

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας



«Μοριακή διερεύνηση της ποικιλότητας ποικιλιών του κελυφοτού φιστικιού (*Pistacia vera*)»

Ονοματεπώνυμο Φοιτήτριας (Α.Μ.)

Δάμπαση Έλλη (02512)

Επιβλέπων Καθηγητής
Μαδέσης Παναγιώτης
Επίκουρος Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας

Βόλος, 2024

«Μοριακή διερεύνηση της ποικιλότητας ποικιλιών του κελυφωτού φιστικιού (*Pistacia vera*)»

«Molecular screening of the diversity of Pistachio cultivars (*Pistacia vera*)»

Η εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

Μαδέσης Παναγιώτης, Επίκουρο Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας

Παυλή Ουρανία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής Βελτίωσης Φυτών

Μαλέτσικα Περσεφόνη, Επίκουρος Καθηγήτρια Δενδροκομίας – Ελαιοκομίας

Υπεύθυνη Δήλωση:

«Πιστοποιώ ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής διατριβής που εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος»

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου, κ. Μαδέση Παναγιώτη Επίκουρο Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογία, για την καθοδήγηση που μου προσέφερε καθώς και τον χρόνο που διέθεσε για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τις καθηγήτριες και μέλη της τριμελούς επιτροπής κα. Παυλή Ουρανία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής Βελτίωσης Φυτών και την κα. Μαλέτσικα Περσεφόνη, Επίκουρος Καθηγήτρια Δενδροκομίας – Ελαιοκομίας. Ακόμη ένα μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου καθώς η βοήθειά τους ήταν αναμφίβολα κρίσιμη για την ομαλή πορεία του πειράματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια η καλλιέργεια της φιστικιάς (*Pistacia vera*) στην Ελλάδα αυξάνεται με ταχύτατους ρυθμούς καθώς η οικονομική αλλά και η διατροφική αξία του καρπού της είναι υψηλή. Κεντρίζοντας το ενδιαφέρον των παραγωγών όλο και περισσότερο, ήταν αναγκαία η δημιουργία ποικιλιών, οι οποίες θα εμφάνιζαν ανθεκτικότητα σε συνήθεις ασθένειες που πλήττουν τις καλλιέργειες των ακρόδρυων στην χώρα μας αλλά και την μείωση του φαινομένου της παρενειαυτοφορίας ή αλλιώς της εναλλαγής και διακύμανσης της καρποφορίας από χρονιά σε χρονιά. Ο καθηγητής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Κ. Ποντίκης το 1986 απομόνωσε σπορόφυτα της ποικιλίας 'Αιγίνης', με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Έπειτα από αρκετή έρευνα προέκυψε η ομώνυμη ποικιλία 'Ποντικής' η οποία επιλέγεται από τους παραγωγούς όλο και πιο συχνά λόγω των θετικών χαρακτήρων της.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη και πιο συγκεκριμένα η μοριακή διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των δυο ποικιλιών που προαναφέρθηκαν, όπως επίσης και η φαινολογική αντίδρασή τους σε συνθήκες αγρού. Επιλέχθηκε η χρήση των μοριακών δεικτών SCoT και ISSR, που η συμμετοχή τους στον κλάδο της μοριακής βιολογίας είναι αξιοσημείωτη. Ακόμη επιλέχθηκε η καταγραφή και μελέτη του φθορισμού της χλωροφύλλης με σκοπό την εξαγωγή περαιτέρω συμπερασμάτων για τις δύο ποικιλίες. Τελικά εντοπίστηκαν οι γενετικές διαφορές των 2 ποικιλιών καθώς επίσης και οι φυσιολογικές διαφορές τους βάση του λόγου F_v/F_o .

Λέξεις κλειδιά: Κελυφωτό φιστίκι, CTAB απομόνωση, SCoT, ISSR, φθορισμός χλωροφύλλης και Παρενειαυτοφορία.

ABSTRACT

In recent years, the cultivation of pistachio (*Pistacia vera*) in Greece is growing rapidly as the economic and nutritional value of the fruit is high. Focusing the interest of the producers increasingly, it was necessary to create varieties that would show resistance to common diseases that affect the cultivation of pistaciaceae in our country and to reduce the phenomenon of biennial bearing or the alternation and variation of fruit set from year to year. In 1986, Professor K. Pontikis of the Agricultural University of Athens isolated seedlings of the Aeginis variety with desirable characteristics. After much research, the homonymous variety 'Pontikis' emerged, which is increasingly chosen by producers because of its positive characteristics.

The aim of this thesis is to study and more specifically to molecularly investigate the genetic diversity between the two varieties mentioned above, as well as their phenological response under field conditions. The use of the molecular markers SCoT and ISSR was chosen, whose contribution to the field of molecular biology is remarkable. Furthermore, the study and recording of chlorophyll fluorescence was chosen to draw further conclusions about the two varieties. Finally, the genetic differences of the 2 varieties and their physiological differences based on the F_v/F_o ratio were identified.

Περιεχόμενα

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΡΙΑ	11
1.2 Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΦΙΣΤΙΚΙΑΣ	12
1.2.1 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	12
1.2.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	14
1.2.3 ΠΑΡΕΝΙΑΥΤΟΦΟΡΙΑ.....	15
1.2.4 ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	16
1.2.5. ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	17
1.3. ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ	17
1.4. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ.....	18
1.5 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	20
1.5.1 DNA ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΕ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ CTAB	20
1.5.2. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ.....	22
1.5.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ:	23
1.5.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	25
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΟΡΓΑΝΑ - ΥΛΙΚΑ	26
2.2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	29
2.2.1. ΤΟΠΟΘΕΣΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	29
2.2.2. ΜΕΘΟΔΟΣ CTAB	31
2.2.3. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ.....	32
2.2.4. ΑΡΑΙΩΣΗ	33
2.2.5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ:	34
2.2.6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ:	39
2.2.7. ΜΕΤΡΗΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ.....	40
2.2.8. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	41
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67
5.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67
5.2. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69
5.3.ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ	69

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Περιοχή εξάπλωσης της άγριας φιστικιάς.

Εικόνα 2: Δέντρο καλλιεργήσιμης φιστικιάς.

Εικόνα 3: Απεικόνιση του σύνθετου φύλλου της φιστικιάς.

Εικόνα 4: Απεικόνιση της καρποταξίας πριν την ωρίμανση.

Εικόνα 5: Απεικόνιση του σπέρματος (ψίχα) του φιστικιού.

Εικόνα 6: Απεικόνιση της φυσιολογία της φιστικιάς.

Εικόνα 7: Παράθεση των τοποθεσιών συλλογής των δειγμάτων μέσω των χαρτών της Google και απαντάται έξω από τον οικισμό του Λιανοκλαδίου . Συγκεκριμένα, με τα κόκκινα εικονίδια σημειώνονται οι δύο αγροί.

Εικόνα 8: Η αντίδραση της φωτοσύνθεσης.

Εικόνα 9: Ο ρόλος του CTAB αντιδραστήριου στην κυτταρική λύση. (Α) Ο αμφιπαθητικός χαρακτήρας του CTAB. Παρατηρείται η υδρόφιλη κεφαλή και το υδρόφοβο άκρο του μορίου. (Β) Το υδρόφιλο τμήμα εντοπίζεται εξωτερικά και το μη πολικό εσωτερικά. (Γ) Σχεδιάγραμμα κυτταρικής μεμβράνης που αποτελείται από λιπίδια με ενσωματωμένη μια πρωτεΐνη. (Δ) Τα λιπίδια της εν λόγω μεμβράνης όταν δεσμεύονται από το CTAB αντιδραστήριο (Jadhav K.P. *et al.*, 2015).

Εικόνα 10. Απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). (Mike Smith,2024).

Εικόνα 11. Διάγραμμα της αρχής ενίσχυσης SCoT με PCR. (Bertrand C. Y., Collard & David J. Mackill, 2009).

Εικόνα 12. Εικονογράφηση του εξοπλισμού της ηλεκτροφόρησης DNA. (Sanger Institute).

Εικόνα 13. Ο φυσιτεώνας του πληθυσμού 1.

Εικόνα 14. Συλλογή και αρίθμηση δειγμάτων φυτικού υλικού.

Εικόνα 15. Λειοτρίβηση φυτικού ιστού με την χρήση υγρού αζώτου.

Εικόνα 16. Το pelet του DNA πριν την διάλυσή του.

Εικόνα 17. Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer για την ποσοτικοποίηση του dsDNA

Εικόνα 18. Ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμισμένος για την διεξαγωγή της PCR gradient

Εικόνα 19. Οι θερμοκρασίες κατά την διαδικασία της PCR gradient.

Εικόνα 20. Η συσκευή SCIE-PLAS που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση.

Εικόνα 21. Η πηκτή αγαρόζης στο καλούπι. Στο πάνω μέρος του διακρίνονται τα βοθρία στα οποία τοποθετούνται τα δείγματα.

Εικόνα 22. Η συσκευή μέτρησης του φθορισμού της χλωροφύλλης, OS30p+ Research Chlorophyll Fluorometer.

Εικόνα 23. Αποτελέσματα PCR για τον έλεγχο της απομόνωσης του DNA από τα δείγματα 1Α-15Α. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 24. Αποτελέσματα PCR για τον έλεγχο της απομόνωσης του DNA από τα δείγματα 1Π-15Π. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder..

Εικόνα 25. Αποτελέσματα της PCR gradient με τους εκκινητές UBC-841, UBC-845, UBC-847 (από δεξιά προς τα αριστερά). Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder. Ο εκκινητής UBC-845 απορρίφθηκε καθώς δεν υπήρξαν αποτελέσματα σε καμία θερμοκρασία.

Εικόνα 26. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT1 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 27. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT1 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder. Το 13ο δείγμα εξαιρέθηκε από την διεξαγωγή του πειράματος στην πορεία καθώς φαίνεται πως το DNA δεν έχει πολλαπλασιαστεί.

Εικόνα 28. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT34 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 29. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT34 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 30. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT35 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 31. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT35 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 32. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT51 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 33. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT51 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 34. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT61 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 35. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT61 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 36. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT70 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 37. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT61 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 38. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-808 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 39. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-808 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη απαντάται ο ladder.

Εικόνα 40. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-811 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 41. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-811 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 42. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-845 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 43. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-845 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 44. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-847 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 45. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-847 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντικής. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 46. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-851 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Εικόνα 47. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-851 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντικής. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Οι εκτάσεις και η συνολική παραγωγή ανά διοικητική περιφέρεια για το έτος 2021

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια-Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το πρωτόκολλο απομόνωσης με τη μέθοδο CTAB.

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά για την Φασματοφωτομέτρηση.

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά για την Διαδικασία της Ηλεκτροφόρησης.

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.

Πίνακας 6. Όργανα για την μέτρηση φθορισμού.

Πίνακας 7. Αλληλουχίες SCoT εκκινητών.

Πίνακας 8. Master mix για PCR με SCoT.

Πίνακας 9. Συνθήκες για την ολοκλήρωση ενός κύκλου PCR με SCoT.

Πίνακας 10. Αλληλουχίες ISSR εκκινητών.

Πίνακας 11. Master mix για PCR με ISSR.

Πίνακας 12. Συνθήκες για την ολοκλήρωση ενός κύκλου PCR με ISSR.

Πίνακας 13. Συνθήκες της PCR gradient.

Πίνακας 14. Αποτελέσματα Φασματοφωτομέτρησης.

Πίνακας 15. Αραιώσεις δειγμάτων.

Πίνακας 16. Συνθήκες που επικράτησαν κατά την διεξαγωγή της PCR gradient.

Πίνακας 17. Γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των 2 πληθυσμών (Pop) από τα 29 άτομα του πειράματος. Τα δεδομένα παρουσιάζονται.

Πίνακας 18. Ανάλυση AMOVA.

Πίνακας 19. Μετρήσεις μέτρησης του φθορισμού της χλωροφύλλης.

Πίνακας 20. Περιγραφικά στατιστικά μετρήσεων φθορισμού χλωροφύλλης.

Πίνακας 21. t-test Ανεξάρτητων δειγμάτων.

Πίνακας 22. Πληθυσμιακά περιγραφικά.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Ποσοστά γενετικής ποικιλότητας. Μεταξύ των πληθυσμών σημειώνεται το 69% ενώ εντός των πληθυσμών το 39%.

Διάγραμμα 2. Αποτελέσματα ανάλυσης PCoA.

Διάγραμμα 3. Δενδροδιάγραμμα UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average) που απεικονίζει τις γενετικές συσχετίσεις μεταξύ των 29 ατόμων.

Διάγραμμα 4. Ραβδόγραμμα των αποτελεσμάτων του t-test για τον λόγο F_v/F_m .

Διάγραμμα 5. Ραβδόγραμμα των αποτελεσμάτων του t-test για τον λόγο F_v/F_o .

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

1. ATP: Adenosine triphosphate (τριφωσφορική αδενοσίνη ή αδενοσινوترιφωσφορικό οξύ)
2. C: Κυτοσίνη
3. CO₂: Carbon Dioxide (διοξείδιο του άνθρακα)
4. CTAB: Cetyltrimethylammonium bromide (Βρωμιούχο κετυλο - τριμεθυλο - αμμώνιο)
5. ddH₂O: double-distilled water (διπλά απιονισμένο νερό)
6. DNA: Deoxyribonucleic acid (δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
7. dNTPs: deoxyriboNucleotide Triphosphates (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια)
8. dsDNA: double stranded Deoxyribonucleic acid (δίκλωνο δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
9. F_m : Μέγιστος φθορισμός στο σκοτάδι
10. F_o : Τιμή του φθορισμού στην απουσία φωτοσυνθετικού φωτός
11. F_v : Φθορισμός χλωροφύλλης κατά τη διάρκεια του ακτινικού φωτισμού
12. G: Γουανίνη
13. GD: Genetic Distance (γενετική απόσταση).
14. ISSR: Ενδιάμεσες απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες
15. NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (νικοτινο-αδενο-φωσφορικό δινουκλεοτίδιο)
16. PCR: Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)
17. PSII: Φωτοσύστημα II
18. RNA: Ribonucleic acid (ριβονουκλεϊκό οξύ)
19. RNase: Ribonuclease (ριβονουκλεάση)
20. SCoT: Start Codon Targeted (στοχευμένο στο κωδικόνιο έναρξης)
21. T_m : θερμοκρασία που περιέχει 50 % μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας.
22. UV: Ultraviolet (υπεριώδης ακτινοβολία)

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΡΙΑ

Σύμφωνα με πολυπληθείς αναφορές, η καταγωγή της φιστικιάς (*Pistacia vera*) φαίνεται να τοποθετείται στην Κεντρική Ασία, όπου και φύεται άγρια καλύπτοντας μεγάλες ορεινές και πεδινές εκτάσεις. Συχνά συναντάται και η άποψη πως η καταγωγή της τοποθετείται στην Μέση Ανατολή, βασισμένη ίσως σε παρατηρήσεις καλλιεργήσιμων εκτάσεων στην περιοχή αυτή.



Εικόνα 1. Περιοχή εξάπλωσης της άγριας φιστικιάς

Στην Αρχαιοελληνική γραμματεία η πρώτη αναφορά στην φιστικιά γίνεται από τον Θεόφραστο (Περί Φυτών Ιστορία, IV, 4,7) χωρίς όμως να της προσδίδει κάποιο συγκεκριμένο όνομα. Σύμφωνα με το κείμενο αυτό στην περιοχή του Αφγανιστάν, παρατήρησε ένα δέντρο όμοιο με το *Pistacia terebinthus*, όσον αφορά όμως το φύλλωμά του αλλά τους καρπούς του περιεγράφηκαν ως τα αμύγδαλα όμως με μικρότερο μέγεθος και πολύ πιο νόστιμοι. Η ονομασία “πιστάκια” (με καταγωγή από την περσική λέξη pista η οποία σημαίνει φιστίκι) συναντάται πρώτη φορά στον Νίκανδρο (Θηραϊκά 891) τον 2^ο αι. π.Χ. όπου για άλλη μια φορά τονίζεται η ομοιότητα του καρπού αυτού με τα αμύγδαλα.

Αν και οι Έλληνες της αρχαιότητας γνώριζαν τα φιστίκια και εκτιμούσαν την γεύση τους, δεν έχουμε επίσημες αναφορές για το πότε έγινε η εισαγωγή και η καλλιέργειά τους, σε αντίθεση με την Ιταλία και την Ισπανία που οι καταγραφές επισημαίνουν το 30 μ.Χ. ως την χρονιά εισαγωγής του δέντρου (Πλίνιος, XV, 83, 91). Ο πρώτος επίσημος οπωρώνας φιστικιάς στην Ελλάδα υπήρξε στο Ψυχικό Αττικής το 1860 από τον Δ. Παυλίδη (της γνωστής σοκολατοβιομηχανίας). Μια δεκαετία μετά, ο διευθυντής του Δημόσιου Δενδροκομείου (γνωστό πλέον ως Βοτανικός) Ορφανίδης ανέλαβε τον πολλαπλασιασμό της φιστικιάς και την σύσταση της καλλιέργειας αυτής στους παραγωγούς. Περί το τέλος του ίδιου αιώνα ο Ν. Περόγλου εγκατέστησε στο κτήμα του στην Αίγινα την πρώτη φυτεία φιστικιάς, από όπου και διαδόθηκε στο υπόλοιπο νησί.

Η πρώτη περίπτωση ευδοκίμησης της καλλιέργειας αυτής, εκτός του μικροκλίματος της Αττικής, ήταν το 1951 όταν ο Ν. Δερβεράκης εγκατέστησε τον πρώτο Φυστικεώνα στην περιοχή της Μάκρης Φθιώτιδος. Η καρποφορία αυτών των δέντρων ξεκίνησε περίπου το 1960 σημειώνοντας

έτσι, την αύξηση ζήτησης των δενδρυλλίων αυτών στην ευρύτερη περιοχή, με αποτέλεσμα την δημιουργία των πρώτων φυτωρίων φιστικιάς. Η Μάκρη έτσι καθίσταται το κέντρο διάδοσης της φιστικιάς στον Νομό Φθιώτιδας και στην Θεσσαλία μετά το 1968. Σύντομα η επέκταση της κατέλαβε ένα πολύ μεγάλο μέρος της χώρας μας προς όλες τις κατευθύνσεις. Σήμερα, μερικά από τα σημαντικότερα κέντρα παραγωγής εντοπίζονται στην Μεγαρίδα, στην Κορινθία, στην Φθιώτιδα, στην Θεσσαλία κ.α. Πλέον η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει χαρακτηρίσει ως προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) τα φιστίκια Αιγίνης, Μεγάρων και Φθιώτιδας (ΥΠ.Α.Α.Τ.).

1.2 Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΦΙΣΤΙΚΙΑΣ

1.2.1 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η καλλιεργήσιμη φιστικιά (*Pistacia vera* L.) ανήκει στην οικογένεια των Anacardiaceae, το γένος αυτό περιλαμβάνει έντεκα εγγεγραμμένα διαφορετικά είδη (Zohari, 1952). Στον Ελλαδικό χώρο συναντιούνται και αρκετά αυτοφυή είδη όπως *P. terebinthus* L. (ή τσιτσιραβλιά, η οποία χρησιμοποιείται και ως υποκείμενο στην καλλιέργεια της *P. vera* L.), *P. lentiscus* L. (ή σχίνος από τον οποίο παράγεται η μαστίχα Χίου) και *P. mutica* F. et M. Με εξαίρεση τον σχίνο, πρόκειται για θάμνους που παράγουν ρητίνη ή γενικότερα μικρά φυλλοβόλα δέντρα.



Εικόνα 2. Δέντρο καλλιεργήσιμης φιστικιάς

Η καλλιεργήσιμη φιστικιά είναι ένα φυλλοβόλο δέντρο, με πλούσια κόμη και αργή ανάπτυξη που δεν το εμποδίζει όμως να φτάσει μέχρι και τα 9 m ύψος. Ανήκει στην κατηγορία των δίοικων, που σημαίνει πως συναντάμε τα θηλυκά και τα αρσενικά άνθη σε διαφορετικά δέντρα, με αποτέλεσμα για τον σχηματισμό των καρπών στον οπωρώνα να απαιτούνται τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά δέντρα, συνήθως εγκαθίστανται σε αναλογία 1:6. Μετά την έναρξη της φυλλόπτωσης τον Νοέμβριο, τα δέντρα μπαίνουν σε κατάσταση λήθαργου μέχρι και τις αρχές Μαρτίου για τα αρσενικά και τέλος του ίδιου μήνα για τα θηλυκά.

Τα φύλλα της είναι σύνθετα κατ' εναλλαγή με περιττό αριθμό φυλλαρίων, σχήματος ωοειδούς στα αρσενικά και πιο στρογγυλεμένα στα θηλυκά (Χατζηνικολάου, 1951). Είναι χρώματος σκούρου πράσινου και αρκετά χονδρά και δερματώδη. Τα άνθη σχηματίζονται στα πλάγια των βλαστών που δημιουργήθηκαν την προηγούμενη χρονιά, σε μορφή ταξιανθίας σύνθετου βότρυος. Το είδος αυτό εμφανίζει το φαινόμενο της πρωτανδρίας, έτσι τα αρσενικά άνθη εμφανίζονται 10-20 ημέρες νωρίτερα από τα θηλυκά, τα δεύτερα δεν σχηματίζουν πέταλα και νεκτάρια με αποτέλεσμα να μην προσελκύονται μέλισσες και έντομα αλλά να απαιτείται η παρουσία ανέμου για την επικονίαση.



Εικόνες 3 και 4. Αριστερά το σύνθετο φύλλο της φιστικιάς και δεξιά καρποταξία πριν την ωρίμανση

Τέλος, οι καρποί σχηματίζονται σε καρποταξίες σύνθετου βότρυ και βοτανικά χαρακτηρίζεται ως δρύπη, δηλαδή αποτελείται από το εξωκάρπιο και το ενδοκάρπιο που μαζί αποτελούν την κόκκινη μαλακή φλούδα που περικλείει το ξυλώδες κέλυφος (ενδοκάρπιο) και εντός αυτού βρίσκεται το σπέρμα (ψύχα). Σημαντική ιδιαιτερότητα του είδους *P. vera* σε σχέση με τα υπόλοιπα του γένους

Pistacia είναι πως το ενδοκάρπιο σχηματίζεται μόνο αφότου έχει ωριμάσει ο καρπός (Ρούσσος, 2019).



Εικόνα 5. Σπέρμα (ψίχα) φιστικιού

1.2.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Οι ανθοφόροι οφθαλμοί της φιστικιάς βρίσκονται στους βλαστούς που δημιουργήθηκαν την προηγούμενη καλλιεργητική περίοδο και διογκώνονται περί τα τέλη Μαρτίου. Η επικονίαση λαμβάνει χώρα από τα μέσα Απρίλη με την βοήθεια του ανέμου, μιας και τα άνθη δεν έχουν νεκτάρια για να προσελκύσουν επικονιαστές. Κατά τον Απρίλιο αναπτύσσεται το ενδοκάρπιο και μέχρι τα τέλη Ιουνίου έχει φτάσει στο τελικό του μέγεθος και έχει σκληροποιηθεί. Το έμβρυο ξεκινά την ανάπτυξή του τέλος Ιουνίου, απορροφώντας μεγάλα ποσά ουσιών (οργανικών και ανόργανων) τόσο από το έδαφος όσο και από τα υπόλοιπα όργανα, την ίδια περίοδο εκδηλώνεται και το φαινόμενο της παρεννιαυτοφορίας. Κατά την διάρκεια αυτού του φαινομένου, οι οφθαλμοί που έχουν σχηματιστεί για την παραγωγή της επόμενης χρονιάς αποκόπτονται, καθώς η ανάπτυξη των καρπών αποτελεί προτεραιότητα για το δέντρο. Μέχρι τα τέλη Αυγούστου ο καρπός έχει ωριμάσει και μέσα στις επόμενες 30 ημέρες και πριν φτάσει το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης, το περικάρπιο ξεκινά να αποκολλάται από το ενδοκάρπιο. Συχνά εμφανίζονται καρποί κενοί, που στερούνται δηλαδή εμβρύου, το φαινόμενο αυτό έχει συσχετιστεί με ανεπάρκεια σε θρεπτικά συστατικά, συγκεκριμένα του Βορίου και ελλιπή άρδευση (Ferguson et al. 1980).



Εικόνα 6. Φυσιολογία φιστικιάς

Η περίοδος βλάστησης του δέντρου ξεκινά από τα τέλη Απριλίου και ολοκληρώνεται μέχρι τα τέλη Μαΐου. Οι νέοι βλαστοί που παρατηρούνται, έχουν σχηματιστεί από κορυφαίους οφθαλμούς, φέρουν σύνθετα φύλλα και από έναν ανθοφόρο οφθαλμό σε κάθε γόνατο. Κατά τα τέλη Νοεμβρίου τα φύλλα θα έχουν αποκοπεί και το δέντρο μέχρι τον επόμενο Μάρτιο θα βρίσκεται σε λήθαργο (N. Rohani, 2019).

1.2.3 ΠΑΡΕΝΙΑΥΤΟΦΟΡΙΑ

Στην καλλιέργεια παρατηρούνται διακυμάνσεις στην ετήσια παραγωγή των καρπών. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται παρενιαυτοφορία και περιγράφει την εναλλαγή και διακύμανση της καρποφορίας από χρονιά σε χρονιά. Ως ‘έτος καρποφορίας’ ορίζεται η χρονιά κατά την οποία η καρποφορία είναι σε μεγάλα επίπεδα ενώ η επόμενη χρονιά, κατά την οποία η καρποφορία είναι ελάχιστη έως μηδενική, ορίζεται ως το “έτος ακαρπίας”. Η καρποφορία της φιστικιάς, σχηματίζεται στους βλαστούς που σχηματίστηκαν την περσινή καλλιεργητική περίοδο, ενώ οι ανθοφόροι οφθαλμοί που θα δώσουν παραγωγή την επόμενη χρονιά, σχηματίζονται στους ετήσιους βλαστούς. Έτσι, όταν οι καρποί που αναπτύσσονται είναι πολλοί, οι ανθοφόροι οφθαλμοί που έχουν σχηματιστεί στον οδηγό βλαστό νεκρώνονται και απορρίπτονται σχεδόν όλοι (Crane and Nelson, 1971).

1.2.4 ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ

Η καλλιέργεια της φιστικιάς αν και μπορεί να γίνει με υποκείμενα διάφορα σπορόφυτα του γένους *Pistacia* στην Ελλάδα πραγματοποιείται αποκλειστικά σε υποκείμενα τσικουδιάς (*P. terebinthus* cv. *tsikoudia*) καθώς εμφανίζει πολύ καλή συγγένεια με την καλλιεργήσιμη φιστικιά, μεγάλη ανθεκτικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες (-10 °C έως -20 °C), στην παρουσία ασβεστίου στο έδαφος καθώς και στην παρουσία μυκήτων του γένους *Phytophthora* sp. (Χιτζανίδου κ.ά., 2004).

1.2.4.1 Αρσενικές ποικιλίες

Στις χώρες όπου συναντάται η καλλιέργεια της φιστικιάς χρησιμοποιούνται διάφορες αρσενικές ποικιλίες δέντρων. Ο Αναγνωστόπουλος (1935) τις Ελληνικές ποικιλίες αυτές τις κατατάσσει με βάση την εποχή που ανθίζουν σε 4 ομάδες, τις “Α”, “Β”, “Γ” και “Δ”. Αυτές μορφολογικά διακρίνονται ανάλογα με τον αριθμό φυλλαρίων που απαρτίζουν τα σύνθετα φύλλα. Ακόμη, οι ομάδες “Α”, “Β” και “Δ” είναι πολύ εύκολα διακριτές από την “Γ” και τα θηλυκά λόγω του μεγάλου μεγέθους τους. Σε γενικές γραμμές, η διάρκεια και ο χρόνος της άνθησης της κάθε ποικιλίας εξαρτάται από τις ώρες ψύχους που συμπλήρωσε τον προηγούμενο χειμώνα. Τα δέντρα της ποικιλίας “Α” είναι τα πιο πρώιμα, αυτά της “Β” χαρακτηρίζονται ως μεσοπρώιμα και η ανθοφορία τους ολοκληρώνεται κατά την έναρξη της άνθησης των θηλυκών ποικιλιών. Τέλος οι “Γ” και “Δ” είναι οι πιο όψιμες ποικιλίες με άνθηση σχεδόν ταυτόχρονη με τα θηλυκά (Ποντίκης, 1996).

1.2.4.2 Θηλυκές ποικιλίες

Στον Ελλαδικό χώρο κατά βάση καλλιεργείται η ποικιλία “Αιγίνης” με προέλευση την Συριακή ποικιλία “*Ashoury*”, ενώ σε μικρότερες εκτάσεις συναντώνται οι ποικιλίες “Ποντίκης”, “Φουντουκάτη” και “Νυχάτη”.

Ο καρπός της ποικιλίας “Αιγίνης” εμφανίζει ανομοιομορφία στο μέγεθός του. Το σχήμα χαρακτηρίζεται ως ωοειδές, με κύρτωση στην μια πλευρά. Το μήκος του φτάνει περίπου τα 20mm ενώ το πάχος του περίπου τα 11mm. Μέσο βάρος είναι το 1g. Γενικά, η ποικιλία αυτή παρουσιάζει μια αρκετά ικανοποιητική αναλογία μεταξύ των ανοικτών και κλειστών καρπών, η οποία είναι γύρω στο 70-85% με ποσοστό ψίχας περί το 56-57% (Ρούσκας et al., 2006).

Σχετικά με την ποικιλία “Ποντίκης” πρόκειται για μια νέα ποικιλία η οποία προήλθε από σπορόφυτα της ποικιλίας “Αιγίνης” και μετά από έρευνα του Καθηγητή Κ. Ποντίκη (Pontikis, 1986). Οι καρποί της έχουν μέτριο μέγεθος, ίδιο περίπου με αυτό της ποικιλίας “Αιγίνης”. Το σχήμα τους χαρακτηρίζεται ως ωοειδές έως επίμηκες και έχουν επίσης παρόμοιο ποσοστό ψίχας με τους καρπούς της προαναφερθείσας ποικιλίας, όμως παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό ανοιχτών κελυφών (90-98%) καθώς και ελάχιστο αριθμό άσπερμων καρπών (5-10%). Τέλος, εμφανίζουν μικρότερη ένταση του φαινομένου της παρεννιαυτοφορίας καθώς και μεγαλύτερη αντοχή σε προσβολές και ασθένειες (Parfitt et al., 2005).

1.2.5. ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η καλλιέργεια της φιστικιάς συναντάται κυρίως στο Ιράν, τις ΗΠΑ, την Τουρκία και την Συρία, με την Ελλάδα να είναι έκτη στην παγκόσμια παραγωγή. Στην χώρα μας τα τελευταία έτη οι ξηροί καρποί ως καλλιέργεια επιλέγονται όλο και πιο συχνά, με αποτέλεσμα η Ελλάδα να κατέχει σημαντική θέση στην παραγωγή όλων των ειδών. Για το έτος 2021 σύμφωνα με στοιχεία της Ελληνικής Στατιστικής Υπηρεσίας (ΕΛΣΤΑΤ) η συνολική παραγωγή ανήλθε στους 1.232.712 t.

Πίνακας 1. Οι εκτάσεις και η συνολική παραγωγή ανά διοικητική περιφέρεια για το έτος 2021.

ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ	ΕΚΤΑΣΗ (στρ.)	ΠΑΡΑΓΩΓΗ (t)
ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΛΛΑΔΑΣ	563.860	6.784
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	400.540	8.180
ΑΤΤΙΚΗΣ	156.232	2.489
ΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ	77.307	749
ΚΡΗΤΗΣ	3.703	81
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ	9.952	89
ΝΟΤΙΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ	3.877	85
ΗΠΕΙΡΟΥ	1.510	48
ΒΟΡΕΙΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ	233	25
ΔΥΤΙΚΗΣ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ	3.183	28
ΑΝ. ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ & ΘΡΑΚΗΣ	1.610	12
ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ	285	6
ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	20	0
ΣΥΝΟΛΟ	1.222.312	18.575

1.3. ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η περιοχή μελέτης βρίσκεται στην Τοπική Κοινότητα Λιανοκλαδίου, 14 km δυτικά της πόλης της Λαμίας. Διοικητικά ανήκει στον Δήμο Λαμιέων του νομού Φθιώτιδας. Ο πληθυσμός του Λιανοκλαδίου ανέρχεται στους 969 κατοίκους σύμφωνα με την απογραφή του 2021 (ΕΛΣΤΑΤ,

2022-ΑΠΟΦΑΣΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΝΟΜΙΜΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 2021-ΑΡ ΠΡΩΤ 9429/Β4- 2116/29-12-2022).

Στην ευρύτερη περιοχή του νομού Φθιώτιδας, η καλλιέργεια της φιστικιάς είναι πολύ συχνή και έντονη μιας και ο καρπός που παράγεται εκεί χαρακτηρίζεται ως Π.Ο.Π. (ΥΠ.Α.Α.Τ).

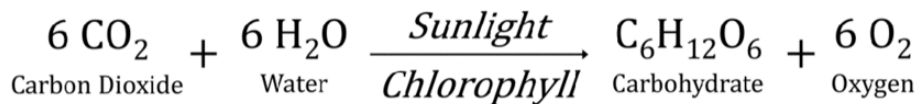


Εικόνα 7. Παράθεση των τοποθεσιών συλλογής των δειγμάτων μέσω των χαρτών της Google και απαντάται έξω από τον οικισμό του Λιανοκλαδίου. Συγκεκριμένα, με τα κόκκινα εικονίδια σημειώνονται οι δύο αγροί.

1.4. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Για την διατήρηση των μορφών ζωής στον πλανήτη κρίνεται απαραίτητη η αδιάκοπη ανανέωση στοιχείων, κυρίως ανόργανων, και συνεχής ροή ενέργειας μέσα από τις τροφικές αλυσίδες. Οι ζωντανοί οργανισμοί καταναλώνουν ενέργεια, η οποία μπορεί να θεωρηθεί μια μορφή τροποποιημένης ηλιακής ενέργειας, η οποία έχει απορροφηθεί από τους αυτότροφους οργανισμούς και μέσω της φωτοσύνθεσης έχει μετατραπεί σε κατάλληλη μορφή (Δροσόπουλος, 1998).

Κατά την φωτοσύνθεση, οι φωτοαυτότροφοι οργανισμοί εκμεταλλεύονται την ηλιακή ακτινοβολία που φτάνει στην επιφάνεια της γης, προς όφελος τους. Με την διαδικασία αυτή συντίθενται από ανόργανα στοιχεία, οργανικές ενώσεις που χαρακτηρίζονται από υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο (Αϊβαλάκις, κ.ά., 2005). Όμως δεν χαρακτηρίζεται ως παραγωγικό όλο το φάσμα φωτός που εκπέμπεται. Η φωτοσυνθετικά ενεργός ακτινοβολία (*Photosynthetically Active Radiation, PAR*) περιλαμβάνει τα μήκη κύματος 400-700 nm (Taiz et Zeiger, 2006).



Εικόνα 8. Αντίδραση φωτοσύνθεσης (Kaylyn Kirkpatrick, 2018)

Η δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα της ατμόσφαιρας πραγματοποιείται με την συμβολή της ηλιακής ακτινοβολίας για να αναχθεί σε σάκχαρο, ενώ παράλληλα πραγματοποιείται διάσπαση νερού με αποτέλεσμα την έκκληση μοριακού οξυγόνου. Η φωτοσύνθεση είναι μια από τις πιο ενεργοβόρες αντιδράσεις, καθώς για τον σχηματισμό ενός mol εξόξης απαιτούνται υπέρογκα ποσά ATP (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005). Οι υδατάνθρακες που προκύπτουν από αυτή την αντίδραση αποτελούν πηγή ενέργειας άμεσα για τους αυτότροφους οργανισμούς αλλά και έμμεσα για τους ετερότροφους που καλύπτουν τις ενεργειακές ανάγκες τους, καταναλώνοντας τους προηγούμενους (Δροσόπουλος, 1998).

Η φωτοσύνθεση μπορεί να διακριθεί από δύο βασικά στάδια, τις φωτεινές και τις σκοτεινές αντιδράσεις. Οι πρώτες πραγματοποιούνται στα θυλακοειδή, τα οποία πρόκεινται για μεμβράνες στο εσωτερικό των χλωροπλαστών, και απαιτούν την παρουσία φωτός. Κατά την διαδικασία αυτή απορροφάται το φως και η ενέργεια της ηλιακής ακτινοβολίας μετατρέπεται σε χημική ενέργεια με την μορφή σταθερών χημικών ενώσεων (NADPH και ATP) οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο. Οι σκοτεινές αντιδράσεις αποτελούν το βιοσυνθετικό κομμάτι της φωτοσύνθεσης, καθώς τα μόρια NADPH και ATP χρησιμοποιούνται για την μετατροπή του CO₂ σε οργανικές ενώσεις. Οι βιοχημικές αυτές αντιδράσεις χαρακτηρίζονται ως σκοτεινές, καθώς λαμβάνουν χώρα στα στρώματα χλωροπλαστών όπου η παρουσία φωτός δεν κρίνεται απαραίτητη (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005).

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός των φυτών απαρτίζεται από διάφορα σύμπλοκα πρωτεϊνών τα οποία φέρουν φωτοσυνθετικές χρωστικές κύριες (χλωροφύλλες a και b) όσο και βοηθητικές (καροτενοειδή). Τα μόρια των χρωστικών αυτών θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν και ως αντένες συλλογής της φωτεινής ενέργειας (Taiz et Zeiger, 2006).

Ως φθορισμός ορίζεται η ιδιότητα εκπομπής ακτινοβολίας, από ένα μόριο το οποίο έχει διεγερθεί, στο φάσμα του ορατού φωτός. Από το σύνολο των φωτοσυνθετικών χρωστικών μόνο οι χλωροφύλλες έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν και συγκεκριμένα στις περισσότερες πειραματικές συνθήκες ο φθορισμός που καταγράφεται, προέρχεται αποκλειστικά από μόρια της χλωροφύλλης-α του δεύτερου φωτοσυστήματος. Το μόριο αυτό χαρακτηρίζεται από την ικανότητα να φθορίζει αποβάλλοντας την περίσσεια ενέργειας που δεν μπορεί να αξιοποιήσει από τα φωτοσυστήματα (Maxwell and Johnson, 2000).

Το μεγαλύτερο ποσοστό φθορισμού εκπέμπεται από το Φωτοσύστημα II (PSII). Όταν ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός προσαρμοστεί στο σκοτάδι και στην συνέχεια υποβληθεί σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού, τότε ο φθορισμός από το αρχικό επίπεδο (F₀) στο οποίο βρίσκεται, θα μεταβληθεί στο μέγιστο επίπεδο (F_m) και θα μειώνεται σταθερά και βαθμιαία μέχρι ένα σταθερό επίπεδο (F_s). Η διαφορά μεταξύ του μέγιστου και του αρχικού επιπέδου είναι γνωστή και ως μεταβλητός φθορισμός της χλωροφύλλης (F_v=F_m-F₀) (Kautsky and Hirsch, 1931).

Ο λόγος F_v / F_m αποδίδει την ιδανική κβαντική ικανότητα του φυτού και αποτελεί την μακράν πιο χρησιμοποιούμενη παράμετρο μέτρησης του φθορισμού της χλωροφύλλης. Είναι ένας ισχυρός τρόπος μέτρησης των πρώιμων καταπονήσεων των φυτών που επηρεάζει το PSII ενώ παράλληλα σχετίζεται με την αφομοίωση του άνθρακα (Genty et al., 1989). Από την άλλη ο λόγος F_v / F_o δεν έχει άμεσα αυτή τη συσχέτιση, είναι όμως πολύ πιο ευαίσθητος. Ο λόγος αυτός γενικά μπορεί να συσχετιστεί με την μέγιστη πρωτογενή απόδοση του PSII. (Tsimilli-Michael, 2020)

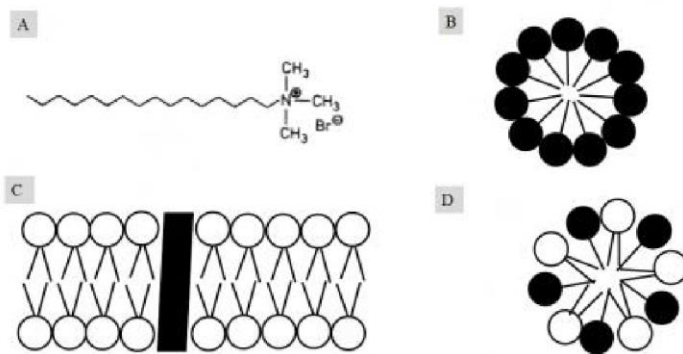
1.5 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

1.5.1 DNA ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΕ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ CTAB

Η εξαγωγή του γενετικού υλικού από όλων των ειδών τα κύτταρα μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους, ωστόσο ως επιθυμητό αποτέλεσμα κρίνεται η απομόνωση μεγάλης ποσότητας DNA το οποίο παράλληλα θα χαρακτηρίζεται από υψηλή ποιότητα (Jobes D.V., 1995). Για την εκπόνηση του πειραματικού μέρους της εν λόγω διατριβής εφαρμόστηκε απομόνωση του γενωμικού DNA μέσω του τροποποιημένου πρωτοκόλλου CTAB (Doyle and Doyle, 1991).

Οι φυτικοί ιστοί μπορούν να αποτελέσουν πρόκληση στην διαδικασία απομόνωσης του DNA καθώς σε αντίθεση με τους ζωικούς ιστούς, περιβάλλονται από το κυτταρικό τοίχωμα (Διαμαντίδης Γ., 2017). Επιπροσθέτως, η απομόνωση του DNA από τα φυτά και η χρήση τους σε μοριακές τεχνικές προϋποθέτει ένα δείγμα απαλλαγμένο από δευτερογενείς μεταβολίτες όπως είναι οι πολυσακχαρίτες και οι φαινόλες, που συναντώνται αρκετά συχνά σε τέτοιου είδους κύτταρα, καθώς η ύπαρξή τους περιορίζει την λειτουργία σημαντικών μοριακών συστατικών (ενδονουκλεάσες, λιγάσες και πολυμεράσες) (Fang G. et al., 1992). Απαραίτητο βήμα λοιπόν, είναι να έχει προηγηθεί η λύση του κυτταρικού τοιχώματος, μέσα στο οποίο εντοπίζεται το γενετικό υλικό προστατευμένο. Αυτό εξασφαλίζεται με την διαδικασία της λειοτρίβησης, η οποία πραγματοποιείται γρήγορα και με χρήση υγρού αζώτου αποβλέποντας στη αποφυγή του κατακερματισμού του γενετικού υλικού καθώς και στην λύση του κυτταρικού τοιχώματος με μεγαλύτερη ευκολία λόγω των φαινομένων της συστολής και διαστολής, που οφείλονται στις ακραίες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. (Jinlu Li et al., 2013).

Το διάλυμα CTAB, που αποτελεί το βασικό στοιχείο στο πρωτόκολλο αυτό πρόκειται για έναν κατιονικό επιφανειοδραστικό (τασιενεργό) παράγοντα, ο οποίος στην δομή του εμφανίζει μια θετικά φορτισμένη -υδρόφιλη- κεφαλή και μια αλυσίδα υδρογονανθράκων που αποτελεί το υδρόφοβο τμήμα του μορίου. Πιο συγκεκριμένα, τα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον αιχμαλωτίζονται από το CTAB, με αποτέλεσμα να την αποδιατάσει και οι πυρήνες να είναι ελεύθεροι προς περεταίρω επεξεργασία (Vinod K., 2004).



Εικόνα 9. Ρόλος του CTAB αντιδραστήριου στην κυτταρική λύση. (Α) Ο αμφιπαθητικός χαρακτήρας του CTAB. Παρατηρείται η υδρόφιλη κεφαλή και το υδρόφοβο άκρο του μορίου. (Β) Το υδρόφιλο τμήμα εντοπίζεται εξωτερικά και το μη πολικό εσωτερικά. (Γ) Σχεδιάγραμμα κυτταρικής μεμβράνης που αποτελείται από λιπίδια με ενσωματωμένη μια πρωτεΐνη. (Δ) Τα λιπίδια της εν λόγω μεμβράνης όταν δεσμεύονται από το CTAB αντιδραστήριο (Jadhav K.P. et al., 2015).

Επόμενη προσθήκη στο διάλυμα είναι η β-μερκαπτοαιθανόλη, μια ουσία αρκετά τοξική που χαρακτηρίζεται από τις πτητικές ιδιότητές της και την δυσάρεστη οσμή της. Η συμβολή της εντοπίζεται στην αποτελεσματική απομάκρυνση των διαφόρων φαινολικών συμπλόκων με απόρροια, την παραλαβή ενός δείγματος DNA μεγάλης καθαρότητας και υψηλού δυναμικού (Aboul-Maaty N.AF. & Oraby H.AS., 2019). Ταυτόχρονα, επιδρά στην τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών απορρυθμίζοντας την λειτουργικότητά τους καθώς μειώνει τους δισουλφιδικούς δεσμούς τους με συνέπεια την μετουσίωση τους (Konigsberg W., 1972).

Για τον περεταίρω καθαρισμό του γενετικού υλικού στην συνέχεια του πρωτοκόλλου γίνεται χρήση μιας ριβονουκλεάσης. Γενικά οι ριβονουκλεάσες αποτελούν μια υπερ-οικογένεια νουκλεασών που καταλύουν την υδρόλυση των 3',5'- φωσφοδιεστερικών δεσμών στο RNA. Η πλειοψηφία των νουκλεασών αυτών δρουν σε δύο διαδοχικά στάδια, το πρώτο περιλαμβάνει τον σχηματισμό ενός νουκλεοσιδίου στο άκρο του οποίου συναντάται μια 2',3'- κυκλική φωσφορική πυριμιδίνη. Ο μηχανισμός σχηματισμού αυτού του ολιγονουκλεοτιδίου χαρακτηρίζεται ως διαφωσφορυλίωση. Κατόπιν ακολουθεί η υδρόλυση του άλατος αυτού και τελικά πυροδοτείται ο σχηματισμός ενός τελικού 3'-φωσφορικού προϊόντος (Hyone-Myong Eun, 1996). Στο συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκε η χρήση της ριβονουκλεάσης A.

Επόμενο βήμα του πρωτοκόλλου αποτελεί η προσθήκη τριχλωρομεθανίου, ενός μη πολικού, υδρόφοβου διαλύτη. Πρόκειται για ένα οργανικό αντιδραστήριο, με την κοινή ονομασία “χλωροφόρμιο” και με μοριακή ταυτότητα CHCl_3 , είναι πτητικός, στερείται χρώματος και χαρακτηρίζεται από έντονη οσμή (Watts, P., 2004). Η συμβολή του αντιδραστήριου αυτού περιλαμβάνει την διάλυση των μη πολικών πρωτεϊνών και την παράσυρση λιπιδίων και κυτταρικών θραυσμάτων στην οργανική φάση. Μετά από αυτή την διαδικασία λοιπόν, παρατηρούνται δύο φάσεις, μια οργανική και μια υδατική η οποία περιλαμβάνει το γενετικό υλικό.

Το χλωροφόρμιο λοιπόν συμβάλλει στην διαχώριση αυτών των δύο φάσεων με ελάχιστες επιμολύνσεις (Heikrujam Jina et al., 2020).

Για την διεκπεραίωση της εν λόγω διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε η ισοπροπανόλη, με σκοπό την γρήγορη καθίζηση του DNA και τον καθαρισμό του γενετικού υλικού από πρόσθετες χημικές ουσίες καθώς και άλατα που μπορεί να παρευρίσκονται. Ακόμη, απομακρύνει τυχόν μόρια νερού που βρίσκονται γύρω από τις φωσφορικές ομάδες του DNA (Heikrujam Jina et al., 2020).

Μαζί με την ισοπροπανόλη προστίθεται και οξικό νάτριο (CH_3COONa) με pH 5,2, το οποίο συμβάλλει επίσης στην καθίζηση του γενετικού υλικού. Το άλας αυτό εξουδετερώνει τα φορτία που δημιουργούνται από τα φωσφορικά σάκχαρα κατά μήκος του DNA. Κατά την παρουσία του στο υδατικό διάλυμα διίσταται σε Na^+ και $[\text{CH}_3\text{COOH}]^-$, με αποτέλεσμα οι φωσφορικές, αρνητικά φορτισμένες ομάδες του νουκλεϊκού οξέος να εξουδετερώνονται από τα κατιόντα του νατρίου, καθιστώντας το μόριο του DNA υδρόφοβο και συνεπώς δυσδιάλυτο στο νερό. Τα ιόντα PO_3^- και Na^+ , απωθούνται λόγω της υψηλής διηλεκτρικής σταθεράς που αποκτά το νερό, φαινόμενο που εξηγείται από τον Coulomb (Heikrujam Jina et al., 2020). Ενώ ακολουθεί και η προσθήκη αιθανόλης περιεκτικότητας 70% με σκοπό την πλύση του DNA που έχει καθιζάνει για την απομάκρυνση των εναπομείναντων αλάτων. (Tan S. C., & Yiar B. C., 2009)

Τέλος, για την μακροχρόνια αποθήκευση του δείγματος DNA, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα TE το οποίο αποτελείται από ποσότητες Tris και EDTA. Το Tris αποτελεί ένα ρυθμιστικό διάλυμα οργανικής φύσης, ενώ το EDTA πρόκειται για μια χηλική ένωση η οποία έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς με δισθενή κατιόντα, προφυλάσσοντας έτσι το δείγμα του γενετικού υλικού από αυτά. Με το pH του διαλύματος να ορίζεται περί των τιμών 7,5 και 8,5 αποτρέπεται η πιθανή όξινη υδρόλυση (Heikrujam Jina et al., 2020).

1.5.2. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

Η φασματοφωτομετρία είναι μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους ανάλυσης ποικίλων ενώσεων καθώς συμβάλλει στον ποσοτικό προσδιορισμό βιομορίων όπως πρωτεΐνες, RNA και DNA μέσα σε δείγματα (Toni A. Trumbo et al., 2013). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στα φαινόμενα ανάκλασης και απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από τις χημικές ενώσεις σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Επιλέγεται συχνά σε διάφορους κλάδους επιστημών καθώς αποτελεί μια οικονομική και εύχρηστη τεχνική που παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα σε μικρά χρονικά διαστήματα (Varma A. et al., 2007).

Πριν την χρήση των δειγμάτων DNA σε τεχνικές ανάλυσης, θα πρέπει να καθοριστεί η ποιότητά του μέσω δεικτών ποιότητας. Ένα όργανο, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για αυτόν τον σκοπό ονομάζεται φασματοφωτόμετρο UV και καλύπτει την περιοχή του φωτός από 190 nm έως τα 390 nm, καθώς το DNA εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 260 nm. Η αναλογία της απορρόφησης, στα 260 και 280 nm χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της καθαρότητας του δείγματος. Μια αναλογία της τάξης του 1,8 είναι γενικά αποδεκτή για να θεωρηθεί καθαρό το DNA που ελέγχεται. Εάν η αναλογία είναι αρκετά μικρότερη ($\leq 1,6$), μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία πρωτεϊνών, φαινολικών ή άλλων προσμείξεων που απορροφούνται έντονα στα 280 nm (Gema Lucena-Aguilar et Al, 2016). Στο εξής πείραμα η τεχνική αυτή ακολούθησε την

απομόνωση του DNA από τους φυτικούς ιστούς με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό και την εκτίμηση της ποιότητάς του.

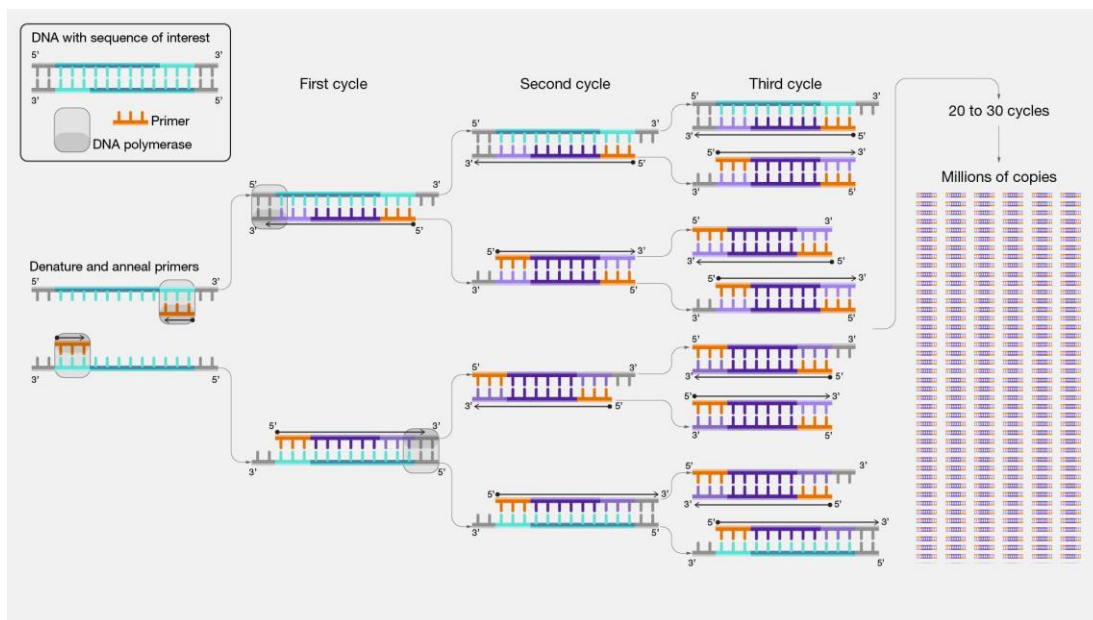
1.5.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ:

Η Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης, ή όπως συχνά αναφέρεται PCR, αποτελεί μια πολύτιμη ανακάλυψη για τον κλάδο της Μοριακής Βιολογίας. Το 1971 καταγράφηκε το θεωρητικό της υπόβαθρο από τον Kjell Kleppe και την ομάδα του αλλά υλοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Kary Mullis το 1985. Μέσω της τεχνικής αυτής και την πάροδο του χρόνου, η κλωνοποίηση και τροποποίηση των νουκλεϊκών οξέων έχει απλοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό (Kadri K., 2020).

Πρόκειται για μια *in vitro* μέθοδο που χρησιμοποιεί δύο εκκινητές, απαρτιζόμενους από 18-25 ολιγονουκλεοτίδια, οι οποίοι υβριδοποιούν αντίθετους κλώνους σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας και πλαισιώνουν μια περιοχή στόχο του DNA, dsDNA από την οποία θα προκύψουν πολλά αντίγραφα (Erlich Henry A., 1989). Η προσθήκη του ενζύμου Taq πολυμεράση, κατέχει έναν από τους πιο βασικούς ρόλους σε αυτή την διαδικασία, που είναι η επιμήκυνση των εκκινητών. Το ένζυμο αυτό έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες.

Η διαδικασία της PCR λαμβάνει χώρα στο μηχάνημα του θερμοκυκλοποιητή και αποτελείται από διαδοχικές επαναλήψεις ενός κύκλου, ο οποίος χαρακτηρίζεται από διακυμάνσεις στην θερμοκρασία των δειγμάτων. Τα στάδια ενός κύκλου PCR είναι τα εξής: α. Σε θερμοκρασίες 92-95°C γίνεται η αποδιάταξη του dsDNA, β. Προσκόλληση των εκκινητών στις αποδιεταγμένες αλυσίδες του DNA στους 50-70°C, γ. Το dsDNA επιδέχεται την τελική του επιμήκυνση σε θερμοκρασία των 72°C (Mackay IM. et al., 2002). Με την ολοκλήρωση ενός κύκλου PCR η ποσότητα γενετικού υλικού έχει διπλασιαστεί. Συμπληρωματικά με το dsDNA και την Taq πολυμεράση προστίθενται κάποια επιπλέον αντιδραστήρια για την επιτυχημένη διεκπεραίωση της τεχνικής. Αυτά είναι, τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, ένα ρυθμιστικό διάλυμα με χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) και ένας ρυθμιστής του pH, του οποίου άριστες τιμές θεωρούνται αυτές μεταξύ 7 και 7,5 (Gupta N., 2019).

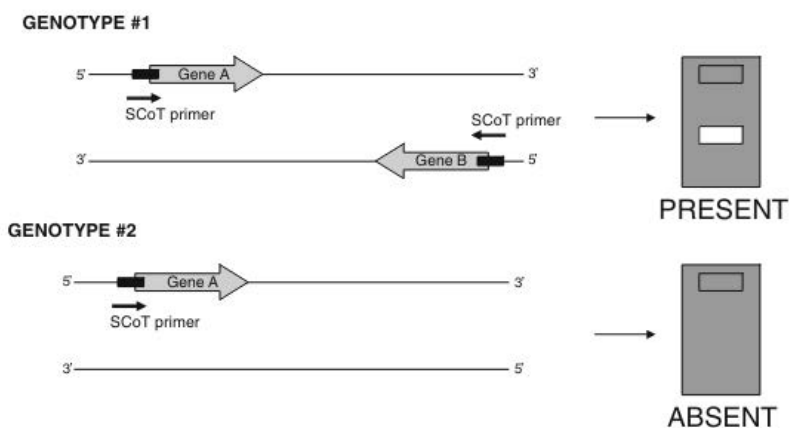
Κατά την διάρκεια του πειράματος αυτού αξιοποιήθηκε επιπλέον και η τεχνική της βαθμιδωτής (gradient) PCR, που επιτρέπει τον εμπειρικό προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδισμού για τους εκκινητές. Κατά την διάρκεια αυτής, μπορούν να ελεγχθούν ταυτόχρονα διαφορετικές θερμοκρασίες σε ένα ζεύγος στηλών καταλαμβάνοντας πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα από την εφαρμογή της κλασικής τεχνικής PCR (Chauhan Tushar, 2019).



Εικόνα 10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). (Mike Smith, 2024).

1.5.3.1. PCR με την χρήση Start Codon Targeted (SCoT) εκκινητών:

Οι SCoT εκκινητές είναι 18-μερείς αλληλουχίες με ποσοστό G-C μεταξύ 50 και 70%. Εμφανίζουν στοχευμένο πολυμορφισμό στο κωδικόνιο έναρξης ATG και χρησιμοποιούνται τόσο ως forward όσο και ως reverse εκκινητής ταυτόχρονα. Θραύσματα του DNA που δημιουργούν οι SCoT ενισχύονται με PCR, η διαδικασία αυτή στοχεύει σε περιοχές των γονιδίων που περιβάλλουν το κωδικόνιο ATG και στους 2 κλώνους του DNA. Τα θραύσματα αυτά μπορούν να ανιχνευθούν και να οπτικοποιηθούν σε πηκτή αгарόζης 1.5%, όμως μόνο αν το γονίδιο εντοπιστεί και στους 2 κλώνους εμφανίζεται κατά την ηλεκτροφόρηση (Bertrand C. Y., Collard & David J. Mackill, 2009).



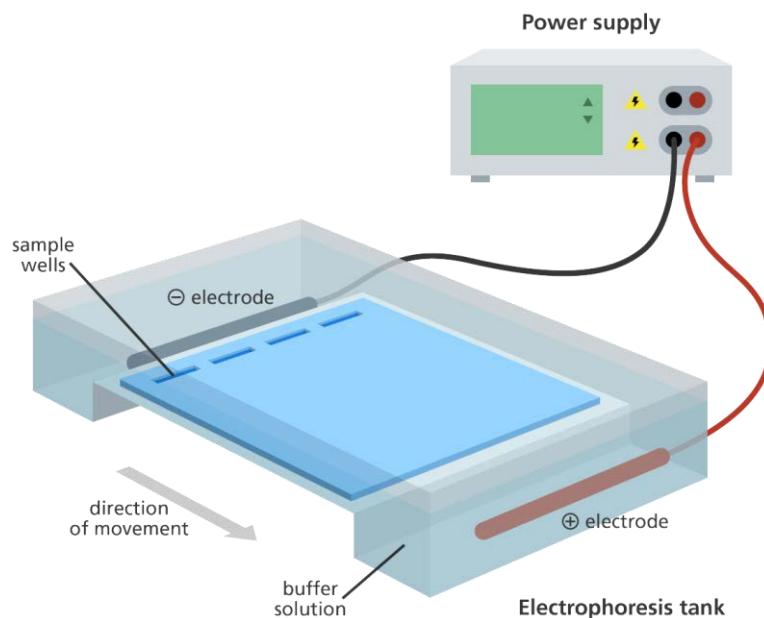
Εικόνα 11. Διάγραμμα της αρχής ενίσχυσης SCoT με PCR. (Bertrand C. Y., Collard & David J. Mackill, 2009).

1.5.3.2. PCR με την χρήση Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) εκκινητών:

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρήση της PCR και περιλαμβάνει την ενίσχυση ενός τμήματος γενετικού υλικού που εντοπίζεται μεταξύ δύο πανομοιότυπων περιοχών μικροδορυφόρων με αντίθετο όμως προσανατολισμό. Χρησιμοποιούνται συνήθως μικροδορυφόροι μήκους 16-25 bp ως εκκινητές σε μία PCR που στοχεύει στον εντοπισμό πολλαπλών γονιδιωματικών τόπων (M. Pradeep Reddy *Et Al*, 2002).

1.5.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μοριακή τεχνική από τις πολλές που αποσκοπούν στον διαχωρισμό μορίων με βάση το ηλεκτρικό τους φορτίο. Συναντάται σε διάφορες εφαρμογές, σε ποικίλους κλάδους, όπως είναι η εγκληματολογία, η ιατρική και η Γενετική. Βασική του αρχή είναι πως ορισμένα βιομόρια όπως το DNA και οι πρωτεΐνες είναι ηλεκτρικά φορτισμένα και όταν βρεθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο διαγράφουν πορεία τόσο ανοδική όσο και καθοδική. Η πορεία τους καθορίζεται από το ηλεκτρικό φορτίο τους, όμως μόρια με κοινές ιδιότητες (φορτίο, μέγεθος και σχήμα) τείνουν να ακολουθούν κοινή διαδρομή, με αποτέλεσμα έπειτα από συνεχή εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, επέρχεται ο διαχωρισμός τους σε ευδιάκριτες ζώνες (Sonagra AD. & Dholariya SJ., 2022).



Εικόνα 12. Εικονογράφηση του εξοπλισμού της ηλεκτροφόρησης DNA. (Sanger Institute).

Η αгарόζη είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης που έχει απομονωθεί από τα φύκη των γενών *Gelidium* και *Gracilaria* και αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μονομερή αγαροβιόζης (L- και D- γαλακτόζη). Κατά την διάρκεια της ζελατινοποίησης της αγαρόζης, τα πολυμερή της συνδέονται μη ομοιοπολικά και σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών, οι πόροι που σχηματίζονται και το μέγεθος αυτών καθορίζει τις ιδιότητες διαχωρισμού των μορίων (Lee P.Y., 2012). Με την

αξιοποίηση αυτών των χαρακτηριστικών και την ιδιότητα πως το DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο καθίσταται δυνατός ο διαχωρισμός των θραυσμάτων γενετικού υλικού και ο καθορισμός του μεγέθους τους, καθώς οι πόροι της γέλης αгарόζης επιτρέπουν την διέλευση θραυσμάτων μεγέθους 0,5-25 kb. Έτσι με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε ένα πήκτωμα αгарόζης, το γενετικό υλικό που θα προστεθεί θα έλκεται από τον θετικά φορτισμένο πόλο προς τον οποίο τελικά θα κινηθεί (Koontz L., 2013).

Η μέθοδος πραγματοποιείται σε τρία διακριτά στάδια: α. Την προετοιμασία της πηκτής από ένα μείγμα αгарόζης και TAE buffer σε αναλογίες που καθορίζονται από το δείγμα το οποίο θα πρέπει να ελεγχθεί, β. Την τοποθέτηση του δείγματος στις εσοχές της γέλης που έχουν δημιουργηθεί από το καλούπι και την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου στην συσκευή και γ. Την απεικόνιση των αποτελεσμάτων με την χρήση ακτινοβολίας UV (Nancy S. 2009).

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΟΡΓΑΝΑ - ΥΛΙΚΑ

Για την συλλογή φυτικού υλικού από τους δύο αγρούς χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

Υλικά:

1. Γάντια
2. Χάρτινες σακούλες
3. Ψαλίδι

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο απομόνωσης με την μέθοδο CTAB.

Αντιδραστήρια	Εταιρεία
2x CTAB Buffer	-
β-μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol)	MP Biomedicals LLC
RNase A (50mg)	Macherey - Nagel GmbH & Co.KG
Χλωροφόρμιο (Chloroform BioChemica)	PanReac Applichem
Ισοπροπανόλη (Isopropanol)	AmpliChem
Οξικό νάτριο (Sodium acetate)	Mallinckrodt
Αιθανόλη (Ethanol absolute for analysis)	Supelco

TE (1x)	-
Όργανα	Εταιρεία
Φυγόκεντρος Micro Centrifuge Fast Gene	Nippon Genetics Europe
Συσκευή Vortex	Nippon Genetics Europe
Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας	MRC Ltd
Ξηρό θερμαντικό λουτρό	BIOLINE scientific
Υλικά	Εταιρεία
Eppendorf tubes	Greiner
Γουδί/Γουδοχέρι	Δίγκας
Σπάτουλα	Δίγκας
Πιπέτες	NICHIRYO

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά για την Φασματοφωτομέτρηση.

Αντιδραστήρια	
Αποστειρωμένο νερό	
Όργανα	Εταιρεία
Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer	Eppendorf - Netheir - Hinz GmbH
Υλικά	Εταιρεία
Απορροφητικό χαρτί	
Κυψελίδες UV	
Πιπέτες	NICHIRYO

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά για την Διαδικασία της Ηλεκτροφόρησης.

Αντιδραστήρια	Εταιρεία
50 bp DNA Ladder	NEW ENGLAND BioLabs Inc.

MIDORI Green DIRECT	Nippon Genetics Europe
Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1x) (Tris acetate - EDTA)	
Αγαρόζη (Agarose Type I: Low EEO)	SIGMA
Όργανα	Εταιρεία
Συσκευή ηλεκτροφόρησης	SCIE - PLAS
Πηγή ηλεκτρικού ρεύματος PowerPlus 300V	Fisherbrand
Υλικά	Εταιρεία
Κωνική Φιάλη	
Ογκομετρικός κύλινδρος	
Καστ ή καλούπι	
Eppendorf tubes	
Πιπέτες	NICHIRYO

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.

Αντιδραστήρια	Εταιρεία
Νερό για έγχυση (Water for injection)	DEMO S.A.
Buffer	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific
dNTPs - Μείγμα νουκλεοτιδίων	Eurofins Genomics
Εκκινητής SCoT01	Eurofins Genomics
Εκκινητής SCoT34	Eurofins Genomics
Εκκινητής SCoT035	Eurofins Genomics
Εκκινητής SCoT61	Eurofins Genomics
Εκκινητής SCoT70	Eurofins Genomics
Εκκινητής ISSR UBC-808	Eurofins Genomics
Εκκινητής ISSR UBC-811	Eurofins Genomics

Εκκινητής ISSR UBC-851	Eurofins Genomics
Εκκινητής ISSR UBC-847	Eurofins Genomics
Εκκινητής ISSR UBC-845	Eurofins Genomics
Taq DNA Polymerase	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific
Όργανα	Εταιρεία
Θερμοκυκλοποιητής PCR Fast Gene	Nippon Genetics Europe
Υλικά	Εταιρεία
Eppendorf tubes	
Πάγος	
Πιπέτες	NICHIRYO

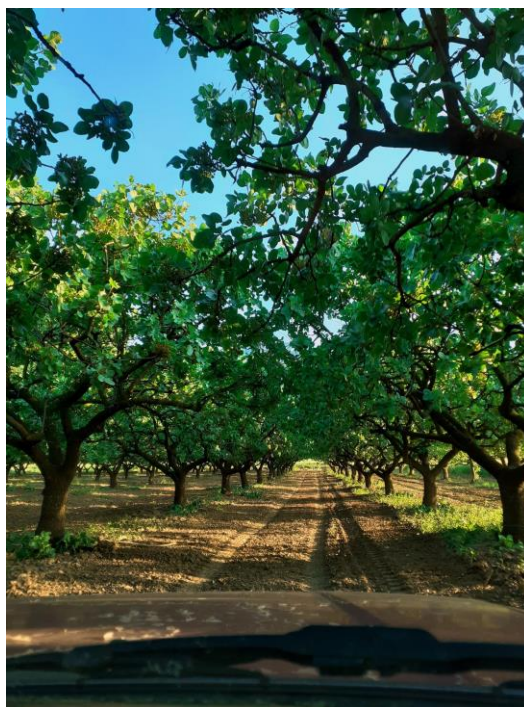
Πίνακας 6. Όργανα για την μέτρηση φθορισμού.

Όργανα	Εταιρεία
OS30p+ Research Chlorophyll Fluorometer	Opti-sciences

2.2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.2.1. ΤΟΠΟΘΕΣΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Για την διεξαγωγή του πειράματος επιλέχθηκε η μελέτη δύο διαφορετικών πληθυσμών, ένας αντιπροσωπευτικός για κάθε ποικιλία ενδιαφέροντος. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε τον Απρίλιο του 2022 σε δύο φυστικεώνας στην τοπική κοινότητα Λιανοκλαδίου του Νομού Φθιώτιδας. Ο πρώτος, από τον οποίο συλλέχθηκαν τα δείγματα της ποικιλίας ‘Αιγίνης’, με συντεταγμένες (38.914363, 22.283881) ανήκει στον κ. Δάμπαση Νικόλαο. Τα δέντρα διένυαν τον 30ο χρόνο ηλικίας τους καθώς φυτεύτηκαν το 1992. Ο δεύτερος αγρός, από όπου συλλέχθηκαν τα δείγματα για την ποικιλία ‘Ποντικής’ προσδιορίζεται από τις συντεταγμένες (38.917258, 22.281212) και ανήκει στον κ. Παπαποστόλου Στέφανο. Η καλλιέργεια αυτών των δέντρων ξεκίνησε το 2014 καθιστώντας τα έτσι 8 χρόνων κατά την διάρκεια εκπόνησης του πειράματος. Θα πρέπει να σημειωθεί πως και οι δύο καλλιέργειες βρίσκονταν σε πλήρη ανάπτυξη και στο έτος καρποφορίας τους, ενώ σύμφωνα με τους δενδροπαραγωγούς αν και η απόσταση μεταξύ των δύο τοποθεσιών δεν ξεπερνά τα 500 m η διαφορά στην σύσταση του εδάφους είναι αρκετά μεγάλη.



Εικόνα 13. Φυστικεώνας πληθυσμού 1.

2.2.1.1. Τρόπος Δειγματοληψίας

Οποιαδήποτε εφαρμογή μοριακής τεχνικής προαπαιτεί την συγκέντρωση φυτικού ιστού, έτσι για την συλλογή ιστού πραγματοποιήθηκε η κοπή με ψαλίδι των φύλλων από τα δέντρα που επιλέχθηκαν τυχαία. Για την διατήρηση της υγείας των δέντρων, τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν απολυμάνθηκαν πριν την διαδικασία της συλλογής. Τα φύλλα κάθε ατόμου τοποθετήθηκαν σε χάρτινη σακούλα, κατάλληλη για δειγματοληψία και αριθμούνταν. Συνολικά συλλέχθηκαν 15 δείγματα από κάθε πληθυσμό. Τέλος για την συντήρηση των δειγμάτων χωρίς αλλοιώσεις, συντηρήθηκαν στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η διαδικασία απομόνωσης του DNA



Εικόνα 14. Συλλογή και αρίθμηση δειγμάτων φυτικού υλικού.

2.2.2. ΜΕΘΟΔΟΣ CTAB

Για την απομόνωση του DNA με την μέθοδο CTAB ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Σε ζυγό Ακριβείας μετρούνται 100 mg ιστού από κάθε δείγμα και στην συνέχεια τοποθετούνται σε γουδιά. Λόγω της δερματώδους φύσης των συγκεκριμένων φύλλων, για διευκόλυνση τοποθετείται επίσης επαρκής ποσότητα υγρού αζώτου. Με την χρήση ενός γουδοχέρι και με γρήγορες κινήσεις πραγματοποιείται η λειοτριβήση των ιστών και κατόπιν κάθε δείγμα τοποθετείται σε μικροσωληνάρια (erppendorf tubes) χωρητικότητας 2 mL.



Εικόνα 15. Λειοτριβήση φυτικού ιστού με την χρήση υγρού αζώτου.

Σε κάθε erppendorf tube αναγράφεται ο κωδικός-αριθμός του κάθε δείγματος.

2. Σε κάθε δείγμα τοποθετούνται 800 μ L CTAB, 10 μ L β -μερκαπτοαιθανόλης και με την χρήση της συσκευής Vortex πραγματοποιείται η ανάδευση αυτών. Για τα επόμενα 30 λεπτά τα σωληνάρια τοποθετούνται στους 65°C και ανά διαστήματα 10 λεπτών αφαιρούνται και υποβάλλονται ξανά σε έντονη ανακίνηση στη συσκευή Vortex.
3. Με την ολοκλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 13.000 rpm και η υπερκείμενη φάση τοποθετείται σε καινούργια erppendorf tubes των 2 μ L.
4. Στο κάθε σωληνάριο προστίθενται ακόμη 800 μ L χλωροφορμίου και υποβάλλονται πάλι σε vortex για διάστημα 10 δευτερολέπτων.
5. Στην συνέχεια θα πρέπει να υποβληθούν πάλι σε φυγοκέντρηση στις 9.000rpm για 15 λεπτά. Η υπερκείμενη φάση μεταγγίζεται σε νέα tubes των 1.5 μ L.
6. Τα βήματα 3-5 θα πρέπει να επαναληφθούν για άλλες δύο φορές.
7. Στα καινούργια erppendorf μαζί με την υπερκείμενη φάση προστίθεται το 1/10 του όγκου της, σε Na acetate και τα $\frac{2}{3}$ του όγκου της, σε υγρή ισοπροπανόλη. Ακολουθεί καλή

ανάμειξη των δειγμάτων μέσω της τεχνικής του pipetting (ταχεία και επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση-εκρόφηση με την χρήση της πιπέτας).

8. Για το συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκε τα δείγματα να παραμείνουν στους -20°C για όλο το βράδυ με σκοπό την επιτυχή καθίζηση του γενετικού υλικού.

Την επόμενη μέρα και αφού τα δείγματα βγουν από την κατάψυξη, το πρωτόκολλο συνεχίζεται ως εξής:

9. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 10 λεπτά στις 10.000rpm και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού.
10. Έπειτα σε κάθε δείγμα προστίθεται 1 mL αιθανόλης 70% και πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά. Η διαδικασία αυτή της πλύσης επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά.
11. Τέλος προστίθενται 50 μL TE σε συγκέντρωση 1x και 2 μL RNase και ακολουθεί επώασή τους για 30 λεπτά στους 37°C .
12. Με την τεχνική του pipetting διαλύεται το pellet του DNA που έχει σχηματιστεί στον πυθμένα των eppendorf tubes και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι το επόμενο βήμα.



Εικόνα 16. Το pellet του DNA πριν την διάλυσή του.

Για τον έλεγχο της επιτυχής απομόνωσης αλλά και της ποσοτικοποίησης του γενετικού υλικού που παραλήφθηκε, ακολουθεί η διαδικασία της φασματοφωτομέτρησης. Έτσι αξιολογείται και αν τα αποτελέσματα δεν είναι τα επιθυμητά μπορεί να κριθεί αναγκαία η επανάληψη της διαδικασίας εξαγωγής DNA σε κάποιο από τα δείγματα.

2.2.3. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

Το πρωτόκολλο αυτής της μεθόδου περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Αρχικά θα πρέπει το φωτόμετρο να τεθεί σε λειτουργία και να επιλεγθεί η λειτουργία για μέτρηση dsDNA ή αλλιώς δίκλωνο DNA

2. Σε μια κυψελίδα UV προστίθενται μL 500 αποστειρωμένο νερό, αυτή αποτελεί το τυφλό (blank) και θα μετρηθεί πρώτο. Πριν την τοποθέτηση της κυψελίδας στην εσοχή του μηχανήματος, πρέπει να καθαριστεί εξωτερικά με απορροφητικό χαρτί στα σημεία που διαπερνιούνται από το φάσμα φωτός. Στην συνέχεια επιλέγεται το 'Blank'.
3. Κατόπιν προετοιμάζονται τα υπόλοιπα δείγματα και καταμετρούνται ένα προς ένα. Συγκεκριμένα για κάθε δείγμα αντιστοιχεί μια καθαρή κυψελίδα UV στην οποία προστίθενται 495 μL αποστειρωμένου νερού και 5 μL DNA και αναδεύονται με την τεχνική pipetting.
4. Για κάθε κυψελίδα που πρέπει να καταμετρηθεί το περιεχόμενό της η διαδικασία είναι η ίδια: καθαρισμός των εξωτερικών τοιχωμάτων με απορροφητικό χαρτί, τοποθέτηση στην εσοχή του φωτόμετρου και επιλογή του 'Sample'.

Κατά την διαδικασία αυτή καταγράφονται οι τιμές για την απορρόφηση στα 260 nm και στα 280 nm καθώς ο λόγος τους (A_{260}/A_{280}) προσδίδει μια γρήγορη εκτίμηση της ποιότητας και ποσότητας του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα αν η τιμή του λόγου αυτού είναι μεταξύ των τιμών 1,8 και 2 το DNA χαρακτηρίζεται από υψηλή καθαρότητα.

Για τον προσδιορισμό της ακριβής συγκέντρωσης χρειάζεται μόνο η τιμή στα 260 nm, η οποία και υπολογίζεται για κάθε δείγμα από τον τύπο:

$$C_{\text{DNA}} (\text{ng} * \mu\text{L}^{-1}) = A_{260} * 50 * 100$$



Εικόνα 17. Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer για την ποσοτικοποίηση του dsDNA.

2.2.4. ΑΡΑΙΩΣΗ

Καθώς από κάθε δείγμα φυτικού ιστού δεν είναι δυνατόν να απομονωθεί ίση ποσότητα γενετικού υλικού κρίνεται αναγκαία η αραιώση αυτών πριν την διεξαγωγή της αλυσιδωτής αντίδρασης

πολυμεράσης (PCR). Έτσι επιτυγχάνεται η εξίσωση όλων των συγκεντρώσεων του DNA. Η ποσότητες αυτού έχουν υπολογιστεί από τον παραπάνω τύπο ενώ οι ποσότητες που απαιτούνται για την αραίωσή τους εκτιμάται βάση του τύπου $C1V1 = C2V2$, με:

$C1 \rightarrow$ η αρχική συγκέντρωση DNA σε κάθε δείγμα που έχει υπολογιστεί από τα αποτελέσματα της φασματοφωτομετρίας.

$V1 \rightarrow$ Ο αρχικός όγκος διαλύματος κάθε δείγματος

$C2 \rightarrow$ Η τελική συγκέντρωση DNA, που στο εξής πείραμα καθορίστηκε στα 20 ng/μL

$V2 \rightarrow$ Ο τελικός όγκος του διαλύματος κάθε δείγματος που πρέπει να ανέρχεται στα και ο οποίος ισούται με $V1 + V_{H2O}$.

Κατ' αυτόν τον τρόπο προσδιορίστηκε ο άγνωστος όγκος $V1$ και ο όγκος του αποστειρωμένου νερού (ddH₂O) που απαιτείται για κάθε δείγμα. Τέλος, σε νέα αριθμημένα tubes προστέθηκαν οι ποσότητες που απαιτούνται σε ddH₂O και αρχικού διαλύματος.

2.2.5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ:

Για την διεξαγωγή των PCR αυτού του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές: SCoT1, SCoT34, SCoT35, SCoT51, SCoT61, SCoT70, UBC-808, UBC-811, UBC-845, UBC-847 και UBC-851.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την PCR αποτελείται από τα παρακάτω βήματα:

1. Πρώτο και βασικό στάδιο αποτελεί η ρύθμιση του θερμοκυκλοποιητή. Οι συνθήκες που επιλέγονται κάθε φορά εξαρτώνται άμεσα από την επιλογή του εκκινητή.
2. Ακολουθεί η αρίθμηση μικρών ειδικών σωληνάρων (PCR tubes) 1 mL. Για κάθε δείγμα πρέπει να αναφέρεται ο αριθμός-κωδικός του και η ημερομηνία.
3. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει την παρασκευή του Master mix του οποίου τα συστατικά θα αναλυθούν στην συνέχεια για κάθε εκκινητή ξεχωριστά.

2.2.5.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΜΕ SCoT:

Η PCR με την χρήση των SCoT εκκινητών ολοκληρώθηκε με την χρήση των εξής εκκινητών, με αλληλουχίες που αναγράφονται στον πίνακα:

Πίνακας 7. Αλληλουχίες SCoT εκκινητών.

Κωδικός-Όνομα	Αλληλουχία
SCoT1	CAA CAA TGG CTC CCA CCA
SCoT34	ACC ATG GCT ACC ACC GCA
SCoT35	CAT GGC TAC CAC CGG CCC
SCoT51	ACA ATG GCT ACC ACT GTC
SCoT61	CAA CAA TGG CTA CCA CCG

SCoT70	CTTAGGCTTACCA GCGCG
--------	---------------------

Σε ένα eppendorf tube των 2 mL προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια. Η τελική ποσότητα που θα δημιουργηθεί αντιστοιχεί σε 30 δείγματα.

Πίνακας 8. Master mix για PCR με SCoT.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (για 1 δείγμα)	Ποσότητα (για 30 δείγματα)
Buffer A	2 μ L	60 μ L
dNTPs	0,4 μ L	12 μ L
Primer	0,8 μ L	24 μ L
Kapa Taq	0,08 μ L (4Units)	2,4 μ L
H ₂ O έγχυσης	16,72 μ L	501.6

Το master mix επειδή αποτελείται από αντιδραστήρια μεγάλης ευαισθησίας, κατά την παρασκευή του παραμένει στον πάγο.

Το injection water είναι το πρώτο συστατικό του master mix που τοποθετείται στο tube ενώ τελευταία προστίθεται η taq πολυμεράση. Με την ολοκλήρωση παρασκευής του, μεταφέρονται από 18 μ L master mix σε αριθμημένα PCR tubes και σε κάθε ένα από αυτά προστίθεται το κατάλληλο δείγμα DNA σε ποσότητα 2 μ L. Αφού με pipetting αναδεύονται τα συστατικά κάθε δείγματος, τοποθετούνται στην συσκευή του θερμοκυκλοποιητή. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο πραγματοποιείται σε 35 κύκλους και αποτελείται από τα στάδια που αναγράφονται στον πίνακα .

Πίνακας 9. Συνθήκες για την ολοκλήρωση ενός κύκλου PCR με SCoT.

Βήματα	Θερμοκρασίες	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	94°C	3 min
Αποδιάταξη	94°C	30 sec
Θερμοκρασία Υβριδισμού	52°C	30 sec
Επιμήκυνση	72°C	1 min
Τελική Επιμήκυνση	72°C	5 min

2.2.5.2.α ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ISSR:

Οι εκκινητές ISSR που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR, οι αλληλουχίες τους αλλά και οι θερμοκρασίες υβριδισμού τους αναγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 10. Αλληλουχίες ISSR εκκινητών.

Κωδικός-Όνομα	Αλληλουχία	Θερμοκρασία Υβριδισμού (T _m)
UBC-808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	52°C
UBC-811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	52°C
UBC-845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	52,2°C
UBC-847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	52,2°C
UBC-851	GTG TGT GTG TGT GTG TCG	52,2°C

Τα συστατικά και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του master mix ήταν:

Πίνακας 11. Master mix για PCR με ISSR.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (για 1 δείγμα)	Ποσότητα (για 30 δείγματα)
Buffer A	2 µL	60 µL
dNTPs	0,4 µL	12 µL
Primer	0,8 µL	24 µL
Kapa Taq	0,2 µL	6 µL
H ₂ O έγχυσης	16,6 µL	498 µL

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του master mix ήταν η ίδια που αναφέρθηκε και για τους εκκινητές SCoT. Αλλαγές όμως υπήρχαν στις συνθήκες των κύκλων της PCR.

Πίνακας 12. Συνθήκες για την ολοκλήρωση ενός κύκλου PCR με ISSR.

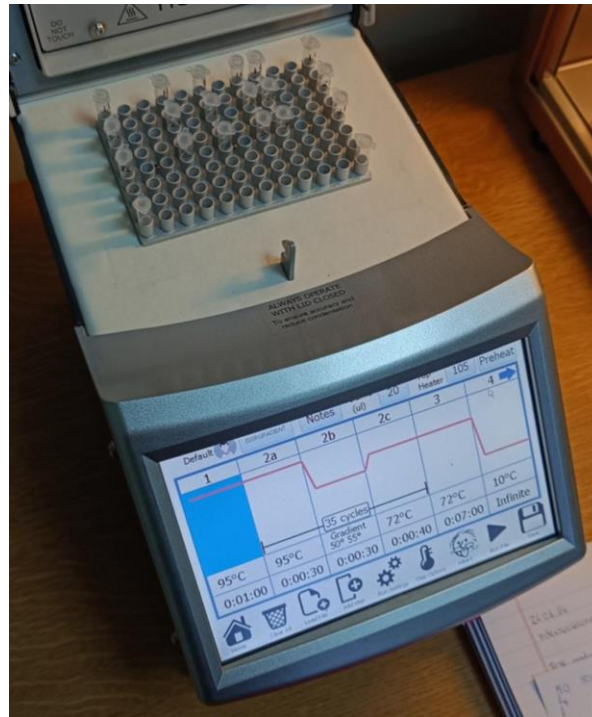
Βήματα	Θερμοκρασίες	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	94°C	4 min
Αποδιάταξη	94°C	30 sec
Θερμοκρασία Υβριδισμού	T _m κάθε εκκινητή	30 sec
Επιμήκυνση	72°C	40 sec
Τελική Επιμήκυνση	72°C	7 min

2.2.5.2.β ISSR PCR gradient:

Στο πείραμα αυτό καθώς οι βιβλιογραφικές αναφορές είχαν κενό για κάποιους εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν και οι θερμοκρασίες υβριδισμού τους ήταν άγνωστες χρησιμοποιήθηκε και η τεχνική της PCR gradient για τον προσδιορισμό αυτών των θερμοκρασιών. Η συνταγή του master mix παρέμεινε η ίδια και οι συνθήκες που επικράτησαν στο μηχάνημα κατά την διεξαγωγή της PCR αναγράφονται πιο κάτω.

Πίνακας 13. Συνθήκες της PCR gradient.

Βήματα	Θερμοκρασίες	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	94°C	4 min
Αποδιάταξη	94°C	30 sec
Θερμοκρασία Υβριδισμού	Gradient 50°C - 55°C	30 sec
Επιμήκυνση	72°C	40 sec
Τελική Επιμήκυνση	72°C	7 min

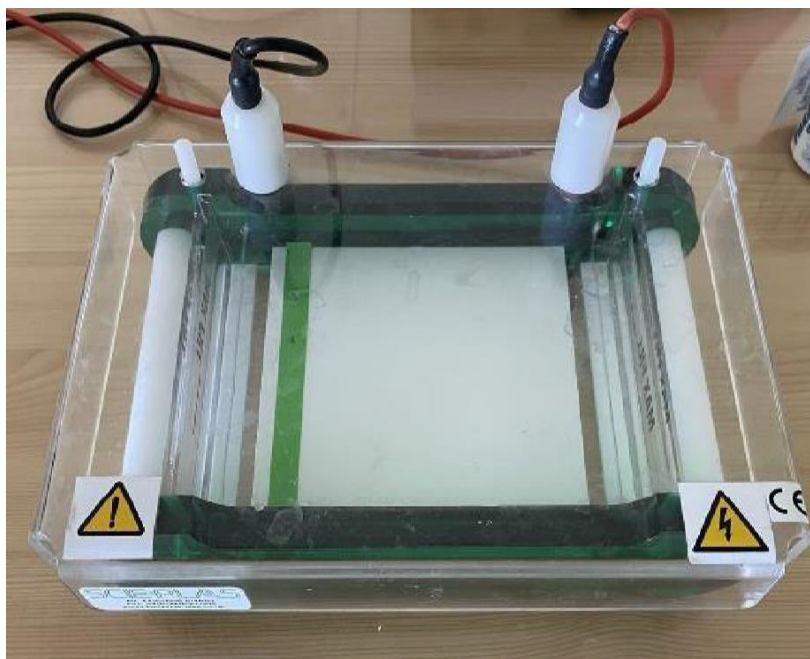


2.2.6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ:

Η τεχνική της Ηλεκτροφόρησης αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης, περιεκτικότητας 1% σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας μετρούνται 0,2 g αγαρόζης τα οποία στην συνέχεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 100 mL.
2. Με την χρήση σιφωνίου και πουάρ προστίθενται 20 mL TAE (1x) στην κωνική φιάλη με την αγαρόζη.
3. Αφού πρώτα καλυφθεί η κωνική φιάλη με απορροφητικό χαρτί, το μείγμα μεταφέρεται στον φούρνο μικροκυμάτων με στόχο την ομογενοποίησή του.
4. Το μείγμα παραμένει στον φούρνο μικροκυμάτων μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, η διαδικασία διακόπτεται για να αναδευτεί το εσωτερικό της κωνικής και για να μην ξεπεράσει το σημείο βρασμού.
5. Όταν η ομογενοποίηση έχει ολοκληρωθεί το μείγμα αφήνεται για να μειωθεί η θερμοκρασία του για περίπου 5 λεπτά.
6. Ακολουθεί η μετάγγισή του στο καλούπι-cast όπου και παραμένει για τα επόμενα 20 min για να μπορέσει να πήξει.
7. Έπειτα η πηκτή αφαιρείται από το καλούπι, απομακρύνονται από αυτό τα χτενάκια και τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ποσότητα TAE (1x).
8. Σε καθαρό PCR tube του 1 mL προστίθενται 1 μ L χρωστικής ουσίας και 5 μ L ladder (πρότυπος δείκτης μοριακών βαρών) και πραγματοποιείται η ανάδευσή του με pipetting.
9. Για τα δείγματα του DNA σε αριθμημένα PCR tubes θα προστεθούν οι ίδιες ποσότητες με την διαφορά όμως αντί για ladder θα προστεθούν 5 μ L δείγματος.
10. Αφού όλα τα δείγματα έχουν αναδευτεί ένα προς ένα μεταφέρονται τα πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί στην πηκτή, με πρώτο να τοποθετείται το δείγμα που περιέχει τον ladder.
11. Αφού έχουν φορτωθεί όλα τα δείγματα τίθεται σε λειτουργία η συσκευή ηλεκτροφόρησης και επιλέγεται τάση ρεύματος στα 100 V. Πριν την έναρξη της ηλεκτροδότησης της συσκευής θα πρέπει να ελεγχθεί ότι τα δύο καλώδια βρίσκονται στις σωστές εσοχές και πως υπάρχει σωστή επαφή.
12. Η διαδικασία αυτή θα διαρκέσει για 50min.
13. Με το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, η τροφοδότηση του ρεύματος πρέπει να διακοπεί. Αφού απομακρύνουμε τα καλώδια από τις εσοχές τους, η πηκτή μεταφέρεται στην κατάλληλη συσκευή UV φωτός για να μελετηθούν τα αποτελέσματα.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των PCR με τους εκκινητές SCoT και ISSR, χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 1.5%. Για την παρασκευή αυτού η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια, με την μόνη διαφορά πως σε 20 mL TAE (1x) προστέθηκαν 0.6 g αγαρόζης.



Εικόνα 20. Η συσκευή SCIE-PLAS που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 21. Πηκτή αγαρόζης στο καλούπι. Στο επάνω μέρος του διακρίνονται τα βοηθία στα οποία τοποθετούνται τα δείγματα.

2.2.7. ΜΕΤΡΗΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ

Η μέτρηση του φθορισμού της χλωροφύλλης πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια του φορητού οργάνου OS30p+ *Research Chlorophyll Fluorometer* και των κατάλληλων υποδοχέων φύλλου (clips). Για αυτές τις μετρήσεις επιλέχθηκαν 15 διαφορετικά άτομα από κάθε πληθυσμό, διασκορπισμένα σε όλη την έκταση των αγρών. Σε κάθε άτομο επιλέχθηκε από ένα φύλλο το οποίο βρισκόταν σε εξωτερική μεριά της κόμης, καλά φωτισμένο, χωρίς ξένα σώματα πάνω (π.χ.: σκόνες), καλά ανεπτυγμένο και όσο πιο υγιές γινόταν. Θα πρέπει να σημειωθεί πως την περίοδο

που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία ο δεύτερος πληθυσμός της ποικιλίας 'Ποντίκης' είχε εμφανείς μυκητολογικές προσβολές, κάτι που μπορεί να επηρέασε άμεσα ή έμμεσα τα αποτελέσματα που παρατίθενται στην συνέχεια.



Εικόνα 22. Συσκευή μέτρησης του φθορισμού της χλωροφύλλης OS30p+ Research Chlorophyll Fluorometer.

2.2.8. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τα προφίλ των θραυσμάτων του DNA από τους δείκτες SCoT και ISSR στα δείγματα βαθμολογήθηκαν χειροκίνητα χρησιμοποιώντας δυαδικά δεδομένα που δηλώνουν την παρουσία (1) ή απουσία (0) ζωνών. Τα πρωτογενή δεδομένα που προέκυψαν, αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GenAlEx 6.5. Υπολογίστηκαν οι συχνότητες εμφάνισης των ζωνών για κάθε πληθυσμό, οι πίνακες γενετικής απόστασης μεταξύ των ατόμων, καθώς επίσης πραγματοποιήθηκαν και περαιτέρω τόσο γενετικές αναλύσεις όσο και στατιστικές. Ο πίνακας των γενετικών αποστάσεων (GD) χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία του δενδροδιαγράμματος με την χρήση του προγράμματος MEGA X.

Όσον αφορά την ανάλυση των μετρήσεων του φθορισμού της χλωροφύλλης πραγματοποιήθηκε ανάλυση t-test με την χρήση του στατιστικού προγράμματος JASP.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

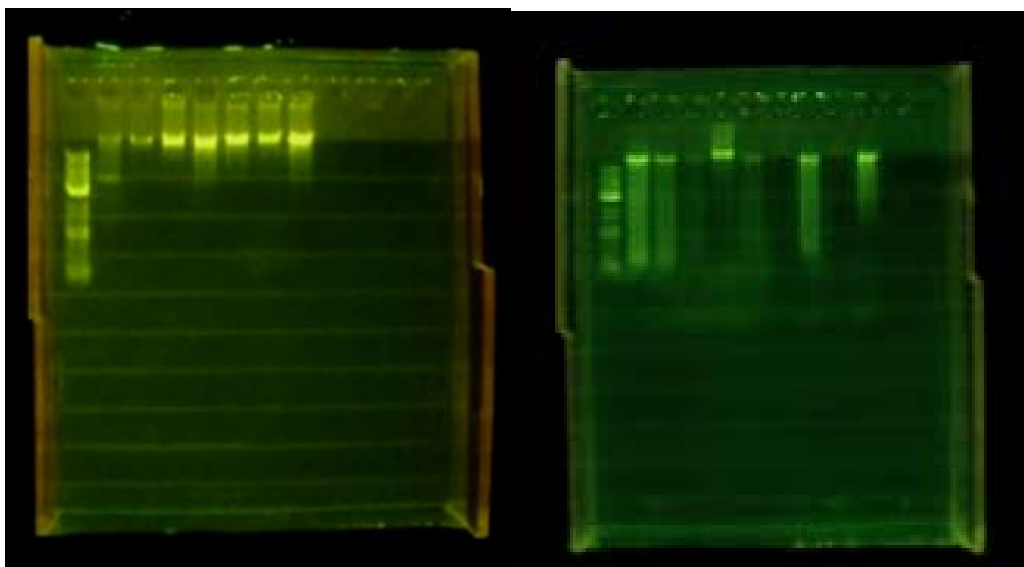
Με την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου CTAB για όλα τα δείγματα, ακολούθησε η ποσοτική τους ανάλυση με την χρήση της μεθόδου της φασματοφωτομετρίας. Τα αποτελέσματα της φασματοφωτομέτρησης είναι τα εξής:

Πίνακας 14. Αποτελέσματα Φασματοφωτομέτρησης.

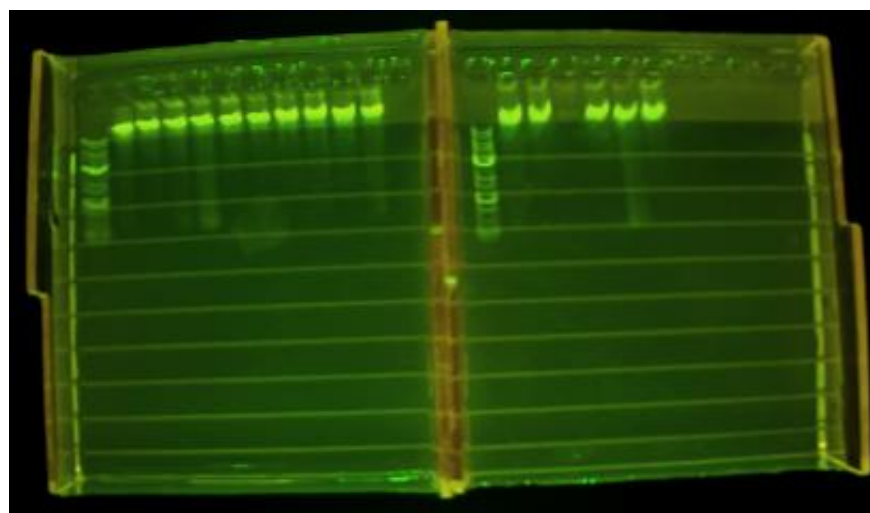
Δείγματα	A ₂₆₀	A _{260/280}	C(ng*μL ⁻¹)
01A	0,073	1.57	365
02A	0,07	1.96	350
03A	0,059	1.43	295
04A	0,043	1.89	215
05A	0,032	1.35	160
06A	0,023	1.49	115
07A	0,064	1.47	320
08A	0,048	1.78	240
09A	0,064	1.39	320
10A	0,044	1.31	220
11A	0,053	1.39	265
12A	0,147	1.23	735
13A	0,118	1.33	590
14A	0,133	1.07	665
15A	0,113	1.39	565
01Π	0,193	1.76	965
02Π	0,083	1.58	415

03Π	0,176	1.53	880
04Π	0,156	1.59	780
05Π	0,187	1.32	935
06Π	0,162	1.69	810
07Π	0,132	1.54	660
08Π	0,248	1.53	1240
09Π	0,158	1.73	790
10Π	0,106	1.49	530
11Π	0,249	1.81	1245
12Π	0,132	1.42	660
13Π	0,124	1.59	620
14Π	0,17	1.5	850

Για τον έλεγχο της παρουσίας γενετικού υλικού αλλά και για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής του κρίθηκε απαραίτητη και η εφαρμογή της μεθόδου της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε πηκτή συγκέντρωσης 1%. Τα αποτελέσματα όπως παρατηρήθηκαν με την χρήση ακτινοβολίας στο φάσμα του UV είναι:



Εικόνα 23. Αποτελέσματα PCR για τον έλεγχο της απομόνωσης του DNA από τα δείγματα 1Α-15Α. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



Εικόνα 24. Αποτελέσματα PCR για τον έλεγχο της απομόνωσης του DNA από τα δείγματα 11Π-15Π. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.

Για να διεξαχθούν οι PCR και να είναι τα αποτελέσματα σε κάθε άτομο συγκρίσιμα κρίθηκε απαραίτητη η αραιώση όλων των δειγμάτων, με σκοπό όλα να έχουν ίσες συγκεντρώσεις της τάξεως των $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Για τον υπολογισμό των απαραίτητων ποσοτήτων νερού χρησιμοποιήθηκαν οι μετρήσεις που λήφθηκαν από την φασματοφωτομέτρηση. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 15. Αραιώσεις δειγμάτων.

Δείγματα	A₂₆₀	A_{260/280}	C₁ (ng*μL⁻¹)	V_{DNA} ή V₁ (μL)	V_{H2O} (μL)
01A	0,073	1,57	365	10	415,0
02A	0,07	1,96	350	10	410,0
03A	0,059	1,43	295	10	137,5
04A	0,043	1,89	215	10	97,5
05A	0,032	1,35	160	10	70,0
06A	0,023	1,49	115	10	47,5
07A	0,064	1,47	320	10	150,0
08A	0,048	1,78	240	10	110,0
09A	0,064	1,39	320	10	150,0
10A	0,044	1,31	220	10	100,0
11A	0,053	1,39	265	10	122,5
12A	0,147	1,23	735	10	165,0
13A	0,118	1,33	590	10	285,0
14A	0,133	1,07	665	10	322,5

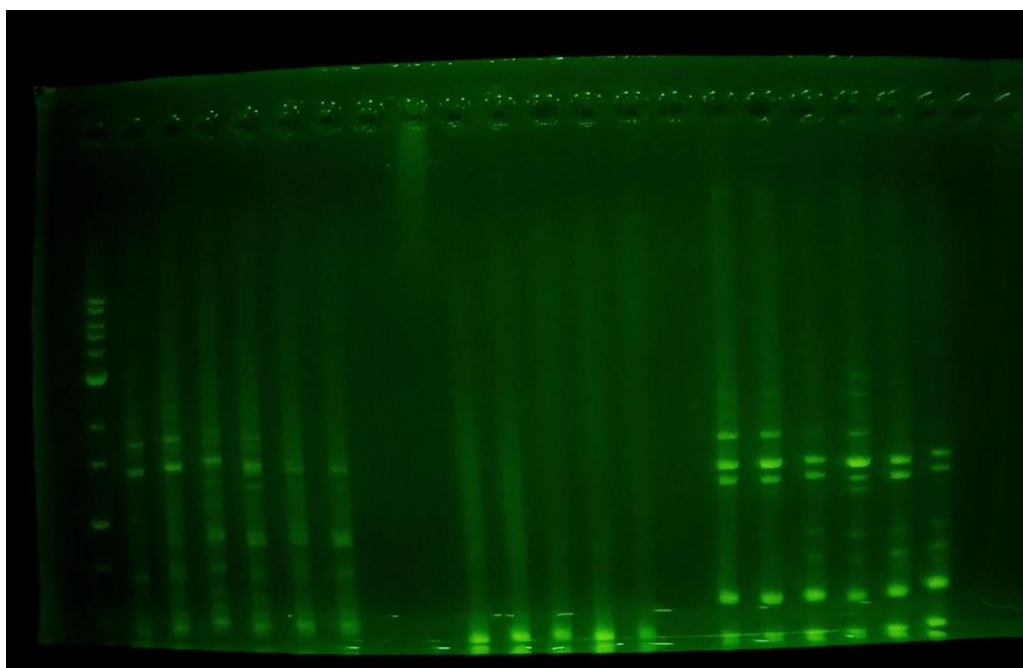
15A	0,113	1,39	565	10	272,5
01Π	0,193	1,76	965	10	472,5
02Π	0,083	1,58	415	10	197,5
03Π	0,176	1,53	880	10	430,0
04Π	0,156	1,59	780	10	380,0
05Π	0,187	1,32	935	10	457,5
06Π	0,162	1,69	810	10	395,0
07Π	0,132	1,54	660	10	320,0
08Π	0,248	1,53	1240	10	610,0
09Π	0,158	1,73	790	10	385,0
10Π	0,106	1,49	530	10	255,0
11Π	0,249	1,81	1245	10	612,5
12Π	0,132	1,42	660	10	320,0
13Π	0,124	1,59	620	10	315,0
14Π	0,17	1,5	850	10	300,0

Καθώς οι θερμοκρασίες υβριδισμού δεν ήταν γνωστές από την βιβλιογραφία για μερικούς από τους εκκινητές ISSR (UBC-841, UBC-845, UBC-847), επιλέχθηκε η τεχνική της PCR gradient για τον προσδιορισμό των βέλτιστων θερμοκρασιών. Έτσι οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν ήταν οι εξείς:

Πίνακας 16. Συνθήκες που επικράτησαν κατά την διεξαγωγή της PCR gradient.

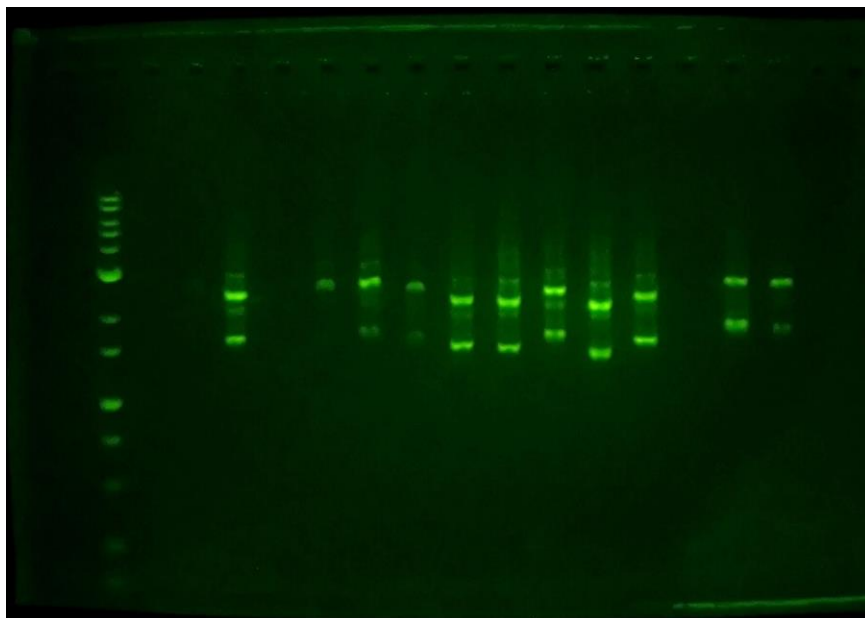
Θέση στον θερμοκυκλοποιητή	Θερμοκρασία
1η	50°C
4η	50,95°C
6η	52,2°C
8η	53,4°C
9η	54,15°C
12η	55°C

Στην συνέχεια ακολούθησε η διεξαγωγή ηλεκτροφόρησης με σκοπό την επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αυτής παρουσιάζονται στην εικόνα 25. Εν τέλει, ως καταλληλότερη κρίθηκε η θερμοκρασία των 52,2°C.

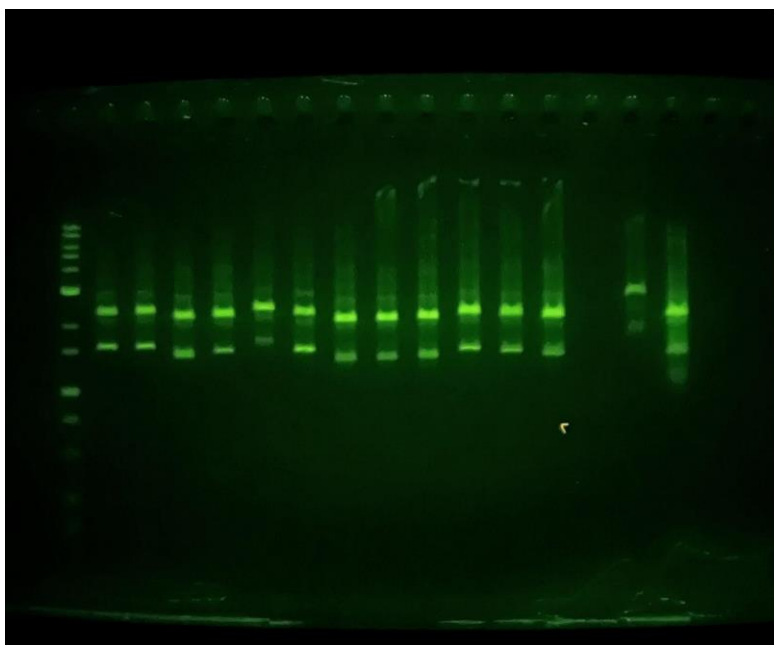


Εικόνα 25. Αποτελέσματα της PCR gradient με τους εκκινητές UBC-841, UBC-845, UBC-847 (από δεξιά προς τα αριστερά). Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder. Ο εκκινητής UBC-845 απορρίφθηκε καθώς δεν υπήρξαν αποτελέσματα σε καμία θερμοκρασία.

Με την ολοκλήρωση όλων των PCR, και την παρατήρηση των αποτελεσμάτων αυτών στο φάσμα UV λήφθηκαν οι εξής φωτογραφίες:



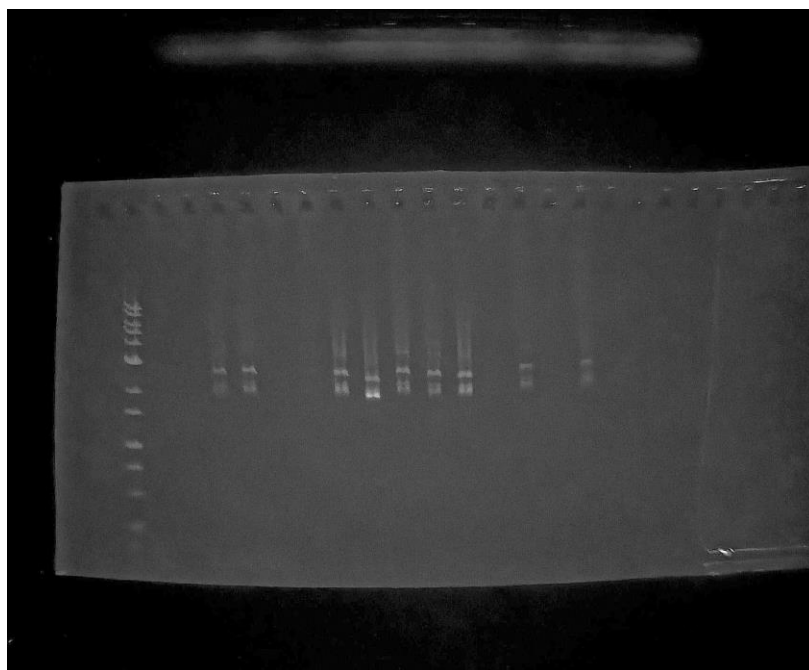
Εικόνα 26. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT1 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



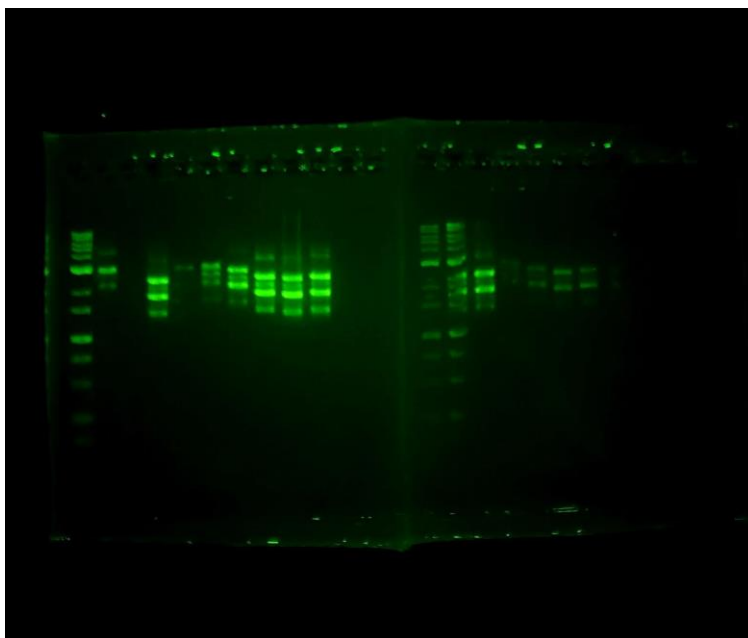
Εικόνα 27. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT1 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder. Το 13ο δείγμα εξαιρέθηκε από την διεξαγωγή του πειράματος στην πορεία καθώς φαίνεται πως το DNA δεν έχει πολλαπλασιαστεί.



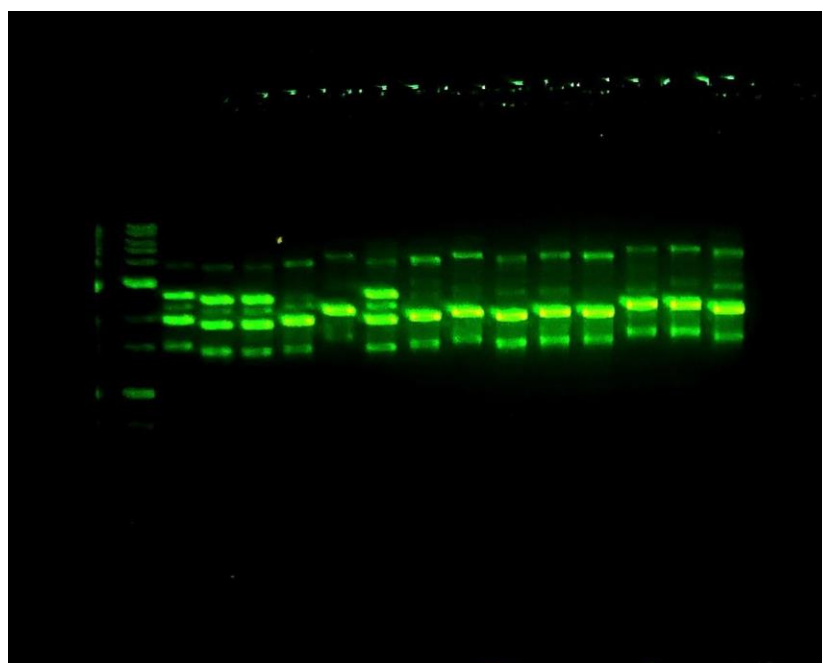
***Εικόνα 28.** Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT34 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.*



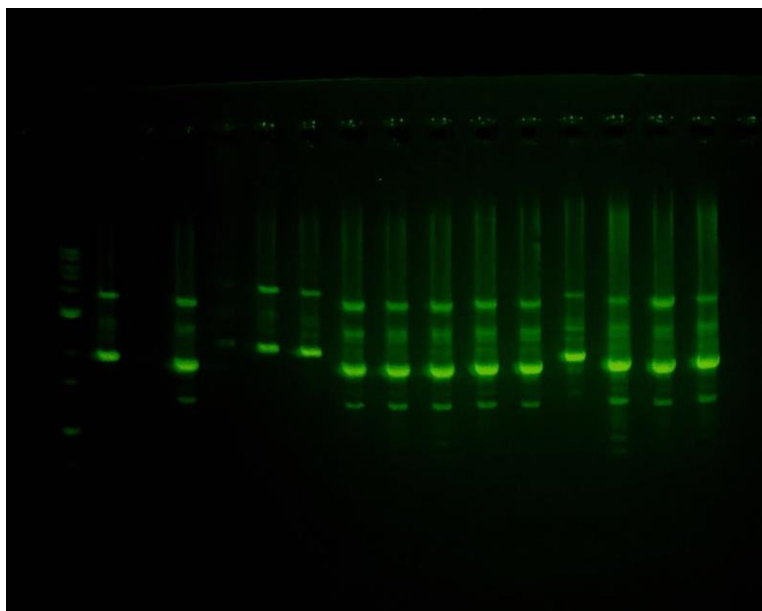
***Εικόνα 29.** Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT34 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.*



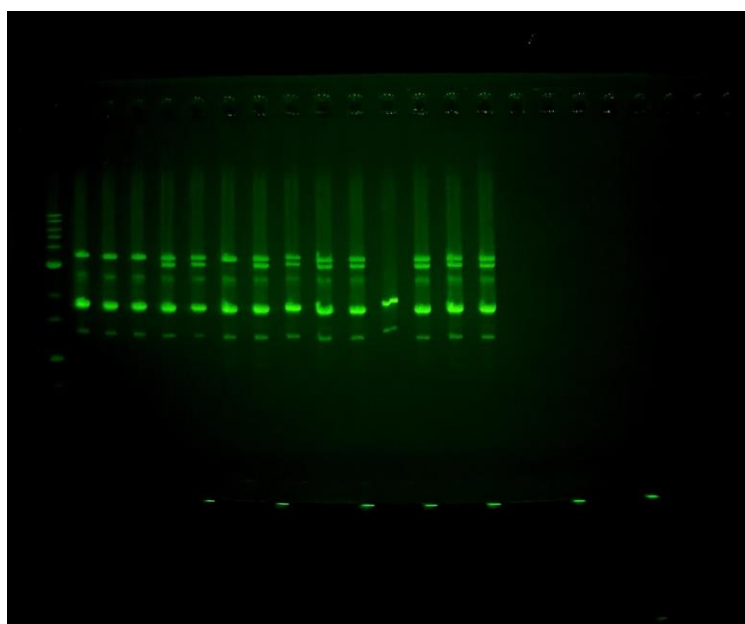
Εικόνα 30. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT35 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



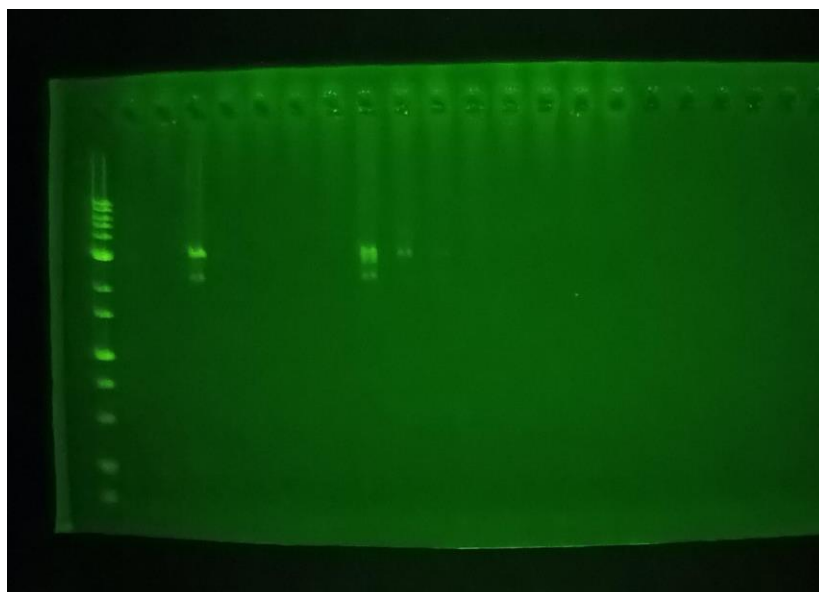
Εικόνα 31. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT35 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντικής. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



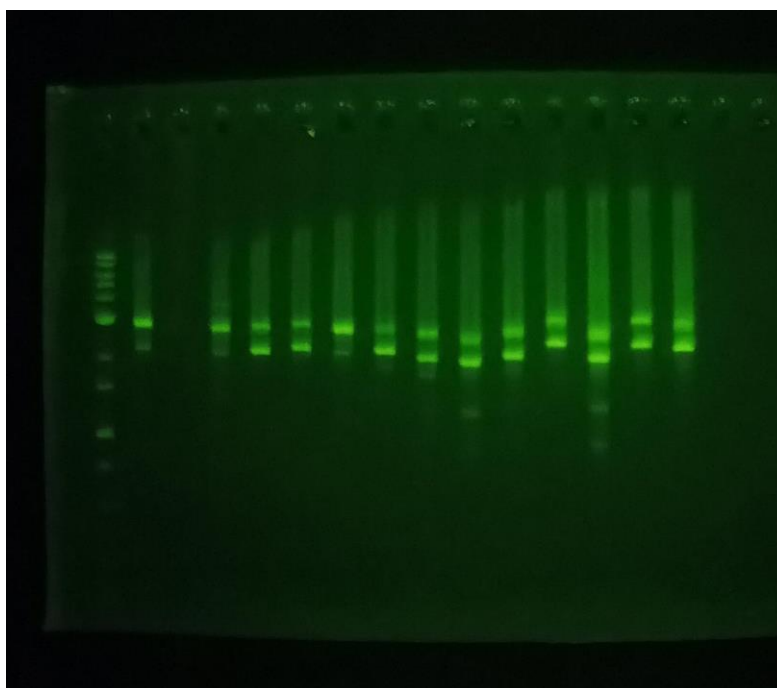
Εικόνα 32. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT51 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



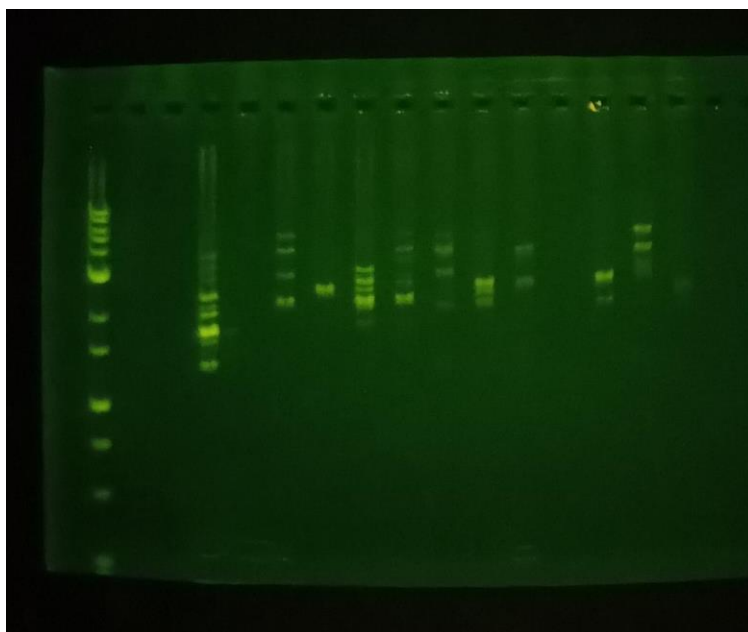
Εικόνα 33. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT51 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



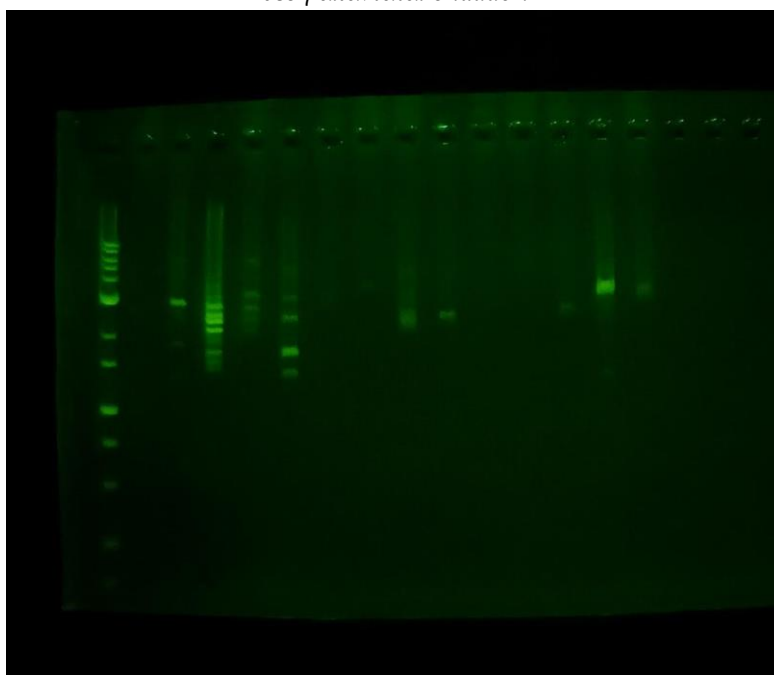
Εικόνα 34. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT61 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



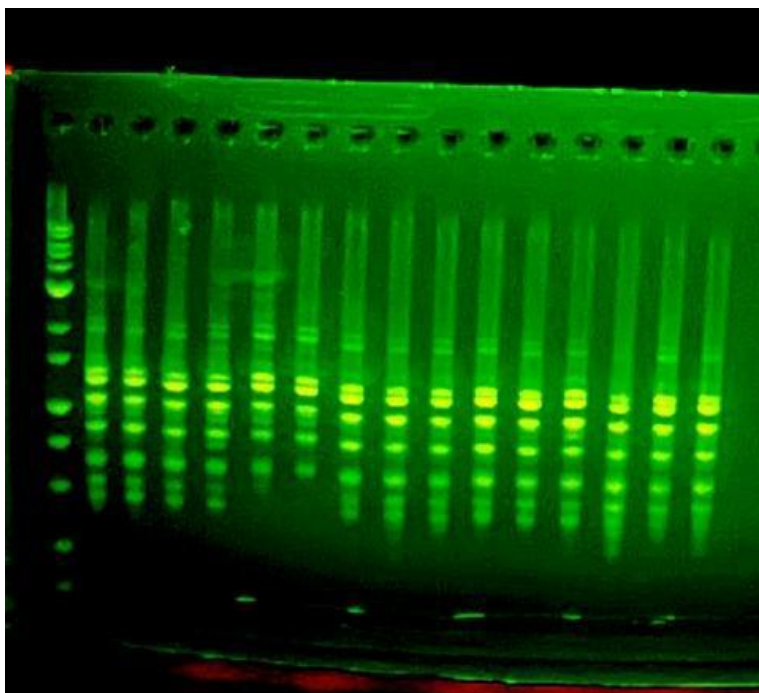
Εικόνα 35. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT61 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



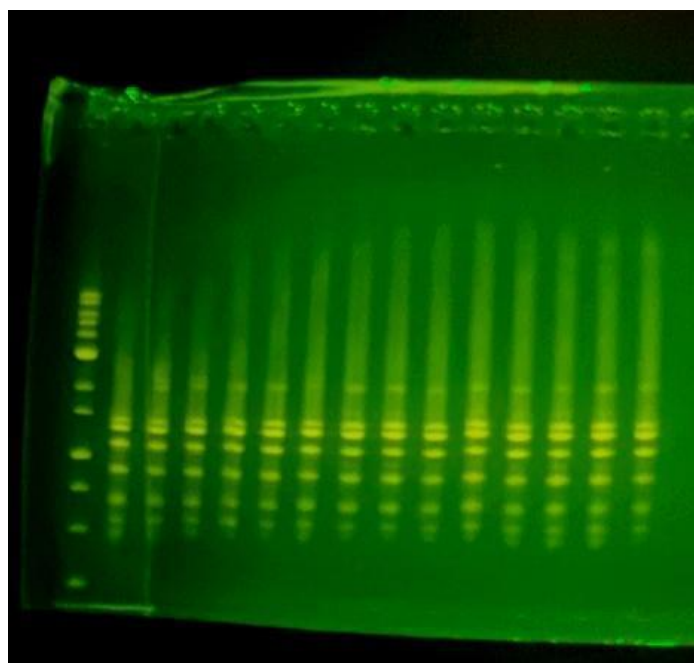
Εικόνα 36. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT70 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



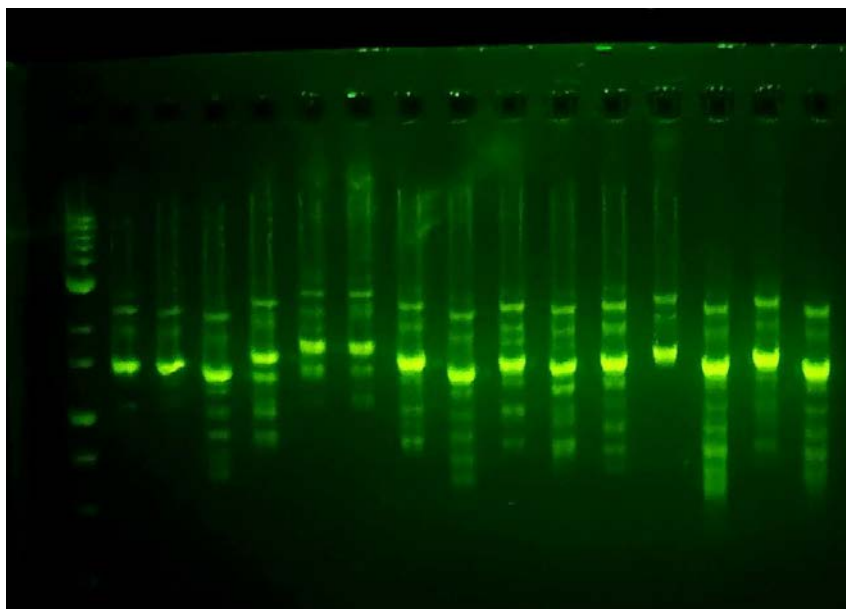
Εικόνα 37. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή SCoT61 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



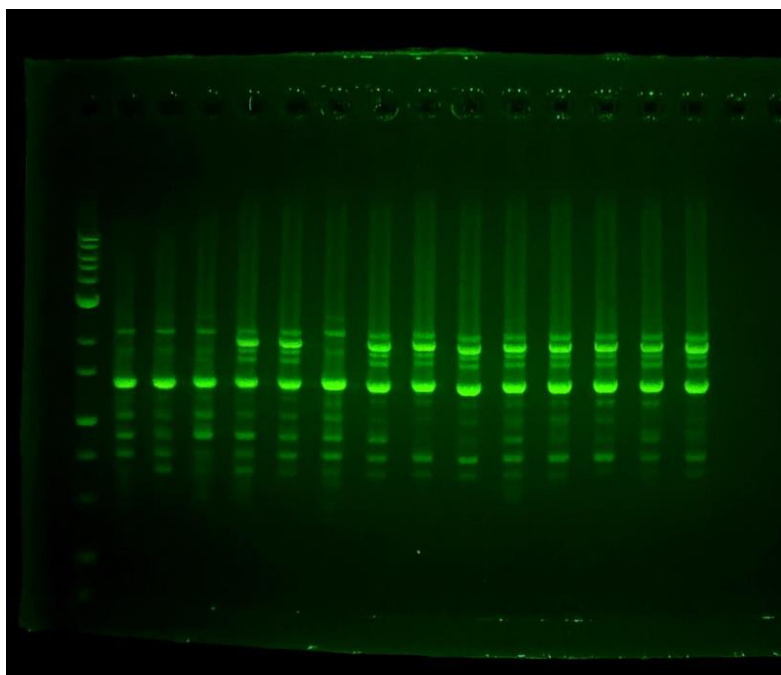
Εικόνα 38. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-808 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αγρίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



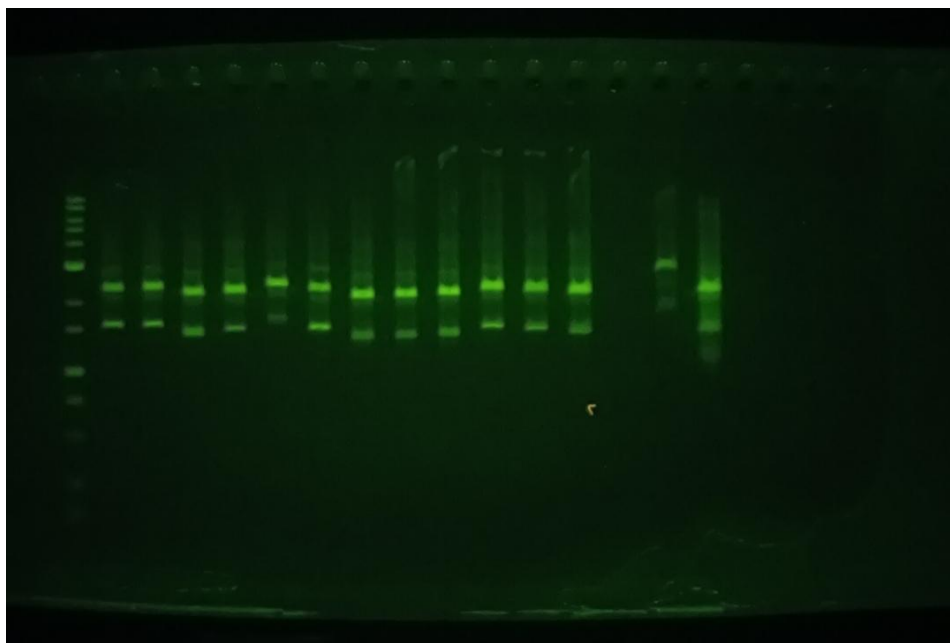
Εικόνα 39. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-808 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντίκης. Στην πρώτη απαντάται ο ladder.



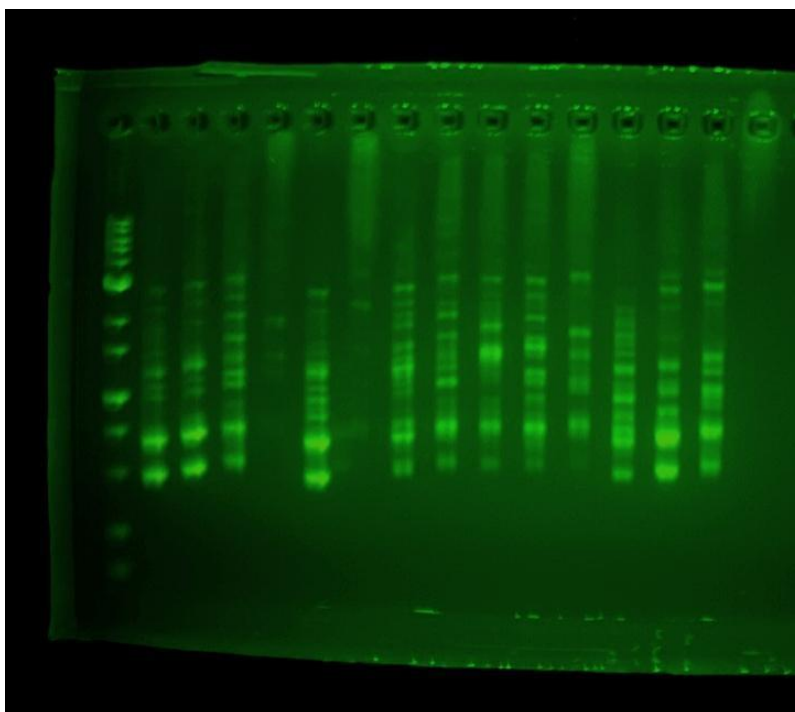
Εικόνα 40. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-811 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αγρίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



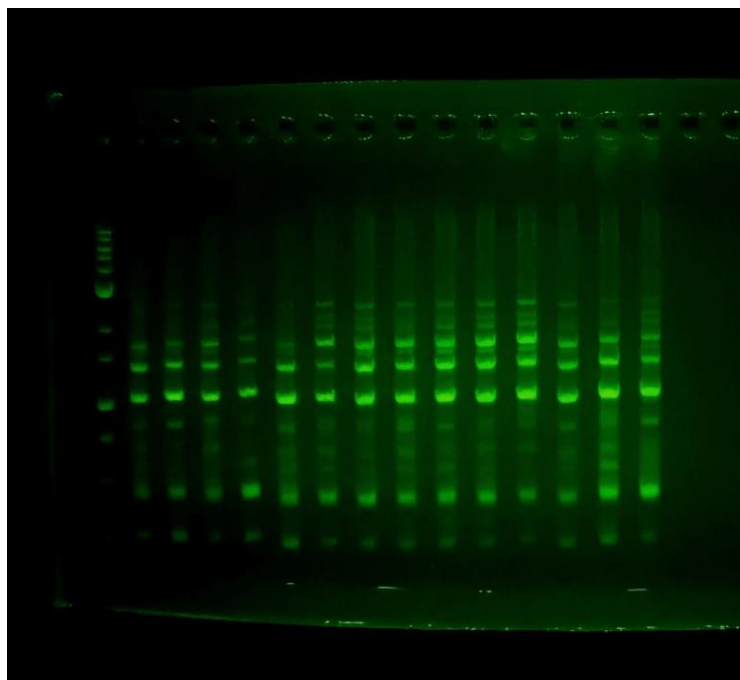
Εικόνα 41. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-811 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντικής. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



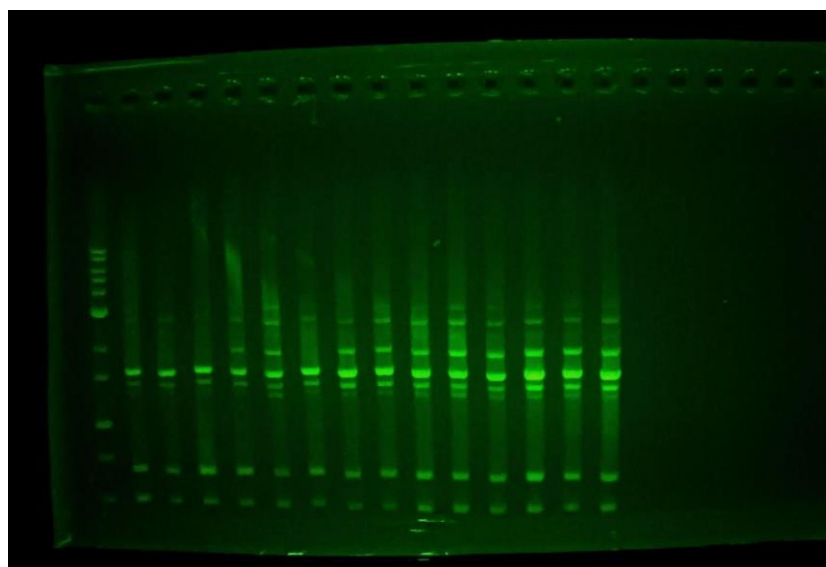
Εικόνα 42. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-845 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αγγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



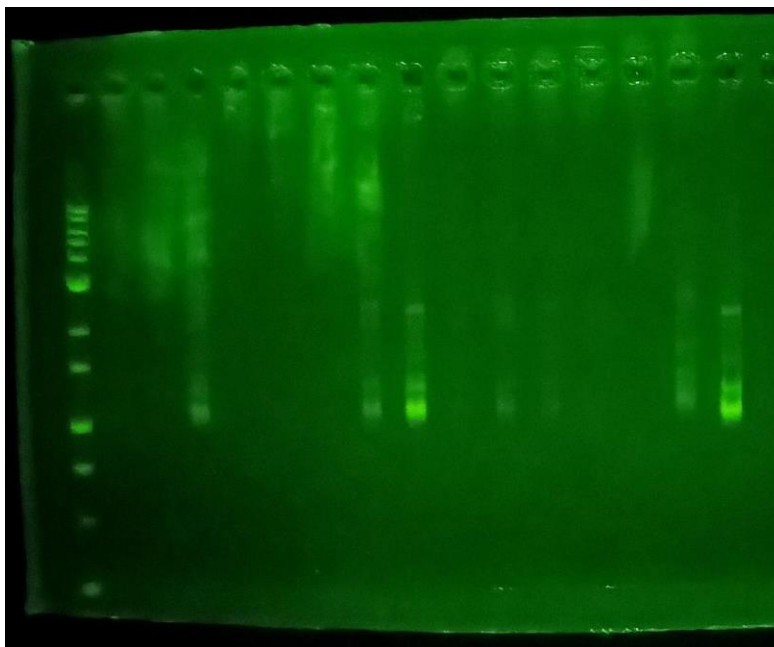
Εικόνα 43. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-845 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντικής. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



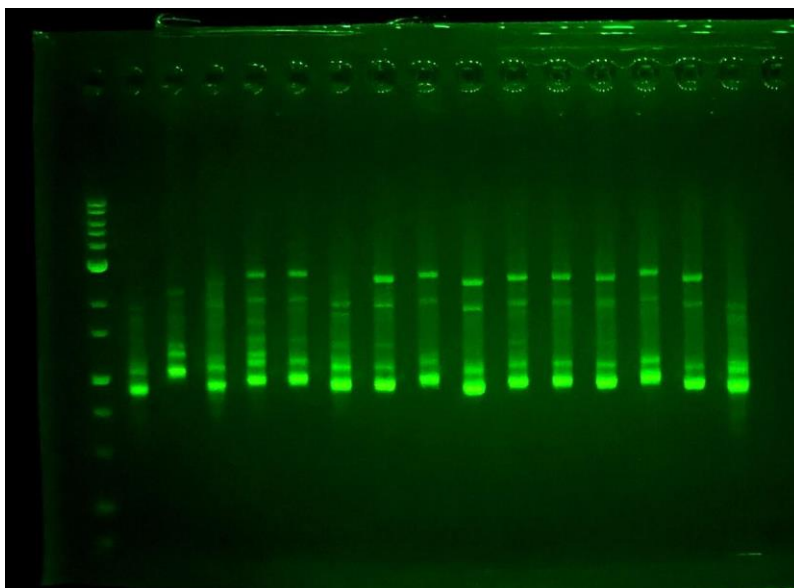
Εικόνα 44. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-847 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



Εικόνα 45. Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-847 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντικής. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.



***Εικόνα 46.** Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-851 για τα δείγματα 1Α-15Α της ποικιλίας Αιγίνης. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.*



***Εικόνα 47.** Αποτελέσματα PCR με τον εκκινητή UBC-851 για τα δείγματα 1Π-15Π της ποικιλίας Ποντικής. Στην πρώτη θέση απαντάται ο ladder.*

Μετά την διαδικασία μετατροπής των οπτικών αποτελεσμάτων σε δυαδικά δεδομένα και την ανάλυση αυτών στο GenAlEx τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στην συνέχεια. Στον πίνακα 16 παρουσιάζεται η ποικιλομορφία μεταξύ των 2 πληθυσμών (POP) από τα 29 άτομα

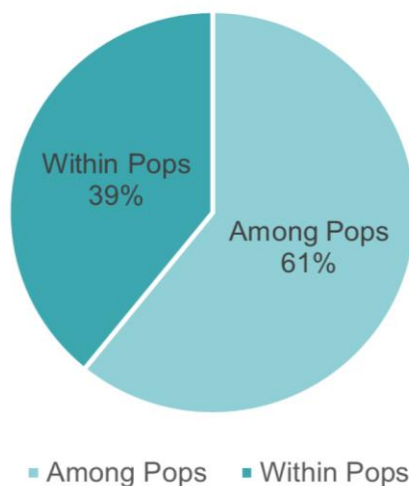
του πειράματος. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως τιμές των μέσων τιμών (mean) $\pm$ τα τυπικά σφάλματα (standard errors SE).

Πίνακας 17. Γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των 2 πληθυσμών (Pop) από τα 29 άτομα του πειράματος. Τα δεδομένα παρουσιάζονται.

POP	N	No. Bands	No. Unique Bands	Na	Ne	I	h	uh	%P
Αιγίνης	15	77	19	0,485	1,109	0,101	0,066	0,073	20,44%
Ποντίκης	14	81	23	0,445	1,084	0,077	0,051	0,055	14,96%
Mean	12,728 $\pm 0,116$	79	21	0,465 $\pm$ 0,033	1,097 $\pm$ 0,01	0,089 $\pm$ 0,009	0,056 $\pm$ 0,006	0,064 $\pm$ 0,006	17,7% $\pm$ 2,74%

Pop=population (Πληθυσμός), N=αριθμός ατόμων,
 No.Bands=αριθμός ζωνών που εμφανίστηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση,
 Na=αριθμός διαφορετικών αλληλομόρφων, Ne=Number of effective alleles= $1/(p^2 + q^2)$,
 I= Shannon's information index, h = ποικιλότητα = $1 - (p^2 + q^2)$,
 P%=ποσοστό πολυμορφικών ζωνών.

Η γενετική ποικιλότητα (h) είναι γενική χαμηλή και παρατηρούμε όμως ότι είναι ψηλότερη στον πληθυσμό 1 (Αιγίνης) ($0,066 \pm 0,006$) συγκριτικά με αυτή του πληθυσμού 2 ($0,055 \pm 0,006$) (πίνακας 17). Ο δείκτης Shannon (I) που αφορά την ποικιλομορφία, επίσης στην ποικιλία 1 είχε μεγαλύτερη τιμή ($0,101 \pm 0,009$) (πίνακας 17). Η γενετική ποικιλότητα του συνολικού δείγματος (%P) μπορεί να χαρακτηριστεί μέτρια 18%) (πίνακας 17). Ενώ ακόμη και στους δύο πληθυσμούς σημειώθηκαν μοναδικά αλληλόμορφα, συγκεκριμένα 19 για τον πληθυσμό 2 και 23 για τον πληθυσμό 1. Στα δεδομένα αυτά επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η στατιστική ανάλυση AMOVA (Analysis of Molecular Variance). Τα αποτελέσματα αυτής καταγράφονται στον πίνακα 18. Η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών είναι στατιστικά σημαντική ($\Phi_{PT}=0.608$, $p<0,001$) υποδεικνύουν πως οι δύο πληθυσμοί - ποικιλίες μπορούν να διαχωριστούν αποτελεσματικά. Ακόμη επισημαίνεται πως το 61% της παρατηρούμενης γενετικής ποικιλότητας αποδόθηκε στην μεταβλητότητα μεταξύ των πληθυσμών, ενώ το 39% σημειώθηκε εντός των γονοτύπων.

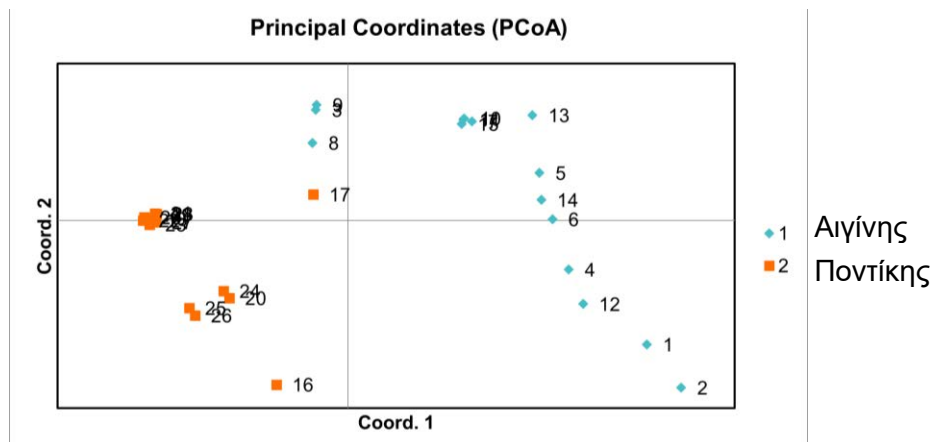


Διάγραμμα 1. Ποσοστά γενετικής ποικιλότητας. Μεταξύ των πληθυσμών σημειώνεται το 69% ενώ εντός των πληθυσμών το 39%.

Πίνακας 18. Ανάλυση AMOVA.

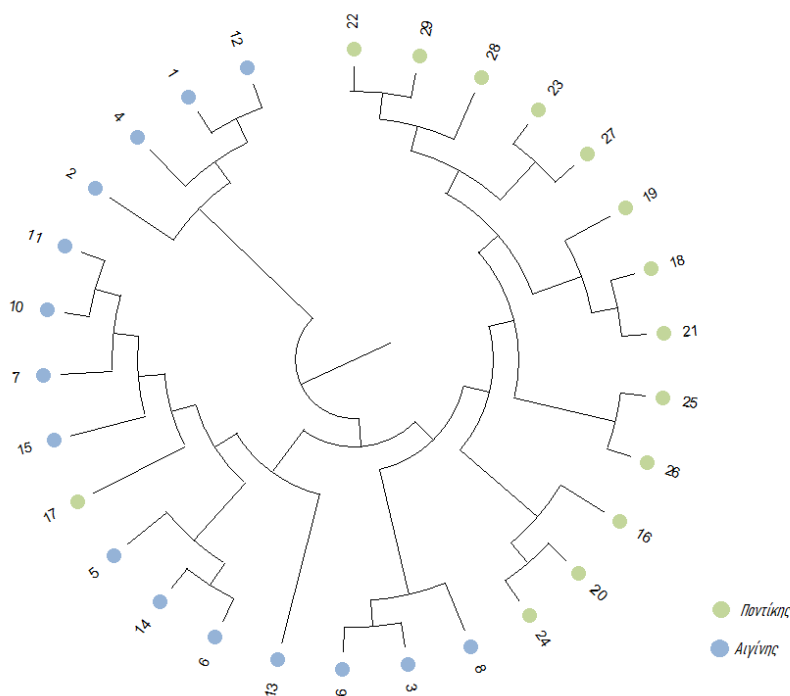
<i>Source</i>	<i>df</i>	<i>Sum Squares</i>	<i>Mean Square</i>	<i>Estimated Variance</i>	<i>%</i>	Φ_{PT}
<i>Μεταξύ πληθυσμών</i>	<i>1</i>	<i>8,474</i>	<i>8,474</i>	<i>0,560</i>	<i>61%</i>	<i>0,608 p<0,001</i>
<i>Εντός πληθυσμών</i>	<i>27</i>	<i>9,733</i>	<i>0,360</i>	<i>0,360</i>	<i>39%</i>	
<i>Σύνολο</i>	<i>28</i>	<i>18,207</i>		<i>0,921</i>	<i>100%</i>	

Η ανάλυση PCoA (Principal Coordinates Analysis) εμφάνισε δύο βασικές συστάδες ατόμων, στις οποίες οι πληθυσμοί μελέτης διαχωρίστηκαν σαφώς όπως εμφανίζεται και στο Διάγραμμα 2. Ως πληθυσμός 1 αναφέρεται η ποικιλία ‘Αιγίνης’ και ως πληθυσμός 2 η ποικιλία ‘Ποντίκης’.



Διάγραμμα 2. Αποτελέσματα ανάλυσης PCoA.

Το δενδροδιάγραμμα UPGMA (διάγραμμα 3), δημιουργήθηκε σύμφωνα με την ανάλυση PCoA και απεικονίζει άριστα τους δύο πληθυσμούς σε δύο κύριες ομάδες. Ο δεύτερος κλάδος του δενδρογράμματος χωρίστηκε σε δύο επιμέρους κλάδους όπου στον έναν περιέχονται τα άτομα της ποικιλίας *Ποντίκης* και στον άλλον τα άτομα της ποικιλίας *Αιγίνης*.



Διάγραμμα 3. Δενδροδιάγραμμα UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average) που απεικονίζει τις γενετικές συσχετίσεις μεταξύ των 29 ατόμων.

Από την χρήση του μηχανήματος OS30_p+ Research Chlorophyll Fluorometer οι τιμές που καταγράφηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 19. Μετρήσεις μέτρησης του φθορισμού της χλωροφύλλης.

<i>Δείγμα</i>	<i>Ποικιλία</i>	<i>Fv/Fm</i>	<i>Fv/Fo</i>
A1	Αιγίνης	0,774	3,436
A2	Αιγίνης	0,763	3,224
A3	Αιγίνης	0,774	3,435
A4	Αιγίνης	0,779	3,538
A5	Αιγίνης	0,781	3,576
A6	Αιγίνης	0,749	2,993
A7	Αιγίνης	0,778	3,505
A8	Αιγίνης	0,784	3,632
A9	Αιγίνης	0,77	3,35
A10	Αιγίνης	0,786	3,678
A11	Αιγίνης	0,765	3,256
A12	Αιγίνης	0,761	3,194
A13	Αιγίνης	0,776	3,482
A14	Αιγίνης	0,801	4,031
A15	Αιγίνης	0,769	3,347
P1	Ποντικής	0,74	2,85
P2	Ποντικής	0,733	2,758
P3	Ποντικής	0,751	3,017
P4	Ποντικής	0,76	3,172
P5	Ποντικής	0,762	3,203
P6	Ποντικής	0,76	3,178
P7	Ποντικής	0,727	2,671
P8	Ποντικής	0,739	2,839
P9	Ποντικής	0,734	2,763
P10	Ποντικής	0,76	3,168
P11	Ποντικής	0,688	2,207
P12	Ποντικής	0,719	2,569
P13	Ποντικής	0,691	2,24
P14	Ποντικής	0,705	2,393
P15	Ποντικής	0,74	2,859

Οι μετρήσεις αυτές, υποβλήθηκαν σε στατιστικό έλεγχο με την χρήση του προγράμματος *JASP 0.12.3002.0*.

Πίνακας 20. Περιγραφικά στατιστικά μετρήσεων φθορισμού χλωροφύλλης.

Descriptive Statistics				
	Fv/Fm		Fv/Fo	
	Aiginis	Pontikis	Aiginis	Pontikis
Valid	15	15	15	15
Missing	0	0	0	0
Mean	0,774	0,734	3,445	2,792
Std. Deviation	0,012	0,024	0,244	0,331
Minimum	0,749	0,688	2,993	2,207
Maximum	0,801	0,762	4,031	3,203

Οι διακυμάνσεις του λόγου Fv/Fm, είναι ενδεικτικές των αποτελεσμάτων ορισμένων περιβαλλοντικών παραγόντων καθώς και των καταπονήσεων που μπορεί να δέχεται το φυτό. Η ευνοϊκότερη τιμή αυτού του λόγου για τα περισσότερα είδη είναι $0,83 \pm 0,05$ (Krause and Weis, 1991). Όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα 20 και οι δύο πληθυσμοί εμφανίζουν μέσο όρο για τις τιμές του λόγου Fv/Fm αρκετά κοντινό (περίπου 0.75) οι οποίες θα μπορούσαν ίσως να ερμηνευθούν ως παρουσία κάποιου είδους καταπόνησης. Από την άλλη, ο λόγος Fv/Fo έρχεται να επιβεβαιώσει τις υποθέσεις καθώς η διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών είναι εντονότερη. Καθώς στον πληθυσμό 1 ο μέσος όρος καταγράφεται στο 3.45 ενώ για τον δεύτερο πληθυσμό είναι στο 2.8 περίπου (πίνακας 20).

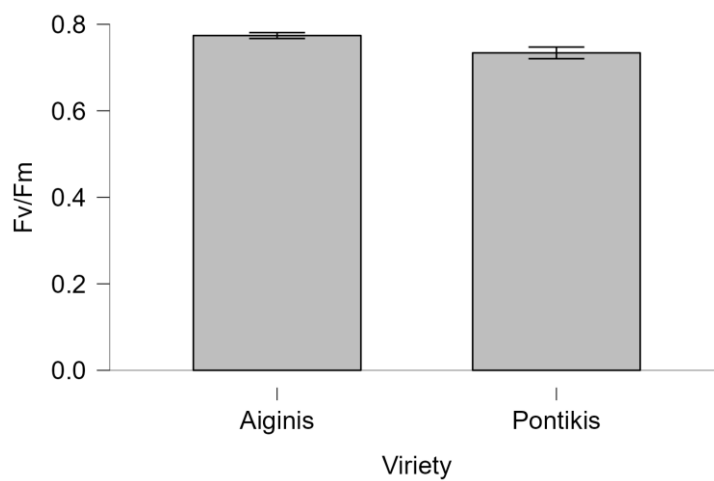
Στην συνέχεια καθώς αποσκοπούσαμε στην σύγκριση τιμών από ανεξάρτητα δείγματα επιλέχθηκε το μοντέλο ελέγχου independent samples t-test. Ως αρχική υπόθεση θα μπορούσε να οριστεί πως οι αναμενόμενες τιμές για τον πληθυσμό 2 (ποικιλία *Ποντίκης*) θα ήταν μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού 1 (ποικιλία *Αιγίνης*). Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου παρατίθενται στα γραφήματα και στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 21. *t-test* Ανεξάρτητων δειγμάτων.

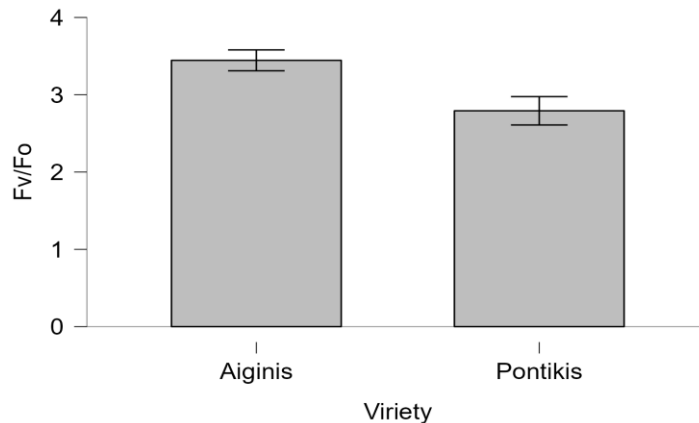
	t	df	p
Fv/Fm	5.698	28	< .001
Fv/Fo	6.142	28	< .001

Πίνακας 22. Πληθυσμιακά περιγραφικά.

	Πληθυσμός	Αριθμός ατόμων	Mean	SD	SE	Coefficient of variation
Fv/Fm	Αιγίνης	15	0,774	0,012	0,003	0,016
	Ποντικής	15	0,734	0,024	0,006	0,033
Fv/Fo	Αιγίνης	15	3,445	0,244	0,063	0,071
	Ποντικής	15	2,792	0,331	0,086	0,119



Διάγραμμα 4. Ραβδόγραμμα των αποτελεσμάτων του *t-test* για τον λόγο Fv/Fm.



Διάγραμμα 5. Ραβδόγραμμα των αποτελεσμάτων του t-test για τον λόγο Fv/Fo.

Με βάση τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό πως διαφορά των μετρήσεων είναι στατιστικά σημαντική αφού ισχύει $p < 0.001$.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέσω όλων των παραπάνω αποτελεσμάτων, καθίσταται κατανοητό πως η τεχνική της απομόνωσης με το πρωτόκολλο CTAB καθώς και η πραγματοποίηση της PCR με την χρήση των μοριακών δεικτών SCoT και ISSR που επιλέχθηκαν, αποδείχθηκαν κατάλληλα. Επιπλέον η λειοτρίβηση με την χρήση υγρού αζώτου, κρίνεται ως καταλληλότερη μέθοδος για την διεκπεραίωση αυτής της διατριβής καθώς λόγω της δερματώδους φύσης των φυτικών ιστών θα απαιτούσε περισσότερο χρόνο και υλικά. Κατά την διαδικασία ανάλυσης των αποτελεσμάτων ο πολυμορφισμός που καταγράφηκε μεταξύ των γονιδιακών θέσεων ήταν αρκετά μεγάλος και έτσι υπήρχε αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση του συνολικού γενετικού υλικού που διατέθηκε προς μελέτη. Όπως προέκυψε με βάση την ανάλυση των βασικών συνιστωσών PCoA (Διάγραμμα 2) αλλά και με το δένδροδιάγραμμα με την μέθοδο UPGMA (Διάγραμμα 3) η ομαδοποίηση μεταξύ των δύο ποικιλιών είναι ξεκάθαρα φανερή. Οι αλληλοεπικαλύψεις μερικών ατόμων που εμφανίζονται και στα δύο διαγράμματα, οφείλονται πιθανών στην προέλευση της ποικιλίας *Ποντίκης* από σπορόφυτα της πρώτης ποικιλίας, όπως αναφέρθηκε άλλωστε και στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. Ακόμη στο Διάγραμμα 2, σχεδόν όλα τα άτομα της δεύτερης ποικιλίας εμφανίζονται σε μια κοινή συστάδα, σε αντίθεση με τα άτομα της ποικιλίας *Αιγίνης*. Η αιτιολόγηση αυτού μπορεί να είναι πως τα νεαρά δέντρα της ποικιλίας *Ποντίκης* προέρχονται από κλώνους, κάτι που θα ήταν δύσκολο να ισχύει για τα συγκεκριμένα δέντρα της ποικιλίας *Αιγίνης*, καθώς την χρονολογία που εγκαταστάθηκαν δεν ήταν διαδεδομένη αυτή η μέθοδος.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως οι διακυμάνσεις του λόγου Fv/Fm παρουσιάζουν τις επιδράσεις των περιβαλλοντικών παραγόντων και των καταπονήσεων στο φυτό. Κατά την περίοδο των μετρήσεων του φθορισμού τα δέντρα και των δύο πληθυσμών βρίσκονταν κάτω από βιοτικές καταπονήσεις, με κατά πολύ μεγαλύτερης έντασης να είναι τα φαινόμενα αυτά στον πληθυσμό 2. Έτσι, θα ήταν αναμενόμενο η μέση τιμή του λόγου Fv/Fm να ήταν πολύ χαμηλά. Υπολογίστηκε

όμως στο 0,734, μια τιμή αρκετά ικανοποιητική για τις συνθήκες που επικρατούσαν, συμπερασματικά μπορεί να επιβεβαιωθεί και πειραματικά η παρατήρηση πως τα άτομα της ποικιλίας *Ποντίκης* εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις προσβολές από μικροοργανισμούς. Ακόμη η διαφορά στους λόγους αυτή μπορεί να είναι αποτέλεσμα της λιγότερης καταπόνησης του φυτού λόγω της μειωμένης εμφάνισης του φαινομένου της παρενδειυτοφορίας, είναι όμως κάτι που χρήζει περαιτέρω και εκτενούς μελέτης.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Amit D. Sonagra, Sagar J. Dholariya “Electrophoresis” Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023
2. Chauhan, Garima & Tripathy, Baishnab. (2019). Role Of Protochlorophyllide Oxidoreductase C In Protection Of Plants From Singlet Oxygen-Induced Oxidative Stress1. Bioscience Biotechnology Research Communications. 12. 504-511. 10.21786/bbrc/12.2/38.
3. Collard, Bertrand & Mackill, David. (2009). Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants. Plant Molecular Biology Reporter. 27. 86-93. 10.1007/s11105-008-0060-5.
4. Crane, J.C., Nelson, M.M., (1971). The Unusual Mechanism of Alternate Bearing in the Pistachio. Hort. Sci. Vol. 65(5) 489-490.
5. Erlich A. Henry. “Principles and Applications for DNA Amplification” Stockton Press, 1989: 1-5, 7-11.
6. Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques. 1992 Jul;13(1):52-4, 56. PMID: 1503775
7. Ferguson, L., Polito, V., Kallsen, C. The pistachio tree: Botany and physiology and factors that affect yield. In Pistachio production manual. L. Feruson, University of California Inc: USA, 2005, pp. 31-39
8. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. J Cytol. 2019 AprJun;36(2):116-117.
9. Heikrujam J, Kishor R, Behari Mazumder P. The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols [Internet]. Biochemical Analysis Tools - Methods for BioMolecules Studies. IntechOpen; 2020
10. Hyone-Myong Eun, chapter 3 & 6, Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology, Academic Press, Pages 145-232, 345-489, 1996.
11. J. J. Doyle and J. L. Doyle, “Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue,” Focus, Vol. 12, No. 1, 1990, pp. 13-15
12. Jinlu Li, Shuo Wang, Jing Yu, Ling Wang, Shiliang Zhou. A Modified CTAB Protocol for Plant DNA Extraction[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2013, 48(1): 72-78.
13. Jobes, D.V., Hurley, D.L. and Thien, L.B. (1995), Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. TAXON, 44: 379-386
14. Kadri K., (2020) Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science. IntechOpen.
15. Kashmiri Prakash Jadhav, Ranjani Raja and Senthil Natesan, “Chemistry of plant genomic dna extraction protocol” BIOINFOLET, 2015.
16. Kautsky, H., Hirsch, A. Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. Naturwissenschaften 19, 964 (1931).

17. Konigsberg, William. "[13] Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol." *Methods in enzymology*. Vol. 25. Academic Press, 1972. 185-188.
18. Koontz, Laura. "Agarose gel electrophoresis." *Methods Enzymol* 529 (2013): 35-45.
19. Krause GW and Weis E 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-249.
20. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (62), e3923.
21. Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreserv Biobank*. 2016
22. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002 Mar 15;30(6):1292-305.
23. Manthos, Ioannis & ROUSKAS, Dimos & Karagiannis, Evangelos & SOTIROPOULOS, Thomas & MOLASIOTIS, Athanasios & Botu, Mihai. (2020). Pomological and phenological characteristics of the main pistachio cultivars in Greece. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 48. 2343-2358. 10.15835/nbha48412097.
24. Maxwell K and Jonhnson GN 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
25. N. Rohani, F. Daneshmand, A. Vaziri, M. Mahmoudi, F. Saber-Mahani, Growth and some physiological characteristics of *Pistacia vera* L. cv Ahmad Aghaei in response to cadmium stress and *Glomus mosseae* symbiosis, *South African Journal of Botany*, V.124, 2019, Pages 499-507,
26. Nadia Aboul-Ftooh Aboul-Maaty and Hanaa Abdel-Sadek Oraby. "Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method" *Bulletin of the National Research Centre*, 2019.
27. Noroozi, Shahram & Baghizadeh, Amin & Jalalijavaran, Mokhtar. (2009). The genetic diversity of Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars revealed by ISSR markers. *Biological Diversity and Conservation*. 2. 50-56.
28. Parfitt, D., Kallsen, C., and Maranto J. (2005). Pistachio cultivars. In *Pistachio Production Manual*, Fourth Edition. Davis, Center for Fruit and Nut Research and Information, pp. 62–66
29. Pontikis, C. A. (1986). 'Pontikis' Pistachio. *HortScience*, 21(4), 1074-1074.
30. Pradeep Reddy, M., Sarla, N. & Siddiq, E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128, 9–17 (2002).
31. Stellwagen NC. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*. 2009 Jun;30 Suppl 1(Suppl 1):S188-95.
32. Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*, Fourth Edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA.

33. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. J Biomed Biotechnol. 2009;2009:574398. doi: 10.1155/2009/574398. Erratum in: J Biomed Biotechnol. 2013;2013:628968. PMID: 20011662; PMCID: PMC2789530.
34. Trumbo, Toni A., Emeric Schultz, Michael G. Borland, and Michael Eugene Pugh. "Applied Spectrophotometry: Analysis of a Biochemical Mixture." Biochemistry and Molecular Biology Education: A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology 41, no. 4 (2013): 242–50.
35. Tsimilli-Michael, Merope. (2019). Revisiting JIP-test: An educative review on concepts, assumptions, approximations, definitions and terminology. Photosynthetica. 57. 90-107. 10.32615/ps.2019.150.
36. Turhan-Serttas, Pelin & Özcan, Tamer. (2018). INTRASPECIFIC VARIATIONS STUDIED BY ISSR AND IRAP MARKERS IN MASTIC TREE (Pistacia lentiscus L.) FROM TURKEY.
37. Varma A., Padh H., Shrivastava N. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. Biotechnol J. 2007 Mar;2(3):386-92. doi: 10.1002/biot.200600195. PMID: 17285676
38. Vinod, K. K. "Total genomic DNA extraction, quality check and quantitation." Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore (2004): 109-121.
39. Watts, Peter, G. Lon 1503775 g, and M. E. Meek. Chloroform. No. 58. World Health Organization, 2004.

5.2. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αϊβαλάκης Γ, Καραμπουρνιώτης Γ και Φασσέας Κ. 2005. Σημειώσεις Γενικής Βοτανικής. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
2. Βασιλακάκης μ. & Ι. Θερσιος, 2006, μαθήματα Ειδικής Δενδροκομίας Εσπεριδοειδή, Εκδ. Γαρταγάνης. Ρούσσος Π., Αν. Καθηγητής Δενδροκομίας ΓΠΑ. Αρχείο ΣΠΕΛ, 1995-2019.
3. Διαμαντίδης Γ., 2017. Εισαγωγή στη Βιοχημεία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
4. Δροσόπουλος, Ι. 1998. Φυσιολογία Φυτών, Μέρος Ι. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
5. Πάνος Αναγνωστόπουλος, «Η φιστικιά στην Ελλάδα», 1935
6. Χατζηνικολάου Άγγελος, Η φιστικιά, Αθήνα 1951
7. Χιτζανίδου Άννα , Μουρίκης Παναγιώτης Α., Χολέβας Κωνσταντίνος Δ., Ασθένειες και εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα, Αθήνα : Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο , 2004

5.3.ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

1. Ελληνική Στατιστική Αρχή ΕΛ.ΣΤΑΤ. - <https://www.statistics.gr/>
2. Υπουργείο Αγροτικής Αναπτυξης και τροφίμων - <https://www.minagric.gr/>
3. Opti-Sciences - <https://www.optisci.com/os30p.html>
4. Sanger Institute - <https://www.sanger.ac.uk/>
5. <https://geneticeducation.co.in/what-is-gradient-pcr-and-how-to-use-it/>