

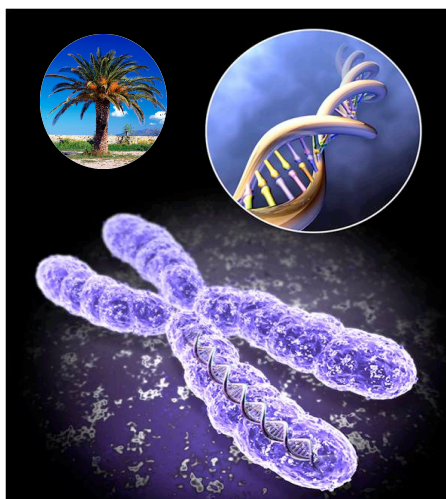


**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**



**ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΤΩΝ  
ΦΟΙΝΙΚΟΔΕΝΔΡΩΝ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ  
ΜΙΚΡΟΔΟΥΦΟΡΙΚΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ**

**ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ ΚΟΚΚΙΝΟΣ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΒΟΥΤΣΙΝΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ – ΚΡΗΤΗΣ  
ΙΟΥΝΙΟΣ, 2011

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:  
ΒΟΥΤΣΙΝΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. Δρ Βουτσινά Αλεξάνδρα, Επιστημονικός Συνεργάτης Εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Κρήτης
2. Δρ. Λουλακάκης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Υπεύθυνος Τομέα Βιολογικών Μαθημάτων Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Κρήτης.
3. Δρ. Σαρρής Παναγιώτης, Επιστημονικός Συνεργάτης Εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Κρήτης.

## *Ευχαριστίες*

*Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Ελέγχου Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών του τμήματος Horticultural Genetics and Biotechnology του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτο Χανίων (MAICh) που πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του Δρ. Παναγιώτη Καλαϊτζή υπεύθυνο σπουδών του τμήματος, προς τον οποίο εκφράζω τις θερμότερες μου ευχαριστίες για τη συνεχή καθοδήγηση του, καθώς και την καθηγήτρια του τμήματος Φυτικής Παραγωγής της σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του ΤΕΙ Ηρακλείου Δρ. Βουτσινά Αλεξάνδρα την οποία ευχαριστώ για τη εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την άριστη συνεργασία μας, η οποία ξεκίνησε με την ανάθεση παρουσίασης σε σεμινάριο και στη συνέχεια της πτυχιακής μου μελέτης ως επιβλέπουσα καθηγήτρια.*

*Ευχαριστώ επίσης, τον υποψήφιο διδάκτορα Μπαζάκο Χρήστο για την πολύτιμη προσφορά του και την ολόπλευρη συμπαράσταση του στην διεκπεραίωση της συγκεκριμένης μελέτης.*

*Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Θεόδωρο Σπανό, τεχνικό ερευνητή του εργαστηρίου και τον κ. Νικόλαο Πετράκη μεταδιδακτορικό ερευνητή για τις συμβουλές και τις υποδείξεις τους καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου μελέτης, καθώς και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου και ιδιαίτερα την Αμαλία Καλογρίδη και Ιωάννα Μανωλικάκη για την συμβολή και συμπαράστασή τους στην εκπόνηση της μελέτης αυτής.*

*Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την υπομονή τους και την υποστήριξη που μου παρείχαν σε όλα μου τα βήματα καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.*

## Περίληψη

Η Κρήτη, εκτός από τη μεγάλη ιστορία της και τον απaráμιλλο αρχαιολογικό της πλούτο έχει και ένα ιδιαίτερα θαυμάσιο φυσικό περιβάλλον με πολλά και μοναδικά φυσικά μνημεία. Ξεχωριστής σημασίας φυσικό μνημείο, είναι το γνωστό σε όλο τον κόσμο, φυσικό φοινικόδασος στο Βαΐ το οποίο είναι το μεγαλύτερο της Ευρώπης, αλλά και το μοναδικό σε όλο τον κόσμο, που συγκροτείται από το είδος φοίνικα, *Phoenix Theophrasti* Greuter (1967). Ενώ ο *Phoenix theophrasti* εντοπίζεται στην Κρήτη από αρχαιοτάτων χρόνων δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα αν είναι εντελώς διαφορετικό είδος από τον *Phoenix dactylifera* ή υπάρχει κάποια συγγένεια μεταξύ των δυο ειδών. Τελευταία η ανάπτυξη των μοριακών δεικτών και συγκεκριμένα των μικροδορυφορικών σε συνδυασμό με σύγχρονες τεχνολογικές πλατφόρμες, δίνει την δυνατότητα για εύρεση πολυμορφισμών που θα βοηθήσουν στον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων αλλά και την εξελικτικής πορείας των διαφόρων ειδών στο πέρασμα του χρόνου. Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν νεαρά φύλλα φοινίκων από όλη την Κρήτη και αφού απομονώθηκε DNA στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός δείκτης, μικροδορυφορικά, για την εύρεση πολυμορφισμών και τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των διαφόρων ατόμων φοίνικα. Τα τρία είδη φοίνικα ομαδοποιήθηκαν επιτυχώς και μια πρώτη εικόνα διαμορφώθηκε για την εξελικτική πορεία των τριών ειδών.

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>5</b>
1.1 Φοίνικας.....	5
1.1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	5
1.1.2 Ταξινόμηση και Μορφολογικά Χαρακτηριστικά .....	7
1.2 Μέθοδοι Ταυτοποίησης Φυτικού Υλικού .....	10
1.2.1 Φαινοτυπικοί Και Βιοχημικοί Δείκτες.....	10
1.2.2 Μοριακοί Δείκτες.....	10
1.2.2.1 Χαρακτηριστικά Μοριακών Δεικτών.....	11
1.2.2.2 Εφαρμογές Των Μοριακών Δεικτών .....	12
1.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) .....	13
1.4 Μοριακοί Δείκτες Που Χρησιμοποιήθηκαν Στο Παρόν Πείραμα .....	16
1.5 Σκοπός Του Πειράματος .....	17
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>18</b>
2.1 Φυτικό Υλικό .....	18
2.2 Εκκινητές.....	18
2.3 Συσκευές .....	19
2.4 Απομόνωση DNA.....	20
2.5 Ποσοτικός-Ποιοτικός Προσδιορισμός του DNA.....	22
2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) .....	22
2.7 Παρασκευή Πηκτής Αγαρόζης-Ηλεκτροφόρηση.....	24
2.8 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση .....	25
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>26</b>
3.1 Ενισχυμένες Ζώνες DNA.....	26
3.2 Διαχωρισμός των Προϊόντων της PCR σε Πηκτή Αγαρόζης .....	28
3.3 Διαχωρισμός των Προϊόντων της PCR σε Τριχοειδή Ηλεκτροφόρηση .....	33
3.4 Κατασκευή δενδρογραμμάτων.....	38
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>40</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>41</b>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Φοίνικας

Οι φοίνικες είναι ξυλώδη, μονοκοτυλήδωνα φυτά που ανήκουν στην οικογένεια των Παλαμιδών ή Αρεκιδών ή Φοινικιδών (Palmae) πολύ πλούσια σε είδη δέντρων, ομαδοποιημένων από μερικά αδιάψευστα και εμφανή κοινά χαρακτηριστικά.

Η ονομασία εξάλλου Palmae σημαίνει στην κυριολεξία «Φοίνικες». Ειδικότερα όμως η ονομασία φοίνικας αναφέρεται στα είδη του γένους Φοίνιξ (Phoenix) της παραπάνω οικογένειας. Γένος που αποτελείται από 17 είδη φοινικοειδών, με μακριά, φτερώδη, χτενοειδή φύλλα. Από αυτά, δυο είδη το *Phoenix canariensis* και *Phoenix dactylifera* είναι τα πιο διαδεδομένα στο μεσογειακό κλίμα και εκείνα που χαρακτηρίζουν το τοπίο. Εξάπλωση που οφείλεται όχι μόνο σε αισθητικά στοιχεία όπως είναι η μεγαλοπρέπεια του φυλλώματος, η αρμονική ταλάντευση κορμού και φύλλων, αλλά και στην προσαρμοστικότητα και αντοχή σε αντίξοες συνθήκες που χαρακτηρίζουν παραλιακές περιοχές, όπως η αλμύρα, ο αέρας, η ξηρασία, η αμμώδης και άνυδρη φύση του εδάφους. Για ότι αφορά την ανθεκτικότητα τους στις χαμηλές θερμοκρασίες, το *Phoenix canariensis* και *Phoenix dactylifera* μπορούν να ζήσουν σε θερμοκρασίες -6°/-7° χωρίς ζημίες (David L. Jones 1995).

#### 1.1.1 Ιστορική Αναδρομή

Η Κρήτη, εκτός από τη μεγάλη ιστορία της και τον απaráμιλλο αρχαιολογικό της πλούτο έχει και ένα ιδιαίτερα θαυμάσιο φυσικό περιβάλλον με πολλά και μοναδικά φυσικά μνημεία. Ξεχωριστής σημασίας φυσικό μνημείο της κρήτης, είναι και το γνωστό σε όλο τον κόσμο, φυσικό φοινικόδασος Βαΐ στο Παλαΐκαστρο του δήμου Ιτάνου, της επαρχείας Σητείας, του Νομού Λασιθίου. Το φοινικόδασος Βαΐ δεν είναι το μόνο μεγαλύτερο και το μοναδικό φυσικό στο χώρο της Ευρώπης, αλλά και το

μοναδικό σε όλο τον κόσμο, που συγκροτείται από το είδος φοίνικα, *Phoenix Theophrasti* Greuter (1967).

Η προέλευση των Φοινίκων της Κρήτης όπως και γενικά στην Ελλάδα είναι άγνωστη, χάνεται στο μακρινό παρελθόν, ενώ υπάρχουν διάφορες σχετικές απόψεις. Κατά την Ελληνική Μυθολογία, όπως μνημονεύεται από τον Όμηρο (στην οδύσσεια), η γέννηση του Θεού Απόλλωνα από τη Λητώ πραγματοποιήθηκε κάτω από ένα φοίνικα στη Νήσο Δήλος. Λέγεται μάλιστα πως τους φοίνικες στη Νήσο Δήλο τους έφερε από τη Κρήτη ο Θησέας όταν οργάνωσε εκεί αγώνες προς τιμή του Απόλλωνα και στεφάνωσε τους νικητές με κλαδιά φοίνικα. Επίσης, η Θεά Άρτεμη, Θεά της Φύσης, διατηρούσε κατά τον Πausανία δάσος από φοίνικες στην Αυλίδα. Από την παρουσία του φοίνικα στη Κρήτη, επίσης, έχουμε και διάφορες παραστάσεις με φοινικόδεντρα σε νομίσματα των αρχαίων πόλεων-κρατών της Κρήτης όπως είναι των πόλεων Έρανος, Πριανός, Ίτανος και Ιεράπετρα. Επίσης, φοίνικες βλέπουμε ζωγραφισμένους ακόμα και σε Μινωικά πιθάρια, κλπ. Πιθανότατα βέβαια οι διάφοροι αγγειογράφοι, ζωγράφοι κλπ. της εποχής εκείνης έπαιρναν τα θέματά τους από το άμεσο φυσικό περιβάλλον τους (της Κρήτης).

Αρκετές όμως πληροφορίες βρίσκουμε και στα διασωθέντα έργα των αρχαίων συγγραφέων. Ο πατέρας της βοτανικής Θεόφραστος (372-287 π.χ.) στο περίφημο έργο του «Περί Φυτών Ιστορίας» αναφέρει ότι στην Κρήτη φυτρώνουν πολλοί φοίνικες που έχουν δύο στελέχη (κορμούς) και μερικοί τρία ή και πέντε. Γνωστά είναι επίσης τα καλούμενα «φοινικικά γράμματα» που γράφονταν σε φύλλα του φοίνικα τα οποία αναφέρει ο Σουίδας, την εφεύρεση των οποίων ιδιοποιούνται οι Ιδαίοι Δάκτυλοι, οι γνωστοί, κατά την παράδοση αρχαιότεροι κάτοικοι της Κρήτης. Όπως λέγεται μάλιστα ο Δίκτυς που ακολούθησε τον Ιδομενέα στον Τρωικό πόλεμο, έγραψε σε φύλλα φοίνικα, με γράμματα φοινικικά για την πολιορκία της Τροίας. Ίσως, όπως λέγεται, οι φοίνικες να διαδόθηκαν στην Κρήτη από τους διάφορους εμπόρους, της Μινωικής εποχής, που εξυπηρετούσαν το εμπόριο μεταξύ της Κρήτης και της Αιγύπτου, Παλαιστίνης, Φοινίκης κλπ. Με την άποψη αυτή, δηλαδή το συσχετισμό των εμπορικών σχέσεων της Κρήτης και της διάδοσης των φοινίκων της, πιθανόν να μην είναι τυχαία και η αναφορά-σύγκριση που κάνει ο Θεόφραστος (372-287 π.χ.) Ίσως η περαιτέρω έρευνα (π.χ. μετρήσεις με ραδιενεργό C14, αναλύσεις των γηραιοκόκκων,

κ.λπ.) να αποδείξει την προέλευση και να διαπιστώσει την χρονολογική εμφάνιση του φοίνικα στην κρήτη (Ζαχαρης Α. 2001).

### **1.1.2 Ταξινόμηση και Μορφολογικά Χαρακτηριστικά**

#### ***PHOENIX CANARIENSIS* -CANARY ISLAND DATE PALM- Φοίνικας Κανάριος**

Είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους φοίνικες (Εικ. 1.1) στον κόσμο και πολύ κοινός παντού, αναπτύσσεται σε θερμές περιοχές, που κυμαίνονται από τη νότιο Γαλλία έως την Αυστραλία και την Καλιφόρνια. Η προέλευση του είναι από τα Κανάρια νησιά και από τη δυτική ακτή της Αφρικής. Το μέγιστο ύψος του φτάνει τα 15-18m, ο κορμός είναι καλυμμένος με τις βάσεις των παλαιότερων φύλλων σε μεγάλη ηλικία. Έχει πυκνή κόμη με κυρτούς λεπτούς κλάδους ομπρελοειδούς μορφής. Τα φύλλα έχουν ανοιχτοπράσινο χρώμα, και είναι μυτερά. Τα άνθη είναι μικρά κίτρινα πολλά μαζί σε τσαμπί. Οι καρποί είναι μικροί χουρμάδες σχήματος οβάλ με ανοικτό κίτρινο χρώμα, πολλοί μαζί σε τσαμπί. Είναι δίοικο δέντρο. Ο σπόρος έχει χαρακτηριστική μορφή με στρογγυλεμένες άκρες. Προτιμά καλά στραγγιζόμενα εδάφη και απαιτεί πλούσια ποτίσματα. Δεν αντέχει στον παγετό και καλό είναι να αποφεύγεται η φύτευση του σε εκτεθειμένες περιοχές της Β. Ελλάδας, πρέπει να φυτεύεται σε καλά ηλιαζόμενες θέσεις. Η χρήση του σε ορεινές περιοχές πρέπει να αποφεύγεται λόγω κλίματος. Η κόμη του όσο είναι νεαρό το φυτό και δεν έχει σχηματίσει κορμό έχει μεγάλο άνοιγμα και σε συνδυασμό με τα λογχοειδή φύλλα, μπορεί να γίνει ενοχλητική ιδιαίτερα κοντά σε καθιστικά ή μονοπάτια. Παρουσιάζει μέτριο ρυθμό ανάπτυξης.



**Εικόνα 1.1:** *Phoenix canariensis*

Πηγή: <http://heavenlytouchmiami.net/canaryislanddate.html>



### *PHOENIX DACTYLIFERA* -Χουρμαδιά, Κουρμαδιά

Κατάγεται από την Αραβία και την Αφρική. Διαφέρει από το προηγούμενο γιατί φθάνει σε μεγαλύτερο ύψος (25-30 m) και έχει λεπτότερο κορμό με διάμετρο 30 cm στον οποίο η πτώση του φύλλου αφήνει ένα χαρακτηριστικό σημάδι. Τα φύλλα έχουν μικρότερο μήκος, είναι λιγότερο πυκνά, με ελαφρότερη κόμη. Συχνά βγάζει βλαστούς στη βάση, χωρίς ποτέ όμως να διακλαδίζεται. Είναι ο φοίνικας (Εικ. 1.2) που παράγει τους χουρμάδες και μόνον βέβαια σε ευνοϊκά κλίματα με μέγεθος που φτάνει τα 5-5,5cm. Αντέχει σε χαμηλές θερμοκρασίες μέχρι τους -8°C.



**Εικόνα 1.2:** *Phoenix dactylifera*

Πηγη: <http://www.biolib.cz/en/taxonimage/id6082/>

### *PHOENIX THEOPHRASTI*-CRETAN DATE PALM -Φοίνικας Θεόφραστος

Η κύρια περιοχή εξάπλωσης του *phoenix theophrasti* (Εικ. 1.3) βρίσκεται στην Κρήτη (Βάι, Νομός Λασιθίου), όπου συναντάται και ο μεγαλύτερος πληθυσμός του είδους (μερικές χιλιάδες άτομα). Εκτός από την Κρήτη, το είδος αναφέρεται ότι εμφανίζεται, επίσης, σε μεμονωμένες συστάδες ολίγων ατόμων σε διάφορα νησιά του Ν. και Α. Αιγαίου και πρόσφατα διαπιστώθηκε η ύπαρξη του φοίνικα και στην Πελοπόννησο (Επίδαυρος) με την παρουσία 10 ατόμων. Εκτός της Ελλάδας, το είδος είναι γνωστό από τα παράλια της Μικράς Ασίας, ιδιαίτερα στην παραλιακή περιοχή της Αττάλειας (ΝΔ. Τουρκία).

Είναι δένδρο με έναν ή περισσότερους κύριους κορμούς, ύψους μέχρι 10-12 m, συμπεριλαμβανομένου του φυλλώματος, περιβαλλόμενους από βραχύτερες πυκνές συστάδες βλαστών που εκφύονται από τη βάση. Κάθε κορμός σχηματίζει στην κορυφή του δέσμη πτεροσχιδών φύλλων, μήκους 3-5 m, που δημιουργούν σφαιρική κόμη. Τα

φυλλάκια του φθάνουν το μήκος των 40 cm, γραμμοειδή, αναδιπλωμένα κατά το μήκος τους, με οξεία κορυφή. Βάση των φύλλων με οξύληκτες ισχυρές άκανθες, περιβάλλουσες τον μίσχο, προερχόμενες από μετασχηματισμό των κατωτέρων



**Εικόνα 1.3:** *Phoenix theophrasti*

Πηγή: <http://hobibahcemiz.net/viewtopic.php?f=35&t=218#p240>

φυλλαρίων. Η περίοδος ανθοφορίας είναι από τον Μάρτιο μέχρι τον Μάιο. Άρσενικες και θηλυκές ταξιανθίες σχηματιζόμενες σε διαφορετικά άτομα (δίοικο φυτό), περικλειόμενες μεταξύ των ακανθωτών βάσεων των φύλλων. Οι άρσενικες ταξιανθίες περικλείονται από σπάθες. Οι θηλυκές ταξιανθίες (φόβες) είναι μεγαλύτερες, απλωτές, αποτελούμενες από πυκνά, ανοιχτοκίτρινα άνθη. Καρπός δρύπη, καστανοκίτρινος στην αρχή, τελικώς μελανόχρους, μη εδώδιμος, 1,5 x 1 cm (Θυμάκης Ν. 2009). Όσον αφορά το γονιδίωμα του, είναι διπλοειδής οργανισμός με χρωμοσωματικό αριθμό 36 (Röser 1994).

## **1.2 Μέθοδοι Ταυτοποίησης Φυτικού Υλικού**

Συχνά, αντιμετωπίζουμε προβλήματα στην ταξινόμηση και το καθορισμό των φυλογενετικών σχέσεων φυτικών οργανισμών η επίλυση των οποίων βασίζεται στη χρήση διαφόρων ειδών δεικτών όπως οι φαινοτυπικοί, οι βιοχημικοί και οι μοριακοί δείκτες.

### **1.2.1 Φαινοτυπικοί και Βιοχημικοί Δείκτες**

Οι φαινοτυπικοί δείκτες αναφέρονται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά και μπορούν να εκτιμηθούν οπτικά, αλλά επηρεάζονται από το περιβάλλον. Ο μικρός αριθμός τέτοιων χαρακτηριστικών με το ανεπιθύμητο αποτέλεσμά τους (π.χ. αλβινισμός, νανισμός κ.λ.π) στα προγράμματα βελτίωσης τα καθιστά μη χρηστικά. Οι βιοχημικοί δείκτες βασίζονται στους πολυμορφισμούς των ισοενζύμων. Όμως, στα περισσότερα οικονομικής σημασίας είδη ο πολυμορφισμός των ενζύμων είναι περιορισμένος, εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού και υπόκειται σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζονται και από το περιβάλλον.

### **1.2.2 Μοριακοί Δείκτες**

Οι μοριακοί δείκτες που είναι γενετικά χαρτογραφημένοι είναι χρήσιμοι για τη μελέτη της κληρονομικότητας γενετικών χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πλυθυσμού, και ως σύγχρονα εργαλεία χρησιμοποιούνται και στο χρωμοσωμικό "βάδισμα" για απομόνωση γονιδίων. Επίσης, υπόσχονται να δώσουν την αναγκαία ώθηση στα προγράμματα βελτίωσης. Είναι σημαντικό να κατανοηθεί ότι οι γενετικοί χάρτες είναι μια συλλογή στατιστικών δεδομένων από τη κατανομή των δεικτών σε πολλούς γονιδιακούς τόπους. Είναι γνωστό ότι οι γενετικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι λειτουργικά γονίδια τα οποία επηρεάζουν το φαινότυπο. Οι μοριακοί δείκτες είναι τυχαία επιλεγμένα τμήματα του DNA, χωρίς αναγκαία επίπτωση στα προϊόντα που τυχόν κωδικοποιούν. Επιπλέον, δεν εξαρτώνται από τα αναπτυξιακά στάδια του φυτού και δύναται να καλύψουν ολόκληρο το γονιδίωμα σε προβλεπόμενες γενετικές αποστάσεις.

Αν θεωρηθεί ότι ο κάθε ένας μοριακός δείκτης αντιπροσωπεύει ένα σημείο από το γενετικό υπόβαθρο κάθε ατόμου, τότε η εκτίμηση όλων των αποτελεσμάτων που

προέρχονται από ανάλυση 2 σημείων, 3 σημείων ή n σημείων διαμορφώνει μια σύνδεση των σημείων. Αλληλόμορφα των μοριακών δεικτών του ίδιου χρωμοσώματος τείνουν να κληρονομούνται μαζί, επιτρέποντας την ομαδοποίηση τους σε ομάδες σύνδεσης. Η σειρά των μοριακών δεικτών πάνω στο χρωμόσωμα και η γενετική απόστασή τους που βασίζεται στο ποσοστό ανασυνδυασμού μεταξύ τους, εξαρτάται από το μέγεθος και το τύπο του πληθυσμού που χρησιμοποιείται καθώς και από το γενετικό υπόβαθρο του οργανισμού. Η προσθήκη νέων δεικτών μπορεί να αλλάξει κάποιο προϋπάρχοντα γενετικό χάρτη. Αυτό δεν αντικρούει παρά μόνο ενισχύει την άποψη ότι οι γενετικοί χάρτες εξελίσσονται, συμπληρώνονται και γίνονται πιο αξιόπιστοι με την πάροδο του χρόνου. Οι μοριακοί δείκτες χρησιμοποιούνται επίσης για τη δημιουργία δένδρων συγγένειας ή εξέλιξης διαφόρων ποικιλιών ή οικοτύπων.

#### **1.2.2.1 Χαρακτηριστικά Μοριακών Δεικτών**

Η φύση των μοριακών δεικτών εξαρτάται άμεσα από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αξιοποίηση τους στα προγράμματα βελτίωσης όπως και σε προγράμματα ταυτοποίησης και πιστοποίησης γενετικού υλικού. Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται εξελίσσονται συνεχώς και η χρήση της μίας ή της άλλης εξαρτάται από το ποσοστό επιθυμίας σάρωσης των χρωμοσωμάτων με τους μοριακούς δείκτες, από το χρόνο, από το κόστος, αλλά επίσης και από το τύπο της διασταύρωσης καθώς και το βαθμό ετεροζυγωτίας. Παρακάτω αναφέρονται οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθοδολογίες μέχρι σήμερα που δίνουν ένα καλό βαθμό επαναληψιμότητας.

Οι μοριακοί δείκτες πρέπει να συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα παρακάτω γνωρίσματα ώστε να παρουσιάζουν τη μέγιστη χρησιμότητα:

- Παρουσία πολυμορφισμού (ή δυνατόν η ύπαρξη πολλών αλληλόμορφων για κάθε γενετικό τόπο).
- Απλη κληρονομικότητα, που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχους αλληλόμορφους.
- Υψηλός συντελεστής κληρονομικότητας. Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων.

- Διασπορά και στην ιδανική περίπτωση ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα.
- Ανεξαρτησία της βιωσιμότητας και του φαινότυπου των φυτών.
- Η μεθοδολογία αναγνώρισης να μην κοστίζει πολύ, να μην έχει αρνητικές συνέπειες στο φυτό και να είναι εύκολη και δυνατή κατά τα νεαρά στάδια της ανάπτυξης των φυτών και συγκεκριμένα όταν τα φυτά αναπτυχθούν τόσο, ώστε να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA.

#### 1.2.2.2 Εφαρμογές των Μοριακών Δεικτών

Οι εφαρμογές των μοριακών δεικτών μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες. Η πρώτη συμπεριλαμβάνει τη βασική γνώση της λειτουργίας του γενετικού υπόβαθρου κάποιου οργανισμού και η δεύτερη την άμεση εφαρμογή στα προγράμματα βελτίωσης. Η πρώτη κατηγορία μπορεί να διαιρεθεί σε δύο κύριες ομάδες:

1. Δημιουργία υψηλής πυκνότητας γενετικού χάρτη, με μοριακούς δείκτες που καλύπτουν ολόκληρο το γονιδίωμα. Μερικά παραδείγματα είναι τα φυτά *Arabidopsis*, ρύζι, καλαμπόκι, κριθάρι, κ.α. ακόμη και ο άνθρωπος.

2. Εντοπισμός γενετικών τόπων που φέρουν γονίδια και κλωνοποίηση των συγκεκριμένων γονιδίων. Η απομόνωση των γονιδίων γίνεται για να διερευνηθεί η λειτουργία τους. η απομόνωση μπορεί να γίνει με βάση τη προσδιορισμένη τους θέση και το "χρωμοσωμικό βάδισμα". Αν και οι διαδικασίες αυτές δεν παρουσιάζουν άμεση εφαρμογή, εντούτοις τα αποτελέσματα που προκύπτουν δημιουργούν τη βάση αξιοποίησης τους στο μέλλον.

Η δεύτερη κατηγορία μπορεί να διαιρεθεί στις ακόλουθες κύριες ομάδες:

1. Ταξινόμηση τράπεζας γενετικού υλικού, ταυτοποίηση ποικιλιών και πιστοποίηση γνησιότητας υβριδίων και υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού με χρήση μοριακών δεικτών που συμπεριλαμβάνουν ή αποκλείουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά γνωρίσματα.

2. Πρόβλεψη της απόδοσης υβριδίων και του γενετικού υπόβαθρου των γονέων. Επιλογή γονέων με βάση τη γνωστή γενετική υπόστασή τους που προκύπτει από τους κοινούς και μη κοινούς μοριακούς δείκτες. Έτσι, ελαττώνεται σημαντικά και ο αριθμός των γονέων, με αποτέλεσμα την ελάττωση του αριθμού των διασταυρώσεων.

3. Ταυτοποίηση ανασυνδυασμού και ταυτόχρονη μείωση του αριθμού των επαναδιασταυρώσεων. Η μεταφορά επιθυμητών γονιδίων από το γονέα-δότη, συνήθως, επιτυγχάνεται με την ταυτόχρονη μεταφορά μη επιθυμητών γενετικών τόπων που συνήθως δεν είναι άμεσα εμφανίσιμοι. Για την απομάκρυνση τους απαιτούνται διαδοχικές διασταυρώσεις που μέσω ανασυνδυασμού θα αντικατασταθούν με DNA του δέκτη. Η δημιουργία τέτοιου ανασυνδυασμού ταυτοποιείται πολύ πιο εύκολα και γρήγορα με τη χρήση μοριακών δεικτών.
4. Ταυτοποίηση και αξιολόγηση του γενετικού υπόβαθρου των άγριων ειδών. Μετά από διασταυρώσεις το γενετικό απόθεμα των άγριων ειδών αναγνωρίζεται και ταυτοποιείται με σχετική ευκολία από καλλιεργούμενα φυτά αυξάνοντας έτσι τη γενετική παραλλακτικότητα και τα περιθώρια βελτίωσης ορισμένων χαρακτηριστικών.
5. Ανάλυση και διαχωρισμός των QTL σε απλά κληρονομικά χαρακτηριστικά (Χατζόπουλος Π., 2001).

### **1.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία επιστημονική τεχνική στη μοριακή βιολογία που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση ενός ή πολλών αντιγράφων ενός τμήματος DNA κατά αρκετές τάξεις μεγέθους, δημιουργώντας χιλιάδες με εκατομμύρια αντίγραφα του συγκεκριμένου τμήματος DNA. Είναι μία τεχνική την οποία εμπνεύστηκε το Δεκέμβριο του 1983 ο Δρ. Kary Mullis ο οποίος και βραβεύτηκε με το Nobel Χημείας γι' αυτό του το επιτεύγμα.

Η PCR είναι μία σχετικά απλή και ταχεία μέθοδος πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας DNA με τη βοήθεια του ενζύμου πολυμεράση και επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών αντιδράσεων που επιτελούνται σε διαφορετική θερμοκρασία. Η αλληλουχία DNA που πρόκειται να πολλαπλασιασθεί επιλέγεται από τους εκκινητές (primers), οι οποίοι είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18-30 βάσεων. Η τεχνική PCR θεωρείται εξαιρετικά ευαίσθητη, δεδομένου ότι το τελικό προϊόν της μετά από 30-40 κύκλους ανέρχεται στο ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η ανάλυση πολύ μικρών ακόμη και μικροσκοπικών δειγμάτων ή ελάχιστων κυττάρων. Η εξαιρετική ευαισθησία των τεχνικών που βασίζονται στην PCR δημιουργεί και το

μεγάλο μειονέκτημα της, δηλ. την επιμόλυνση των δειγμάτων από προϊόν προηγηθείσας αντίδρασης PCR με τους ίδιους εκκινητές. Η μοναδική ευαισθησία της τεχνικής και η δυνατότητα μικρού μήκους προϊόντος (μπορεί να είναι μόνο 40-50 βάσεις) επιτρέπει εύκολα τη χρήση της ακόμη και σε μερικά κλασματοποιημένο DNA, όπως αυτό που λαμβάνεται από ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εμπεδωμένους σε παραφίνη (Καπράνος Ν. 1997).

Η διαδικασία της PCR (Εικ. 1.4) αποτελείται από 3 κύρια βήματα τα οποία επαναλαμβάνονται για 30-40 κύκλους. Η ακολουθία αυτών των κύκλων λαμβάνει χώρα σε μια συσκευή η οποία θερμαίνει και ψύχει τους σωλήνες (tubes), μέσα στους οποίους βρίσκεται το μίγμα των αντιδραστηρίων, σε σύντομο χρονικό διάστημα. Τα 3 κύρια βήματα αναλυτικότερα έχουν ως εξής:

➤ 1<sup>ο</sup> βήμα – Αποδιάταξη στους 94°C:

Κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης το δίκλωνο μόριο του DNA θερμαίνεται στους 94°C με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο μονόκλωνων αλυσίδων. Συγκεκριμένα, η υψηλή θερμοκρασία σπάει τους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τις δύο αλυσίδες μεταξύ τους και έτσι διαχωρίζονται. Όλες οι ενζυματικές αντιδράσεις σταματούν. Η διάρκεια της αποδιάταξης είναι συνήθως 4 min.

➤ 2<sup>ο</sup> βήμα – Υβριδισμός ή αναδιάταξη στους 54°C:

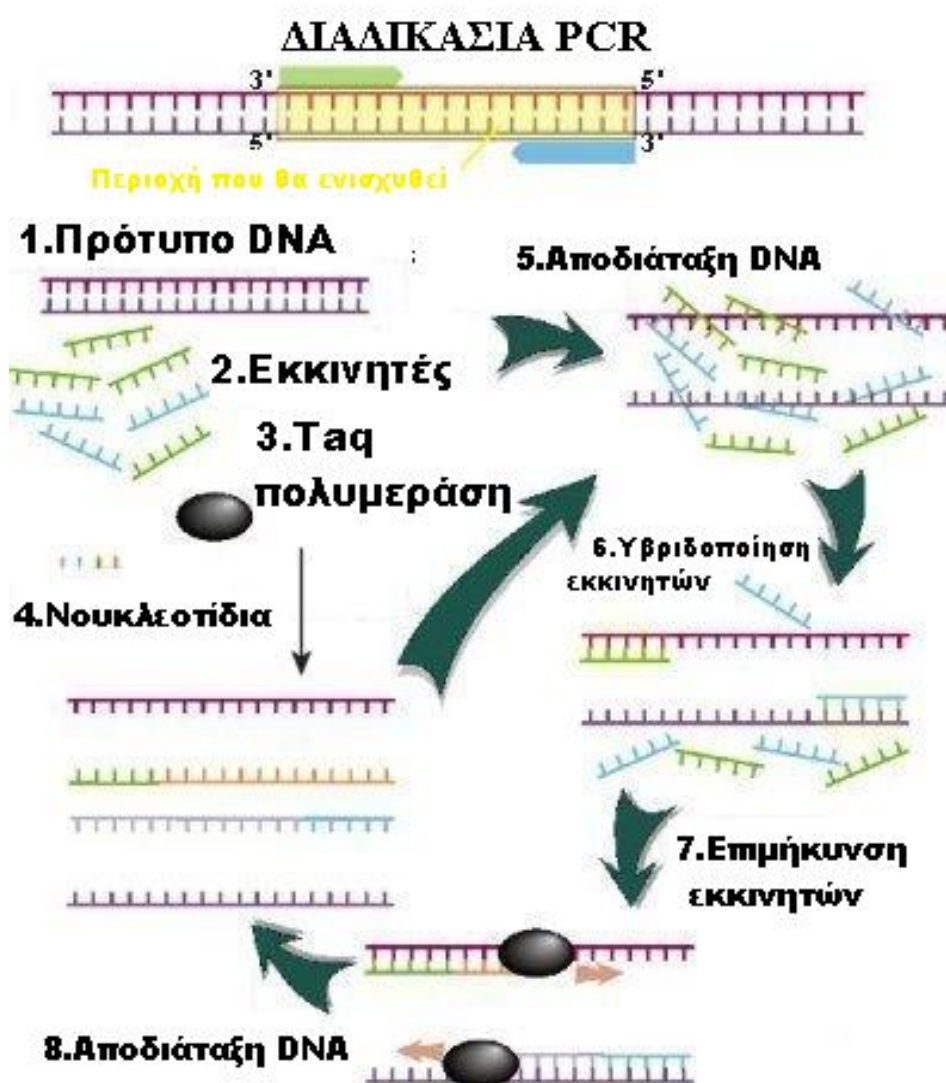
Οι ιοντικοί δεσμοί ανάμεσα στο μονόκλωνο DNA και την αλληλουχία του εκκινητή σπάνε και σχηματίζονται παροδικά. Οι πιο σταθεροί δεσμοί διαρκούν λίγο περισσότερο (στα σημεία όπου οι εκκινητές εφαρμόζουν ακριβώς) και στο μικρό αυτό τμήμα δίκλωνου DNA (εκκινητή και μονή αλυσίδα DNA-στόχου) η πολυμεράση μπορεί να προσκολληθεί και να ξεκινήσει η συμπλήρωση της αλληλουχίας. Μόλις συμπληρωθούν μερικές βάσεις, ο ιοντικός δεσμός είναι τόσο ισχυρός ανάμεσα στο DNA-στόχο και τον εκκινητή ώστε δεν πρόκειται να ξανασπάσει. Ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'-άκρο της μιας αλυσίδας του στόχου και ο άλλος στο 3'άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας του στόχου. Προσθέτοντας εκκινητή σε περίσσεια αποφεύγουμε την υβριδοποίηση του αρχικού DNA με τον εαυτό του.

➤ 3<sup>ο</sup> βήμα – Επιμήκυνση ή πολυμερισμός στους 72°C:

Στους 72°C είναι η ιδανική θερμοκρασία για τη δράση της πολυμεράσης. Οι εκκινητές, στα σημεία όπου έχουν συμπληρωθεί μερικές βάσεις, συνδέονται ήδη με ένα

ισχυρότερο ιοντικό δεσμό στη μονόκλωνη αλυσίδα του DNA ο οποίος υπερτερεί σε σχέση με τις δυνάμεις που προσπαθούν να σπάσουν αυτούς τους δεσμούς. Οι εκκινητές που δε βρίσκονται σε συμπληρωματική αλληλουχία αποκολλούνται εξ αιτίας της υψηλής θερμοκρασίας.

Η πολυμεράση επιμηκύνει και τους δυο εκκινητές προς το μέρος του στόχου διότι η κατεύθυνση της σύνθεσης του DNA ακολουθεί την πορεία από το 5' προς το 3' –άκρο. Η σύνθεση του DNA πραγματοποιείται και στις δυο αλυσίδες αλλά προεκτείνεται και πέρα από την αλληλουχία-στόχο.



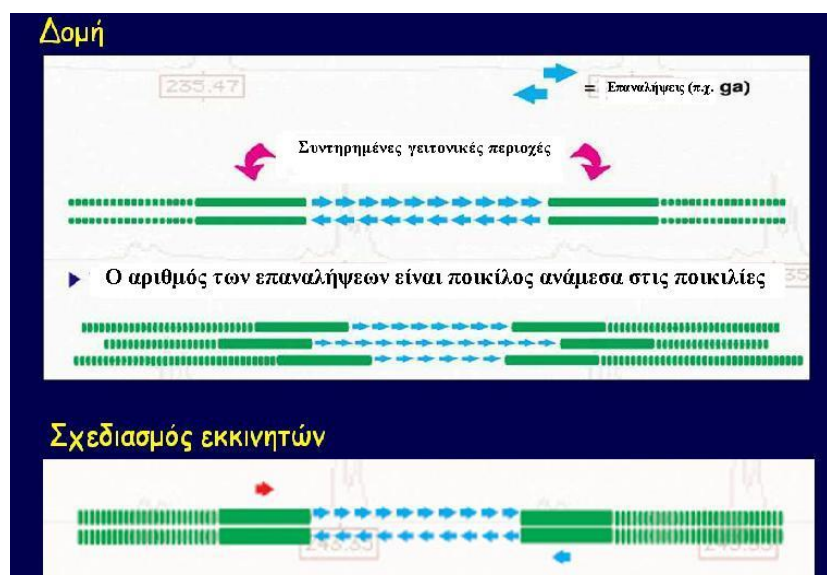
Εικόνα 1.4. Η διαδικασία της PCR και τα στάδιά της.  
Πηγή: <http://neodnaism.com/what-is/pcr>



## 1.4 Μοριακοί Δείκτες που Χρησιμοποιήθηκαν στο Παρόν Πείραμα

### **SSRs (Simple Sequence Repeats): Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες**

Ο όρος απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (SSR simple sequence repeats), που επίσης ονομάζονται μικροδορυφόροι (microsatellites), συνήθως χρησιμοποιείται όταν το μήκος της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας είναι μικρότερο από 10 βάσεις νουκλεοτιδίων. Οι μικροδορυφόροι εντοπίζονται σε αδρανείς περιοχές των χρωμοσωμάτων, όπως στα κεντρομερή, αλληλουχίες του γονιδιώματος που δεν εκφράζονται (μη κωδικές) (Lewin, 2004). Απαντώνται σε ευκαρυωτικά γονιδιώματα και παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό λόγω της παραλλακτικότητας στον αριθμό των επαναλήψεων (Marmiroli *et. al*, 2003). Οι μοριακοί δείκτες ssr βασίζονται στην μέθοδο PCR που περιλαμβάνει την ενίσχυση μικροδορυφορικών περιοχών χρησιμοποιώντας εκκινητές που περιβάλλουν αυτές. Οι αλληλουχίες DNA που περιβάλλουν τις μικροδορυφορικές περιοχές είναι συνήθως συντηρημένες, καθιστώντας δυνατό το σχεδιασμό συγκεκριμένων εκκινητών για την ενίσχυση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Εικ.1.5). Οι μικροδορυφόροι χρησιμοποιούνται ως μία αξιόπιστη τεχνική αλλά προϋποθέτει τη γνώση της αλληλουχίας για το σχεδιασμό των εκκινητών και εξελιγμένα συστήματα ηλεκτροφόρησης με ακριβή διαφοροποίηση των τμημάτων του DNA (Acquaah, 2007).



Εικόνα 1.5: Δομή SSRs.

## **Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της μεθόδου SSRs**

Η μέθοδος των SSRs εκκινητών παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα:

### Πλεονεκτήματα

- Συγκυριάρχοι δείκτες.
- Με υψηλή επαναληψιμότητα.
- Δυνατότητα αυτοματοποίησης.
- Διασκορπισμένοι στο φυτικό γονιδίωμα.
- Ανίχνευση πολλαπλών αλληλόμορφων.

### Μειονεκτήματα

- Απαιτείται γνώση της αλληλουχίας των εκκινητών.
- Μπορεί να αναλυθούν μη κωδικοποιημένες περιοχές.
- Σχετικά υψηλού κόστους.

## **1.5 Σκοπός του Πειράματος**

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη έχει ως στόχο την διερεύνηση πιθανών διαφορών μεταξύ των *Phoenix theophrasti* και *Phoenix dactylifera*. Οι πληθυσμοί φοινίκων που εντοπίζονται στο Βάι είναι *Phoenix theophrasti*. Όποτε δείγματα συλλέχθηκαν από όλη την περιφέρεια της Κρήτης και συγκρίθηκαν με εμπορικούς φοίνικες από τα είδη *P. dactylifera* και *P. canariensis*. Οι γενετικές ομοιότητες και διαφορές εντοπίστηκαν με την χρήση μοριακών δεικτών, Μικροδορυφορικά (Microsatellites), και στην συνέχεια υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των διαφόρων ατόμων φοίνικα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Φυτικό Υλικό

Το φυτικό υλικό, συνολικά 26 άτομα φοίνικα, από το οποίο απομονώθηκε DNA συλλέχθηκε από διάφορες περιοχές της Κρήτης και τυχαία σημεία της κόμης του δένδρου με μεγάλη προσοχή ώστε να αποτελούνται από την πιο νεαρή και υγιή βλάστηση. Αμέσως μετά τη συλλογή, τα νεαρά φύλλα τοποθετήθηκαν σε σακούλες και στη συνέχεια σε φορητό ψυγείο. Τέλος, μεταφέρθηκαν το συντομότερο δυνατό στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας φυτών του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων όπου καταψύχθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Εκκινητές

Για την υλοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τρεις SSRs εκκινητές (Billote N. *et. al*, 2004) η επιλογή των οποίων έγινε βάση του υψηλού πολυμορφισμού που παρουσιάζουν και το γεγονός ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για όλα τα γένη *Phoenix*. Τα ονόματα και οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1.

**Πίνακας 2.1:** Τα ονόματα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, η αλληλουχία των βάσεων κάθε εκκινητή και το μέγεθος του προϊόντος που κυμαίνεται ανάλογα με τον αριθμό των επαναλήψεων της αλληλουχίας (GA).

<b>Όνομα Εκκινητή-Χρωστική</b>	<b>Αλληλουχία</b>	<b>Μέγεθος προϊόντος(bp)</b>
<b>mPdCIR078-F-FAM</b>	5'-TGGATTTCCATTGTGAG-3'	117-152
<b>mPdCIR078-R</b>	5'-CCCGAAGAGACGCTATT-3'	
<b>mPdCIR085-F-HEX</b>	5'-GAGAGAGGGGTGGTGTATT-3'	152-183
<b>mPdCIR085-R</b>	5'-TTCATCCAGAACCACAGTA-3'	
<b>mPdCIR093-F-TET</b>	5'-CCATTTATCATTCCTCTCTTG-3'	153-184
<b>mPdCIR093-R</b>	5'-CTTGGTAGCTGCGTTTCTTG-3'	

### 2.3 Συσκευές

- ❖ Φυγόκεντρος (eppendorf 5804R)
- ❖ Απαγωγός εστία
- ❖ Μικροφυγόκεντρος (eppendorf 5415D)
- ❖ Υδατόλουτρο (BIOLINE)
- ❖ Συσκευή στροβιλίσματος (Vortex Stuart SA8)
- ❖ pH meter (JenWay 3310)
- ❖ Ζυγαριά ακριβείας (Kern EW)
- ❖ Ζυγαριά ακριβείας (Kern KB)
- ❖ Θερμικός αναδευτήρας (Heidolph MR 3001 K)
- ❖ Συσκευή PCR (BIO-RAD S1000™ Thermal Cycler)

- ❖ Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (LIFE TECHNOLOGIES GIBCO BRL HORIZON 11·14)
- ❖ Τροφοδοτικό ρεύματος (GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES PS608)
- ❖ Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES TFX-20M)
- ❖ Φασματοφωτόμετρο (IMPLEN)
- ❖ Τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (PERKIN ELMER ABI PRISM™ 310 GENETIC ANALYSER)
- ❖ Επωαστήρας (Gkister TS-100)

## **2.4 Απομόνωση DNA**

Οι φυτικοί ιστοί περιέχουν, εκτός από το DNA, διάφορες προσμίξεις (RNA, χρωστικές, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες κ.ά.), οι οποίες πρέπει να απομακρυνθούν ώστε να απομονωθεί καθαρό DNA, κατάλληλο για τις αντιδράσεις PCR. Στο παρόν πείραμα η απομόνωση έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο CTAB (Haymes 1996), τροποποιημένη σε αρκετά σημεία ώστε να δώσει την επιθυμητή ποσότητα και καθαρότητα DNA. Το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού έδωσε τιμές ενδεικτικές της καθαρότητας και της συγκέντρωσης του DNA. Ο λόγος της απορρόφησης A260/A280 κυμάνθηκε μεταξύ 1,19 και 1,89. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για το 2X CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) extraction buffer είναι: 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA (Ph 8), 1.4 M NaCl, 1% PVP-40

### Διαδικασία Απομόνωσης DNA

- Τα νεαρά φύλλα (4-6 gr νεαρού ιστού φοίνικα) τοποθετούνται στο γουδί, προστίθεται υγρό άζωτο και ομογενοποιούνται. Ο ιστός μεταφέρεται σε πλαστικό φιαλίδιο (falcon) των 50ml.
- 200 mg ιστού τοποθετούνται σε σωληνάκια, τύπου erpendorf των 2ml και προστίθεται 0,8 ml 2x CTAB ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο έχει προθερμανθεί στους 65°C (υδατόλουτρο) για μισή ώρα. Στη συνέχεια προστίθεται 0,1 ml β-

μερκαπτοαιθανόλης, γίνεται καλή αναδευση (vortex) και επώαση στους 65<sup>0</sup>C για μια ώρα.

➤ Αφήνονται τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και ύστερα προστίθεται 0.66 ml φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1 και αναδεύεται καλά (vortex).

➤ Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (20<sup>0</sup>). Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf των 2 ml.

➤ Τα δυο προηγούμενα στάδια επαναλαμβάνονται ακόμη μια φορά.

➤ Προστίθεται 0.6 ml χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1 και καλή ανάδευση (vortex).

➤ Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf του 1.5 ml.

➤ Προστίθεται 0.6 φορές τον όγκο του υπερκείμενου 100% ισοπροπανόλη και γίνεται ελαφριά ανάδευση.

➤ Επώάζεται για 30-45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Φυγοκεντρηση για 10 λεπτά στις 14000 rpm στους 4<sup>0</sup>C. Γίνεται κατακρήμνιση του DNA και δημιουργία ίζηματος.

➤ Απομακρύνεται το υπερκείμενο αφήνοντας μόνο το ίζημα. Προστίθεται 500μl 70% αιθανόλης και γίνεται καλή ανάδευση.

➤ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 14000rpm στους 4<sup>0</sup>C.

➤ Απομακρύνεται η αιθανόλη και στεγνώνεται καλά το ίζημα στον επωαστήρα στους 50<sup>0</sup>C για 3-5 λεπτά.

➤ Επαναδιαλύεται το ίζημα σε 50-150 μl διπλά απεσταγμένο νερό. Αφού διαλυθεί το ίζημα προστίθεται 1μl RNase A για κάθε 50μl νερού και επώάζεται στους 37 <sup>0</sup>C για μισή ώρα.

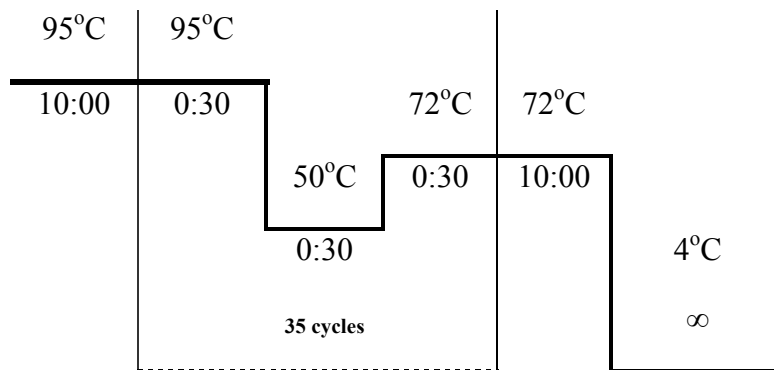
➤ Τοποθέτηση των δειγμάτων στους -20<sup>0</sup>C

## **2.5 Ποσοτικός-Ποιοτικός Προσδιορισμός του DNA**

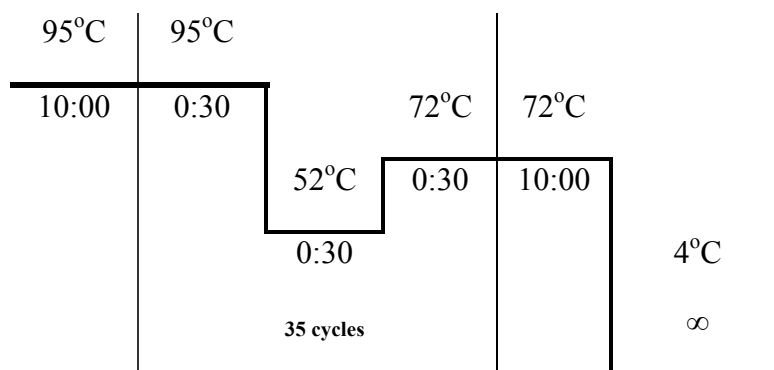
Η φασματοφωτομετρική μέθοδος, όπου το ποσοστό απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της ένωσης που την απορροφά, χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA. Παράλληλα τα δείγματα έτρεξαν σε πηκτή αγαρόζης για να έχουμε και ποιοτικό προσδιορισμό του γενωμικού DNA. Ο λόγος της απορρόφησης του οργάνου A260/A280 έδωσε τιμές ενδεικτικές της καθαρότητας του DNA ενώ με βάση την απορρόφηση στα 260nm υπολογίζεται η συγκέντρωση. Οι αραιώσεις στα δείγματα, τελικής συγκέντρωσης 10ng/μl, έγιναν βασιζόμενες στις μετρήσεις του φασματοφωτόμετρου ώστε να χρησιμοποιηθούν στις αντιδράσεις της PCR.

## **2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)**

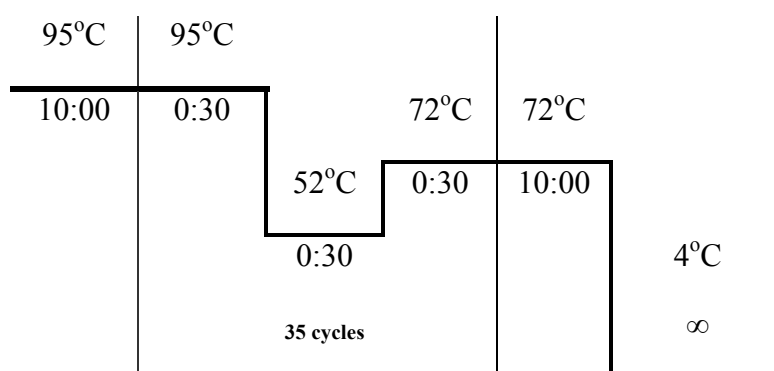
Ο πολλαπλασιασμός του DNA έγινε σε θερμοκυκλικό μηχάνημα PCR με τις εξής συνθήκες: αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 10 min ακολουθούμενη από 35 κύκλους της αντίδρασης οι οποίοι χωρίζονται σε τρία επιμέρους στάδια. Το πρώτο στάδιο αναφέρεται στη θέρμανση στους 95°C για 30 sec έπειτα ακολουθεί πτώση της θερμοκρασίας στους 49-52°C, ανάλογα το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιείται (πίνακας 2.2, 2.3, 2.4), για 30 sec ώστε να υβριδίσει ο εκκινητής και τέλος άνοδος στους 72°C για 30 sec όπου πραγματοποιείται η επιμήκυνση του εκκινητή για τη σύνθεση των νέων κλώνων. Μετά την ολοκλήρωση των απαιτούμενων κύκλων, η θερμοκρασία παρέμεινε στους 72°C για 10 min ώστε να πραγματοποιηθεί η τελική επιμήκυνση των νέων κλώνων. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα παραγόμενα προϊόντα διατηρήθηκαν στους 4°C. Για κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που ανάγονται στο παρακάτω πίνακα (2.5).



**Πίνακας 2.2:** Συνθήκες PCR για το mPdCIR078 ζεύγος εκκινητών σε DNA από ιστό φύλλων.



**Πίνακας 2.3:** Συνθήκες PCR για το mPdCIR085 ζεύγος εκκινητών σε DNA από ιστό φύλλων.



**Πίνακας 2.4:** Συνθήκες PCR για το mPdCIR093 ζεύγος εκκινητών σε DNA από ιστό φύλλων



**Πίνακας 2.5:** Τα ονόματα, οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις, και ο όγκος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

	Αρχική συγκέντρωση (stock)	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (για μία αντίδραση)
<b>PCR buffer</b>	10 x	1 x	<b>2.5 μl</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1.5 mM	<b>1.5 μl</b>
<b>dNTPs</b>	10 mM	0.2 mM	<b>0.5 μl</b>
<b>AmpliTaq Gold DNA Polymerase</b>	5 U/μl	0.025 U/μl	<b>0.125 μl</b>
<b>Primer-F</b>	10 μM	1 μM	<b>1.5 μl</b>
<b>Primer-R</b>	10 μM	1 μM	<b>1.5 μl</b>
<b>Αποστειρωμένο απιονισμένο νερό</b>			<b>Συμπλήρωση για τελικό όγκο 25 μl</b>

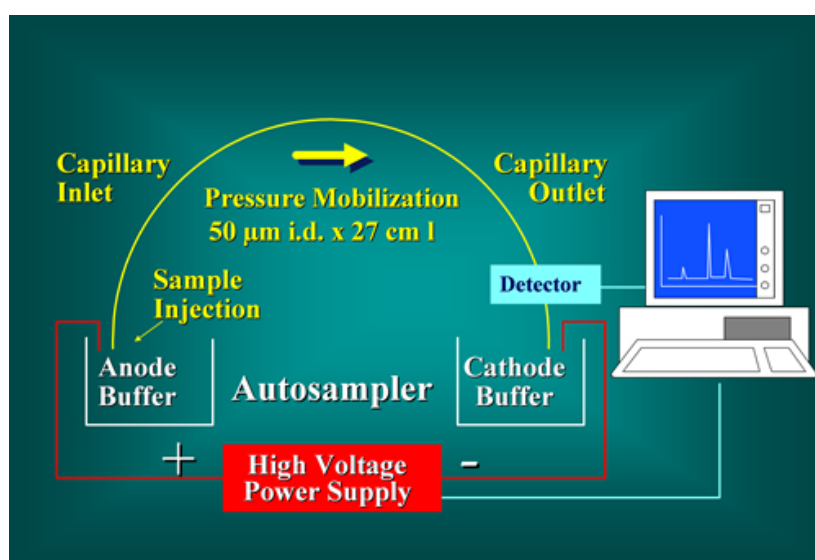
## 2.7 Παρασκευή Πηκτής Αγαρόζης-Ηλεκτροφόρηση

Για την ανάλυση των SSRs χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αγαρόζης 2%. Σε κωνική φιάλη προστέθηκαν 2g αγαρόζης σε 100ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε στο φούρνο μικροκυμάτων όπου το περιεχόμενο της, ενώ έβράζε, ανακινούταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως. Μετά τη διάλυση προστέθηκαν 2μl χρωστική red gel, το διάλυμα αφέθηκε να κρυώσει και στη συνέχεια τοποθετήθηκε μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, με το ειδικό χτενάκι για το σχηματισμό των ‘πηγαδιών’. Το διάλυμα αφέθηκε να πήξει και φορτώθηκε το δείγμα. Σε κάθε ‘πηγάδι’ της πηκτής φορτώθηκε δείγμα όγκου 12μl. Στο πρώτο πηγάδι τοποθετήθηκε ποσότητα πρότυπης κλίμακας μεγέθους τμήματος (50bp ladder). Για την ανάλυση των δειγμάτων στην πηκτική εφαρμόστηκε ρεύμα τάσης 100 Volt για 1 ώρα. Το αποτέλεσμα πάρθηκε με φωτογραφία υπο ακτινοβολία UV.

## 2.8 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis, CE) είναι η πλέον μοντέρνα τεχνική διαχωρισμού και ανάλυσης (Εικ. 2.2). Ο τελικός όγκος δείγματος που χρειάζεται για την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση είναι 10 μl εκ των οποίων τα 7,5μl είναι φορμαμίδιο, 2μl δείκτης GeneScan™-500 TAMRA™ Size Standard (Applied Biosystems) και 0,5μl PCR προϊόν. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Peak Scanner Software v1 (Applied Biosystems) και το 310 GeneScan v. 3.1 (Applied Biosystems). Πλεονεκτεί των άλλων ενόργανων τεχνικών ανάλυσης κατά κύριο λόγο σε τρία σημεία:

- Παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δυνατή διαχωριστική ικανότητα.
- Απαιτεί ελάχιστη ποσότητα δείγματος
- Η κατανάλωση τοξικών οργανικών διαλυτών είναι ελάχιστη αφού απαιτούνται όγκοι της τάξης του μικρόλιτρου. Από τα παραπάνω γίνεται εύκολα κατανοητό ότι η CE είναι φιλική τόσο προς το χρήστη όσο και το περιβάλλον. Στη CE χρησιμοποιούνται συνήθως τριχοειδή στενής διαμέτρου (20-75μm ή ακόμα και 10μm).



**Εικόνα 2.2: Η μέθοδος της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης.**

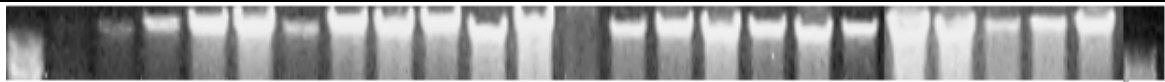
Πηγή: <https://www.chnola-research.org/node/218>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 3.1 Ενισχυμένες Ζώνες DNA

Με βάση τις μετρήσεις που έδωσε το φασματοφωτόμετρο, οι συγκεντρώσεις του DNA στα είκοσι έξι δείγματα κυμάνθηκαν από 37 ng/μl έως 1947 ng/μl ενώ οι λόγοι καθαρότητας (A260/A280) κυμάνθηκαν από 1,195 έως 1,896. Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι μετρήσεις σύμφωνα με το φασματοφωτόμετρο. Οι απομονώσεις του DNA από τα δείγματα έδωσαν επαρκή ποσότητα για τις αντιδράσεις της PCR όπως φαίνεται στην Εικ. 3.1. Μετά από δοκιμαστικές αντιδράσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA, 10ng, 25ng και 50ng, η ποσότητα των 10ng κρίθηκε ότι δίνει τα πιο ικανοποιητικά προϊόντα κατά τις αντιδράσεις PCR.

L	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	L	
																									
1: Out-preveli-2		2: Plakias3		3: Preveli1-DNA1		4: Martsalo 4		5: Out preveli-1		6: L-40-1															
7: AGP-1		8: Plakias 2-A		9: Plakias -1-C		10: NATO-2		11: Preveli 1-1		12: Ch2-B															
13: Vai in 1		14: L-19		15: L-30-A		16: Out-vai1		17: Stalida1		18: Ch3-A															
19: Ch4-A		20: Vai in2		21: L-16		22: Ch1a		23:Phoenix canariensis		L. 1kb DNA Ladder															

**Εικόνα 3.1:** Απεικόνιση δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης έπειτα από απομόνωσή DNA

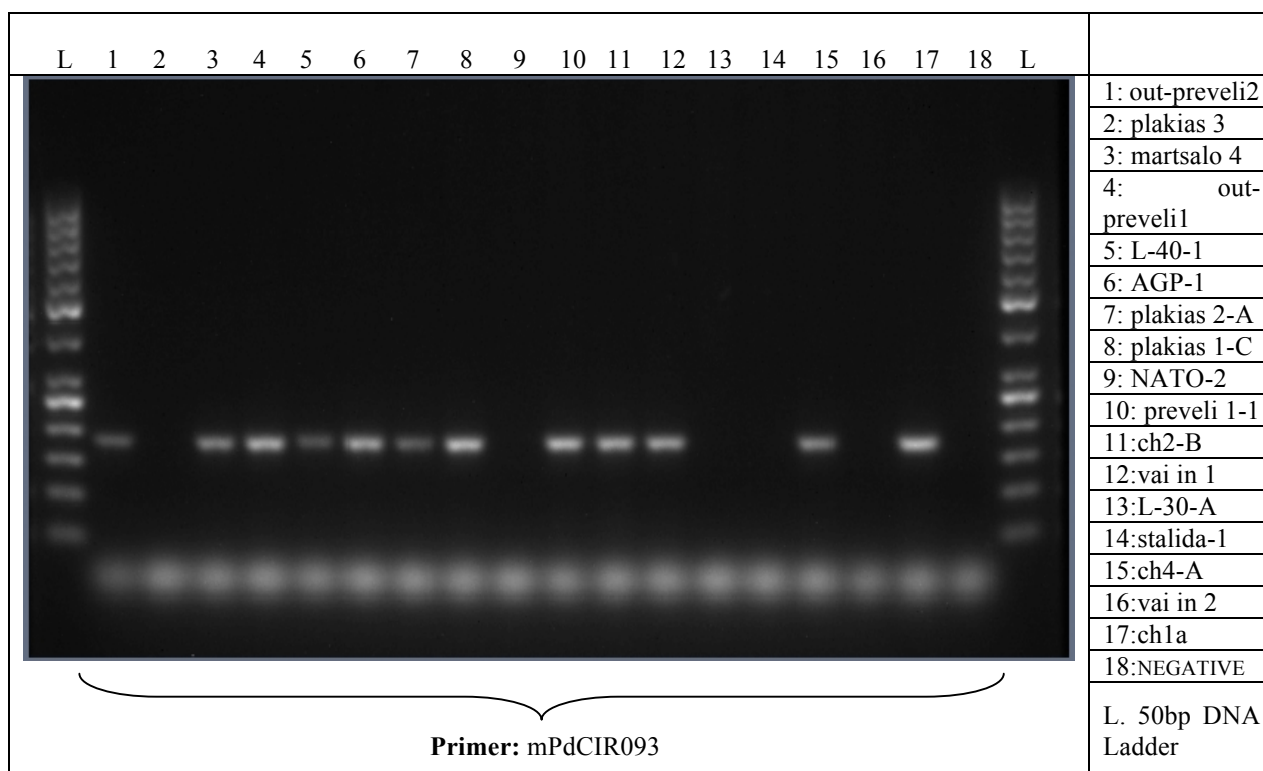
**Πίνακας 3.1:** Απορρόφηση DNA για τα 26 δείγματα του πειράματος

A/A	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	260nm	280nm	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	ΠΟΣΟΤΗΤΑ DNA ng/μl
1	AGP-1	0,440	0,244	1,861	212
2	Ch1a	0,295	0,158	1,896	145
3	Ch2-B	0,713	0,395	1,829	350
4	Ch4-A	0,207	0,118	1,857	96,5
5	Kafavathia	0,094	0,058	1,628	176
6	L-16	0,257	0,142	1,807	481
7	L-30-A	0,134	0,100	1,459	53,5
8	L-40-1	0,331	0,278	1,231	140
9	L-5	0,524	0,424	1,239	982
10	Martsalo-4	0,509	0,275	1,894	248
11	Nato-2	0,566	0,316	1,863	270
12	Out-Preveli-1	0,614	0,343	1,828	300
13	Out-Preveli-2	0,341	0,195	1,817	162
14	Out-Vai1	0,274	0,192	1,426	513
15	Phoenix canariensis-1	0,788	0,435	1,833	1947
16	Phoenix canariensis-2	1,352	0,750	1,827	665
17	Phoenix dactylifera-1	0,821	0,704	1,195	358
18	Phoenix dactylifera-2	0,842	0,659	1,309	386
19	Plakias-1-c	0,471	0,257	1,885	228
20	Plakias-2-A	0,597	0,370	1,707	274
21	Plakias-3	0,113	0,070	1,754	49,5
22	Preveli-1-1	0,698	0,380	1,889	338
23	Preveli1-DNA1	0,560	0,344	1,627	1050
24	Stalida-1	0,310	0,200	1,712	132
25	Vai in-1	0,084	0,051	1,786	37,1
26	Vai in-2	0,179	0,123	1,564	78,2

### 3.2 Διαχωρισμός των Προϊόντων της PCR σε Πηκτή Αγαρόζης

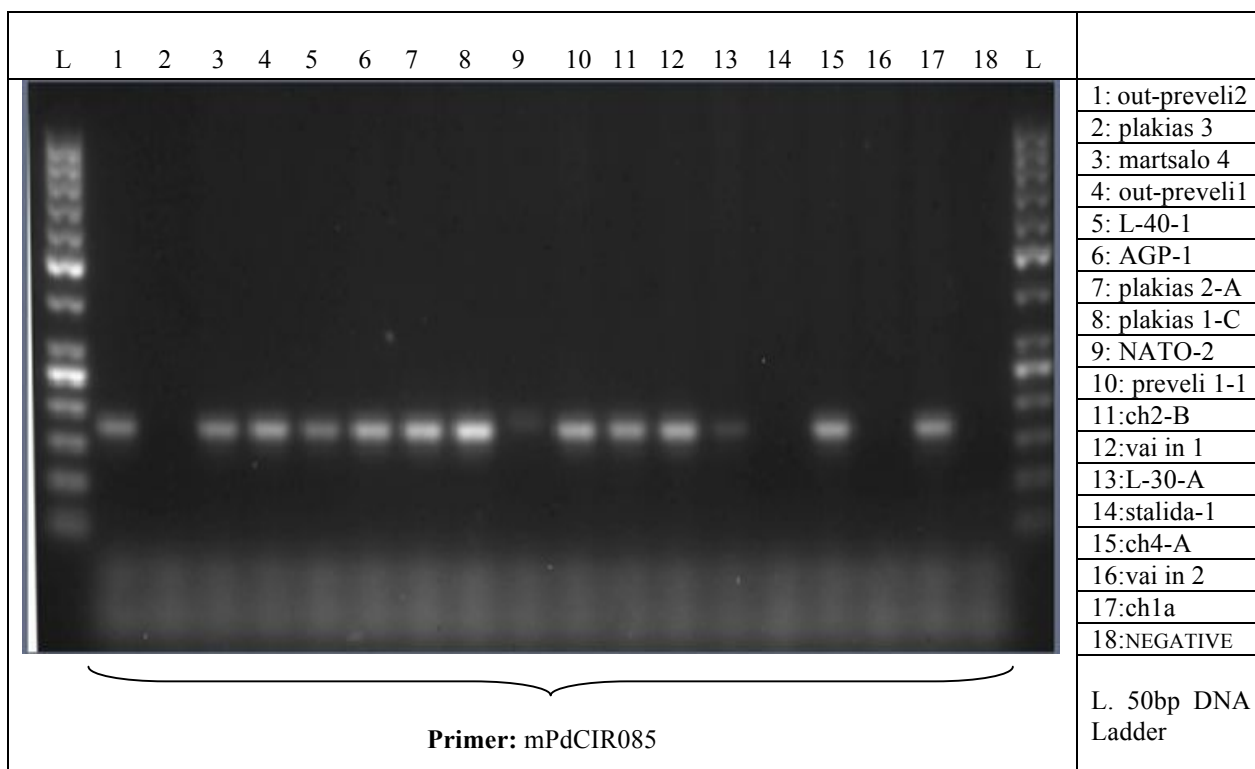
Ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR επετεύχθη, κατόπιν πολλών δοκιμαστικών συνδυασμών της πυκνότητας στην πηκτή αγαρόζης και της ταχύτητας της ηλεκτροφόρησης, όταν η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε πηκτή αγαρόζης 2% με τάση 100 Volts για μία ώρα (εικόνες 3.2-3.6).

Στην εικόνα 3.2 απεικονίζονται το μέγεθος των προϊόντων PCR με τον εκκινητή mPdCIR093 για 17 δείγματα σε πηκτή αγαρόζης. Σύμφωνα με την εικόνα, διακρίνουμε ότι τα 12 δείγματα από τα 17 έδωσαν PCR προϊόν μεγέθους 170-180 bp, δηλαδή το αναμενόμενο μέγεθος σύμφωνα με τον εκκινητή mPdCIR093 (153-184 bp).



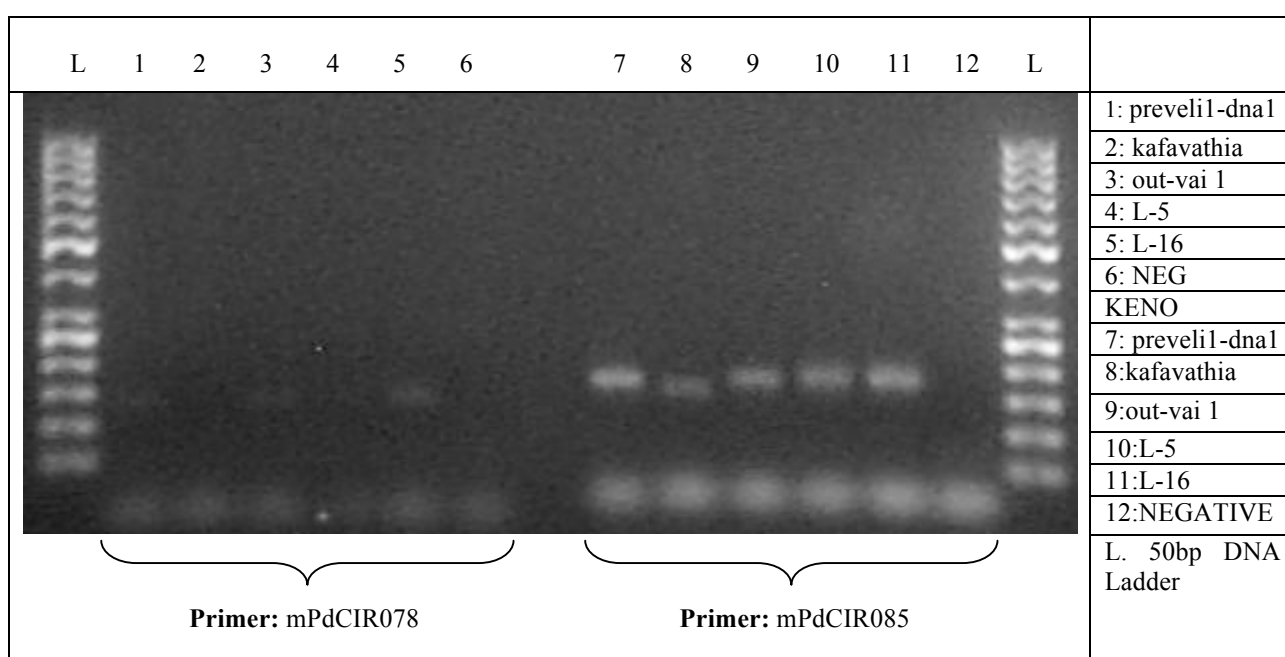
**Εικόνα 3.2:** Πηκτή αγαρόζης 17 δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή mPdCIR093

Στην εικόνα 3.3 διακρίνονται το μέγεθος των προϊόντων PCR με τον εκκινητή mPdCIR085 για 17 δείγματα σε πηκτή αγαρόζης. Σύμφωνα με την εικόνα, παρατηρούμε ότι τα 14 δείγματα από τα 17 έδωσαν PCR προϊόν μεγέθους 160-180 bp, δηλαδή το αναμενόμενο μέγεθος σύμφωνα με τον εκκινητή mPdCIR085 (152-183 bp).



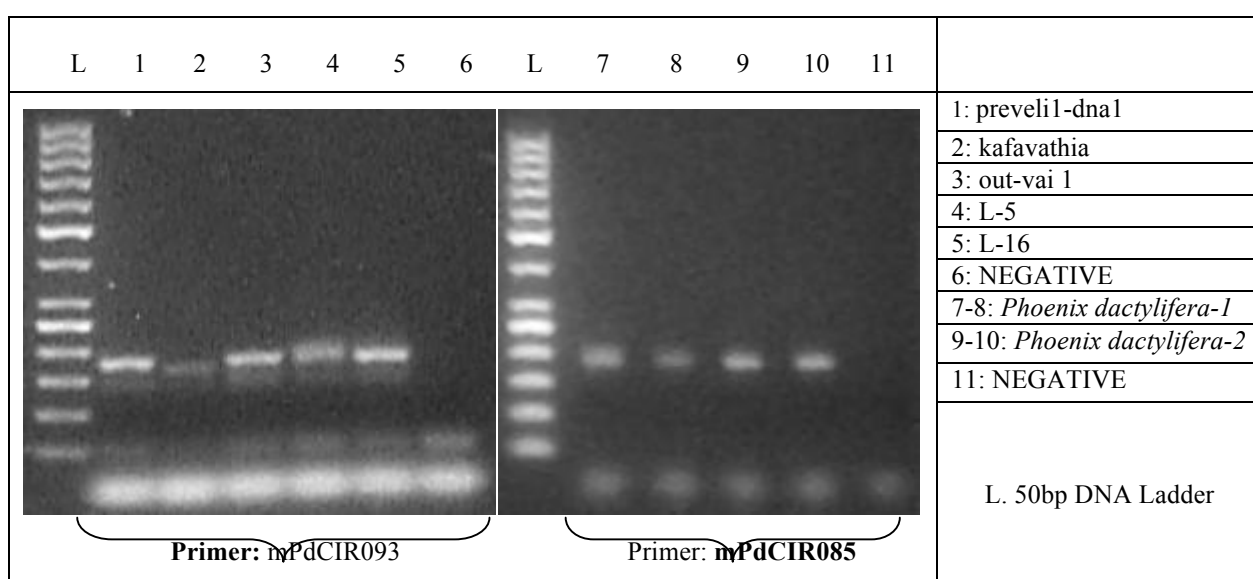
**Εικόνα 3.3:** Πηκτή αγαρόζης 17 δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή mPdCIR085

Στην εικόνα 3.4 παρουσιάζεται το μέγεθος των προϊόντων PCR με τους εκκινητές mPdCIR078 και mPdCIR085 για 5 δείγματα σε πηκτή αγαρόζης. Σύμφωνα με την εικόνα, παρατηρούμε ότι τα 3 δείγματα από τα 5 έδωσαν PCR προϊόν για τον εκκινητή mPdCIR078, μεγέθους 146-152 bp, δηλαδή το αναμενόμενο μέγεθος (117-152 bp). Τα 5 ίδια δείγματα για τον εκκινητή mPdCIR085 έδωσαν και τα 5 PCR προϊόν μεγέθους 160-180 bp, δηλαδή το αναμενόμενο μέγεθος (152-183bp). Το δείγμα 8 (kafavathia) φαίνεται να έχει διαφορά βάσεων με τα άλλα δείγματα (7, 9, 10,11) της τάξεως των 6-10 bp και αυτό αποτελεί ένδειξη πολυμορφισμού.



**Εικόνα 3.4:** Πηκτή αγαρόζης 5 δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή mPdCIR078 στα αριστερά της εικόνας και με τον mPdCIR085 στα δεξιά της εικόνας.

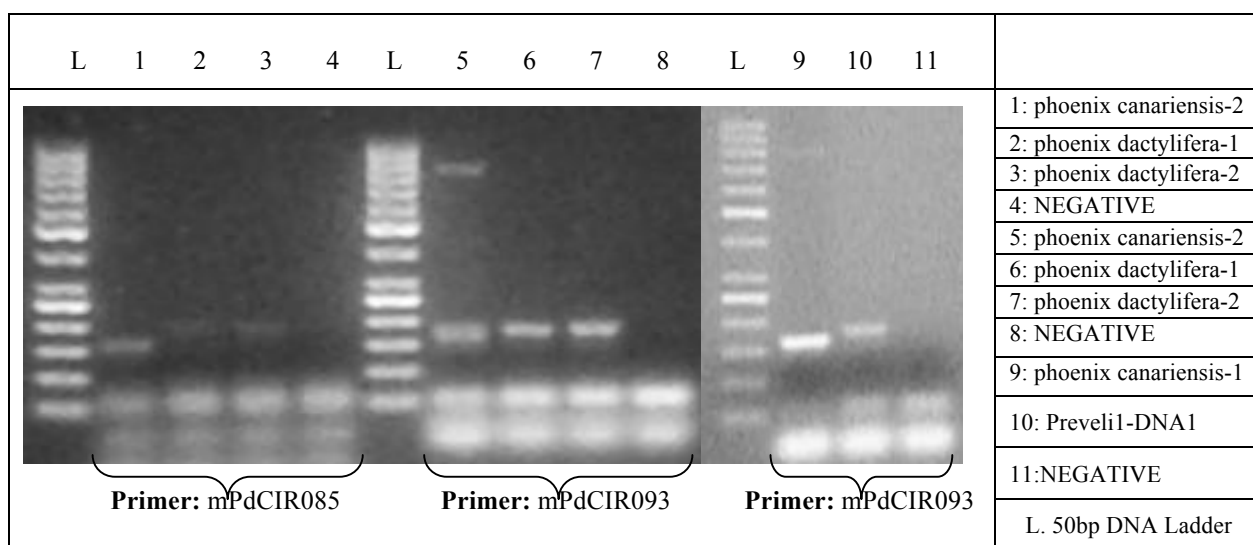
Στην εικόνα 3.5 απεικονίζονται το μέγεθος των προϊόντων PCR με τους εκκινητές mPdCIR093 και mPdCIR085 για 7 δείγματα σε πηκτή αγαρόζης. Σύμφωνα με την εικόνα, παρατηρούμε ότι τα 5 δείγματα έδωσαν όλα PCR προϊόν για τον εκκινητή mPdCIR093, μεγέθους 170-184 bp, δηλαδή το αναμενόμενο μέγεθος (153-184 bp). Τα δείγματα 1, 2, 3, 4, 5 φαίνεται να έχουν διαφορά βάσεων μεταξύ τους της τάξεως των 2-10 bp και αυτό αποτελεί ένδειξη πολυμορφισμού. Τα 2 δείγματα (7-8, 9-10) για τον εκκινητή mPdCIR085 έδωσαν και τα 2 PCR προϊόν μεγέθους 170-180 bp, δηλαδή το αναμενόμενο μέγεθος (152-183bp).



**Εικόνα 3.5:** Πηκτή αγαρόζης 7 δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή mPdCIR093 στα αριστερά της εικόνας και με τον mPdCIR085 στα δεξιά της εικόνας.



Στην εικόνα 3.6 φαίνεται το μέγεθος των προϊόντων PCR με τους εκκινητές mPdCIR085 και mPdCIR093 για 5 δείγματα σε πηκτή αγαρόζης. Σύμφωνα με την εικόνα, παρατηρούμε ότι τα 3 δείγματα (1, 2, 3) έδωσαν όλα PCR προϊόν για τον εκκινητή mPdCIR085, μεγέθους 160-180 bp, δηλαδή το αναμενόμενο μέγεθος (152-183 bp). Το δείγμα 1 (phoenix canariensis-2) με τα δείγματα 2 και 3 έχουν διαφορές στο μέγεθος του προϊόντος παρουσιάζοντας πολυμορφισμό. Τα δείγματα 5, 6 και 7 έδωσαν όλα PCR προϊόν για τον εκκινητή mPdCIR093, μεγέθους 170-180 bp, δηλαδή το αναμενόμενο μέγεθος (153-184 bp). Στο δείγμα 5 ο εκκινητής έχει υβριδίσει μη επιθυμητή περιοχή νουκλεοτιδίων (παραπροϊόν). Τα 2 δείγματα 9 και 10 για τον εκκινητή mPdCIR093 έδωσαν και τα 2 PCR προϊόν μεγέθους 160-180 bp, δηλαδή το αναμενόμενο μέγεθος (153-184bp). Το δείγμα 9 με το δείγμα 10 λόγω της μεγάλης διαφοράς στο μήκος προϊόντος παρουσιάζουν πολυμορφισμό ορατό στη πηκτή αγαρόζης.



**Εικόνα 3.6:** Πηκτή αγαρόζης 5 δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή mPdCIR085 στα αριστερά της εικόνας και με τον mPdCIR093 στη μέση και στα δεξιά της εικόνας.

### **3.3 Διαχωρισμός των Προϊόντων της PCR σε Τριχοειδή Ηλεκτροφόρηση**

Επειδή η διαχωριστική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης με πηκτική αгарόζης δεν είναι επαρκής για τον εντοπισμό διαφορών λίγων νουκλεοτιδικών βάσεων, χρησιμοποιήσαμε τη τριχοειδή ηλεκτροφόρηση του γενετικού αναλυτή ABI310 (Perkin Elmer). Η υψηλή διαχωριστική ικανότητα και η ακρίβεια των μετρήσεων είναι υψίστης σημασίας για την ανάλυση των μικροδορυφορικών, καθώς 2 βάσεις διαφορά κατά την μέτρηση είναι πιθανό να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα. Συνολικά αναλύθηκαν 44 δείγματα, τα οποία περιλαμβάνουν 22 άτομα φοίνικα σε 2 τόπους (loci) (Πίνακας 3.2). Η μελέτη μόνο 2 τόπων από τους 3 που είχε αρχικά σχεδιαστεί να μελετήσουμε, οφείλεται σε πιθανό λανθασμένο σχεδιασμό ενός ζευγάρι εκκινητών (mPdCIR078) από τους Billotte et al., 2004, καθώς όλες οι συνθήκες PCR που δοκιμάσαμε δεν μας έδωσαν ενισχυμένο προϊόν.

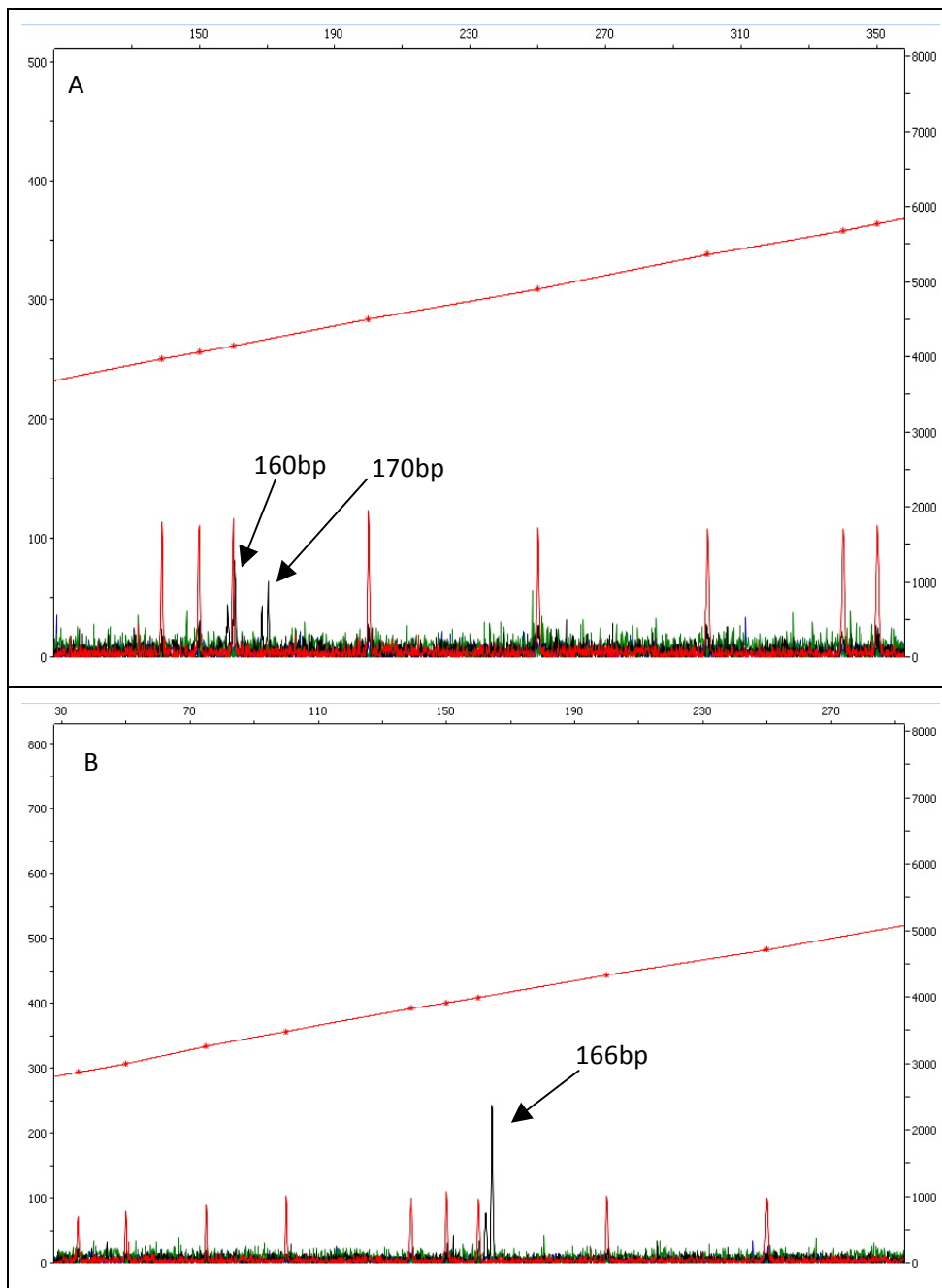
Οι εκκινητές του τόπου 1 (mPdCIR085), επισημάνθηκαν με την χρωστική HEX ενώ οι εκκινητές του τόπου 2 (mPdCIR093) με την χρωστική TET, δίνοντας μαύρο και πράσινο χρώμα κορυφή αντίστοιχα, στην ανάλυση του ηλεκτροφερογράμματος. Επειδή ο φοίνικας είναι διπλοειδής οργανισμός, η ύπαρξη μιας κορυφής στο ηλεκτροφερόγραμμα υποδηλώνει ομόζυγο άτομο, ενώ η ύπαρξη δυο κορυφών ετερόζυγο άτομο.

**Πίνακας 3.2:** Οι πολυμορφισμοί μικροδορυφορικών ανά τόπο που προέκυψαν έπειτα από ανάλυση τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

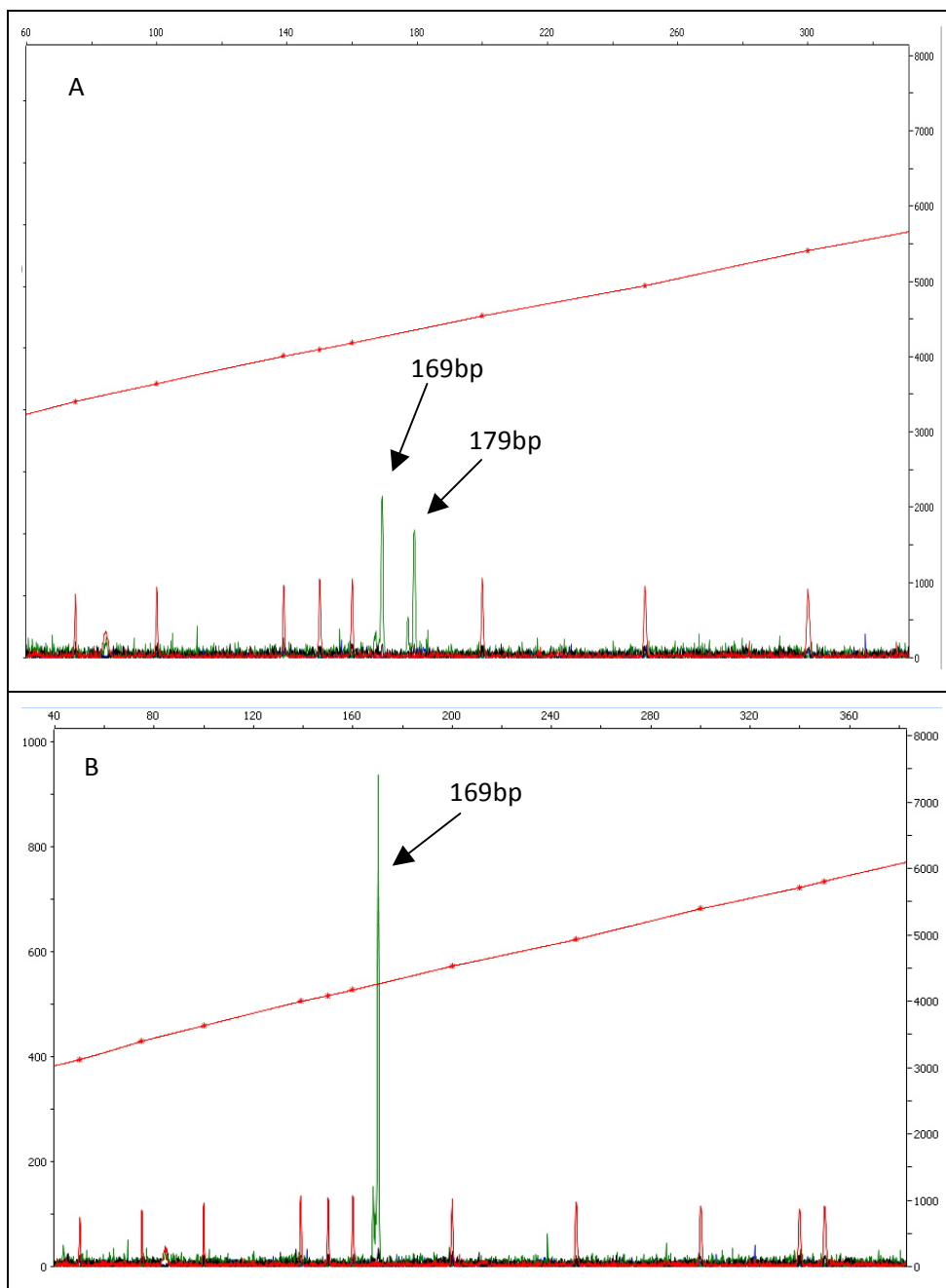
Δείγματα DNA	Τόπος 1 (locus)		Τόπος 2 (locus)	
	Αλληλόμορφο1	Αλληλόμορφο2	Αλληλόμορφο1	Αλληλόμορφο2
<b>out-preveli-2</b>	164 bp	164 bp	169 bp	169 bp
<b>preveli-DNA1</b>	166 bp	166 bp	171 bp	171 bp
<b>Martsalo 4</b>	164 bp	164 bp	169 bp	169 bp
<b>out-preveli-1</b>	164 bp	164 bp	169 bp	169 bp
<b>L-40-1</b>	164 bp	164 bp	169 bp	169 bp
<b>AGP-1</b>	164 bp	164 bp	169 bp	169 bp
<b>Plakias 2-A</b>	164 bp	164 bp	169 bp	169 bp
<b>Plakias-1-C</b>	164 bp	164 bp	169 bp	169 bp
<b>Preveli 1-1</b>	164 bp	164 bp	169 bp	169 bp
<b>ch2-B</b>	164 bp	164 bp	169 bp	169 bp
<b>Kafavathia</b>	148 bp	148 bp	157 bp	157 bp
<b>Vai in 1</b>	164 bp	164 bp	169 bp	169 bp
<b>out-Vai1</b>	164 bp	164 bp	171 bp	171 bp
<b>L-5</b>	160 bp	170 bp	169 bp	179 bp
<b>Ch4-A</b>	164 bp	164 bp	169 bp	169 bp
<b>Ch1a</b>	164 bp	164 bp	169 bp	169 bp
<b>phoenix canariensis-1</b>	148 bp	148 bp	155 bp	155 bp
<b>phoenix canariensis-2</b>	148 bp	148 bp	155 bp	165 bp
<b>phoenix dactylifera-1</b>	170 bp	178 bp	171 bp	171 bp
<b>phoenix dactylifera-2</b>	178 bp	178 bp	169 bp	171 bp
<b>NATO-2</b>	168 bp	176 bp	—	—
<b>L-30-A</b>	164 bp	164 bp	—	—

Στις εικόνες 3.7 και 3.8 παρατηρούμε τα ηλεκτροφερογράμματα από 2 άτομα του Τόπου 1 και του Τόπου 2 αντίστοιχα. Οι κορυφές με κόκκινο χρώμα είναι ο δείκτης GS500 ο οποίος έχει επισημανθεί με την χρωστική TAMRA και χρησιμοποιείται για την ακριβή μέτρηση του ενισχυμένου προϊόντος PCR. Έτσι στην εικόνα 3.7 το άτομο “L-5” του τόπου 1 είναι ετερόζυγο δίνοντας 2 μαύρες κορυφές ενώ στο άτομο “preveli-DNA1” η μια μόνο κορυφή ομολογεί ομόζυγο άτομο. Αντίστοιχα στην εικόνα 3.8 το άτομο “Vai in 1” είναι ομόζυγο στον τόπο 2, ενώ οι 2 κορυφές του ατόμου “L-5” υποδηλώνουν την ετεροζυγωτία του. Κατά την παρατήρηση των ηλεκτροφερογραμμάτων εντοπίζονται κάποιες μικρότερες κορυφές ακριβώς δίπλα στις μεγάλες κορυφές. Αυτές τις κορυφές με διαφορά μια βάση από την μεγάλη κορυφή δεν τις λαμβάνουμε υπόψη, διότι οφείλονται σε παραπροϊόν κατά την ενίσχυση με PCR.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση όλων των ηλεκτροφερογραμμάτων μας έδωσαν μια γενική εικόνα σχετικά με το πολυμορφισμό που εντοπίζεται σε αυτά τα άτομα στους συγκεκριμένους δυο τόπους. Όπως παρατηρούμε στον Πίνακα 3.2, παρόλο που το ποσοστό ετερόζυγων ατόμων είναι μικρό καθώς εντοπίστηκαν μόνο 3 ετερόζυγα άτομα στον κάθε τόπο, ο υψηλός πολυμορφισμός αυτών των δυο τόπων δείχνει ικανός να διαχωρίσει τα είδη του φοίνικα. Βέβαια η αξιοπιστία του διαχωρισμού, χρησιμοποιώντας μόνο δυο τόπους, δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή όμως είναι ικανή για να μας δώσει μια πρώτη εικόνα για τον διαχωρισμό του *P. theophrasti* από τον *P. dactyliphera* και τον *P. canariensis*. Έτσι ακολούθησε κατασκευή δένδρογραμμάτων UPGMA για την απόκτηση πιο ξεκάθαρης εικόνας σχετικά με την ομαδοποίηση και τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ατόμων φοίνικα.



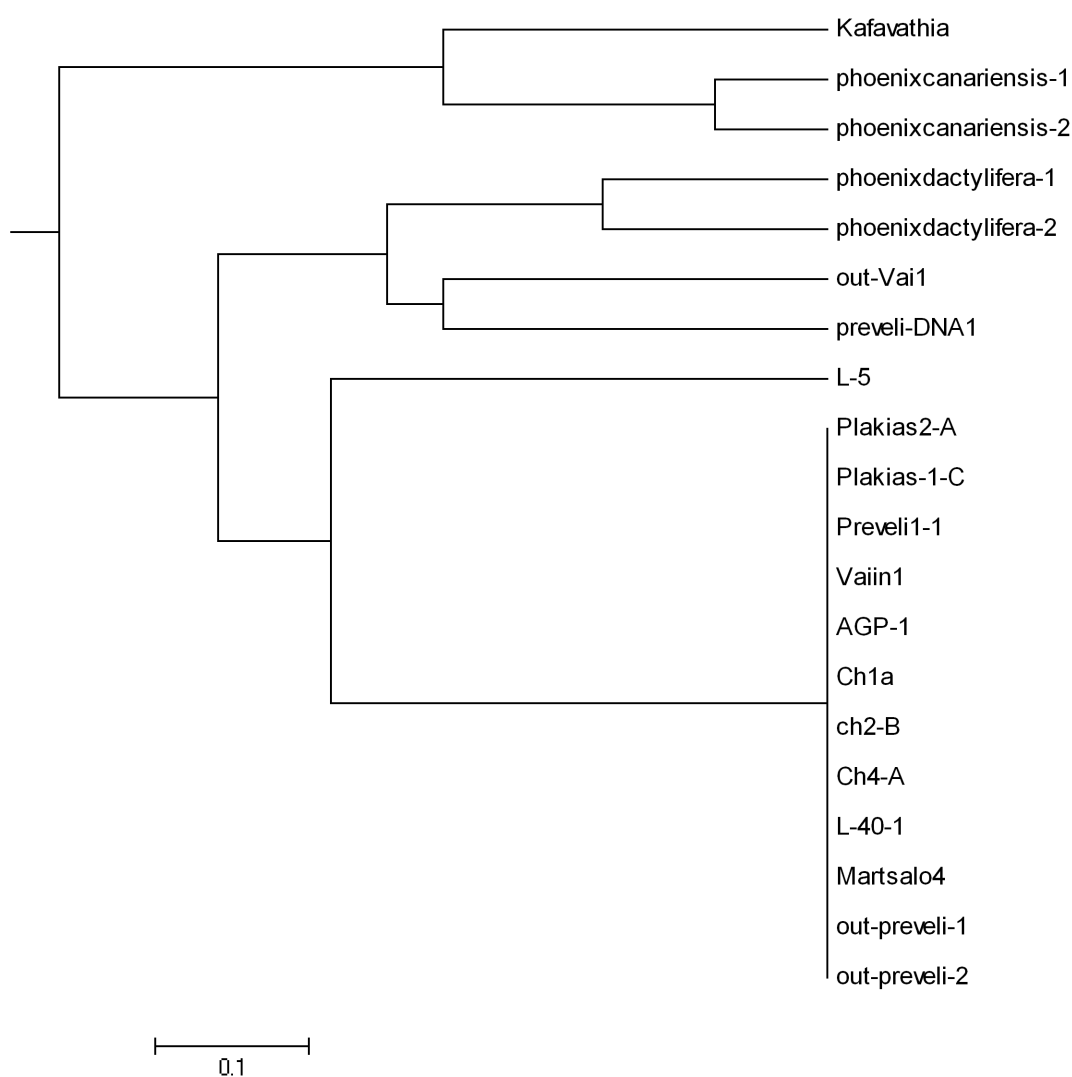
**Εικόνα 3.7:** Ηλεκτροφερόγραμμα ατόμων L-5 (A) και preveli-DNA1 (B). Με κόκκινο χρώμα φαίνεται ο δείκτης GS500-TAMRA.



**Εικόνα 3.8:** Ηλεκτροφερόγραμμα ατόμων L-5 (A) και V*ai* in 1 (B) με τη μέθοδο τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Με κόκκινο χρώμα φαίνεται ο δείκτης GS500-TAMRA.

### 3.4 Κατασκευή δενδρογραμμάτων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του πίνακα 3.2 έγινε με το λογισμικό Power Marker v3.25 (Liu K. and Muse S.V., 2005). Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν κατά Nei1983 και αναλύθηκαν με τη μέθοδο UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means) με αποτέλεσμα δενδρογράμμα με ρίζα (Εικόνα 3.9). Η ρίζα σε ένα δένδρο δείχνει τον κοινό πρόγονο των ειδών που περιλαμβάνει ενώ συγχρόνως δηλώνεται η εξελικτική κατεύθυνση και τα εξελικτικά μονοπάτια μέσω των οποίων ένα ή περισσότερα είδη προήλθαν από κάποιο άλλο.



Εικόνα 3.9. Δενδρογράμμα μικροδορυφορικών με την μέθοδο UPGMA

Στο δένδρογραμμα με ρίζα (Εικόνα 3.9) που προέκυψε με την μέθοδο UPGMA μπορούμε να ξεχωρίσουμε 3 ομάδες ατομών φοίνικα. Συγκεκριμένα, η πρώτη ομάδα που ξεχωρίζει και βρίσκεται σε μακρινή γενετική απόσταση από τα υπόλοιπα άτομα και είδη, περιλαμβάνει τα άτομα του είδους *P. canariensis* και το άτομο “kavafathia” που πολύ πιθανό να ανήκει στο είδος *P. canariensis*. Στην συνέχεια, η δεύτερη ομάδα που διακρίνουμε αποτελείται από τα δυο *P. dactyliphera* και τα άτομα “out-vail” και “preveli-DNA1” που ενώ πιστεύεται ότι ανήκουν στο είδος *P.theophrasti*, στο δένδρογραμμά μας βρίσκονται σε κοντινή γενετική απόσταση από τα *P. dactyliphera*. Στην τρίτη ομάδα που είναι πολυπληθέστερη από τις δυο προηγούμενες εντοπίζονται όλα τα υπόλοιπα άτομα δίνοντας μια πρώτη εικόνα ότι ο *P. theophrasti* μπορεί να αποτελεί διαφορετικό είδος από τον *P. dactyliphera*. Αυτό υποδηλώνεται κυρίως από την γενετική απόσταση που παρόλο δεν είναι το ίδιο μεγάλη όπως αυτή με τον *P. canariensis* αλλά είναι ικανή να διαφοροποιήσει τα δυο είδη. Βέβαια η μικρή γενετική απόσταση μπορεί να υποδηλώνει ένα εξελικτικό μονοπάτι μέσα από το οποίο ο *P.theophrasti* προήλθε από τον *P. dactyliphera*.



### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία έγινε μια πρώτη προσπάθεια για τον γενετικό διαχωρισμό του *P.theophrasti* από τους *P. dactyliphera* και *P. canariensis*. Για αυτό τον σκοπό συλλέχθηκαν δείγματα από τοποθεσίες που βρίσκεται ο *P.theophrasti* και στην συνέχεια έγινε χρήση του μοριακού δείκτη SSR (Μικροδορυφορικά) για τον εντοπισμό της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των διαφόρων ατόμων φοίνικα. Ο λόγος που εφαρμόστηκε ο μοριακός δείκτης SSR είναι ότι βρίσκεται σε αφθονία στο γονιδίωμα, είναι συγκυρίαρχος δείκτης και έχει υψηλή επαναληψιμότητα. Έτσι, η μελέτη 20 ατόμων σε 2 τόπους παρουσίασε ικανό πολυμορφισμό για τον διαχωρισμό και την ομαδοποίηση των ατόμων φοίνικα σε τρεις αναμενόμενες ομάδες, οι οποίες αποτελούν τα τρία είδη φοίνικα. Το πιο ενδιαφέρον συμπέρασμα είναι ότι ο *P.theophrasti* φαίνεται να είναι ξεχωριστό είδος αλλά σε κοντινή γενετική απόσταση από τον *P.dactyliphera*. Βέβαια, ο αριθμός των τόπων και ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επαρκής για να διαχωρίσει τα είδη φοίνικα αλλά δεν κρίνεται επαρκής για ασφαλή συμπεράσματα καθώς η μελλοντική μελέτη περισσότερων ατόμων με περισσότερους SSRs μοριακούς δείκτες κρίνεται αναγκαία.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acquaah G., (2007). Biotechnology in plant breeding. In *Principles of Plant Genetics and Breeding*, Acquaah, G(ed.). Blackwell Publishing. 231-256.
- Billotte N., Marseillac N., Brottier P., Noyer J.-L., Jacquemoud -Collet J.-P., Moreau C., Couvreur T., Chevallier M.-H., Pintaud J.-C., Risterucci A.-M., (2004). Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. *Molecular Ecology Notes* (4) :256 –258.
- Haymes K. M., (1996). Mini-prep method suitable for a plant breeding program. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14, 280-284.
- Jones D. L., (1995). *Palms Throughout the World*. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C. chapter 1
- Lewin B., (2004). *Genes* VIII. (1) : 158
- Liu K. and Muse S.V., (2005). Power Marker: Integrated analysis and environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21(9):2128-2129.
- Marmioli N., Peano C. Maestri E. (2003). Advanced PCR techniques in identifying food components, *in: Food Authenticity and Traceability* (editor: Michele Lees). Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, England. 3-33.
- Röser M., (1994). *Pathways of karyological differentiation in palms* (Arecaceae). *Pl. Syst. Evol.* (189): 83-122.
- Ζαχάρης Α., (2001). Το φοινικόδασος Βάι και οι φοίνικες της Κρήτης. Εκδ. δωρικός, Αθήνα, (94): 35-46
- Θυμακης Ν., (2009). Βιβλίο Ερυθρών Δεδομένων των Σπάνιων και Απειλούμενων Φυτών της Ελλάδας. Πάτρα, Τόμος (Β) Δεύτερος Ε-Ζ. 256
- Καπράνος Ν., (1997). In situ Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (In situ PCR). *Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής*; 11 (Παρ. 1):25-34
- Χατζόπουλος Π., (2001). Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα, 9: 325-339.