τέλος στην τρίτη ομάδα κατατάσσονται η Λιμεττιά, η Κιτριά, η Λεμονιά, το Περγαμόντο και το υποκείμενο 12.



Εικόνα 3. Δενδρόγραμμα των γονέων από τον αλγόριθμο UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average clustering) με βάση τα δεδομένα της ανάλυσης AFLP.

3.2. Διαχωρισμός νουκελλικών από ζυγωτικούς απογόνους.

Για τον διαχωρισμό των νουκελλικών από τους ζυγωτικούς απογόνους χρησιμοποιήσαμε τους ίδιους συνδυασμούς εκκινητών (E+AGC/M+CAG και E+AGC/M+CCA) αλλά η εκτίμηση της πολυμορφικότητας των τόπων AFLP πραγματοποιήθηκε εντός της κάθε οικογένειας ξεχωριστά. Στον Πίνακα 4 φαίνεται ο αριθμός των πολυμορφικών τόπων για κάθε οικογένεια, το σύνολο των ενισχυμένων τόπων που παράχθηκαν και το επί τοις εκατό ποσοστό των πολυμορφικών τόπων.

Όπως έχουμε αναφέρει παραπάνω, τα άτομα της τρέχουσας εργασίας έχουν χωριστεί σε δύο ομάδες (βλέπε Πίνακα 3). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των ατόμων της πρώτης ομάδας προκύπτουν οι παρακάτω πίνακες.

Ο Πίνακας 5 αναφέρεται στα άτομα της πρώτης ομάδας των οποίων η γενετική ταυτότητα (απομικτικό ή ζυγωτικό άτομο) είναι άγνωστη. Φαίνεται, για κάθε απόγονο ξεχωριστά, το άθροισμα των τόπων AFLP αποκλειστικά πατρικής προέλευσης καθώς και δύο εκατοστιαίοι μέσοι όροι.

Μ'αυτό τον τρόπο θελήσαμε να διαχωρίσουμε, με μοριακό τρόπο, τους απογόνους σε ζυγωτικούς ή νουκελλικούς. Οι απόγονοι που δεν θα έχουν κανένα τόπο αποκλειστικά πατρικής προέλευσης θεωρήσαμε ότι είναι νουκελλικοί (π.χ. ο Νεραντζιά Χ Πορτοκ. N4).

Στους γενετικούς τόπους AFLP που ανιχνεύσαμε εντοπίσαμε στους απογόνους ένα ποσοστό εκ νέου ανασυνδυασμένων τόπων AFLP οι οποίοι δεν βρίσκονται σε κανένα γονέα. Στον Πίνακα 6 φαίνεται το άθροισμα των ανασυνδυασμένων τόπων των απογόνων καθώς και το επί τοις εκατό ποσοστό του μέσου όρου αυτών.

Τα δεδομένα της ανάλυσης AFLP των ατόμων της δεύτερης ομάδας χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία του δένδρογράμματος των δύο οικογενειών που χρησιμοποιήθηκαν στην ομάδα αυτή. Χρησιμοποιήσαμε τον συντελεστής ομοιότητας Ζακάρ (Jaccard) για την ομαδοποίηση των δεδομένων με βάση τον αλγόριθμο UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average clustering). Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό

Πίνακας 4. Αριθμός πολυμορφικών τόπων ανά οικογένεια.

Μητρικός γονέας	Πατρικός γονέας	Αριθμός πολυμορφικών τόπων	Σύνολο ενισχυμένων τόπων	Μέσος όρος % πολυμορφικών τόπων
Νεραντζιά	Πορτοκαλιά	9	97	9,3
	Λεμονιά	26	97	26,8
	Carrizo	24	97	24,7
	Σατσούμα	28	97	28,9
	Κιτριά	26	97	26,8
	Κλημεντίνη	31	97	32,0
	Lime	26	97	26,8
	Βολκαμεριάνα	24	97	24,7
	Περγαμόντο	16	97	16,5
	Citrumelo	26	97	26,8
Υποκείμενο 12 1452	Νεραντζιά	35	97	36,1
		49	97	50,5

Πίνακας 5. Μοναδικοί τόποι απογόνων πατρικής προέλευσης.

Πατρικοί γονείς (μητρικός γονέας Νεραντζιά)	Απόγονοι (Νουκελλικοί ή Ζυγωτικοί)	Σύνολο μοναδικών τόπων πατρικής προέλευσης	Μέσος όρος μοναδικών πατρικών τόπων που πέρασαν στο γένωμα όλων των απογόνων (% μοναδικών πατρικών)	Μέσος όρος μοναδικών τόπων στο συνολικό γένωμα όλων των απογόνων (νουκελλικών και ζυγωτικών) %
Πορτοκαλιά	Νεραντζιά X Πορτοκ. N1	4	100	35,5
	Νεραντζιά X Πορτοκ. N2	4	100	
	Νεραντζιά X Πορτοκ. N3	4	100	
	Νεραντζιά X Πορτοκ. N4	0	0	
	Νεραντζιά X Πορτοκ. N5	4	100	
Λεμονιά	Νεραντζιά X Λεμονιά N1	7	87,5	28,8
	Νεραντζιά X Λεμονιά N2	8	100	
Carrizo	Νεραντζιά X Carrizo	6	54,5	29,2
	Νεραντζιά X Carrizo N22	8	72,7	
Σατσούμα	Νεραντζιά X Σατσούμα	3	75	10,7%
Κιτριά	Νεραντζιά X Κιτριά	8	100	30,8%
Κλημεντίνη	Νεραντζιά X Κλημεντίνη	3	75	8,1%
	Νεραντζιά X Κλημεντίνη N1	2	50	
Lime	Νεραντζιά X Lime	7	63,6	26,9%
Βολκαμεριάνα	Νεραντζιά X Βολκαμερ.	5	83,3	20,8%
Περγαμόντο	Νεραντζιά X Περγαμόντο	5	62,5	31,2%
Citrumelo	Νεραντζιά X Citrumelo	5	45,5	19,2%

Πίνακας 6. Ανασυνδυασμένοι τόποι AFLP των απογόνων.

Πατρικοί γονείς (μητρικός γονέας Νεραντζιά)	Απόγονοι (Νουκλελλικοί ή Ζυγωτικοί)	Σύνολο ανασυνδυασμένων τόπων	Μέσος όρος ανασυνδυασμένων τόπων (% επί του συνολικών τόπων κάθε ατόμου)
Πορτοκαλιά	Νεραντζιά X Πορτοκ. N1	0	2,2
	Νεραντζιά X Πορτοκ. N2	0	
	Νεραντζιά X Πορτοκ. N3	0	
	Νεραντζιά X Πορτοκ. N4	1	
	Νεραντζιά X Πορτοκ. N5	0	
Λεμονιά	Νεραντζιά X Λεμονιά N1	5	17,3
	Νεραντζιά X Λεμονιά N2	4	
Carrizo	Νεραντζιά X Carrizo	0	2,1
	Νεραντζιά X Carrizo N22	1	
Σατσούμα	Νεραντζιά X Σατσούμα	10	35,7
Κιτριά	Νεραντζιά X Κιτριά	2	7,7
Κλημεντίνη	Νεραντζιά X Κλημεντίνη	1	19,3
	Νεραντζιά X Κλημεντίνη N1	11	
Lime	Νεραντζιά X Lime	2	7,7
Βολκαμεριάνα	Νεραντζιά X Βολκαμερ.	4	16,7
Περγαμόντο	Νεραντζιά X Περγαμόντο	1	6,2
Citrumelo	Νεραντζιά X Citrumelo	3	11,5

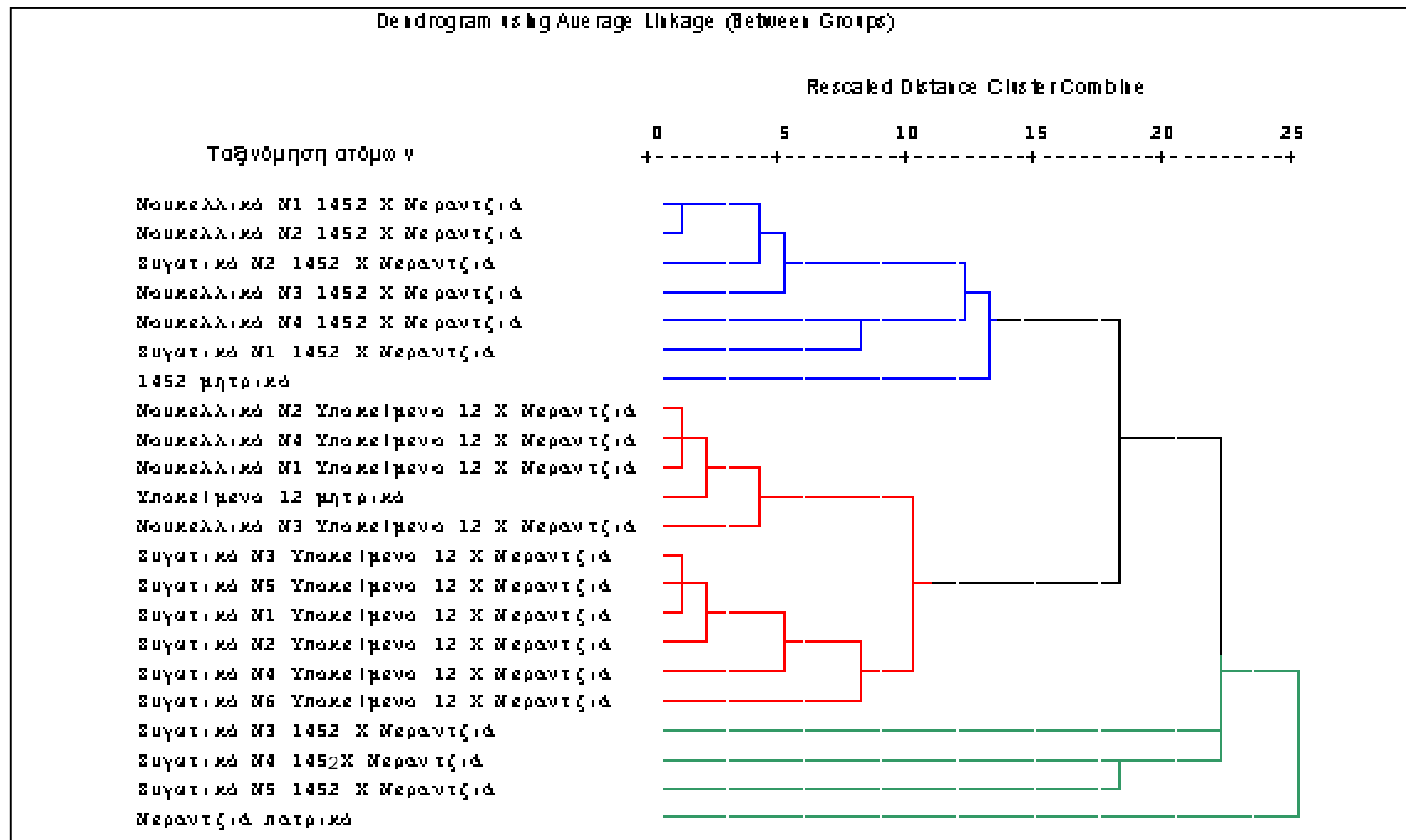
πρόγραμμα SPSS και η πολυμεταβλητή διαδικασία ανάλυσης κατ' ομάδας (CLUSTER). Το δένδρογραμμα απεικονίζεται στην Εικόνα 4.

Από το δένδρογραμμα της Εικόνας 4 μπορούμε να διακρίνουμε τρεις ομάδες (με ξεχωριστό χρώμα ή κάθε μία) ει. Η ομάδα με το κόκκινο χρώμα περιέχει όλα τα νουκελλικά και ζυγωτικά άτομα που προέρχονται από την διασταύρωση του υποκειμένου 12 με την Νεραντζιά καθώς και το μητρικό φυτό (υποκείμενο 12). Η ομάδα με το κυανό χρώμα περιέχει τέσσερα νουκελλικά και δύο ζυγωτικά άτομα που προέρχονται από την διασταύρωση του 1452 (μητρικό φυτό) με την Νεραντζιά καθώς και το μητρικό φυτό. Στην ομάδα με το πράσινο χρώμα περιέχονται τα τρία ζυγωτικά άτομα της διασταύρωσης του 1452 με την Νεραντζιά καθώς και το πατρικό φυτό Νεραντζιά. Επιπλέον την ομάδα με το κόκκινο χρώμα μπορούμε να την χωρίσουμε σε δύο υποομάδες, στην πρώτη υποομάδα περιέχονται όλα τα νουκελλικά άτομα του υποκειμένου 12 μαζί με το μητρικό φυτό υποκείμενο 12 ενώ στη δεύτερη υποομάδα περιέχονται όλα τα ζυγωτικά άτομα της διασταύρωσης του υποκειμένου 12 με την Νεραντζιά.

Ο Πίνακας 7 περιέχει τα αθροίσματα των μοναδικών τόπων AFLP αποκλειστικά πατρικής προέλευσης (δεν υπάρχουν στο μητρικό φυτό). Μ' αυτό τον τρόπο θέλαμε να διαχωρίσουμε τους νουκελλικούς από τους ζυγωτικούς απογόνους. Επίσης θέλαμε να εξετάσουμε κατά πόσο τα άτομα που έχουν έστω και ένα μόνο τόπο πατρικής προέλευσης μπορεί να θεωρηθούν ως ζυγωτικά.

Στον Πίνακα 8 φαίνονται οι τόποι AFLP που προέρχονται από ανασυνδυασμό (που δεν προϋπήρχαν σε κανένα γονέα και εμφανίστηκαν στους απογόνους) και το αντίστοιχο εκατοστιαίο ποσοστό τους - επί του μέσου όρου των απογόνων της δεύτερης ομάδας.

Επίσης παρατηρήσαμε ένα ποσοστό ενισχυμένων τόπων στο μητρικό φυτό οι οποίοι δεν είναι ενισχυμένοι στους νουκελλικούς απογόνους. Ο Πίνακας 9 περιέχει το άθροισμα των μη ενισχυμένων τόπων AFLP των νουκελλικών απογόνων. Οι δύο μη ενισχυμένοι τόποι των νουκελλικών του μητρικού φυτού Υποκείμενο 12 προέρχονται από ένα μόνο άτομο. Όλα τα υπόλοιπα νουκελλικά άτομα έχουν όλους τους τόπους μητρικής προέλευσης (συν τους ανασυνδυασμένους).



Εικόνα 4. Δενδρόγραμμα των δύο οικογενειών της δεύτερης ομάδας που παράχθηκε από τον αλγόριθμο UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average clustering) με βάση τα δεδομένα της ανάλυσης AFLP.

Πίνακας 7. Μοναδικοί τόποι πατρικής προέλευσης στους απογόνους.

Μητρικοί γονείς (πατρικός γονέας Νεραντζιά)	Απόγονοι	Αριθμός διαφορετικών γενοτύπων (ατόμων)	Σύνολο μοναδικών τόπων πατρικής προέλευσης	Μέσος όρος (%) μοναδικών τόπων πατρικής προέλευσης που πέρασαν στο γένωμα των απογόνων	Μέσος όρος (%), στο σύνολο των τόπων κάθε απογόνου, μοναδικών τόπων πατρικής προέλευσης
Υποκείμενο 12	Νουκελλικοί	4	0	0	0,0
	Ζυγωτικοί	6	6	50	2,9
1452	Νουκελλικοί	4	8	50	4,1
	Ζυγωτικοί	5	8	40	3,3

Πίνακας 8. Ανασυνδυασμένοι τόποι AFLP των απογόνων – δεύτερη ομάδα.

Θηλυκοί γονείς (αρσενικός γονέας Νεραντζιά)	Απόγονοι	Αριθμός διαφορετικών γενοτύπων (ατόμων)	Άθροισμα ανασυνδυασμένων τόπων (επι όλων των ατόμων)	Μέσος όρος ανασυνδυασμένων τόπων – επί του συνόλου των ατόμων (%)
Υποκείμενο 12	Νουκελλικοί	4	14	10,0
	Ζυγωτικοί	6	46	21,9
1452	Νουκελλικοί	4	13	6,6
	Ζυγωτικοί	5	18	6,1

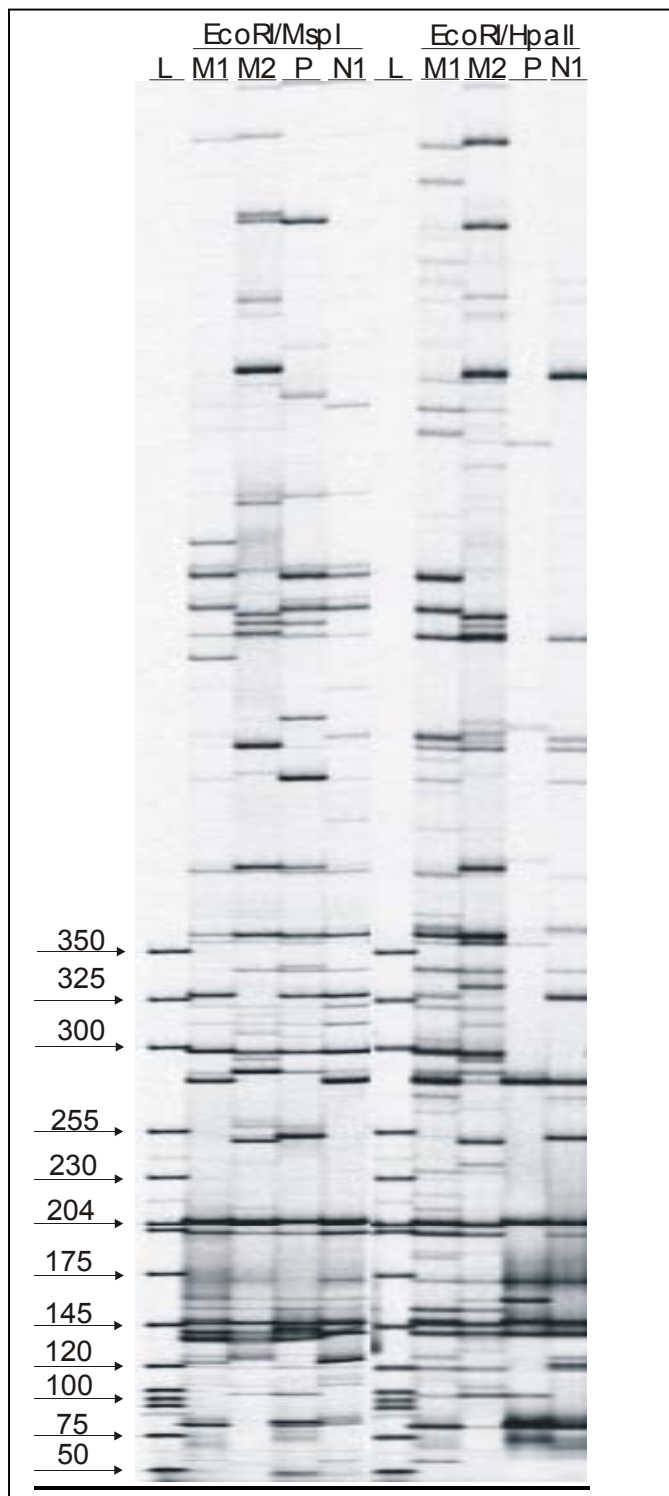
Πίνακας 9. Τόποι μητρικής προέλευσης που δεν ενισχύονται στους νουκελλικούς απογόνους.

Θηλυκοί γονείς (αρσενικός γονέας Νεραντζιά)	Άθροισμα μη ενισχυμένων τόπων νουκελλικών απογόνων	Αριθμός διαφορετικών γενοτύπων (ατόμων)	Μέσος όρος μη ενισχυμένων τόπων νουκελλικών απογόνων (%)
Υποκείμενο 12	2	4	1,4
1452	35	4	17,8

3.3. MSAP ανάλυση.

Για την ανάλυση MSAP χρησιμοποιήθηκαν οι συνδυασμοί περιοριστικών ενζύμων / εκκινητών EcoRI+AGC/MspI+AAT και EcoRI+AGC/HpaII+AAT. Παράχθηκαν συνολικά 34 και 51 τόποι AFLP αντίστοιχα οι οποίοι ήταν όλοι πολυμορφικοί (100%). Το μέγεθος των τόπων MSAP που προσμετρήσαμε κυμαίνονταν από 50 έως 700 βάσεις. Η Εικόνα 5 είναι αντιπροσωπευτική ενός πηκτώματος πολυακρυλαμίδης τεσσάρων ατόμων τις ίδιας οικογένειας (δύο γονείς και δύο απόγονοι) που ενισχύθηκαν από την τεχνική MSAP με τον παραπάνω συνδυασμό εκκινητών.

Οι παραγόμενοι πολυμορφισμοί από τους δύο συνδυασμούς περιοριστικών ενζύμων ανά άτομο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 10.



Εικόνα 5. Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που αποκτήθηκε από τον αυτοπονημένο αλληλουχητή της Li-Cor IR2, και απεικονίζει μοριακά αποτυπώματα τεσσάρων ατόμων που παρήχθησαν με την MSAP ανάλυση (M1: Μητρικό φυτό υποκείμενο 12, M2:

Μητρικό φυτό 1452, Ρ: Πατρικό φυτό Νεραντζιά, Ν1: Νουκελλικό φυτό υποκείμενο 12 Χ Νεραντζιά και L: Πρότυπο μέγεθος).

Πίνακας 10. Ενισχυμένοι τόποι AFLP παραγόμενοι από τα δύο ισοσχιζομερή περιοριστικά ένζυμα.

Άτομα	Γενετική σύσταση ατόμου (Νουκελλικό' Ν, ζυγωτικό' Ζ)	Ενισχυμένοι τόποι	
		EcoRI/MspI	EcoRI/HpaII
Γονέας Υποκείμενο 12 ♀		31	51
Γονέας 1452 ♀		31	41
Γονέας Νεραντζιά ♂		34	13
Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά Ν1	N	30	23
Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά Ν2	N	12	25
Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά Ν3	N	8	9
Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά Ν4	N	9	23
Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά Ν1	Z	6	12
Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά Ν2	Z	15	16
Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά Ν3	Z	16	29
Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά Ν4	Z	11	20
Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά Ν5	Z	21	24
Υποκείμενο 12 x Νεραντζιά Ν6	Z	7	14
1452 x Νεραντζιά Ν1	N	9	29
1452 x Νεραντζιά Ν2	N	6	25
1452 x Νεραντζιά Ν3	N	11	17
1452 x Νεραντζιά Ν4	N	13	13
1452 x Νεραντζιά Ν1	Z	9	14
1452 x Νεραντζιά Ν2	Z	5	14
1452 x Νεραντζιά Ν3	Z	8	21
1452 x Νεραντζιά Ν4	Z	5	11
1452 x Νεραντζιά Ν5	Z	7	21
Σύνολο		304	465

4. Συμπεράσματα και συζήτηση.

4.1. Προσδιορισμός των γενετικών σχέσεων των γονέων.

Οι δύο συνδυασμοί εκκινητών AFLP ήταν αρκετοί για να μας αποδώσουν αρκετούς ισχυρούς πολυμορφισμούς, 56 στο σύνολο, με τους οποίους αποκτήσαμε μια σαφή εικόνα για την φυλογενετική σχέση μεταξύ των γονέων. Με βάση το δενδρόγραμμα της Εικόνας 3 οι γονείς διαχωρίστηκαν σε τρεις μεγάλες ταξινομικές ομάδες εκτός από την Νεραντζιά της δεύτερης ομάδας τις οποίας η φυλογενετική απόσταση ήταν μεγαλύτερη από αυτή των άλλων γονέων.

Στην πρώτη ταξινομική ομάδα κατατάσσονται το Carrizo και τα δύο Citrumelo τα οποία είναι υβρίδια με κοινό μητρικό γονέα το *Poncirus trifoliata*. Το Carrizo έχει διαφορετικό πατρικό γονέα από τα Citrumelo αν και από το διάγραμμα διαπιστώνουμε ότι τα δύο Citrumelo έχουν μεγαλύτερη φυλογενετική απόσταση από αυτή του Carrizo με το πατρικό γονέα Citrumelo των οποίων η απόσταση είναι πολύ μικρή και η κοντινότερη από όλων των υπόλοιπων γονέων.

Στην δεύτερη ταξινομική ομάδα παρατηρούμε ότι όλα τα άτομα έχουν κοινή βοτανική καταγωγή την Μανταρινιά (*Citrus reticulata*) η οποία είναι γνήσιο άγριο είδος των εσπεριδοειδών. Η Σατσούμα και η Κλημεντίνη είναι Μανταρινιές διαφορετικής ποικιλίας ενώ η Νεραντζιά και η Πορτοκαλιά είναι υβρίδια με κοινούς γονείς, διαφορετικής ποικιλίας, των οποίων ο πατρικός γονέας είναι η Μανταρινιά. Όμως σε αυτή την ταξινομική ομάδα κατατάσσεται και η Βολκαμεριάνα η οποία είναι ένα φυσικό υβρίδιο της λεμονιάς αν και αναμέναμε να καταταχθεί στην τρίτη ταξινομική ομάδα μαζί με την λεμονιά.

Στην τρίτη ταξινομική ομάδα κατατάχθηκαν τα άτομα με βοτανική καταγωγή είτε από την Κιτριά (*Citrus medica*) είτε από την Λιμμετιά (*Citrus lime*). Σε αυτή τη ομάδα η Κιτριά και η Λιμμετιά ανήκουν στα γνήσια άγρια είδη των εσπεριδοειδών. Η Λεμονιά που κατατάσσεται στην τρίτη ταξινομική ομάδα είναι υβρίδιο από την διασταύρωση της Κιτριάς με την Λιμμετιά. Το Περγαμόντο που κατατάσσεται επίσης σε αυτή την ομάδα έχει άγνωστη προέλευση και γενετική σύσταση αλλά θεωρείται ως υβρίδιο Νεραντζιάς x Λεμονιάς ή Λιμμετίας. Τέλος το υποκείμενο 12, το οποίο όπως είπαμε ανήκει στην

ομάδα των *Limnomyces*, κατατάχθηκε στην τρίτη ταξινομική ομάδα και απέχει φυλογενετικά περισσότερο από τα υπόλοιπα άτομα αυτής της ομάδας (Εικόνα 3).

Από αυτά τα αποτελέσματα διαπιστώνουμε ότι οι δείκτες AFLP είναι μια δυναμική τεχνική όπου δύο μόνο συνδυασμοί εκκινητών μας δίδουν ένα ικανοποιητικό αριθμό πολυμορφικών τμημάτων (γενετικών τόπων) αρκετό ώστε να δώσουν μια πλήρη εικόνα για την μοριακή διαφοροποίηση και φυλογενετική καταγωγή του πολλαπλασιαστικού υλικού των εσπεριδοειδών. Η διαπίστωση αυτή ενισχύεται αν συγκρίνουμε τα AFLP με άλλες μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης που δίδουν πολύ μικρότερο αριθμό πολυμορφικών τόπων. Για παράδειγμα, για τον προσδιορισμό της φυλογενετικής σχέσης ειδών του γένους *Citrus* ο Federici (1998) χρησιμοποίησε δείκτες RAPD και προσδιόρισε 197, τμήματα χρησιμοποιώντας 23 εκκινητές RAPD. Καθ'έναν από αυτούς τους εκκινητές έδωσε από 5 έως 15 πολυμορφικά τμήματα.

Δείκτες AFLP έχει χρησιμοποιήσει και ο Chao (2004) για τον προσδιορισμό των Μανταρινιών της ποικιλίας Σατσούμα χρησιμοποιώντας δεκατέσσερα άτομα της ποικιλίας Σατσούμα Ιαπωνικής καλλιέργειας τέσσερα άτομα της ποικιλίας Σατσούμα κινέζικης καλλιέργειας και τρία άτομα της ποικιλίας Σατσούμα άγνωστης καταγωγής με έξι συνδυασμούς εκκινητών. Από αυτή την εργασία του Chao (2004) τα είκοσι Μανταρίνια της ποικιλίας Σατσούμα χωρίστηκαν σε πέντε υποομάδες και καταλήγει στο συμπέρασμα ότι οι δείκτες AFLP είναι μια αποτελεσματική τεχνική για τον προσδιορισμό της φυλογενετικής σχέσης ανάμεσα στην ποικιλία των Σατσούμα καθώς και χρήσιμο εργαλείο για μελλοντικό προσδιορισμό νέων ποικιλιών Σατσούμα.

Θεωρούμε ότι οι δείκτες AFLP είναι μια αποτελεσματική και αρκετά πληροφοριακή τεχνική για τον προσδιορισμό της γενετικής καταγωγής όχι μόνο για τις Μανταρινιές της ποικιλίας Σατσούμα όπως διατύπωσε ο Chao (2004) αλλά γενικότερα για όλα τα είδη των εσπεριδοειδών καθώς με την χρήση δύο συνδυασμών εκκινητών αποκαλύπτονται αρκετοί ισχυροί πολυμορφισμοί οι οποίοι αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο μέρος του συνολικού γενώματος των ατόμων. Αυτό συμβαίνει γιατί και ένας μόνο συνδυασμός εκκινητών μπορεί να αποδώσει ένα υψηλό αριθμό γενετικών τόπων.

4.2. Διαχωρισμός των νουκελλικών από τα ζυγωτικά σπορόφυτα.

Από το δενδρόγραμμα της Εικόνας 4 όπως είδαμε μπορούμε να διακρίνουμε τρεις ταξινομικές ομάδες στις οποίες χωρίζονται τα άτομα της δεύτερης ομάδας που χρησιμοποιήσαμε σε αυτή την εργασία. Στην μια ταξινομική ομάδα (κόκκινη όπως αναφέρεται στα αποτελέσματα) κατατάχθηκαν όλοι η απόγονοι των διασταυρώσεων του υποκειμένου 12 με την Νεραντζιά καθώς και το μητρικό φυτό υποκείμενο 12 ενώ στις άλλες δύο ταξινομικές ομάδες κατατάχθηκαν όλοι απόγονοι της διασταύρωσης του 1452 με την Νεραντζιά καθώς και το πατρικό φυτό Νεραντζιά. Επίσης διακρίνουμε τις δύο υποομάδες της «κόκκινης» ομάδας που αποτελούνται η μία από τα νουκελλικά και το μητρικό τους φυτό και η άλλη από τα ζυγωτικά άτομα της διασταύρωσης του υποκειμένου 12 με την Νεραντζιά όπως αναμενόταν αν και με βάση την βιβλιογραφία αναμέναμε τα νουκελλικά άτομα μαζί με το μητρικό τους φυτό να είναι ταυτόσημα και όχι να παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις. Επομένως μπορούμε να πούμε ότι αυτά τα νουκελλικά άτομα είναι πολύ κοντά στο μητρικό τους φυτό αλλά δεν είναι όμοια. Επίσης παρατηρούμε ότι, γενετικά, οι ζυγωτικοί απόγονοι είναι πιο κοντά στο μητρικό παρά στο πατρικό.

Τα άτομα όμως της διασταύρωσης 1452 με την Νεραντζιά δεν δημιούργησαν μια κοινή ταξινομική ομάδα αλλά χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Επίσης τα νουκελλικά δεν διαχωρίζονται από τα ζυγωτικά άτομα (σε αντίθεση με την πρώτη οικογένεια). Στην πρώτη ομάδα αυτής της οικογένειας ευρίσκονται τρία ζυγωτικά άτομα μαζί με το πατρικό φυτό και στην άλλη ομάδα κατατάσσονται τα τέσσερα νουκελλικά μαζί με τα δύο αλλά ζυγωτικά άτομα και το μητρικό φυτό το οποίο απέχει περισσότερο από τα υπόλοιπα άτομα σε αυτή την ταξινομική ομάδα. Επομένως μπορούμε να πούμε ότι το πατρικό φυτό Νεραντζιά έχει υψηλότερη συγγένεια με τα τρία ζυγωτικά άτομα (N3, N4 και N5) (έναντι του μητρικού φυτού 1452) ενώ συμβαίνει το αντίθετο με τα υπόλοιπα δύο ζυγωτικά άτομα και με όλα τα νουκελλικά άτομα της ίδιας διασταύρωσης.

Από τον Πίνακα 4 συμπεραίνουμε ότι το ποσοστό πολυμορφισμού ανά οικογένεια ποικίλει ανάλογα το είδος του πατρικού φυτού. Θεωρούμε ότι το

ποσοστό πολυμορφισμού σε κάθε οικογένεια εξαρτάται από το είδος των διασταυρούμενων φυτών και την φυλογενετική τους συγγένεια.

Για το διαχωρισμό των απογόνων σε νουκελλικά ή ζυγωτικά σπορόφυτα, της πρώτης ομάδας ατόμων, με την τεχνική των AFLP προσδιορίσαμε το ποσοστό επί της εκατό του μέσου όρου των μοναδικών τόπων AFLP πατρικής προέλευσης. Με τον τρόπο αυτό θεωρούμε ότι οι απόγονοι που έχουν έστω και ένα μοναδικό τόπο πατρικής προέλευσης προέρχονται από ζυγωτικό έμβρυο γιατί όπως αναφέραμε το μέχρι τώρα δόγμα αποδέχεται ότι τα νουκελλικά σπορόφυτα έχουν πανομοιότυπο γένωμα τόσο με το μητρικό φυτό όσο και μεταξύ τους. Επομένως τα σπορόφυτα που θα έχουν έστω και ένα μοναδικό τόπο που προέρχεται από το πατρικό γένωμα (δηλαδή που δεν υπάρχει στο μητρικό φυτό) σημαίνει ότι προέρχονται από έμβρυο που δημιουργήθηκε από τον συνδυασμό των γενωμάτων και των δύο γονέων.

Στην διασταύρωση της Νεραντζιάς με την πορτοκαλιά (Πίνακας 5) παρατηρούμε ότι οι τέσσερις από τους πέντε απογόνους έχουν ο καθένας από τέσσερις μοναδικούς πολυμορφικούς τόπους πατρικής προέλευσης και κανένα μητρικής προέλευσης. Μόνο ο πέμπτος απόγονος (Νεραντζιά x Πορτοκαλιά N⁰4) έχει τρεις μοναδικούς τόπους μητρικής προέλευσης και κανένα πατρικής. Αυτός ο απόγονος θεωρούμε ότι προέρχεται από νουκελλικό έμβρυο ενώ οι υπόλοιποι απόγονοι από ζυγωτικό έμβρυο. Το θεωρούμε όμως νουκελλικό σπορόφυτο έχει ανασυνδυάσει ένα τόπο AFLP ενώ έχει ένα μη ενισχυμένο ένα τόπο που υπάρχει στο μητρικό φυτό. Οι υπόλοιποι τόποι του απόγονου είναι πανομοιότυποι με το μητρικό φυτό (77,8%). Επομένως ο εκ νέου ανασυνδυασμένος τόπος έχει άμεση σχέση με το μη ενισχυμένο τόπο.

Οι υπόλοιποι απόγονοι έχουν 100% πανομοιότυπους τόπους αποκλειστικής πατρικής προέλευσης αλλά και μεταξύ τους. Η ομοιότητα αυτή των ζυγωτικών απογόνων με το πατρικό φυτό εξηγείται από το γεγονός ότι οι δύο διασταυρούμενοι γονείς (Νεραντζιά και Πορτοκαλιά) είναι υβρίδια και προέρχονται από την διασταύρωση των ίδιων γονέων διαφορετικής ποικιλίας σε κάθε διασταύρωση.

Σε όλες τις υπόλοιπες οικογένειες της πρώτης ομάδας δεν παρατηρήσαμε κανένα απόγονο ο οποίος να μην έχει μοναδικούς τόπους AFLP πατρικής προέλευσης.

Επομένως θεωρούμε ότι όλοι αυτοί οι απόγονοι προέρχονται από ζυγωτικά έμβρυα. Αυτό τον τρόπο διαχωρισμού των απογόνων σε νουκελλικά και ζυγωτικά άτομα δεν μπορούμε να τον θεωρήσουμε αξιόπιστο λόγο των εκ νέου ανασυνδυασμών που παρατηρούνται σε όλους τους απόγονους είτε νουκελλικούς είτε ζυγωτικούς. Για τον λόγο ότι αυτοί οι ανασυνδυασμοί είναι τυχαίοι τότε ένα νουκελλικό άτομο θα μπορούσε τυχαία να επιδείξει τόπους όμοιους με εκείνους του πατρικού φυτού σε ορισμένες θέσεις. Αυτό θα μπορούσε να συμβαίνει σε απογόνους που έχουν μεγάλο αριθμό ανασυνδυασμένων τόπων και μικρό αριθμό μοναδικών τόπων πατρικής προέλευσης. Μια τέτοια περίπτωση είναι ο απόγονος Νεραντζιά Χ Σατσούμα με ποσοστό 35,7% (10 τόποι AFLP) ανασυνδυασμένων τόπων και μόνο 10,7% (3 τόποι AFLP) μοναδικών τόπων πατρικής προέλευσης. Με βάση τα παραπάνω δημιουργείται το ερώτημα αν η χρήση των δεικτών AFLP ως τεχνική διαχωρισμού των νουκελλικών από τους ζυγωτικούς απογόνους στα εσπεριδοειδή είναι αποτελεσματική. Το ερώτημα αυτό θα απαντηθεί παρακάτω.

Βάση της βιβλιογραφίας αναμέναμε ότι οι νουκελλικοί απόγονοι της δεύτερης ομάδας, που έχουν προσδιοριστεί ως νουκελλικά σπορόφυτα με βάση τα μορφολογικά και ισοενζυμικά χαρακτηριστικά, να έχουν πανομοιότυπο γένομα με το μητρικό φυτό αλλά και μεταξύ τους. Όμως στην βάση των αποτελεσμάτων της τρέχουσας εργασίας προσδιορίσαμε ένα ποσοστό μοριακών τόπων AFLP οι οποίοι δεν προέρχονται από κανένα γονέα και το οποίο δικαιολογεί την μικρή διαφορά στο δενδρόγραμμα της Εικόνας 4. Εκεί φαίνονται οι γενετικές σχέσεις των νουκελλικών ατόμων της διασταύρωσης του υποκειμένου 12 με την Νεραντζιά με το μητρικό φυτό υποκείμενο 12. Το ποσοστό των μοριακών τόπων AFLP στα νουκελλικά σπορόφυτα που δημιουργήθηκαν από τους θηλυκούς γονείς υποκείμενο 12 και 1452 είναι της τάξεως του 10% και 6,6% αντιστοίχως. Το υπόλοιπο ποσοστό (90%) των μοριακών τόπων AFLP στα νουκελλικά που προέρχονται από το θηλυκό γονέα υποκείμενο 12 είναι πλήρως ταυτόσημοι με το αντίστοιχο μητρικό ποσοστό τόπων AFLP. Αυτοί οι τόποι AFLP (10% και 6,6%) θεωρούμε ότι προέρχονται από τον εκ νέου ανασυνδυασμό του γενετικού υλικού της μητέρας και τους ονομάζουμε ανασυνδυασμένους τόπους. Αυτοί οι τόποι πρέπει να προκύπτουν κατά την διάρκεια της σωματικής νουκελλικής εμβρυογένεσης χωρίς δηλαδή να υπάρχει μείωση. Εάν η παραπάνω υπόθεση ευσταθεί

τότε ο μηχανισμός της σποροφυτικής απόμιξης στα εσπεριδοειδή λειτουργεί σαν ένας εναλλακτικός φυσικός μηχανισμός δημιουργίας γενετικής παραλλακτικότητας.

Οι ανασυνδυασμένοι αυτοί τύποι στην πλειοψηφία τους είναι όμοιοι (ίδιου μεγέθους), στα νουκελλικά σπορόφυτα, με εξαίρεση ενός μικρού αριθμού που εμφανίζονται μόνο σε ένα άτομο. Επομένως μπορούμε να προτείνουμε ότι δεν είναι τυχαία ανασυνδυασμένοι τύποι ανάμεσα στα νουκελλικά σπορόφυτα αλλά ότι οι ανασυνδυασμοί αυτοί συμβαίνουν με ελεγχόμενο και καθορισμένο τρόπο και σε συγκεκριμένα σημεία του μητρικού γενώματος. Επίσης παρατηρούμε ότι η έκταση του παραπάνω φαινομένου διαφοροποιείται ανάμεσα στα διαφορετικά διασταυρούμενα είδη των εσπεριδοειδών. Αν το φαινόμενο αυτό (των *de novo* ανασυνδυασμών) ελέγχεται από τον πατρικό ή μητρικό γονέα και πόσα γονίδια ελέγχουν την ένταση και έκταση του φαινομένου αυτού είναι ερωτήματα που χρειάζονται ευρύτερο γενετικό σχεδιασμό για να απαντηθούν.

Όμως στα νουκελλικά του γονέα 1452 προσδιορίσαμε ένα ποσοστό 4% μοναδικών τύπων AFLP πατρικής προέλευσης ενώ το υπόλοιπο ποσοστό (89.4%) είναι πλήρως πανομοιότυπο με αυτό του μητρικού γονέα δικαιολογώντας έτσι την μη ομαδοποίηση των νουκελλικών αυτών ατόμων στο δενδρόγραμμα της Εικόνας 4 και την κατάταξή τους με τα ζυγωτικά άτομα. Επομένως τα νουκελλικά του θηλυκού γονέα 1452, που είχαν αρχικά χαρακτηριστεί νουκελλικά (στην βάση των μορφολογικών και ισοενζυμικών χαρακτήρων) πρέπει να καταταχθούν τελικά στους ζυγωτικούς απογόνους με βάση τους δείκτες AFLP. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφέρουμε ότι σύμφωνα με τον Ruiz (2000) η ισοενζυμική ποικιλότητα είναι περιορισμένη και υπάρχουν λίγοι διαθέσιμοι ισοενζυμικοί τύποι για την χρήση τους ως δείκτες ανάλυσης πατρότητας στα εσπεριδοειδή. Επίσης ένα άλλο μειονέκτημα των ισοενζύμων, σε σύγκριση με τους μοριακούς δείκτες, είναι ότι διαφοροποιούνται τόσο από το φαινοτυπικό στάδιο των φυτών Ruiz (2000) όσο και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξής τους δηλαδή από την διαφορική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των φυτών. Σε αντίθεση με τα παραπάνω οι δείκτες AFLP που έχουν υψηλή ποικιλομορφία, ανιχνεύουν πολύ μεγαλύτερο αριθμό διαθέσιμων τύπων εγκατασπαρμένων σε όλο το γονιδίωμα και δεν επηρεάζονται από το στάδιο ανάπτυξης των φυτών.

Σε άλλες μελέτες που έχουν γίνει για τον διαχωρισμό των νουκελλικών από τα ζυγωτικά σπορόφυτα όπως των Scarano (2003), Ruiz (2000) και Luro (1995) δεν έχουν αναφερθεί ανασυνδυασμένοι τόποι στα νουκελλικά σπορόφυτα. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις ο αριθμός και η πολυμορφικότητα των χρησιμοποιούμενων δεικτών ήταν τέτοια που δεν θα επέτρεπε την ανακάλυψη de novo πολυμορφισμών παρά μόνο σε πολύ πιο εκτεταμένες μελέτες. Αντιθέτως, με την δική μας περίπτωση των AFLP είχαμε το πλεονέκτημα να εντοπίσουμε μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφικών τόπων σε μια μελέτη μικρής έκτασης (με ένα ή δύο συνδυασμούς εκκινητών) που όμως απέδωσε υψηλό πληροφοριακό περιεχόμενο. Για παράδειγμα στην εργασία μας προσδιορίσαμε 20 περίπου πολυμορφικούς τόπους ανά συνδυασμό εκκινητών την στιγμή που οι δείκτες RAPD προσδιόρισαν από πέντε έως δέκα πολυμορφικούς τόπους. Από την άλλη υπάρχει πάντα η πιθανότητα στις διασταυρώσεις των συγκεκριμένων ειδών των εργασιών άλλων ερευνητών να μην συμβαίνει το φαινόμενο του ανασυνδυασμού κατά την δημιουργία των νουκελλικών εμβρύων που παρατηρήσαμε στις δικές μας οικογένειες νουκελλικών.

Όμως κατά τον Ruiz (2000) οι δείκτες SSR είναι συγκυρίαρχοι δείκτες (όπως και τα ισοένζυμα). Επίσης παρουσιάζουν τα πρόσθετα πλεονεκτήματα ότι έχουν υψηλότερο πληροφοριακό περιεχόμενο -τόσο στο αριθμό των πολυμορφικών τόπων όσο και στον αριθμό των αλληλόμορφων του κάθε τόπου- ενώ είναι ανεπηρέαστοι από την φυσιολογική κατάσταση του ιστού και απολύτως επαναλήψιμοι. Αντιθέτως, οι δείκτες RAPD και AFLP λόγω της κυρίαρχης φύσης τους δεν μπορούν να διαχωρίσουν ετεροζύγωτα και ομοζύγωτα άτομα, είναι λιγότερο πληροφοριακοί ανά μοριακό τόπο και επομένως μειώνουν στο μισό την δυνατότητα να προσδιορίσουν τα ζυγωτικά σπορόφυτα ενώ πρέπει να προσμετρηθεί μεγαλύτερος αριθμός τόπων.

Δείκτες AFLP έχουν χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των νουκελλικών από τα ζυγωτικά σπορόφυτα που προέρχονται από την διασταύρωση διπλοειδών σωματικών υβριδίων και διπλοειδών υβριδίων από τη Scarano (2003) η οποία χρησιμοποίησε μια άλλη εκδοχή των AFLP χρησιμοποιώντας ένα ένζυμο κοπής, ένα προσαρμοστή και ένα εκκινητή. Η Scarano (2003) αναφέρει ότι η ανάλυση των μοριακών αποτυπωμάτων που προέκυψαν από την τροποποιημένη τεχνική AFLP ήταν πιο πολύπλοκη από την ανάλυση των αντίστοιχων μοριακών αποτυπωμάτων των δεικτών SSR. Επίσης η

ταχύτητα, η υψηλή επαναληψιμότητα, η τεχνική απλότητα και η σταθερή ποιότητα του DNA που απαιτείται μετατρέπουν την διαδικασία των SSR πιο κατάλληλη, από την τροποποιημένη αυτή εκδοχή των AFLP, για τον χαρακτηρισμό των ζυγωτικών φυτών (Scarano, 2003).

Συμπερασματικά, η χρήση της τεχνικής AFLP για τον διαχωρισμό των νουκελλικών από τους ζυγωτικούς απογόνους των εσπεριδοειδών επιτυγχάνει κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ενώ τα αποτελέσματα της πρέπει να εξετάζονται εντός της κάθε διασταύρωσης ξεχωριστά. Πρέπει επίσης να αναφέρουμε ότι για να έχουμε στατιστικώς έγκυρα συμπεράσματα θα έπρεπε να αναλύσουμε ένα μεγαλύτερο αριθμό απογόνων των οικογενειών της πρώτης ομάδας και ένα μεγαλύτερο αριθμό οικογενειών, με διαχωρισμένα νουκελλικά και ζυγωτικά σπορόφυτα, της δεύτερης ομάδας.

4.3. MSAP ανάλυση.

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένα από τα σπουδαιότερα μοντέλα χαρακτηρισμού για τον προσδιορισμό των επιγενετικών αλλαγών στην γονιδιακή έκφραση. Σ' αυτή την εργασία χρησιμοποιήσαμε την ανάλυση MSAP για να ελέγξουμε την ομοιότητα του πρότυπου μεθυλίωσης του DNA ανάμεσα στο μητρικό φυτό και τα νουκελλικά σπορόφυτα. Όλοι οι απόγονοι έχουν ηλικία άνω των δέκα ετών. Είναι πιθανόν, σ' αυτά τα δέκα χρόνια, να έχουν συσσωρευτεί αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA των απογόνων όσο και του μητρικού φυτού. Αυτό δεν μας επιτρέπει άμεσες συγκρίσεις μεταξύ των νουκελλικών απογόνων και του μητρικού φυτού. Παρ' όλα αυτά τα νουκελλικά σπορόφυτα τείνουν να έχουν κοινό πρότυπο μεθυλίωσης με το μητρικό φυτό σε αντίθεση με τα ζυγωτικά σπορόφυτα τα οποία φαίνονται να έχουν λιγότερες ενισχυμένους τύπους από το μητρικό φυτό (μικρότερο ποσοστό μεθυλιωμένου DNA). Γενικά παρατηρείται ότι όταν η ευαισθησία των AFLP στην μεθυλίωση αυξάνεται τότε αυξάνονται οι παρατηρούμενες διαφορές (συνολικά αθροίσματα , Πίνακας 10) .

Παρόμοιες αναλύσεις με την δική μας -για την μεθυλίωση του DNA στα εσπεριδοειδή- βρήκαμε μόνο από τον Hao (2003). Ο ερευνητής αυτός αποτίμησε την διαφοροποίηση που δημιουργείται κατά την διάρκεια ιστοκαλλιέργειας σε κάλους

εσπεριδοειδών (κλωνική σταθερότητα). Εκτίμησε την διαφοροποίηση τόσο σε γενετικό όσο και σε επιγενετικό επίπεδο αναλύοντας τα πρότυπα μεθυλίωσής των κάλων.

Βιβλιογραφία

I. Ελληνική Βιβλιογραφία

- Βασιλακάκης Μ., Θέριος Ι. 1996. Μαθήματα Ειδικής Δενδροκομίας Εσπεριδοειδή. Κεφ:2 20-25, Κεφ:14 187-272.
- Βεκιάρη, Σ. Και Ε. Πρωτοπαπαδάκης 1998. Ποιότητα αιθέριων ελαίων φύλλων και φλοιών Κρητικών λεμονιών ποικιλίας <<Ζαμπεττάκη>>.Πρ. Ετ. Επ. Τεχν. Τρ. Θεσ/νίκη.
- Ποντίκης Κ. 1993. Εσπεριδοειδή. Κεφ:2 23-25, Κεφ:10 175-284, 288-291.
- Πρωτοπαπαδάκης Ε. Και Αγγελάκης Α.. 1983. Συμπεριφορά 24 αυτόριζων υποκειμένων εσπεριδοειδών στις περιοχές Χανίων και Μεσσαράς Κρήτης. Γεωργική Έρευνα 7:24-37.
- Πρωτοπαπαδάκης, Ε., 1992. Εσπεριδοειδή, τα πρώιμα μανταρίνια "Κλαουζελίνα". Γεωργία Κτηνοτροφία Τ.6/92: 44-45.
- Πρωτοπαπαδάκης, Ε. 1994. Οι ποικιλίες λεμονιάς. Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τους. Γεωργία Κτηνοτροφία Τ.8/94 18-20.
- Πρωτοπαπαδάκης Ε. 2004. Τα Εσπεριδοειδή. Κεφ:3 18-19, Κεφ:4 28,35-37, 42.

II. Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Baurens F.C., Bonnot F., Bienvenu D., Causse S., and Legavre T. 2003. Using SD-AFLP and MSAP to assess CCGG methylation in Banana genome. *Plant Molecular Biology Reporter* 21:339-348.
- Breto M.P., Ruiz C., Pina J.A., and Asins M.J. 2001. The diversification of Citrus clementina Hort. Ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21:285-293.
- Cervera M.-T., Garcia L. R. and Martinez-Zapater J.M. 2002. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Mol. Genet. Genomics* 268: 543-552.
- Chao C.-C.T., Devanand P.S. and Cao B.R. 2004. Identification of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu*) cultivars in California using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Proc. XXVI IHC-IVth Int. Symp. Taxonomy of Cultivated Plants*.
- Coletta H.D. F., Machado M.A., Targon M.L.P.N. Moreira M.C.P.Q.D.G & Pompeu Jr. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. *Euphytica* 102:133-139.
- Echeverria S. P., Valencia V. A. H, Kay A. J. 2001. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science* 161:359-367.
- Federici C.T., Fang D.Q., Scora R.W., Roose M.L. 1998. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 96:812-822.
- Fu C.H., Chen C.L., Guo W.W. and Deng X.X. 2004. GISH, AFLP and PCR-RFLP analysis of an intergeneric somatic hybrid combining Goutou sour orange and *Poncirus trifoliata*. *Plant Cell Reports*
- Garcia R., Asins M.J., Forner J., Carbonell E.A. 1999. Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* (1999) 99:511-518.
- Grimanelli D., Leblanc O., Perotti E. and Grossniklaus U. 2001. Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics* 10:597-604.

- Guo W.W., Cheng Y.J. and Deng X.X. 2001. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata*. *Plant Cell Reports*
- Hao Y.J, Wen X.P., Deng X.X. 2004. Genetic and epigenetic evaluations of *Citrus* calluses recovered from slow-growth culture. *J. Plant Physiol.* 161:479-484.
- Luro F., Frederic L., Bove J.M., Ollitrault P. 1995. DNA Amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. *HortScience* 30(5):1063-1067.
- Mingliang Xu, Xiangqian Li, and Schuyler S. Korban. 2000. AFLP-based detection of DNA methylation. *Plant Molecular Biology Reporter* 18:361-368.
- Moore G. A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends in Genetics* 9:536-540.
- Morton J. F. 1987. Fruits of warm climates. p. 130-142,160-172.
- Nicolosi E., Deng Z.N., Gentile A., La Malfa S., Continella G., Tribulato E. 2000. *Citrus* phylogeny and molecular origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100:1155-1166.
- Protopapadakis, E. 1987. Identification by isoenzymes of five cultivars of *Citrus medica* grafted on four rootstocks. *Jour. Hort. Sci.* 62 (3):413-419.
- Protopapadakis E., Kasapakis J., Tsagri M. and Kocias D. 2001. Bergamot as *Citrus* rootstock in Greece. 6th Inter. Congress of *Citrus* Nurserymen. Sao Paolo, July.
- Protopapadakis E. and Papanikolaou X. 1998. A study on Glutamate-Oxaloacetate Transaminase isozymes of *Citrus* Cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45: 561-564.
- Protopapadakis, E. and Papanikolaou X. 1998. Characterization of *Citrus aurantium* and *Citrus taiwanica* rootstocks by isoenzymes and essential oil analysis. *Jour. Hort. Sci. Biot* 73(1) 81-85.
- Protopapadakis, E. and Papanikolaou X. 1998. Characterization by isozymes and essential oils of *Citrus aurantium* and *Citrus taiwanica* rootstocks. 5th Inter. Congress of *Citrus* Nurserymen. Montpellier (France).

- Protopapadakis E., Tzortzakakis S., Kasapakis J., Tsagris M., 2001. Presence of CEVd and HSVD in Citrus bergamia (bergamot) showing yellow vein disease. XV Conference of the International Organization of Citrus Virologists.
- Reuther W. et al. 1967. The Citrus industry Vol. 1. University of California, Division of Agricultural Sciences, Library of Congress Catalog Card No. 67-63041 USA.
- Ruiz C., Breto M. P. & Asins M. J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in Citrus breeding programs using SSR markers. Euphytica 112:89-94.
- Scarano M.T., Tusa N., Abbate L., Lucretti S., Nardi L., Ferrante S. 2003. Flow cytometry, SSR and modified AFLP markers for the identification of zygotic plantlets in backcrosses between Femminello lemon cybrids (2n and 4n) and a diploid clone of Femminello lemon (*Citrus limon* L. Burm. F.) tolerant to mal secco disease. Plant Science 164: 1009-1017.
- Simone M. D., Russo M. P., Puleo G., Marsan P. A., Lorenzoni, Marocco A. and Recupero G. R. 1998. Construction of genetic maps for Citrus aurantium and C. latipes based on AFLP, RAPD and RFLP markers. Fruits. 53:383-390.
- Spielman M. Vinkenoog R. and Scott R. J. 2003. Genetic mechanism of apomixis. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 358:1095-1103.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee, T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Kuiper M. and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23 (21): 4407-4414.
- Xiong L.Z., Xu C.G., Maroof S. M.A. 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. Mol. Gen. Genet. 261:439-446.