

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΑΠΑΚΡΙΒΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΟΝΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ(SNPs) ΣΕ
ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΕΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

«Πολυμορφισμοί Μονού Νουκλεοτιδίου (SNPs) Σε Ποικιλίες Ελιάς»

«Single Nucleotide Polymorphisms in olive varieties»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος (επιβλέπων):

**Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

2. Κουρέτας Δημήτριος:

**Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

3. Παπαδοπούλου Καλλιόπη:

**Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή κ.Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο για τις συμβουλές του και τη καθοδήγηση που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου απ' το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής για το φιλικό κλίμα συνεργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου που είναι πάντα δίπλα μου και στηρίζει τις επιλογές μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο παρόν πείραμα μελετήθηκε η γενετική παραλλακτικότητα Ελληνικών ποικιλιών ελιάς, με τη χρήση μοριακών δεικτών SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Υγιή φύλλα συλλέχθηκαν από κάθε ποικιλία και ακολούθησε η απομόνωση του DNA σύμφωνα με τη μέθοδο CTAB (Busconi et al., 2003). Στα πλαίσια της μοριακής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών. Ο διαχωρισμός των προϊόντων της Polymerase Chain Reaction (PCR) έγινε σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v παρουσία διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου. Στη συνέχεια ακολούθησε κλωνοποίηση των προϊόντων σε πλασμιδιακό φορέα και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τα συστήματα βιοπληροφορικής Omiga, Blast (NCBI) και τέλος με το ClustalW, όπου και δημιουργήθηκαν τα φυλογενετικά δέντρα. Οι μοριακοί δείκτες πολυμορφισμού που χρησιμοποιήθηκαν, έδωσαν ικανοποιητικό αριθμό πολυμορφικών ζωνών για να καταστεί δυνατός ο γονοτυπικός διαχωρισμός των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, για το κομμάτι του Calcium Binding Protein (Cbp) προέκυψαν αποτελέσματα πολυμορφισμού για έξι ποικιλίες ελιάς στις 476 βάσεις (Αμφίσσης, Καλαμών, Μεγάρων, Χαλκιδικής, Κορωνέϊκη, Χονδρολιά). Για το κομμάτι του Cycloartenol Synthase (Cycl) προέκυψαν αποτελέσματα πολυμορφισμού για πέντε ποικιλίες ελιάς στις 802 βάσεις (Αμφίσσης, Καλαμών, Μεγάρων, Χαλκιδικής, Κορωνέϊκη). Τέλος, για το κομμάτι της Anthocyanidin Synthase (Ant) δεν προέκυψαν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Abstract

In this study, healthy leaves of different varieties of olives were collected in order to study the intra-varietal variability. DNA extraction was performed according to Busconi et al., protocol. Markers SNPs were used for investigating the genetic variability. In the context of molecular analysis were used three different pairs of primers. PCR products were separated in 1% w/v agarose gel and digitally photographed under UV light. PCR products were cloned into plasmid vector and were sent for sequencing. Phylogenetic trees were created from the results of sequencing, using the ClustalW.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

| | |
|--|--|
| 1.1. Γενικά στοιχεία – Ιστορική αναδρομή.....σελ.1 | |
| 1.2. Παραγωγή ελιάς.....σελ. 2 | |
| 1.3. Νομοθεσία.....σελ. 4 | |
| 1.4. Βοτανικά χαρακτηριστικά.....σελ. 6 | |
| 1.5. Ασθένειες και εχθροί της ελιάς.....σελ. 7 | |
| 1.6. Χημική σύσταση ελαιοκάρπου.....σελ. 8 | |
| 1.7. Ευεργετικές δράσεις του ελαιοκάρπου.....σελ. 9 | |
| 1.8. Ποικιλίες.....σελ. 11 | |
| 1.9. Γενετική παραλλακτικότητα στην ελιά και μέθοδοι ταυτοποίησης ποικιλιών ελιάς.....σελ. 21 | |
| 1.10. Μοριακοί δείκτες SNPs.....σελ. 24 | |
| Σκοπός του πειράματος.....σελ. 26 | |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

| | |
|--|--|
| 2.1. Φυτικό υλικό.....σελ. 27 | |
| 2.2. Εξαγωγή DNA από φύλλα ελιάς.....σελ. 27 | |
| 2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....σελ. 28 | |
| 2.4. Ηλεκτροφόρηση.....σελ. 31 | |
| 2.5. Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....σελ. 32 | |
| 2.6. Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη.....σελ. 33 | |
| 2.7. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....σελ. 34 | |
| 2.8. Καθαρισμός του DNA με φαινόλη – χλωροφόρμιο.....σελ. 35 | |
| 2.9. Δημιουργία πλασμιδιακού φορέα με άκρα θυμίνης σε pBluescript.σελ.35 | |
| 2.10. Αντίδραση σύνδεσης DNA μορίων σε φορέα (Ligation).....σελ. 36 | |

| | |
|---|-----------|
| 2.11. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση.....σελ. | 37 |
| 2.12. Μετασχηματισμός – Ηλεκτροδιάτρηση.....σελ. | 38 |
| 2.13. Ανάπτυξη τριβλίων υπό ασηπτικές συνθήκες και διαλογή αποικιών.....σελ. | 39 |
| 2.14. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini Preps).....σελ. | 40 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....σελ. | 42 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....σελ. | 48 |
| Παράρτημα.....σελ. | 50 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ. | 53 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η εμφάνιση της ελιάς χάνεται στα βάθη των αιώνων. Πολλοί ιστορικοί συγγραφείς, θεωρούν σαν πιο πιθανό τόπο προέλευσης της ελιάς την περιοχή της Συρίας και της Μικράς Ασίας. Ενώ κάποιοι άλλοι θεωρούν ότι ο τόπος προέλευσής της είναι η Αφρική (Αβησσυνία, Αίγυπτος). Στη Μεσόγειο η καλλιέργειά της χρονολογείται από το 20 π.Χ. αιώνα, λέγεται δε ότι η ελιά υπήρχε ήδη στη λεκάνη της Μεσογείου, όταν ο πρωτόγονος άνθρωπος άρχισε να ασχολείται με τη γεωργία. Στην Ελλάδα η ελιά καλλιεργείται από τα μυκηναϊκά και μινωικά χρόνια, όπως μαρτυρούν τα ευρήματα ανασκαφών.

Η ελιά αποτελούσε ανέκαθεν σύμβολο ευημερίας, ειρήνης, γονιμότητας και ευφορίας. Για να καταλάβουμε την κοινωνική σημασία της ελιάς πρέπει να θυμηθούμε ότι στην αρχαία Ελλάδα οι νικητές των Ολυμπιακών αγώνων στέφονταν με ένα στεφάνι ελιάς και έπαιρναν σαν δώρο ελαιόλαδο. Η Ελληνική μυθολογία αναφέρει την ελιά ως δώρο της θεάς Αθηνάς όταν έγινε διαγωνισμός ανάμεσα σ' αυτήν και το θεό Ποσειδώνα για το ποιος από τους δυο θα έδινε το όνομα του στην πόλη. Κατά την μυθολογία ο Ποσειδώνας χτύπησε με την τρίαινα τον ιερό βράχο της Ακρόπολης και αμέσως ξεπήδησε ένα κύμα αλμυρού νερού που αργότερα ονομάστηκε "Ερεχθίδα" θάλασσα. Όταν χτύπησε η Αθηνά τον ιερό βράχο με το ραβδί της ξεπετάχτηκε ένα δέντρο ελιάς γεμάτο καρπό, το οποίο θεωρήθηκε ως η υπόσχεση για δόξα και ευημερία της πόλης.

Από την αρχαία Ελλάδα έως και σήμερα η ελιά είναι το ιερότερο δέντρο του τόπου μας και συνδέεται άμεσα με την κουλτούρα και την διατροφή της χώρας μας. Στην Ελλάδα, οι ρίζες του ιερού δέντρου φτάνουν μέχρι την αρχαιότητα. Αποτελώντας σημαντικό μέρος της διατροφής αλλά και της οικονομικής ζωής της Μεσογείου και της Ελλάδας ειδικότερα, αναπόφευκτο ήταν η μακρόχρονη πορεία της ελιάς να έχει διεισδύσει στην καλλιτεχνική ζωή των κατοίκων. Με έμπνευση την αγροτική ζωή στην περιοχή της νότιας Γαλλίας, ο Ολλανδός ζωγράφος Βίνσεντ βαν Γκογκ δημιούργησε πίνακες με θέμα την ελιά. Ο ποιητής Κωστής Παλαμάς ύμνησε την ελιά στο ομώνυμο ποίημά του, ενώ στα δημοτικά τραγούδια συχνά γίνεται αναφορά στο ελαιόδεντρο και τους καρπούς του.

Η ελιά είναι ένα δέντρο με ατελείωτη ιστορία και είναι μεταξύ των παλαιότερων γνωστών καλλιεργούμενων δέντρων στον κόσμο (Liphshitz et al., 1991). Είναι δέντρο αιθαλές και αιωνόβιο και αποτελεί ίσως το πιο χαρακτηριστικό είδος του μεσογειακού τοπίου, καθώς η λεκάνη της Μεσογείου, η οποία έχει το 98% του παγκόσμιου φυτικού δυναμικού και παραγωγής, ήταν και είναι η βασική περιοχή καλλιέργειάς της (Zohary 1995). Οι καλλιεργητικές φροντίδες είναι λίγες και για τον λόγο αυτό επιβιώνει και σε ιδιαίτερα δυσπρόσιτες περιοχές. Υπάρχουν συνολικά γύρω στα 30 είδη. Στη χώρα μας υπάρχει μόνο ένα είδος ελιάς, η Ελιά η ευρωπαϊκή,

που τη βρίσκουμε σε δύο ποικιλίες: την ήμερη (*Olea europaeavar. sativa*) που καλλιεργείται για τους καρπούς της και τη δασική (*Olea europaeavar. oleaster*) που είναι η γνωστή μας Αγριελιά.

Η ελιά ευδοκίμει σε κλίματα εύκρατα χωρίς ακρότητες θερμοκρασίας (με μέση ετήσια θερμοκρασία 16°C) και υγρασίας, γι' αυτό είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη μεσογειακή ζώνη (όπως στην Ελλάδα, στην Ιταλία, στην Ισπανία, στην Τουρκία και αλλού). Ευδοκίμει σε πολλές περιοχές του κόσμου, αρκεί η θερμοκρασία να μη κατέρχεται πολύ και για μεγάλα χρονικά διαστήματα κάτω από το μηδέν. Γι' αυτό και ιδιαίτερα κατάλληλες περιοχές για την καλλιέργειά της είναι οι παραθαλάσσιες. Ο καρπός της ελιάς ωριμάζει στα μέσα προς τέλη του φθινοπώρου, οπότε και ξεκινάει η συγκομιδή. Η ελιά παραδοσιακά μαζεύεται με το χέρι και το μάζεμα της ελιάς αποτελεί εδώ και αιώνες σημαντική αγροτική δραστηριότητα σε πολλές περιοχές της Μεσογείου.

1.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΙΑΣ

Οκαρπός της ελιάς αποτελεί παραδοσιακό προϊόν της διατροφής των Ελλήνων και η καλλιέργειά της έχει μεγάλη οικονομική και όχι μόνο, σημασία για την ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου. Στους πίνακες που ακολουθούν βλέπουμε τη παγκόσμια παραγωγή επιτραπέζιων ελιών και ελαιολάδου από το 2005 μέχρι και το 2012.

Στον Πίνακα 1.1 βλέπουμε τις 9 πρώτες χώρες στη παγκόσμια παραγωγή επιτραπέζιων ελιών. Ενώ στον Πίνακα 1.2. βλέπουμε την παραγωγή για τις επιτραπέζιες ελιές των χωρών που είναι μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Για την περίοδο 2011-2012, η παγκόσμια παραγωγή ήταν 2.565.000 τόννοι: Συγκεκριμένα, οι πρώτες τρεις θέσεις ανήκουν: στην Ισπανία με 482.000 τόννους, στην Ελλάδα με 110.000 τόννους και στην Ιταλία με 60.200 τόννους.

| <u>Πίνακας 1.1</u> Παγκόσμια παραγωγή επιτραπέζιων ελιών (1,000 τόννοι) | | | | | | | |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 2005/6 | 2006/7 | 2007/8 | 2008/9 | 2009/10 | 2010/11 | 2011/12 |
| Αλγερία | 68,5 | 81,0 | 91,0 | 98,0 | 136,0 | 128,0 | 133,0 |
| Αργεντινή | 85,0 | 75,0 | 100,0 | 95,0 | 220,0 | 250,0 | 200,0 |
| Αίγυπτος | 200,0 | 436,0 | 432,0 | 440,0 | 409,0 | 200,0 | 500,0 |
| Ιράν | 24,0 | 39,5 | 39,5 | 30,5 | 47,5 | 24,0 | 45,0 |
| Μαρόκο | 100,0 | 90,0 | 100,0 | 100,0 | 90,0 | 110,0 | 100,0 |
| Συρία | 120,0 | 200,0 | 100,0 | 120,0 | 135,0 | 142,0 | 165,0 |
| Τουρκία | 280,0 | 240,0 | 200,0 | 300,0 | 390,0 | 330,0 | 450,0 |
| Ε.Ε. | 623,5 | 714,5 | 720,5 | 677,0 | 675,0 | 809,0 | 667,5 |
| Περού | 30,0 | 52,0 | 112,0 | 9,0 | 75,0 | 72,5 | 87,0 |
| Άλλες χώρες | 231,0 | 160,5 | 256,5 | 213,0 | 191,5 | 374,5 | 217,5 |
| Σύνολο | 1.762,0 | 2.088,5 | 2.151,5 | 2.082,5 | 2.369,0 | 2.440,0 | 2.565,0 |

Πηγή: ΙΟΟC

| Πίνακας1.2. Παραγωγή επιτραπέζιων ελιών σε χώρες της Ε.Ε. (1,000 τόνοι) | | | | | | | |
|--|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| | 2005/6 | 2006/7 | 2007/8 | 2008/9 | 2009/10 | 2010/11 | 2011/12 |
| Κύπρος | 7,5 | 6,1 | 4,0 | 2,9 | 3,0 | 3,5 | 2,8 |
| Ισπανία | 420,3 | 499,7 | 553,3 | 485,7 | 492,6 | 597,7 | 482,1 |
| Γαλλία | 1,2 | 1,5 | 1,5 | 1,6 | 1,9 | 1,5 | 1,3 |
| Ελλάδα | 125,5 | 108,0 | 95,0 | 105,0 | 107,0 | 135,0 | 110,0 |
| Ιταλία | 61,0 | 80,0 | 55,7 | 68,5 | 58,6 | 60,2 | 60,2 |
| Πορτογαλία | 8,0 | 19,2 | 11,0 | 13,0 | 12,3 | 11,0 | 11,0 |
| Σύνολο | 623,5 | 714,5 | 720,5 | 676,7 | 675,4 | 808,9 | 667,4 |

Πηγή: ΙΟΟC

Στον Πίνακα 1.3 βλέπουμε τις 9 πρώτες χώρες στη παγκόσμια παραγωγή ελαιολάδου. Ενώ στον Πίνακα 1.4 βλέπουμε την παραγωγή για το ελαιόλαδο των χωρών που είναι μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Για την περίοδο 2011-2012, η παγκόσμια παραγωγή ήταν 3.098.000 τόνοι: Συγκεκριμένα, οι πρώτες τρεις θέσεις ανήκουν: στην Ισπανία με 1.347.400 τόννους, στην Ιταλία με 440.000 τόννους και στην Ελλάδα με 310.000 τόννους.

| Πίνακας1.3. Παγκόσμια παραγωγή ελαιολάδου (1,000 τόνοι) | | | | | | | |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 2005/6 | 2006/7 | 2007/8 | 2008/9 | 2009/10 | 2010/11 | 2011/12 |
| Αλγερία | 32,0 | 21,5 | 24,0 | 61,5 | 26,5 | 50,0 | 54,5 |
| Ιορδανία | 22,0 | 37,0 | 21,5 | 18,5 | 17,0 | 21,0 | 22,0 |
| Μαρόκο | 75,0 | 75,0 | 85,0 | 85,0 | 140,0 | 130,0 | 120,0 |
| Συρία | 100,0 | 154,0 | 100,0 | 130,0 | 150,0 | 180,0 | 200,0 |
| Τυνησία | 220,0 | 160,0 | 170,0 | 160,0 | 150,0 | 120,0 | 180,0 |
| Τουρκία | 112,0 | 165,0 | 72,0 | 130,0 | 147,0 | 160,0 | 180,0 |
| Ε.Ε. | 1.928,5 | 2.031,0 | 2.118,5 | 1.939,0 | 2.224,5 | 2.205,0 | 2.180,5 |
| Αυστραλία | 9,0 | 9,0 | 12,0 | 15,0 | 18,0 | 18,0 | 19,0 |
| Χιλή | - | 5,0 | 6,5 | 8,5 | 12,0 | 16,0 | 22,0 |
| Άλλες χώρες | 74,0 | 109,5 | 103,5 | 122,0 | 88,5 | 118,5 | 120,0 |
| Σύνολο | 2.572,5 | 2.767,0 | 2.713,0 | 2.669,5 | 2.973,5 | 3.018,5 | 3.098,0 |

Πηγή: ΙΟΟC

| Πίνακας1.4. Παραγωγή ελαιολάδου σε χώρες της Ε.Ε. (1,000 τόννοι) | | | | | | | |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 2005/6 | 2006/7 | 2007/8 | 2008/9 | 2009/10 | 2010/11 | 2011/12 |
| Κύπρος | 7,2 | 8,3 | 4,0 | 2,8 | 4,2 | 6,5 | 5,6 |
| Ισπανία | 826,9 | 1.111,4 | 1.236,1 | 1.030,0 | 1.401,5 | 1.389,6 | 1.347,4 |
| Γαλλία | 4,4 | 3,3 | 4,7 | 7,0 | 5,7 | 5,6 | 5,2 |
| Ελλάδα | 424,0 | 370,0 | 327,2 | 305,0 | 320,0 | 300,0 | 310,0 |
| Ιταλία | 636,5 | 490,0 | 510,0 | 540,0 | 430,0 | 440,0 | 440,0 |
| Πορτογαλία | 29,1 | 47,5 | 36,3 | 53,4 | 62,5 | 62,9 | 71,8 |
| Σλοβενία | 0,5 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,7 | 0,7 | 0,7 |
| Σύνολο | 1.928,6 | 2.030,8 | 2.118,7 | 1.938,7 | 2.224,6 | 2.205,3 | 2.180,7 |

Πηγή: ΙΟΟC

1.3.ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Η παραγωγή των επιτραπέζιων ελιών και του ελαιολάδου, θεωρούνται από τους σημαντικότερους τομείς της εθνικής οικονομίας. Γι' αυτό, έχει δημιουργηθεί ένας διεθνής οργανισμός, το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, το οποίο είναι υπεύθυνο για την προώθηση, τους εμπορικούς κανονισμούς και διάφορες άλλες διαδικασίες που σχετίζονται με τις επιτραπέζιες ελιές και το ελαιόλαδο.

Για λόγους διασφάλισης της αναγνώρισης των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που έχουν ορισμένα προϊόντα, όπως οι επιτραπέζιες ελιές κάποιων περιοχών, η Ευρωπαϊκή Κοινότητα δημιούργησε το 1992 συστήματα, όπως την ΠΟΠ και την ΠΓΕ (www.minagric.gr). Αυτά τα συστήματα ανάπτυξης και προστασίας ειδών διατροφής έχουν σαν στόχο να βοηθήσουν τον καταναλωτή δίνοντας πληροφορίες σχετικά με τον ιδιάζοντα χαρακτήρα των προϊόντων και να προστατεύσουν τα ονόματα προϊόντων από παράνομη χρήση και απομιμήσεις.

- ΠΟΠ – Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης: το όνομα μιας περιοχής, το οποίο χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος ή ενός τροφίμου που κατάγεται από τη συγκεκριμένη περιοχή, του οποίου η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά οφείλονται αποκλειστικά στο ιδιαίτερο γεωγραφικό περιβάλλον που περιλαμβάνει τους εγγενείς φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες, του οποίου η παραγωγή, η μεταποίηση και η επεξεργασία πραγματοποιούνται στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή.
- ΠΓΕ – Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη: το όνομα μιας περιοχής, το οποίο χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος ή ενός

τροφίμου που κατάγεται από την εν λόγω περιοχή, του οποίου η συγκεκριμένη ποιότητα, η φήμη ή άλλα χαρακτηριστικά μπορούν να αποδοθούν στην εν λόγω γεωγραφική καταγωγή, του οποίου η παραγωγή ή /και η μεταποίηση ή/και η επεξεργασία πραγματοποιούνται στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή.

Επίσημα, έχουν αναγνωρισθεί και κατοχυρωθεί επιτραπέζιες ελιές και ελαιόλαδα κάποιων περιοχών της Ελλάδας, με αυτές τις ενδείξεις. Στους πίνακες 1.5. και 1.6. δίνονται όλες οι Ελληνικές ελιές και τα Ελληνικά ελαιόλαδα των ΠΟΠ και ΠΓΕ (ec.europa.eu).

| Πίνακας 1.5.ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ | | | | | |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|----|--|-----------------------|
| | Προϊόν/Όνομασία | Κατηγορία αναγνώρισης | | Προϊόν/Όνομασία | Κατηγορία αναγνώρισης |
| 1 | Βιάννος Ηρακλείου Κρήτης | ΠΟΠ | 15 | Ρόδος | ΠΓΕ |
| 2 | Λυγουριό Ασκληπείου | ΠΟΠ | 16 | Θάσος | ΠΓΕ |
| 3 | Βόρειος Μυλοπόταμος Ρεθύμνης Κρήτης | ΠΟΠ | 17 | Καλαμάτα | ΠΟΠ |
| 4 | Κροκεές Λακωνίας | ΠΟΠ | 18 | Κολυμβάρι Χανίων Κρήτης | ΠΟΠ |
| 5 | Πέτρινα Λακωνίας | ΠΟΠ | 19 | Σητεία Λασιθίου Κρήτης | ΠΟΠ |
| 6 | Κρανίδι Αργολίδας | ΠΟΠ | 20 | Αποκορώνας Χανίων Κρήτης | ΠΟΠ |
| 7 | Πεζά Ηρακλείου Κρήτης | ΠΟΠ | 21 | Σάμος | ΠΓΕ |
| 8 | Αρχάνες Ηρακλείου Κρήτης | ΠΟΠ | 22 | Ζάκυνθος | ΠΓΕ |
| 9 | Λακωνία | ΠΓΕ | 23 | Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο Θραγανό | ΠΟΠ |
| 10 | Χανιά Κρήτης | ΠΓΕ | 24 | Φοινίκι Λακωνίας | ΠΟΠ |
| 11 | Κεφαλονιά | ΠΓΕ | 25 | Άγιος Μαθαίος Κέρκυρας | ΠΓΕ |
| 12 | Ολυμπία | ΠΓΕ | 26 | Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο Τροιζηνία | ΠΟΠ |
| 13 | Λέσβος ή Μυτιλήνη | ΠΓΕ | 27 | Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο Σέλινο Κρήτης | ΠΟΠ |
| 14 | Πρέβεζα | ΠΓΕ | | | |

| Πίνακας 1.6.ΕΛΙΕΣ | | |
|--------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| | Προϊόν/Όνομασία | Κατηγορία αναγνώρισης |
| 1 | Ελιά Καλαμάτας | ΠΟΠ |
| 2 | Κονσερβολιά Αμφίσσης | ΠΟΠ |
| 3 | Κονσερβολιά Άρτας | ΠΓΕ |
| 4 | Κονσερβολιά Αταλάντης | ΠΟΠ |
| 5 | Κονσερβολιά Ροβίων | ΠΟΠ |
| 6 | Κονσερβολιά Στυλίδας | ΠΟΠ |
| 7 | Θρούμπα Θάσου | ΠΟΠ |
| 8 | Θρούμπα Χίου | ΠΟΠ |
| 9 | Θρούμπα Αμπαδιάς Ρεθύμνης Κρήτης | ΠΟΠ |
| 10 | Κονσερβολιά Πηλίου Βόλου | ΠΟΠ |
| 11 | Πράσινες ελιές Χαλκιδικής | ΠΟΠ |

1.4.ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η ελιά ανήκει στην οικογένεια *Oleaceae* και το βοτανικό της όνομα είναι *Olea sativa euromediterranea*. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει 30 γένη (Bartolucci et al., 1999). Η οικογένεια διαθέτει διπλοειδείς ποικιλίες με $2x=46$ χρωμοσώματα. Αντιπροσωπευτικά γένη για την Ελλάδα είναι τα εξής: *Olea* (Ελιά), *Phillyrea* (Φιλόρα), *Syringa* (Πασχαλιά), *Ligustrum* (Λιγούστρο), *Forsythia* (Φορσύθια) και *Jasminium* (Γιασεμί) (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999). Το είδος που έχει οικονομικό ενδιαφέρον είναι το *Olea europaea*, που παρουσιάζει δύο παραλλαγές, την καλλιεργούμενη ποικιλία *Olea europaea sativa* και στην άγρια ποικιλία *Olea europaea oleaster*. Η καλλιεργούμενη και η άγρια ποικιλία δεν είναι δυνατό να διαχωρίζονται πάντα με βάση αυστηρά βοτανικά κριτήρια και γι' αυτό η διάκρισή τους στηρίζεται απλά στο γεγονός ότι το ένα καλλιεργείται και το άλλο όχι (Mataix et al., 2006).

Το δέντρο της ελιάς είναι φυτό υποτροπικό, αειθαλές, ανεμόφιλο, το ύψος του μπορεί να φθάσει στα 15-20m και ο χρόνος ζωής του κυμαίνεται από μερικές δεκάδες έως εκατοντάδες έτη. Αυτή η μακροζωία μπορεί να αποδοθεί στην ανθεκτικότητα που εμφανίζει το ξύλο σε προσβολές από εχθρούς και ασθένειες, καθώς και την ικανότητα ανάπτυξης νέας βλάστησης από το ριζικό σύστημα και τον λαιμό.

Ο όγκος του ριζικού συστήματος βρίσκεται σε βάθος μεταξύ 20-70 εκ. Λίγες είναι οι ρίζες που προχωρούν σε βάθος 1-1,20 μέτρα και κυρίως στα ξερά και πετρώδη εδάφη, που οι ρίζες εισχωρούν πέραν του ενός μέτρου, για ανεύρεση υγρασίας και θρεπτικών στοιχείων, γεγονός που βοηθά την ελιά να είναι ανθεκτική στην ξηρασία.

Ο κορμός είναι κυλινδρικός και ανώμαλος. Στα ηλικιωμένα δέντρα χοντραίνει πολύ, ανάλογα με την ποικιλία, το έδαφος κτλ. Έχει πάντοτε ρόζους με πολλά τυφλά μάτια από τα οποία βγαίνουν νέα βλαστάρια. Ο φλοιός στα νεαρά δέντρα είναι ομαλός και λείος με χρώμα σταχτοπράσινο, ενώ όσο μεγαλώνει το δέντρο ο φλοιός ζαρώνει, σχίζεται προς τα έξω και το χρώμα γίνεται σκούρο σταχτί ως μαύρο.

Ανάλογα με την ποικιλία, τα κλωνάρια έχουν κατεύθυνση όρθια (ορθόκλαδα δέντρα), άλλα πλάγια (πλαγιόκλαδα) και άλλα επικλινή (κρεμόκλαδα δέντρα). Έχει φύλλα ελλειπμοειδή ως αντίστροφα ωοειδή, με υφή δερματώδη, με σκούρα άνω και γκριζα κάτω επιφάνεια, με μήκος ως τέσσερα εκατοστά (Σίρκου 2009). Ανθίζει από τον Απρίλιο ως τον Ιούνιο.

Τα άνθη είναι μικρά, κιτρινόλευκα και διατάσσονται σε πλευρικές ομάδες. Η ύπαρξη ατελών ανθέων οφείλεται σε διάφορα αίτια, ένα από τα οποία είναι και η έλλειψη επαρκούς φυλλώματος. Όσο λιγότερα φύλλα έχει μια ελιά τόσο περισσότερα ατελή (ελαττωματικά) άνθη παρατηρούνται. Μπορεί η ανθοφορία να είναι μεγάλη αλλά λίγα άνθη δίνουν καρπό. Επομένως, φροντίδα κάθε καλλιεργητή θα πρέπει να είναι η αύξηση, όσο το δυνατό, του αριθμού των φύλλων, ανάλογα με τη γονιμότητα του εδάφους και τα διαθέσιμα θρεπτικά στοιχεία και να λαμβάνονται μέτρα ώστε να προστατεύεται το φύλλωμα από αρρώστιες.

Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη, ωοειδής ή σφαιρικός, αρχικά πράσινος, αργότερα μαύρος, με σχετικά μικρές διαστάσεις (μέχρι 1,5 εκατοστά), λιγότερο σαρκώδης και φτωχός σε λάδι (Αθανασιάδης 1986). Αποτελείται από τη φλούδα, τη σάρκα και από τον πυρήνα. Γενικά είναι είδος φωτόφυτο, ευαίσθητο στους παγετούς, αλλά ανθεκτικό στην ξηρασία και την ατμοσφαιρική ρύπανση. Είναι ένα από τα κυρίαρχα φυτά των μεσογειακών θαμνώνων και ιδιαίτερα διαδεδομένο στις παράκτιες περιοχές της Ελλάδας.

1.5.ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΕΧΘΡΟΙ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Η ελιά είναι ευπαθές δέντρο σε μύκητες, βακτήρια και έντομα. Οι κυριότερες ασθένειες της ελιάς είναι οι εξής:

1) Κυκλοκόνιο

Κύριο σύμπτωμα της ασθένειας είναι ο σχηματισμός στρογγυλών κηλίδων με χρώμα σταχτί-καστανό στο κέντρο που περιβάλλονται από καστανόμαυρες ζώνες. Ο μύκητας εμφανίζεται κυρίως στην πάνω επιφάνεια των φυτών. Όταν η προσβολή γίνεται σοβαρή, τα φύλλα κιτρινίζουν και πέφτουν.

2) Καρκίνωση ή φυματίωση

Βακτήριο είναι το αίτιο της ασθένειας που προκαλεί καρκινώματα (όγκους) σε νεαρούς βλαστούς και κλάδους.

3) Βερτισιλλίωση

Πρόκειται για μύκητα εδάφους με πολύ μεγάλο κύκλο ξενιστών, ο οποίος μολύνει τα δένδρα από τις λεπτές ρίζες και προκαλεί απόφραξη των αγγείων του ξύλου. Η ασθένεια ξεκινά με τον μεταχρωματισμό των φυτών και γίνεται τελικώς φανερή είτε με τη μορφή μεμονωμένων ξερών κλάδων στα μεγαλύτερης ηλικίας δένδρα (ημιπληγία) είτε με την πλήρη ξήρανση των νεαρών δένδρων (αποπληξία).

Όμως, οι προσβολές της ελιάς από έντομα είναι αυτές που προκαλούν τη μεγαλύτερη ζημιά.

4) *Bactrocera oleae*

Ο δάκος της ελιάς, που εντοπίστηκε για πρώτη φορά στη Καλιφόρνια το 1998, είναι ένα πολύ επιζήμιο παράσιτο του καρπού της ελιάς στις περισσότερες ελαιοκομικές χώρες. Αποτελεί το πιο βλαβερό έντομο για το ελαιόδεντρο. Σε περίπτωση έντονης προσβολής, η παραγωγή υποβαθμίζεται ποιοτικά και ποσοτικά (Fooks 1998).

5) *Prays oleae*

Ο πυρηνοτρήτης είναι ένα έντομο ευρέως διαδεδομένο στην περιοχή της Μεσογείου και σε άλλες ελαιοκομικές χώρες, που προκαλεί σοβαρές ζημιές, αν και λιγότερο επιβλαβείς από αυτές που προκαλεί ο δάκος.

6) *Parlatoria oleae*

Η παρλατόρια ελιάς είναι ευρέως διαδεδομένη στις μεσογειακές χώρες, τη Κίνα, τη Μέση Ανατολή, την Ινδία, τη Τουρκία και τις Η.Π.Α. Είναι ένα σοβαρό παράσιτο και απαιτεί συστηματική θεραπεία φυτοφαρμάκων κάθε χρόνο για να μειωθούν οι οικονομικές απώλειες (Therios 2009).

1.6.ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ

Η χημική σύσταση των καρπών της ελιάς δεν μπορεί να δοθεί με ακρίβεια διότι ποικίλλει σημαντικά από ποικιλία σε ποικιλία. Η χημική σύσταση εξαρτάται επίσης από το στάδιο ανάπτυξης και το βαθμό ωριμότητας του ελαιοκάρπου. Ο καρπός της ελιάς χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, η οποία αυξάνεται καθώς προχωρά η ωρίμανση. Συνεπώς, οι ώριμες ελιές περιέχουν περισσότερα λιπαρά από τις πράσινες ελιές. Η συγκέντρωση των σακχάρων στις ελιές, μειώνεται καθώς προχωρά η ωρίμανση. Στις επεξεργασίες των επιτραπέζιων ελιών είναι πολύ σημαντική η μείωση των σακχάρων κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, γιατί τα σάκχαρα αποτελούν την κύρια πηγή άνθρακα για τη μικροβιακή ανάπτυξη. Οι νωπές ελιές έχουν χαρακτηριστική συγκέντρωση σε διαιτητικές ίνες (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη), οι οποίες κυμαίνονται από 0,3 έως 0,6%. Χαμηλή είναι η συγκέντρωση των ιχνοστοιχείων, με το κάλιο να είναι το αφθονότερο. Επίσης, ο καρπός της ελιάς περιέχει ένα σημαντικό ποσοστό φαινολικών ενώσεων που κυμαίνονται από 3 έως 6% επί ξηράς ουσίας.

Στην παρουσία της χλωροφύλλης οφείλεται το αρχικό πράσινο χρώμα του καρπού ενώ το ρόδινο έως πορφυρό χρώμα που έχουν οι ώριμες ελιές οφείλεται στο σχηματισμό των ανθοκυανών. Τέλος, οι ελιές περιέχουν μια πικρή ουσία, την ελευρωπαΐνη, η οποία τις κάνει ακατάλληλες προς κατανάλωση, αν δεν προηγηθεί κάποια επεξεργασία. Η συγκέντρωση αυτής της ένωσης μειώνεται με το χρόνο ωρίμανσης (Μπαλατσούρας 1995). Συγκεκριμένα, οι πλήρως ώριμες ελιές από ορισμένες ποικιλίες παρουσιάζουν χαμηλή συγκέντρωση ελευρωπαΐνης και μπορούν

να καταναλωθούν άμεσα. Τα συστατικά του ελαιοκάρπου φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (1.7.).

| | Υγρασία | Λίπη | Σάκχαρα | Πρωτεΐνες | Φυτικές ίνες | Τέφρα |
|-------|----------------|-------------|----------------|------------------|---------------------|--------------|
| Εύρος | 65 - 75 | 12 - 30 | 3 - 6 | 1 - 2 | 2 - 5 | 1 - 1,5 |

Πίνακας 1.7.: Σύνθεση (%w/w) των σημαντικότερων συστατικών της σάρκας του νωπού ελαιοκάρπου.

1.7.ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ

Το ελαιόλαδο είναι ένα βασικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι μπορεί να έχει μεγάλα οφέλη για την υγεία, όπως η μείωση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου, την πρόληψη ορισμένων μορφών καρκίνου κ.ά. Το παρθένο ελαιόλαδο φαίνεται να είναι ένα λειτουργικό τρόφιμο με διάφορα συστατικά όπως πολυφαινολικές ενώσεις και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία μπορεί να έχουν θρεπτικά οφέλη. Είναι γνωστό ότι η αυξημένη κατανάλωση μονοακόρεστων λιπαρών οξέων αντί των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, μειώνει τον κίνδυνο της αθηροσκλήρωσης (Nakbi et al., 2010).

Κάποιες από τις ευεργετικές δράσεις που έχει το ελαιόλαδο είναι ότι βοηθάει στην απορρόφηση των βιταμινών, επιβραδύνει τη γήρανση, συμβάλλει στον έλεγχο της χοληστερίνης, βοηθά στα πεπτικά έλκη, διευκολύνει τη λειτουργία του συκωτιού και πολλές άλλες.

Όλα τα παραπάνω οφείλονται στην ποικιλία των συστατικών του, όπως:

- φαινόλες, οι οποίες αυξάνουν την αντίσταση στην οξείδωση,
- στερόλες, οι οποίες εμποδίζουν την απορρόφηση της χοληστερόλης από το έντερο,
- καροτένια, τα οποία βοηθούν την ανάπτυξη του κυττάρου και την αιμοποίηση και επιταχύνουν την διαδικασία της επούλωσης,
- τερπενικές αλκοόλες, οι οποίες βοηθούν την αποβολή της χοληστερόλης,
- τοκοφερόλες, οι οποίες εμποδίζουν την αυτοοξείδωση, και
- β-καροτίνη, η οποία είναι αντιοξειδωτική και απαραίτητη για την όραση.

Το ελαιόλαδο είναι ο χυμός που παίρνουμε από τον καρπό της ελιάς. Το ελαιόλαδο διακρίνεται σε βρώσιμο και μη βρώσιμο και ταξινομείται σε διάφορες κατηγορίες βάσει της επεξεργασίας που έχει υποστεί και της οξύτητας που διαθέτει. Οι κατηγορίες του ελαιόλαδου σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιόλαδου είναι οι εξής (Σ.Ε.ΒΙ.Τ.ΕΛ., Fooks 1998, IOOC):

- 1) *Παρθένο ελαιόλαδο*: Είναι το λάδι που παραλαμβάνεται από τον καρπό της ελιάς με μηχανικά ή φυσικά μέσα και κατά την παραλαβή του δεν

προκαλούνται αλλοιώσεις στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του. Το ελαιόλαδο αυτής της κατηγορίας δεν έχει υποβληθεί σε καμία επεξεργασία, εκτός από πιθανή μετάγγιση, φυγοκέντριση και διήθηση.

- 2) *Παρθένο ελαιόλαδο κατάλληλο για κατανάλωση*: Το ελαιόλαδο αυτό περιλαμβάνει τους παρακάτω τύπους.
 - Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο – Είναι παρθένο ελαιόλαδο με άμεμπτη γεύση και οσμή και με μέγιστη οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, 1g/100gλαδιού.
 - Εκλεκτό ή φίνο παρθένο ελαιόλαδο – Είναι παρθένο ελαιόλαδο με άμεμπτη γεύση και οσμή και με μέγιστη οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, 1,5g/100g λαδιού.
 - Κουράντε ή ημίφινο ή κανονικό παρθένο ελαιόλαδο – Είναι παρθένο ελαιόλαδο με καλή γεύση και οσμή και με οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, 3g/100gλαδιού (μέχρι και 3,3g/100g λαδιού).
- 3) *Παρθένο ελαιόλαδο ακατάλληλο για κατανάλωση*: Ονομάζεται ελαιόλαδο λαμπάντε. Έχει κακή γεύση και οσμή και η οξύτητά του, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, είναι μεγαλύτερη από 3,3g/100g λαδιού. Το ελαιόλαδο αυτό προορίζεται για ραφινάρισμα ή για βιομηχανική χρήση.
- 4) *Ραφιναρισμένο ελαιόλαδο*: Είναι το ελαιόλαδο το οποίο παραλαμβάνεται από παρθένο ελαιόλαδο με ραφινάρισμα, το οποίο όμως δεν προκαλεί αλλαγές στην αρχική δομή των γλυκεριδίων. Η οξύτητά του δεν υπερβαίνει τα 0,3g/100g λαδιού.
- 5) *Γνήσιο ή αγνό ή κουπέ ελαιόλαδο*: Είναι μείγμα από παρθένο ελαιόλαδο κατάλληλο για κατανάλωση και ραφιναρισμένου ελαιολάδου. Συνήθως χρησιμοποιούνται προσμίξεις σε διάφορες αναλογίες, οι οποίες δίνουν διάφορους τύπους. Τα μείγματα αυτά πρέπει να έχουν τα χαρακτηριστικά ποιότητας τα οποία έχουν καθοριστεί για το γνήσιο ελαιόλαδο.
- 6) *Ακατέργαστο πυρηνέλαιο*: Είναι το έλαιο που λαμβάνεται από τους πυρήνες της ελιάς, κατόπιν επεξεργασίας με διαλύτες.
- 7) *Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο*: Είναι το έλαιο που λαμβάνεται με εξευγενισμό ακατέργαστου πυρηνελαίου. Η οξύτητά του δεν υπερβαίνει τα 0,5g/100gλαδιού. Τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.
- 8) *Πυρηνέλαιο*: Είναι μείγμα εξευγενισμένου πυρηνελαίου και παρθένων ελαιολάδων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπάντε. Η οξύτητά του δεν υπερβαίνει τα 1,5g/100g λαδιού.

1.8.ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ

Η ελιά καλλιεργείται από τους αρχαίους χρόνους για τα πολύτιμα προϊόντα της, το ελαιόλαδο και τις βρώσιμες ελιές, που αποτελούν βασικά είδη διατροφής του ανθρώπου. Η τελευταία προσπάθεια εντόπισης και ταξινόμησης των ποικιλιών ανήκει στην FAO (1998) η οποία εντόπισε 538 ποικιλίες ελιών ελαιοπαραγωγής και επιτραπέζιων με 1300 συνώνυμα.

Η διάκριση και η ταξινόμησή τους στηρίζεται στην περιγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών του δένδρου, όπως το μέγεθος και η μορφή του, στην περιγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών του πυρήνα και του καρπού και στην περιγραφή των φύλλων και των ανθέων (Γρηγοριάδου 2003). Επίσης στηρίζεται στην ευαισθησία και την προσαρμοστικότητα της κάθε ποικιλίας στις εδαφοκλιματικές συνθήκες, την αντοχή της σε εχθρούς και ασθένειες, καθώς και την περιεκτικότητα των καρπών σε λάδι και το χρόνο ωρίμανσης τους (Mulas 1999). Τέλος, κριτήριο αποτελεί και ο προορισμός χρήσης του καρπού τους. Έτσι, πέρα από το κλασικό διαχωρισμό των καλλιεργούμενων ποικιλιών, ανάλογα με το βάρος του καρπού, σε μικρόκαρπες (1,2 – 2,6 γραμμάρια), μεσόκαρπες (2,7 – 4,2 γραμμάρια) και μεγαλόκαρπες (4,3 – 10,5 γραμμάρια) έχουμε και το διαχωρισμό ανάλογα με τη χρήση του καρπού της.

Με βάση τον προορισμό χρήσης του καρπού οι ποικιλίες ελιάς χωρίζονται στις εξής τρεις ομάδες (Fooks 1998): 1) Επιτραπέζιες ποικιλίες (βρώσιμες ελιές) 2) Ελαιοπαραγωγικές ποικιλίες (ελαιοποιήσιμες ελιές) 3) Μεικτές ποικιλίες όπου ο καρπός τους είναι κατάλληλος και ως επιτραπέζιος αλλά και για παραγωγή λαδιού (πίνακας 1.8.).

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης όλοι οι καρποί των ελιών αλλάζουν χρώμα από πράσινο σε βιολετί και τέλος σε μαύρο. Εξαίρεση αποτελεί η Λευκόκαρπη ποικιλία, που κάνει ελιές λευκές, αντί μαύρες και η Ασπρολιά της Λευκάδας, που οι καρποί της είναι στην αρχή λευκοί και έπειτα μαυρίζουν. Τα γευστικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου εξαρτώνται κυρίως από ποιο στάδιο ωρίμανσης συλλέγεται η ελιά βάση του χρώματος της. Ελαιόλαδο προερχόμενο από πράσινες και βιολετί ελιές περιλαμβάνει μεγάλη ποσότητα αρωματικών συστατικών έχοντας έντονη φρουτώδη γεύση. Όπως οι ποικιλίες Κορωνέικη και Αθηνολιά. Αντιθέτως, όσο ωριμάζει ο καρπός της ελιάς, η ποσότητα των αρωματικών συστατικών μειώνεται. Ελαιόλαδο που προέρχεται από βιολετί και μαύρες ελιές έχει απαλότερη γεύση και πιο απαλό άρωμα. Όπως οι ποικιλίες Λαδολιά και Μανάκι.

| Πίνακας 1.8. Οι σπουδαιότερες ελληνικές ποικιλίες ελιάς: | | | | |
|---|-------------------|-----------------------|---|--|
| | Ποικιλία | Μέγεθος καρπού | Άλλες ονομασίες | Κύριες περιοχές καλλιέργειας |
| <u>Επιτραπέζιες ποικιλίες</u> | | | | |
| 1 | Στρογγυλολιά | μεγάλο | Γαλανή, Πρασινολιά, Χοντρολιά, Μηλολιά | Χαλκιδική |
| 2 | Κονσερβολιά | μεγάλο | Αμφίσσης, Άρτας, Βόλου, Πηλίου, Πατρινή | Αγρίνιο, Αμφισσα, Άρτα, Πήλιο, Πάτρα |
| 3 | Καλαμών | μεγάλο | Καλαματιανή, Αετονύχι, Κορακολιά, Τσιγκέλι | Μεσσηνία, Λακωνία, Αιτωλοακαρνανία |
| 4 | Χαλκιδικής | μεγάλο | Γαϊδουρολιά, Καρυδολιά | Χαλκιδική |
| 5 | Αδρόκαρπη | μεγάλο | Κορομηλολιά, Δαμασκηνάτη | σε όλη την Ελλάδα |
| 6 | Κολυμπάδα | μεγάλο | Καρυδολιά, Μυλολιά, Στρομπουλολιά | Αττική, Φωκίδα, Κυκλάδες, Μεσσηνία, Εύβοια |
| 7 | Καρολιά | μεγάλο | Στραβολιά, Καρούλα | Μυτιλήνη, Κέρκυρα, Ζάκυνθο |
| 8 | Βασιλικάδα | μεγάλο | Βασιλική, Ισπανική, Κολοκυθάτη, Ροβιάτικη | Κέρκυρα, Χαλκιδική, Ροβιές Ευβοίας |
| <u>Ελαιοπαραγωγικές ποικιλίες</u> | | | | |
| 9 | Κορωνέικη | μικρό | Λαδολιά, Κρητικιά, Ψιλολιά, Βάτσικη, Λιανολιά | Πελοπόννησος, Κρήτη, Ιόνια νησιά |
| 10 | Τσουνάτη | μικρό | Αθηνολιά, Μαστοειδής, Ματσολιά, Μουρατολιά | Πελοπόννησος, Κρήτη |
| 11 | Λιανολιά Κέρκυρας | μικρό | Κορφολιά, Μερολιά, Πρεβεζάνα, Στριφτολιά, Σουβλολιά | Κέρκυρα, Κεφαλονιά, Ζάκυνθος, Πρέβεζα |
| 12 | Κουτσουρελιά | μικρό | Πατρινή, Λιανολιά | Κορινθία, Αργολίδα, Αιτωλοακαρνανία |
| 13 | Αδραμυτινή | μέσο | Αϊβαλιώτικη, Φραγκολιά, Μυτιληνιά | Μυτιλήνη, Χίος |
| 14 | Αγουρομανακολιά | μέσο | Αγουρομάνακο, Αγουρομανάκι | Αργολίδα, Κορινθία, Αρκαδία |
| 15 | Βαλανολιά | μέσο | Κολοβή, Μυτιληνιά, Βαλάνα | Λέσβος, Χίος, Μυτιλήνη, Σκύρο |
| 16 | Μυρτολιά | μικρό | Σμερτολιά, Μουρτολιά | Λακωνία |
| 17 | Μεγαρίτικη | μέσο | Περαχωρίτικη, Βοβώδικη | Αττική, Βοιωτία, Κορινθία |
| <u>Μεικτές ποικιλίες</u> | | | | |
| 18 | Θρουμπολιά | μέσο | Ασκούδα, Θασίτικη, Θρούμπα | Σάμος, Θάσος, Αττική, Εύβοια, Κρήτη |
| 19 | Κοθρέικη | μεγάλο | Γλυκομανάκι, Κορινθιακή, Μανάκι, Γλυκομανακολιά | Αργολίδα, Κορινθία, Αρκαδία, Φωκίδα, Φθιώτιδα, Κρήτη |
| 20 | Ματολιά | μέσο | Ρουσολιά, Νυχάκι, Χοντρολιά, Νταμουρελιά | Ηλεία |
| 21 | Αμυγδαλολιά | μεγάλο | Στραβομούτα, Κουρομούτα, Ισπανική | Αττική, Αμφισσα |

1.Αμφίσσης (*Olea europaea* var. *Rotunda*)

Είναι η πιο μεγαλόκαρπη ποικιλία ελιάς. Καλλιεργείται συνήθως κάτω από ξηρικές συνθήκες σε μεγάλες εκτάσεις στην περιοχή Πηλίου – Βόλου και γύρω από την πόλη της Αμφισσας από όπου πήρε και το όνομα. Είναι γνωστή και με τα ονόματα Κονσερβολιά, Πηλίου, Βόλου, Άρτας, Πατρινή κ.ά. Τα δέντρα αυτής της ποικιλίας απαιτούν ιδιαίτερες καλλιεργητικές φροντίδες αλλά γίνονται αρκετά μεγάλα και μπορούν να φτάσουν και τα 10 μέτρα ύψος (www.elia-diktyo.gr). Ο καρπός είναι μεγάλος (5,5 – 8 γραμμάρια), σφαιρικός ή ωοειδής, με κουκούτσι μεγάλο υποστρόγγυλο. Το χρώμα από ζωνρό πράσινο μετατρέπεται σε κοκκινωπό και στην πλήρη ωρίμανση κυανόμαυρο (Εικόνα 2.1.). Η σάρκα είναι κάπως σκληρή στα ξηρότερα εδάφη και μαλακότερη στα γόνιμα – υγρά εδάφη. Η περιεκτικότητα σε λάδι

είναι περίπου 16%, ανάλογα με την περιοχή και τις επικρατούσες συνθήκες. Λόγω του γεγονότος ότι η συγκεκριμένη ποικιλία δίνει σχετικά χαμηλότερης ποιότητας ελαιόλαδο συγκριτικά με άλλες ποικιλίες, χρησιμοποιείται κυρίως σαν ελιά ή πατέ (www.karpea.gr).

Η ποικιλία Αμφίσσης είναι αρκετά παραγωγική. Σε γόνιμα αρδευόμενα εδάφη με καλή αποστράγγιση, ξεπερνά τα 100 κιλά καρπού ανά δέντρο ηλικίας 12 χρόνων και πάνω. Ευδοκίμει μέχρι τα 600 μέτρα υψόμετρο. Επομένως καλλιεργείται τόσο στα πεδινά όσο και στα ορεινά. Βελτιωμένη όμως ποιότητα καρπού, που υπερέρχει σε χρώμα, άρωμα και γεύση, εξασφαλίζεται μόνο από τα δέντρα που καλλιεργούνται στις ημιορεινές περιοχές (500-600 μέτρα). Η ωρίμανση αρχίζει από τα μέσα Νοεμβρίου και παρατείνεται μέχρι το Φεβρουάριο. Δίνει πράσινες, ξανθές και μαύρες επιτραπέζιες ελιές άριστης ποιότητας, ιδιαίτερα κατάλληλες για κανσερβοποίηση.



Εικόνα 2.1.

2. Καλαμών (*Olea europaea* var. *Ceraticarpa*)

Ανήκει στις μαγαλόκαρπες επιτραπέζιες ελληνικές ποικιλίες ελιάς και καλλιεργείται σε μεγάλη έκταση γύρω από την πόλη της Καλαμάτας (από όπου πήρε και το όνομά της) και σε μικρότερη έκταση σε άλλες περιοχές της Ελλάδας. Είναι γνωστή και με τα ονόματα Αετονυχολιά, Καλαματιανή, Κορακολιά, Τσιγκέλι κ.ά. Οι ιδιαιτερότητές του είναι πρώτον ότι τα φύλλα του είναι τα μεγαλύτερα από όλες τις ελληνικές ποικιλίες ελιών και δεύτερον ότι το κουκούτσι «χωρίζει» από τη σάρκα εξαιρετικά εύκολα (www.elia-diktyo.gr). Το δέντρο αναπτύσσει ζωνή βλάστηση και έχει μέτριο ύψος. Τα φύλλα είναι πολύ πλατιά, σκληρά με κυματοειδή και αναδιπλωμένα άκρα, με την πάνω επιφάνεια βαθυπράσινη και την κάτω σταχτοπράσινη. Ο καρπός είναι μέτριος ως μεγάλος, βάρους 5-6 γραμμαρίων, με εξαιρετική ποιότητα για βρώσιμος. Η σάρκα είναι σκληρή και το κουκούτσι μεγάλο, μακρουλό σαν τον καρπό. Η καλύτερη εποχή για τη συγκομιδή της ποικιλίας αυτής είναι Δεκέμβριος – Ιανουάριος. Η συγκομιδή γίνεται μόνο όταν το χρώμα του καρπού έχει γίνει εντελώς μαύρο (Εικόνα 2.2.).

Η περιεκτικότητά της σε λάδι είναι 17-19% και είναι άριστης ποιότητας (www.Agro-Help.com). Γενικά είναι ανθεκτική και παραγωγική ποικιλία. Στις χρονιές της μεγάλης παραγωγής χρειάζεται άρδευση μέχρι την έναρξη της ωρίμανσης του καρπού

για να μεγαλώσει ικανοποιητικά ο καρπός και να μη ζαρώσει. Για την αποφυγή της υπερπαραγωγής και του μικρού μεγέθους του καρπού, συστήνεται αυστηρό κλάδεμα τη χρονιά που προβλέπεται μεγάλη παραγωγή. Καλλιεργείται τόσο στα πεδινά όσο και στα ημιορεινά μέχρι 600 μέτρα, αλλά καλύτερη ποιότητα καρπού εξασφαλίζεται από ελαιόδεντρα των ημιορεινών περιοχών. Η ποικιλία αυτή είναι και παγκοσμίως η πιο γνωστή επιτραπέζια ελιά.



Εικόνα 2.2.

3. Κορωνέικη (*Olea europaea* var. *Mastoides*)

Είναι η πιο γνωστή ποικιλία ελιάς στην Ελλάδα αφού της αντιστοιχεί το 60% της ελληνικής παραγωγής. Είναι ποικιλία παγκόσμιας διάδοσης. Στην Ελλάδα καλλιεργείται εκτεταμένα σε όλη την Πελοπόννησο, στη Κρήτη και στα Ιόνια νησιά. Είναι γνωστή και με τα ονόματα Λιανολιά, Ψιλολιά, Λαδολιά, Βάτσικη κ.ά. Είναι ποικιλία μικρόκαρπη, κατάλληλη για την παραγωγή λαδιού εξαιρετικής ποιότητας και χαμηλής οξύτητας (0,2-0,4 βαθμούς). Οι καρποί της φέρονται σε τσαμπιά και έχουν σχήμα κυλινδροκωνικό με μικρή θηλή (Εικόνα 2.3.). Η ελαιοπεριεκτικότητά της κυμαίνεται από 15% έως 30% και συνηθέστερα από 20% έως 25% (Κωστελένος 2011). Είναι η επικρατέστερη ποικιλία στην Κρήτη και φέρει την τοπική ονομασία Λιανολιά. Ο καρπός της έχει βάρος 0,3-1,0 γραμμάρια και ύψος από 12-15 χιλιοστά. Το δέντρο της είναι ορθόκλαδο, θαμνώδες και φτάνει μέχρι το ύψος των 8-10 μέτρων με διάμετρο 6-8 μέτρα, αν καλλιεργείται σε γόνιμο έδαφος και αρδεύεται.

Δεν έχει ιδιαίτερες εδαφοκλιματικές απαιτήσεις και χαρακτηρίζεται από δύο σημαντικά πλεονεκτήματα: την ανθεκτικότητά της στην ξηρασία και την υψηλή και σταθερή καρποφορία της (από 30 ως και πάνω από 150 κιλά καρπού κατά δέντρο). Το μειονέκτημα του μικρού μεγέθους του καρπού της, αν και πρόκειται για ποικιλία με αποκλειστικά ελαιοπαραγωγική κατεύθυνση, ξεπερνιέται από το γεγονός ότι το λάδι της με το πρασινοκίτρινο χρώμα του, είναι εκλεκτής ποιότητας με φρουτώδη γεύση και εξαιρετικό άρωμα καρπού. Ανθίζει κατά το τελευταίο δεκαήμερο Απριλίου και ωριμάζει κατά την περίοδο Οκτώβρη-Δεκέμβρη. Είναι παραγωγικό δέντρο. Καρποφορεί σταθερά με υπερπαραγωγή κάθε δεύτερη χρονιά. Με λίγη περιποίηση και σχετικό κλάδεμα μπορεί να καρποφορεί καλά κάθε χρονιά. Θεωρείται η καλύτερη ποικιλία για παραγωγή λαδιού.



Εικόνα 2.3.

4. Μανάκι (*Olea europaea* var. *Minorrotunda*)

Καλλιεργείται στην Αμφισσα, στην Κόρινθο, στην Κρήτη και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας. Είναι γνωστή και με τα ονόματα Κοθρέικη, Μανακολιά, Γλυκομάνακο κ.ά. Ανήκει στις μεγαλόκαρπες ελληνικές ποικιλίες. Το δέντρο της είναι αρκετά ανθεκτικό στο κρύο και στους ισχυρούς ανέμους, όπου άλλες ποικιλίες δε μπορούν να αποδώσουν. Ο καρπός του είναι σφαιρικός ή ωοειδής και δίνει εξαιρετικό ελαιόλαδο, αλλά γίνεται και πολύ νόστιμη και αρωματική επιτραπέζια ελιά (Εικόνα 2.4.). Η απόδοσή της σε λάδι φτάνει το 25% και είναι καλής ποιότητας. Η ποικιλία αυτή ωριμάζει με αργούς ρυθμούς και η καλύτερη εποχή για τη συγκομιδή της είναι από το τέλος Ιανουαρίου μέχρι τις αρχές του Φεβρουαρίου (www.karpea.gr).



Εικόνα 2.4.

5. Μεγάρων (*Olea europaea* var. *Argentata*)

Καλλιεργείται στην Αττική, στη Κόρινθο και στη Βοιωτία. Είναι γνωστή και με τα ονόματα Περαχωρίτικη, Βοβωδική κ.ά. Είναι ποικιλία μικρών απαιτήσεων σε υγρασία που μπορεί να καλλιεργηθεί σε ξηρές περιοχές και παράλληλα παρουσιάζει μικρές απαιτήσεις σε χειμερινό ψύχος για ανθοφορία. Θεωρείται μέτριας παραγωγικότητας και ωριμάζει Νοέμβριο-Δεκέμβριο (Fabro 2009). Το δέντρο είναι πλαγιόκλαδο και φτάνει σε ύψος τα 5-8 μέτρα. Τα φύλλα είναι σχετικά μεγάλα και απολήγουν σε αιχμηρή κορυφή (Εικόνα 2.5.). Ο καρπός παρουσιάζει πολυμορφία. Χρησιμοποιείται κυρίως για παρασκευή λαδιού καλής ποιότητας και για την παρασκευή διάφορων τύπων μέτριας ποιότητας ελιών (κυρίως τσακιστές).

Μειονέκτημα αποτελεί η μεγάλη ευαισθησία της στην προσβολή από παράσιτα και συγκεκριμένα στο Δάκο.



Εικόνα 2.5.

6. Χαλκιδικής (*Olea europaea* var. *Maxima*)

Ποικιλία που καλλιεργείται σχεδόν αποκλειστικά στη Χαλκιδική και είναι γνωστή ως Γαϊδουρολιά, λόγω του μεγάλου μεγέθους των καρπών της. Η συγκεκριμένη ποικιλία παράγει καρπούς κυλινδροκωνικού σχήματος που φέρουν θηλή. Το μέσο βάρος του καρπού κυμαίνεται μεταξύ 4 έως 14 γραμμάρια (Εικόνα 2.6.). Το χρώμα της επιδερμίδας του καρπού αλλάζει διαδοχικά με την πρόοδο της ωρίμανσης, από πράσινο σε πρασινοκίτρινο, αχυροκίτρινο, ρόδινο και καταλήγει σε ξεθωριασμένο ερυθρό μαύρο, χωρίς όμως να καταλήγει ποτέ σε μαύρο. Αυτό είναι το μειονέκτημα της ποικιλίας που την αποκλείει από τη χρήση για παρασκευή μαύρης επιτραπέζιας ελιάς. Η περιεκτικότητα σε λάδι αγγίζει το 20%. Η ποικιλία ωριμάζει σχετικά νωρίς και η συγκομιδή της γίνεται μεταξύ Νοεμβρίου και Δεκεμβρίου (www.karpea.gr).



Εικόνα 2.6.

7. Στρογγυλολιά (*Olea europaea* var. *Rubrotunda*)

Καλλιεργείται βασικά στη Χαλκιδική. Είναι γνωστή και με τα ονόματα Γαλανή, Πρασινολιά, Στρογγυλοραχάτη, Μηλολιά, Χοντρολιά κ.ά. Είναι δέντρο με σημαντική ανθεκτικότητα στο ψύχος και στην ξηρασία. Ο καρπός του δέντρου είναι πολύ μεγάλος (Fabro 2009). Έχει περιεκτικότητα σε λάδι 16% και η σχέση καρπού / πυρήνα (κουκούτσι) είναι 6,8:1. Χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή πράσινης επιτραπέζιας ελιάς (Εικόνα 2.7.).



Εικόνα 2.7.

8. Βαλανολιά (*Olea europaea var. pyriformis*)

Ανήκει στις μεσόκαρπες ελαιοπαραγωγικές ποικιλίες ελιάς και καλλιεργείται στη Λέσβο, τη Χίο, τη Μυτιλήνη και τη Σκύρο. Είναι γνωστή και με τα ονόματα Κολοβή, Μυτιληνιά και Βαλάνα. Αποτελεί τα 7/10 των δέντρων στους ελαιώνες της Λέσβου. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο μέχρι 500 μέτρων και γενικά δεν έχει μεγάλες απαιτήσεις. Το δέντρο της είναι σχεδόν ζωηρό, με ακανόνιστο σχήμα και με μέτρια παραγωγικότητα. Ωριμάζει όψιμα τον καρπό της, Φεβρουάριο με Μάρτιο αλλά η συλλογή της αρχίζει από νωρίς, κατά το Νοέμβριο (Fabrio 2009). Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι φτάνει στο 25-30%. Το λάδι είναι εξαιρετικής ποιότητας, με έντονο άρωμα και καλή γεύση. Θεωρείται μια από τις καλύτερες ελαιοποιήσιμες ποικιλίες της χώρας μας (Εικόνα 2.8.).



Εικόνα 2.8.

9. Θρουμπολιά (*Olea europaea var. media oblonga*)

Ανήκει στις μεσόκαρπες μεικτές ποικιλίες ελιάς και καλλιεργείται κυρίως στη Χίο, τη Σάμο, τη Θάσο, την Αττική και τη Κρήτη. Είναι γνωστή και με τα ονόματα Θρούμπα, Ασκούδα, Θασίτικη κ.ά. Αυτή η ποικιλία θεωρείται η πιο διαδεδομένη στη χώρα μας, μιας και είναι δέντρο που μπορεί να καλλιεργηθεί σε μεγάλο υψόμετρο και δύσκολα προσβάλλεται από το δάκο (www.elia-diktyo.gr). Η περιεκτικότητά της σε λάδι φτάνει μέχρι 28% και είναι καλής ποιότητας. Χρησιμοποιείται επίσης και για την παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς, της ονομαζόμενης θρούμπας ή σταφιδολιάς. Το φυσικό σταφίδιασμα και το γλυκίσμα της ελιάς αυτής οφείλεται σε ένα μύκητα, τον *Phomaoleae*, που διασπά την ελευρωπαϊνή και δίνει ξανθό χρώμα και γλυκιά γεύση στον καρπό. Οι ελιές που έχουν προσβληθεί από το μύκητα αυτόν δεν είναι κατάλληλες για την παραγωγή ελαιολάδου (Fooks 1998). Στην αγορά, με το όνομα θρούμπες, διατίθενται ελιές αυτής της ποικιλίας που έχουν γλυκαθεί «τεχνικά» με αλάτι και στην πραγματικότητα πρόκειται για παστωμένες ελιές (Εικόνα 2.9.).



Εικόνα 2.9.

10. Αδραμυτινή (*Olea europaea* var. *media subrotunda*)

Ανήκει στις μεσόκαρπες ελαιοπαραγωγικές ποικιλίες και καλλιεργείται κυρίως στη Μυτιλήνη, όπου αποτελεί το 20% περίπου των ελαιώνων του νησιού, στη Χίο και αλλού. Είναι γνωστή και με τα ονόματα Αϊβαλιώτικη, Μυτιληνιαία και Φραγκολιά. Προέρχεται από τη Μικρά Ασία. Αντέχει σε υψόμετρο 500-600 μέτρων. Έχει μέτρια αντοχή στο ψύχος και είναι ευαίσθητη στο Δάκο και στον Καρκίνο. Το δέντρο της φτάνει τα 6-8 μέτρα ύψος (Fooks 1998). Ο καρπός ωριμάζει Νοέμβριο με Δεκέμβριο. Η περιεκτικότητά της σε λάδι φτάνει το 22-25%. Το λάδι της είναι λεπτόρρευστο με εξαιρετικό άρωμα (Εικόνα 2.10.).



Εικόνα 2.10.

Στην Ελλάδα εκτός από τις ελληνικές ποικιλίες καλλιεργούνται και αρκετές ξένες, σε περιορισμένο επίπεδο όμως και κυρίως για παραγωγή επιτραπέζιες ελιάς. Στην Ελλάδα έχουν εισαχθεί ισπανικές, ιταλικές και γαλλικές ποικιλίες. Οι σπουδαιότερες από αυτές είναι οι εξής:

1. Arbequina (*Olea europaea* var. *Ierdensis*)

Ισπανική ποικιλία με μεγάλη αντοχή στο ψύχος. Είναι δέντρο μέσης ζωηρότητας, με κλαδιά που κρέμονται. Τα φύλλα είναι μικρά, με έντονο πράσινο χρώμα. Ο καρπός είναι αρκετά μικρού μεγέθους, σχεδόν σφαιρικός ή επιμήκης. Καλλιεργείται στην Αραγονία και Καταλονία της Ισπανίας. Είναι πολύ παραγωγική ποικιλία, ωριμάζει

όμως τον καρπό της σταδιακά. Η περιεκτικότητα σε λάδι είναι 17-20%, καλής ποιότητας (Εικόνα 2.11.).



Εικόνα 2.11.

2. Ascolana

Ιταλική ποικιλία που καλλιεργείται στην Αμερική, στο Ισραήλ, στο Μεξικό, στην Αργεντινή και ελάχιστα στην Ελλάδα. Το δέντρο γίνεται μεγάλο, κάτω από ευνοϊκές συνθήκες. Οι απαιτήσεις του σε ψύχος είναι μεγάλες και είναι ευαίσθητο στο Δάκο. Τα φύλλα είναι φαρδιά, με πράσινο λαμπερό χρώμα στην επιφάνεια και γκριζοπράσινο στην κάτω. Ο καρπός της είναι μεγάλος και έχει περιεκτικότητα σε λάδι που φτάνει το 17%. Όμως, χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή πράσινης επιτραπέζιας ελιάς σε άλμη (Εικόνα 2.12.).



Εικόνα 2.12.

3. Frantoio

Ιταλική ποικιλία με ευκολία προσαρμογής. Καλλιεργείται σε πολλές ελαιοπαραγωγικές περιοχές του κόσμου. Είναι ευαίσθητη στο Κυκλοκόνιο και στα κοκκοειδή. Το δέντρο φτάνει σε μεγάλο ύψος. Ο καρπός είναι μικρός, ωοειδής και έχει περίπου 20% περιεκτικότητα σε λάδι, που είναι εξαιρετικής ποιότητας. Η παραγωγικότητά της είναι υψηλή και σταθερή (Εικόνα 2.13.).



Εικόνα 2.13.

4. Gordal (*Olea europaea* var. *Regalis*)

Ισπανική μεγαλόκαρπη ποικιλία που κατάγεται από τη Σεβίλλη και καλλιεργείται στην Αμερική, στη Βόρεια Αφρική και στην Ελλάδα. Η ποικιλία είναι ανθεκτική στο ψύχος και στο Κυκλοκόνιο, ευαίσθητη όμως στα κοκκοειδή. Σε εύφορο έδαφος το δέντρο γίνεται μεγάλο με απλωμένο φύλλωμα και κρεμαστά καρποφόρα κλαδιά. Τα φύλλα είναι σχετικά μεγάλα, λογχοειδή, με σκούρο πράσινο χρώμα στην πάνω επιφάνεια και γκριζοπράσινο στην κάτω. Η περιεκτικότητα σε λάδι είναι χαμηλή, περίπου 14%. Δίνει επιτραπέζια πράσινη και μαύρη ελιά εξαιρετικής ποιότητας σε άλμη (Εικόνα 2.14.).



Εικόνα 2.14.

5. Leccino

Ιταλική ποικιλία, με κρεμασμένα κλαδιά, ανθεκτική στο Κυκλοκόνιο. Ο καρπός είναι μεγάλος, ωοειδής – κυλινδρικός. Καλλιεργείται για παραγωγή λαδιού, το οποίο είναι καλής ποιότητας (Εικόνα 2.15.).



Εικόνα 2.15.

6. Manzanilla (*Olea europaea* var. *Pomiformis*)

Ισπανική μεσόκαρπη επιτραπέζια ποικιλία. Το δέντρο αναπτύσσει ζωνρή βλάστηση και μέτριο ύψος (8-10 μέτρα). Ο καρπός είναι στρογγυλός και μοιάζει με μικρό μήλο, από όπου πήρε και το όνομά της. Το χρώμα του είναι στιλπνό πράσινο και γίνεται μαύρο κατά την ωρίμανση. Η περιεκτικότητά της σε λάδι είναι 18% περίπου. Η ποικιλία αυτή είναι αρκετά παραγωγική. Η μέση ετήσια παραγωγή κατά δέντρο στην ηλικία των 12 χρόνων και άνω ξεπερνά τα 60 κιλά. Καλλιεργείται τόσο στα πεδινά όσο και στα ορεινά (Εικόνα 2.16.).



Εικόνα 2.16.

7. Picholine

Γαλλική ποικιλία που θεωρείται η καλύτερη για την παραγωγή πράσινης επιτραπέζιας ελιάς. Ο καρπός είναι μέτριος με περιεκτικότητα σε λάδι 17% (Εικόνα 2.17.).



Εικόνα 2.17.

8. Picual

Ισπανική μεσόκαρπη ποικιλία που η αναλογία του καρπού σε λάδι ξεπερνά το 21%. Το δέντρο αναπτύσσει μέτριο ύψος και είναι ορθόκλαδο. Τα φύλλα είναι μέτρια, επιμήκη. Ο καρπός είναι σφαιρικός ή ωοειδής, με πράσινο χρώμα και μαύρο στιλπνό στο στάδιο της ωρίμανσης. Είναι αρκετά παραγωγική ποικιλία και ξεπερνά τα 80 κιλά στα γόνιμα αρδευόμενα εδάφη. Αν και είναι ελαιοποιήσιμη ποικιλία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σαν επιτραπέζια πράσινη ή μαύρη. Η ποικιλία είναι ανθεκτική στο Κυκλοκόνιο και στη Βερτιτσιλλίωση αλλά προσβάλλεται εύκολα από το Δάκο (Εικόνα 2.18.).



Εικόνα 2.18.

1.9. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΕΛΙΑΣ

Η ελιά παρουσιάζει την πλουσιότερη γενετική παραλλακτικότητα, ανάμεσα σε 2.600 ποικιλίες. Η ελιά είναι ένα διπλοειδές είδος ($2n=46$) που παρουσιάζει υψηλό επίπεδο διασταυρώσεων. Ο βαθμός των διασταυρώσεων διαφέρει ανάλογα με τις ποικιλίες και τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. Έχουν καταγραφεί πάρα πολλές ελληνικές ποικιλίες ελιάς και αυτό αποδεικνύει το γενετικό πλούτο της περιοχής. Έχουν γίνει προσπάθειες διάκρισης αυτών των ποικιλιών με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους αλλά και με γενετικούς δείκτες (Αναγνωστόπουλος 1939).

Έχει αναφερθεί παλαιότερα ότι τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά δεν παρέχουν κάποια άμεση πληροφορία για συγκεκριμένους γονότυπους, αφού

καθορίζονται από πολλά γονίδια και διαφέρουν ανάλογα με το χρόνο και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Hamrick 1992). Οι Cantini et al., 1999 σε έρευνα που έκαναν, χρησιμοποίησαν μορφολογικούς χαρακτήρες, όπως τα φύλλα, ο καρπός και ο τρόπος ανάπτυξης, προκειμένου να αξιολογήσουν τη γενετική ποικιλομορφία ανάμεσα σε διάφορες γνωστές και άγνωστες ποικιλίες ελιάς.

Έχει πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση ποικιλιών ελιάς με βάση τα ισοένζυμα αλλά αυτή η μέθοδος έδειξε μειονεκτήματα. Συγκεκριμένα, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων ήταν δύσκολη εξαιτίας του σχετικά μικρού αριθμού πολυμορφισμών που παράγονται και την πιθανότητα ότι η έκφραση του ισοενζύμου μπορεί να μεταβληθεί από περιβαλλοντικές συνθήκες (Trujillo 1995). Οι Williams et al (1990), Welsh, McClelland (1990) and Newbury, Ford-Lloyd (1993) περιέγραψαν τους μοριακούς δείκτες RAPDs οι οποίοι απέδειξαν ότι είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για γενετική ταυτοποίηση. Αυτοί ανέφεραν ότι η μέθοδος των RAPDs, η οποία περιλαμβάνει άμεση ανάλυση του DNA που εξάγεται από δείγματα φύλλων ελιάς, είναι ανεξάρτητη από περιβαλλοντικές συνθήκες και παρουσιάζει μεγαλύτερο βαθμό πολυμορφισμού (Ozkaya et al., 2004).

Η εμφάνιση μεγάλου αριθμού ομόνυμων ποικιλιών (ποικιλίες που έχουν το ίδιο όνομα αλλά είναι γενετικά διαφορετικές), συνώνυμων ποικιλιών (ποικιλίες που έχουν διαφορετικά ονόματα αλλά είναι γενετικά το ίδιο) και κλώνων, έχουν δυσκολέψει την ταυτοποίηση ποικιλιών της ελιάς (Bandelj et al., 2002). Αυτά τα προβλήματα αντιμετωπίστηκαν με τη χρήση μορφολογικών, καρυοτυπικών, βιοχημικών και μοριακών δεικτών.

Μορφολογικοί Δείκτες

Η πιο γνωστή και εύκολη μέθοδος ταυτοποίησης ποικιλιών είναι αυτή που στηρίζεται στον εντοπισμό διαφορών μεταξύ ποικιλιών και τον διαχωρισμό τους, με βάση τα κληρονομήσιμα και μορφολογικά χαρακτηριστικά. Στην ουσία, πρόκειται για καταγραφή μόνο- ή ολίγο- γονιδιακών χαρακτηριστικών. Η ταυτοποίηση ποικιλιών με την χρήση μορφολογικών δεικτών αποτελεί τον πιο γρήγορο και οικονομικό τρόπο, καθώς δεν απαιτεί την χρήση εξεζητημένων τεχνικών ή ειδικό εξοπλισμό. Αντιθέτως, η χρήση αυτών των δεικτών δεν είναι τόσο αποτελεσματική για πολυγονιδιακά χαρακτηριστικά, εξαιτίας του χαμηλού συντελεστή κληρονομικότητας (Patterson and Weatherup, 1984).

Καρυοτυπικοί Δείκτες

Οι καρυοτυπικοί δείκτες περιλαμβάνουν το χρωμοσωμικό αριθμό, τα χρωμοσωμικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της ελιάς, τα ειδικά πρωτόκολλα χρώσης του κυττάρου και τον *insitu* υβριδισμό. Πρόκειται για δύσκολη μέθοδο, αφού απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και επιστημονικό προσωπικό με εμπειρία και γνώσεις.

Βιοχημικοί Δείκτες

Οι βιοχημικοί δείκτες περιλαμβάνουν τους δευτερογενείς μεταβολίτες και τις πρωτεΐνες (πρωτεϊνικοί δείκτες). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι τα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού ανώτερων φυτών, όπως η ελιά. Είναι κληρονομήσιμοι και πολυμορφικοί δείκτες. Οι πρωτεϊνικοί δείκτες είναι πρωτεΐνες που εξυπηρετούν συγκεκριμένες εφαρμογές διαχείρισης του γενετικού υλικού. Κυριότεροι πρωτεϊνικοί δείκτες είναι οι ορολογικές αναλύσεις, οι πρωτεΐνες αποθήκευσης και τα ισοένζυμα. Οι πληροφορίες που παρέχουν αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα γονιδίων που κωδικοποιούν πολυπεπίδια, τα οποία δεν είναι τυχαία διασκορπισμένα στο γονιδίωμα της ελιάς αλλά σε συγκεκριμένες θέσεις (Bretting and Widrechner, 1995).

Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA που παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των ποικιλιών της ελιάς, η ανάδειξη των οποίων χρησιμοποιείται για την μελέτη της κληρονομικότητας χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας της ελιάς (Fanourakis et al., 2004). Ανιχνεύουν δηλαδή, διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία του DNA τόσο του πυρήνα, όσο και των οργανιδίων. Αυτές οι διαφοροποιήσεις οφείλονται σε πολυμορφισμούς στο DNA.

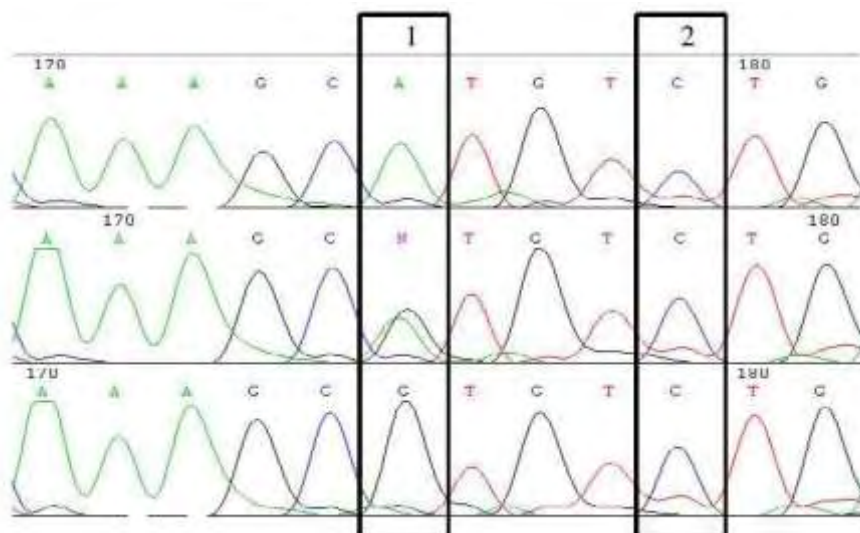
Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), οι οποίοι αποτέλεσαν την αρχή για την μετέπειτα εξέλιξη της μοριακής βελτίωσης φυτών (Botstein et al., 1980). Αυτοί οι δείκτες βασίζονται στη χρήση των περιοριστικών ενζύμων, με τη βοήθεια των οποίων πέπτουν το μόριο DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Ακολουθεί διαχωρισμός των κομματιών DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, αποτύπωση κατά Southern, υβριδισμός με κατάλληλο ανιχνευτή DNA και λήψη της οπτικής εικόνας με αυτοραδιογραφία με ραδιενεργό ισότοπο (Bebeli and Kaltsikes, 1993). Μετά την εισαγωγή της PCR σαν πολύτιμο εργαλείο στην έρευνα, αναπτύχθηκαν νέοι μοριακοί δείκτες που βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA, τα RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990).

Τη δεκαετία του 1990 αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν οι δεύτερης γενιάς μοριακοί δείκτες, που συμπεριλαμβάνουν τους SSRs (Simple Sequence Repeat) (Hearne et al., 1992), τους AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) και μια ποικιλία τροποποιημένων τύπων τους (Vos et al., 1995). Στα τέλη της ίδιας δεκαετίας αναπτύχθηκαν και οι τρίτης γενιάς μοριακοί δείκτες, οι IFLPs (Intron Fragment Length Polymorphisms) και οι SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) (Landegren et al., 1988).

1.10. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)

Πολυμορφισμός είναι η εμφάνιση πάνω από μία μορφή γονιδίου (αλληλόμορφο) σε ένα γονιδιακό τόπο, γεγονός που οδηγεί στην ύπαρξη γενετικής ποικιλότητας. Οι πολυμορφισμοί παρατηρούνται μερικές φορές στα γονίδια και είναι υπεύθυνοι για τις διαφορές του φαινοτύπου που παρατηρούμε ανάμεσα στα άτομα. Στα γονίδια, οι πολυμορφισμοί αναφέρονται συνήθως σαν «μεταλλαγές» ή «ποικιλίες». Οι μοριακοί δείκτες SNPs είναι μια τεχνική ανάλυσης της γενετικής ποικιλότητας. Είναι τμήματα DNA με πολυμορφισμό και βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό των τμημάτων του DNA με τη PCR τεχνική. Για παράδειγμα, δύο τμήματα DNA αλληλουχίας από διαφορετικά άτομα, AAGCCTA και AAGCTTA, περιέχουν μια διαφορά σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Συγκεκριμένα αφορούν αναλύσεις που πραγματοποιούνται σε επίπεδο DNA, με άμεσο προσδιορισμό της αλληλουχίας DNA διαφορετικών ατόμων και σύγκριση της ποικιλότητας SNP (Frohman et al., 1988).

Αν και έχουν περιγραφεί πολυάριθμες προσεγγίσεις για την ανακάλυψη των SNPs, οι κυριότερες βασίζονται στην σύγκριση των ακολουθιών συγκεκριμένων τόπων. Η πιο απλή προσέγγιση, όταν στοχεύει σε μια καθορισμένη περιοχή, είναι να εκτελεί άμεσα την αλληλούχιση των προϊόντων PCR που λαμβάνονται σε διαφορετικά άτομα. Αυτή η προσέγγιση τείνει να είναι δαπανηρή εξαιτίας της ανάγκης για εκκινητές συγκεκριμένων τόπων. Επίσης, περιορίζεται σε περιοχές για τις οποίες η ακολουθία δεδομένων είναι διαθέσιμη και παράγει μια διπλοειδή ακολουθία, στην οποία δεν είναι πάντα εύκολο να γίνει διάκριση ανάμεσα σε αλληλουχίες αντικειμένων και πολυμορφισμούς. Και αυτό γιατί παρατηρούνται διπλές κορυφές σε μία θέση και τότε αναφερόμαστε σε ετεροζυγώτες (Vignal et al., 2002).



Πλαίσιο 1: πάνω ακολουθία → ομοζυγώτες AA
μεσαία ακολουθία → ετεροζυγώτες AG
κάτω ακολουθία → ομοζυγώτες GG
Πλαίσιο 2: πάνω ακολουθία → ετεροζυγώτες CT

μεσαία ακολουθία → ομοζυγώτες CC
κάτω ακολουθία → ετεροζυγώτες CT

Τα SNPs έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων δεικτών, όπως τη διαθεσιμότητα μεγάλων αριθμών των δεικτών και τα βελτιωμένα αποτελέσματα για δείγματα κακής ποιότητας (Frascaroli E. et al., 2012). Επίσης, αν και έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα πληροφοριών σε σύγκριση με τους μοριακούς δείκτες SSRs, εμφανίζονται σε πολύ μεγαλύτερη πυκνότητα στο γονιδίωμα και είναι επιδεκτικές σε υψηλής-απόδοσης μεθόδους, όπως η ταυτοποίηση (Rafalski A., 2002). Για αυτούς τους λόγους, προσφέρουν απaráμιλλη δυνατότητα για πιο αναλυτική εξέταση στο γονιδίωμα και σε δείγματα μεγαλύτερου μεγέθους που προέρχονται από φυσικούς πληθυσμούς (Seeb et al., 2011).

Παρά τα πολλά πλεονεκτήματα των SNPs, η χρήση τους σε μελέτες γενετικής ποικιλότητας έχει επικριθεί λόγω του γεγονός ότι οι SNPs ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά σε ένα μικρό κομμάτι αλληλουχιών ατόμων και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σε συστοιχίες για ταυτοποίηση πολύ μεγαλύτερων (Ramírez-Soriano and Nielsen, 2009).

Στην παρούσα μελέτη, ο έλεγχος του πολυμορφισμού με τους μοριακούς δείκτες SNPs, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μιας σειράς εκκινητών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τρία ζευγάρια εκκινητών. Το πρώτο ζευγάρι ενισχύει το γενετικό τόπο *Cbp* (*Calcium binding protein*), ο οποίος είναι πρωτεΐνη δέσμευσης του ασβεστίου. Το δεύτερο ζεύγος ενισχύει το γενετικό τόπο *Ant* (*Anthocyanidin synthase*), ο οποίος είναι εξαρτώμενος από την οξυγενεάση και καταλύει το προτελευταίο βήμα στη βιοσύνθεση των ανθοκυανινών που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Και τέλος, το τρίτο ζευγάρι ενισχύει τον τόπο *Cycl* (*Cycloartenol synthase*), ο οποίος είναι ένα σημαντικό είδος στανολεστέρων που εντοπίζονται στα φυτά.

Σκοπός του πειράματος

Απ' τους αρχαίους χρόνους μέχρι σήμερα, η ελιά πέρασε από το στάδιο της αγριελιάς στις σημερινές, καλλιεργήσιμες μορφές της. Στη διαδρομή αυτή έχει προσαρμοστεί σε διάφορες κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες και έχει οδηγηθεί στη δημιουργία πλήθους ποικιλιών. Καλλιεργείται για τα πολύτιμα προϊόντα της, το ελαιόλαδο και τις βρώσιμες ελιές, που αποτελούν βασικά είδη διατροφής του ανθρώπου. Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία γίνεται διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων διαφόρων ποικιλιών ελιάς, με σκοπό να κατανοήσουμε την εξέλιξή της και να εντοπίσουμε πολυμορφισμούς, οι οποίοι θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη μοριακών διαγνωστικών για τον διαχωρισμό αυτών των ποικιλιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Για την διεξαγωγή αυτής της έρευνας συλλέχθηκαν φύλλα, από τα οποία απομονώθηκε το DNA, από διάφορες καλλιεργούμενες ποικιλίες ελιάς. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτό το πείραμα ήταν επτά και συγκεκριμένα οι εξής ποικιλίες: Αμφίσσης, Καλαμών, Χαλκιδικής, Μανάκι, Μεγάρων, Χονδρολιά και Κορωνέικη.

2.2. ΕΞΑΓΩΓΗ DNA ΑΠΟ ΦΥΛΛΑ ΕΛΙΑΣ

Η εξαγωγή του DNA από δείγματα ελιάς θα μπορούσε να έχει μεγάλη σημασία, όταν θέλουμε να εντοπίσουμε την πρώτη ύλη (Busconi et al., 2003). Για την εξαγωγή DNA από φύλλα ελιάς, ακολουθήσαμε την μέθοδο των Doyle and Doyle (1987) με κάποιες τροποποιήσεις. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα παρακάτω υλικά:

Υλικά που χρησιμοποιήσαμε:

- ✓ Φύλλα ελιάς
- ✓ Υγρό άζωτο
- ✓ Διάλυμα CTAB
- ✓ Χλωροφόρμιο
- ✓ Ισοπροπανόλη
- ✓ 70% αιθανόλη
- ✓ Διάλυμα επαναδιάλυσης TE-Buffer

Πειραματική διαδικασία:

- Λαμβάνουμε 1gr. φύλλα ελιάς από μια ποικιλία. Κόβουμε τα φύλλα σε πολλά μικρά κομμάτια και τα βάζουμε στο γουδί. Χρησιμοποιούμε υγρό άζωτο και με το γουδοχέρι χτυπάμε τα φύλλα μέχρι να γίνουν σκόνη.
- Ζυγίζουμε τη σκόνη.
- Για κάθε 5gr. σκόνης προσθέτουμε 20ml CTAB (2% w/v CTAB, 100mM Tris-HCl pH8, 1,4 MNaCl, 20mM EDTA pH8, 1% w/v PVP, 0,2% v/v b-mercaptoethanol) το οποίο έχουμε προθερμάνει στο υδατόλουτρο.
- Στη συνέχεια, επωάζουμε το δείγμα στο υδατόλουτρο για 1 ώρα στους 65°C με δυναμική ανακίνηση περιοδικά ανα 10 λεπτά χωρίς τη χρήση vortex.

- Προσθέτουμε chloroform τόσο όση η ποσότητα που έχουμε στο erpendorf και αναδεύουμε.
- Φυγοκεντρούμε σε 14.000rpm (μέγιστες στροφές) για 10 λεπτά.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό erpendorf των 2ml.
- Στο υπερκείμενο προσθέτουμε ξανά chloroform, αναδεύουμε και φυγοκεντρούμε σε 14.000rpm για 10 λεπτά.
- Στο τελικό υπερκείμενο υγρό του δείγματος που προκύπτει προσθέτουμε άλλη τόση ισοπροπανόλη.
- Φυγοκεντρούμε σε 14.000rpm για 20 λεπτά. Σ' αυτό το στάδιο το γενετικό υλικό μέσα στο σωληνάκι erpendorf αρχίζει να φαίνεται. Απορρίπτουμε το υγρό διατηρώντας μόνο το ίζημα.
- Προσθέτουμε 200μl αιθανόλη 70%. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά και απορρίπτουμε το υγρό.
- Αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει για 30 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τέλος, προσθέτουμε 50μlTEBuffer στο ίζημα και επωάζουμε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το DNA είναι έτοιμο και το διατηρούμε στους 4°C.

2.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η PCR (polymerasechainreaction) ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά το 1985. Σήμερα αντιμετωπίζεται σαν μια από τις πιο σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις της δεκαετίας και έχει αλλάξει, με επαναστατικό τρόπο, τη μελέτη του DNA. Ο εφευρέτης της μεθόδου, Karry Mullis, τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993.

Η PCR είναι μια πολύ γρήγορη και οικονομική τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρά τμήματα του DNA. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο γιατί για να γίνει ανάλυση των μεταλλάξεων ή των πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο, είναι απαραίτητες αρκετά μεγάλες ποσότητες του DNA. Απομονωμένα τμήματα DNA θα ήταν αδύνατο να μελετηθούν επαρκώς χωρίς τη μέθοδο της PCR.

Μια αντίδραση PCR πρέπει να περιέχει τα εξής συστατικά:

1. **Μήτρα DNA:** Το μόριο DNA που περιέχει την αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Όσο μεγαλύτερα κομμάτια DNA χρησιμοποιούνται, τόσο καλύτερα τα αποτελέσματα της μεθόδου.
2. **Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer):** Με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος διατηρούνται οι κατάλληλες συνθήκες (ιοντική ισχύ, pH) έτσι ώστε να έχουμε τη μέγιστη απόδοση της αντίδρασης. Η τελική του συγκέντρωση πρέπει να είναι 1X.

3. **MgCl₂**: Το MgCl₂ είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της πολυμεράσης. Τα ιόντα Mg²⁺ σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs τα οποία θα αποτελέσουν το υπόστρωμα της πολυμεράσης. Όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση άλατος περιέχει η αντίδραση τόσο μειώνεται η ειδικότητα της πολυμεράσης.
4. **5' τριφωσφορικάδεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)**: Τα dNTPs (dATP, dCTP, dGTP και dTTP) αποτελούν τα απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA στην αντίδραση PCR.
5. **Εκκινητές (primers)**: Οι εκκινητές είναι ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων , τα οποία αποτελούν εκκινητικά μόρια για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων.

| <u>Primers</u> | <u>MgCl₂</u> | <u>Ta°C</u> | <u>AmplicionSize (bp)</u> |
|----------------|-------------------------|-------------|---------------------------|
| Ant | 2 | 58 | 582 |
| Cbp | 3 | 58 | 476 |
| Cycl | 2.5 | 57 | 802 |

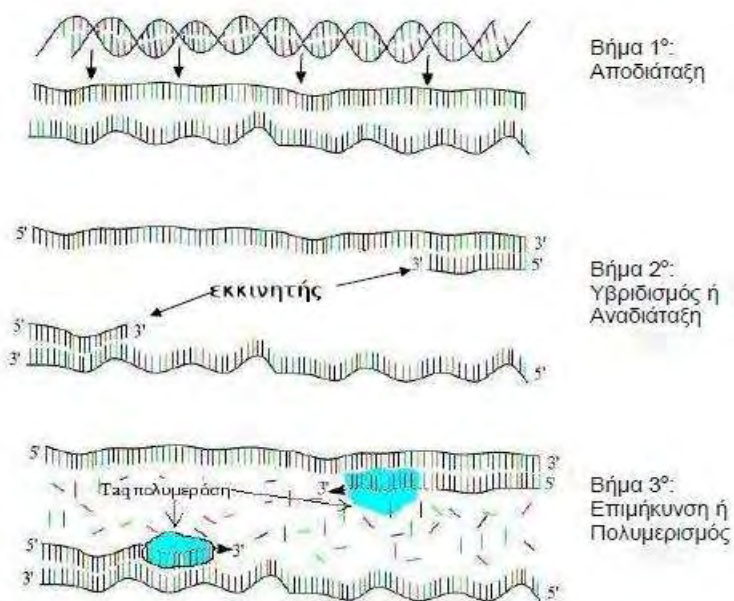
6. **Ειδική DNA πολυμεράση (Taq)**: Η Taq DNA πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988), επιτρέπει τη χρησιμοποίηση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης. Είναι υπεύθυνη για την προσθήκη των νουκλεοτιδίων στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες με ταχύτητα 1000bp/λεπτό. Μια ενζυμική μονάδα (1 Unit) είναι αρκετή για μια αντίδραση.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια μοριακή τεχνική που στοχεύει στην ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας από ένα μόριο-στόχο DNA. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει τρία στάδια (Εικόνα 1):

1. Την αποδιάταξη του DNA στόχου. Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνες αλυσίδες σε υψηλή θερμοκρασία (94-95°C).
2. Την υβριδοποίηση των εκκινητών (primer annealing). Οι δυο εκκινητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στις δυο αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται αποκλειστικά από το μήκος και την αλληλουχία των εκκινητών.
3. Τον πολυμερισμό (primer extension). Στο στάδιο αυτό γίνεται σύνθεση DNA με επιμήκυνση των εκκινητών με κατεύθυνση 5'-3', χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στο διάλυμα έχοντας ως υπόστρωμα τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από την Taq DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C.

Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται για αρκετούς κύκλους μέχρι να συντεθεί αρκετό προϊόν.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ



Εικόνα 1: Τα 3 στάδια της PCR.

Για την εφαρμογή της PCR ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

- Τοποθετούμε σε αποστειρωμένα σωληνάκια όλα τα συστατικά, δηλ. H_2O , buffer και $MgCl_2$ (ανάδευση με vortex πριν τη χρήση τους), primers, dNTPs και την επιθυμητή ποσότητα DNA.
- Το τελευταίο αντιδραστήριο που προστίθεται είναι η Taq DNA πολυμεράση.
- Αναδεύουμε ήπια με πιπέτα.
- Τοποθετούμε τα δείγματα στη συσκευή PCR που εκτελεί το ακόλουθο πρόγραμμα θερμοκρασίας / χρόνου.

Ο τελικός όγκος του δείγματος DNA που χρησιμοποιήθηκε για τη PCR τεχνική είναι 10μl.

| <u>Στάδιο</u> | <u>Θερμοκρασία</u> | <u>Χρόνος</u> | <u>Κύκλος</u> |
|----------------------|--------------------|---------------|---------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 95°C | 4min. | 1 |
| Αποδιάταξη DNA | 95°C | 30sec. | 35 |
| Υβριδισμός εκκινητών | Ta°C | 30sec. | |
| Πολυμερισμός | 72°C | 1min. | |
| Τελικός πολυμερισμός | 72°C | 7min. | 1 |

2.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση μορίων DNA (Sambrook et al., 1989). Όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο στα άκρα του πηκτώματος τότε το DNA θα μετακινηθεί προς το θετικό πόλο λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρει σε ουδέτερο pH.

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες.

Ο στόχος μας είναι να ηλεκτροφορήσουμε τα προϊόντα PCR ώστε αφενός να διαπιστωθεί αν ενισχύθηκε η αναμενόμενη αλληλουχία και αφετέρου η αλληλουχία αυτή να απομονωθεί από το πήκτωμα και στη συνέχεια να καθαριστεί.

Υλικά που χρησιμοποιήσαμε:

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X
- ✓ Αγαρόζη
- ✓ Δείκτης μοριακών βαρών (ladder)
- ✓ Διάλυμα φόρτωσης (Loadingbuffer) 10X: 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικκόλη σε νερό.
- ✓ Βρωμιούχο αιθίδιο

Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1% (gel) ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

- Αρχικά ετοιμάζουμε την ειδική συσκευή, εισάγουμε τα «χτενάκια» έτσι ώστε να σχηματιστούν οι θέσεις στις οποίες θα εισαχθεί το διάλυμα του DNA.
- Σε κωνική φιάλη ζυγίζουμε τις επιθυμητές ποσότητες σκόνης αγαρόζης και ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X.
- Θερμαίνουμε στον φούρνο μικροκυμάτων και αναδεύουμε ανα διαστήματα με κυκλικές κινήσεις μέχρι να πετύχουμε την πλήρη διάλυση της αγαρόζης.
- Αφήνουμε το διάλυμα να κρυώσει, προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr 10 mg/ml) και ανακινούμε ελαφρά.
- Στη συνέχεια, το μεταφέρουμε στην ειδική συσκευή όπου το αφήνουμε για περίπου 25 λεπτά.
- Μόλις στερεοποιηθεί, αφαιρούμε τα «χτενάκια» και είναι έτοιμο προς χρήση.

Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία ηλεκτροφόρησης που έχει ως εξής:

- Τοποθετούμε το πήκτωμα μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Είναι απαραίτητο να καλύπτεται εντελώς από το διάλυμα της συσκευής, TBE 0,5X.
- Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προσθέτουμε 5,0μl χρωστική σε κάθε δείγμα.
- Φορτώνουμε τα δείγματα στα πηγαδάκια του πηκτώματος. Πάντα βάζουμε σε ένα πηγαδάκι και τον μάρτυρα (ladder) διότι βοηθάει στον προσδιορισμό του αριθμού των βάσεων.
- Ηλεκτροφορούμε για 30 λεπτά περίπου.
- Τοποθετούμε το πήκτωμα στη συσκευή UV ακτινοβολίας και παρακολουθούμε το διαχωρισμό των ζωνών του DNA .
- Φωτογραφίζουμε το πήκτωμα.

2.5. ΑΝΑΚΤΗΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (gelextraction)

Ο στόχος αυτής της διαδικασίας είναι να απομονώσουμε το DNA των ζωνών που μας ενδιαφέρουν και έτσι να μπορέσουμε να το επεξεργαστούμε περαιτέρω σε άλλες πειραματικές διαδικασίες όπως Re-PCR, κλωνοποίηση κ.ά. Για να το πετύχουμε αυτό, χρησιμοποιήσαμε το kit: Invisorb® Spin DNA Extraction (250) της εταιρείας Invitex.

Υλικά που χρησιμοποιήσαμε:

- ✓ Δείγμα του πηκτώματος (τμήμα του gel αγαρόζης το οποίο περιέχει το επιθυμητό DNA)
- ✓ Gel Solubilizer S
- ✓ Binding Enhancer
- ✓ Wash Buffer
- ✓ Elution Buffer
- ✓ Spin Fliter
- ✓ 2,0ml Receiver Tubes

Πειραματική διαδικασία:

- Απομονώνουμε με ξυράφι το κομμάτι του πηκτώματος που περιέχει τη ζώνη DNA που μας ενδιαφέρει και το τοποθετούμε σε σωληνάκι τύπου erppendorf των 2ml.
- Υπολογίζουμε το βάρος της ζώνης αφαιρώντας το βάρος ενός άδειου erppendorf. Το βάρος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 300mg.
- Αν το βάρος είναι πάνω από 150mg προσθέτουμε 1ml ή 1000μl από το Gel Solubilizer S, ενώ αν είναι μέχρι 150mg προσθέτουμε 500μl Gel Solubilizer S.
- Επιάζουμε στους 50°C μέχρι να διαλυθεί πλήρως (περίπου 15 λεπτά).

- Για 1ml Gel Solubilizer S, προσθέτουμε 500μl Binding Enhancer ενώ για 500μl Gel Solubilizer S, προσθέτουμε 250μl Binding Enhancer.
- Αναδεύουμε με πιπέτα.
- Βάζουμε τα Spin Fliter μέσα στα Receiver Tube (2ml) και μεταφέρουμε με πιπέτα τα διαλύματα.
- Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε 11.000rpm και απορρίπτουμε το υγρό. Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία για να πάρουμε όλο το υγρό.
- Προσθέτουμε 500μl Wash Buffer. Φυγοκεντρούμε για 30 δευτερόλεπτα σε 9.000rpm και απορρίπτουμε το υγρό. Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία ακόμη μια φορά.
- Φυγοκεντρούμε για 4 λεπτά σε 14.000rpm, με ανοιχτό το καπάκι της φυγόκεντρος για να απομακρυνθεί όλη η αιθανόλη και στη συνέχεια τοποθετούμε το φίλτρο από κάθε δείγμα σε νέο eppendorf των 1,5ml.
- Προσθέτουμε 20μl Elution Buffer στο κέντρο της στήλης χωρίς να αγγίζει το tip το φίλτρο. Επωάζουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε 9.000rpm. Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία για ακόμη μια φορά.
- Απορρίπτουμε το φίλτρο (Spin Fliter) και αποθηκεύουμε το DNA στους 4°C.

2.6. ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ DNA ΜΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ

Ο στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη με σκοπό τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων ή την απομάκρυνση αλάτων, ολιγονουκλεοτιδίων ή άλλων προσμίξεων. Η τεχνική είναι γρήγορη και αποδοτική. Η παρουσία αιθανόλης αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα από τα νουκλεϊκά οξέα και εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα, όπως τα Na^+ , τα οποία συνδέονται σε αυτές. Με αυτό τον τρόπο μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζεται ίζημα.

Υλικά που χρησιμοποιήσαμε:

- ✓ Ισοπροπανόλη
- ✓ Οξικό νάτριο
- ✓ 70% αιθανόλη
- ✓ Διάλυμα επαναδιάλυσης

Πειραματική διαδικασία:

- Προσθέτουμε στο δείγμα 1 όγκο (δηλ. 1 φορά τον αρχικό όγκο του) ισοπροπανόλη και οξικό νάτριο (CH_3COONa).
- Αναδεύουμε ελαφρά και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.

- Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά σε 14.000rpm και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
- Προσθέτουμε μισό όγκο αιθανόλη 70%.
- Αναδεύουμε αναποδογυρίζοντας το erpendorf.
- Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 14.000rpm και απορρίπτουμε το υγρό.
- Χρησιμοποιούμε πιπέτα για τυχόν σταγόνες αιθανόλης που μπορεί να έχουν μείνει.
- Αφήνουμε ανοιχτό το erpendorf μέχρι να ξηραθεί το ίζημα του DNA.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε υδατικό διάλυμα.

2.7. ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Τα ένζυμα περιορισμού απομονώνονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια, στα οποία ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να παρέχουν προστασία έναντι της εισβολής βακτηριοφάγων. Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και κόβουν το DNA πάντα στο ίδιο σημείο. Τα ένζυμα αυτά κόβουν το ξένο DNA ενώ το μητρικό DNA προστατεύεται λόγω της μεθυλίωσης που υφίσταται από τα ίδια τα ένζυμα περιορισμού ή από ειδικές μεθυλάσες που παράγονται σε συνδυασμό με τα ένζυμα περιορισμού.

Η δράση τους εστιάζεται στην αναγνώριση ειδικών παλίνδρομων αλληλουχιών τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς τη θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας. Με τον τρόπο αυτό και ανάλογα με την αλληλουχία που αναγνωρίζουν, δημιουργούνται τμήματα DNA με τυφλά ή προεξέχοντα μονόκλωνα άκρα.

Πειραματική διαδικασία:

- Τοποθετούμε σε αποστειρωμένο erpendorf τα παρακάτω:

| <u>Υλικά</u> | <u>Ποσότητα</u> |
|---------------------|------------------------|
| DNA | 2,5μl |
| Buffer | 1,5μl |
| Ένζυμο περιορισμού | 0,3μl |
| H ₂ O | 10,7μl |
| Τελικός όγκος | 15μl |

- Αναδεύουμε και επωάζουμε για 1 ώρα στους 37°C.

2.8. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΦΑΙΝΟΛΗ – ΧΛΩΡΟΦΟΡΜΙΟ

Ο σκοπός της μεθόδου είναι η απομάκρυνση των υπολειμμάτων (κυρίως πρωτεϊνών) από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιώντας δύο οργανικούς διαλύτες, τη φαινόλη και το χλωροφόρμιο. Η φαινόλη αποδιατάσσει και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες μαζί με τα λιπίδια από τα νουκλεϊκά οξέα, ενώ το χλωροφόρμιο διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω της μεγάλης πυκνότητας που προσδίδει στην οργανική φάση. Τα νουκλεϊκά οξέα συγκεντρώνονται στην υδατική φάση, η οποία, μετά από φυγοκέντρηση, σχηματίζει την άνω φάση λόγω της μικρότερης πυκνότητάς της.

Υλικά που χρησιμοποιήσαμε:

- ✓ Φαινόλη
- ✓ Χλωροφόρμιο
- ✓ 70% αιθανόλη
- ✓ Οξικό νάτριο
- ✓ Ισοπροπανόλη

Πειραματική διαδικασία:

- Προσθέτουμε H₂O στα δείγματα και μισό όγκο (σε σχέση με τον αρχικό όγκο) φαινόλη και χλωροφόρμιο.
- Ανακινούμε δυνατά ώστε να γίνει ανάμειξη των φάσεων και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 14.000rpm.
- Μεταφέρουμε προσεκτικά με πιπέτα την υδατική φάση (άνω φάση) σε καθαρό eppendorf.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου, αναδεύουμε και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 14.000rpm. Στη συνέχεια, μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό eppendorf. (x2)
- Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη για να συλλέξουμε το DNA μας.

2.9. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΜΕ ΑΚΡΑ ΘΥΜΙΝΗΣ (T) ΣΕpBluescript

Η χρήση του φορέα είναι να μεταφέρει ένα κομμάτι DNA (ένθεμα) σε ένα κύτταρο-αποδέκτη με σκοπό την κλωνοποίησή του. Στο συγκεκριμένο πείραμα δημιουργούμε φορέα με άκρα θυμίνης γιατί θέλουμε να εισάγουμε ένθεμα το οποίο έχει συμπληρωματικά άκρα αδενίνης.

Πειραματική διαδικασία:

- Πέψη του φορέα με το ένζυμο *EcoRV*, το οποίο κόβει μόνο μια φορά το πολυσυνδέτη του φορέα και δημιουργεί τυφλά άκρα.

| <u>Υλικά</u> | <u>Ποσότητα</u> |
|------------------|-----------------|
| DNA | 10μl |
| Buffer | 1,5μl |
| <i>EcoRV</i> | 0,3μl |
| H ₂ O | 3,2μl |
| Τελικός όγκος | 15μl |

- Επιάζουμε στους 37°C για μία ώρα.
- Πραγματοποιούμε καθαρισμό με φαινόλη – χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση και επαναδιάλυση σε 20μl H₂O.
- Δημιουργούμε την αντίδραση προσθήκης T-άκρων.

| <u>Υλικά</u> | <u>Ποσότητα</u> |
|--------------------|-----------------|
| Φορέας | 20μl |
| Buffer | 5μl |
| Taq DNA polymerase | 0,5μl |
| dTTPs | 1μl |
| H ₂ O | 23,5μl |
| Τελικός όγκος | 50μl |

- Επιάζουμε την αντίδραση στους 72°C για 2,5 ώρες.
- Πραγματοποιούμε καθαρισμό με φαινόλη – χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση και επαναδιάλυση σε 50μl H₂O.

2.10. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ DNA ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΦΟΡΕΑ (Ligation)

Σκοπός του ligation είναι η προετοιμασία των προϊόντων PCR ώστε να μπορούν να κλωνοποιηθούν σε κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης. Έχουμε ήδη δημιουργήσει έναν φορέα με άκρα θυμίνης τα οποία είναι συμπληρωματικά με τα άκρα αδενίνης του DNA (ένθεμα).

Η αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιείται με τη παρουσία του ενζύμου DNA λιγάσης.

Πειραματική διαδικασία:

- Τοποθετούμε σε αποστειρωμένο erpendorf τα παρακάτω:

| <u>Υλικά</u> | <u>Ποσότητα</u> |
|------------------|-----------------|
| DNA (ένθεμα) | * |
| Ligase | 1μl |
| Buffer | 1μl |
| Φορέας | 1,25μl |
| H ₂ O | |
| Τελικός όγκος | 10μl |

*Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιείται, υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:
 $ng\ DNA = (ng\ φορέα \times kb\ ενθέματος / kb\ φορέα) \times αναλογία\ ενθέματος - φορέα.$

Η αναλογία ενθέματος : φορέα κυμαίνεται από 3:1 – 8:1.

- Επωάζουμε για 2,5 ώρες στους 22°C.

2.11. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ

Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για την εισαγωγή DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα (Neumann et al., 1982). Σήμερα χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό διαφόρων ειδών βακτηριακών κυττάρων με αποδόσεις που κυμαίνονται από 10^9 έως 10^{10} αποικίες/μgDNA. Η απόδοση εξαρτάται από παράγοντες όπως, η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το μήκος του ηλεκτρικού παλμού και η συγκέντρωση του DNA (Dower et al., 1988).

Υλικά που χρησιμοποιήσαμε:

- ✓ Stock *E.coli* DH5a
- ✓ Θρεπτικό υλικό LB Broth
- ✓ 10% γλυκερόλη παγωμένη

Πειραματική διαδικασία:

- Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτουμε με πιπέτα, 1ml θρεπτικού υλικού LB Broth (10gr. Bactrotrytone, 5gr. Yeast extract, 5gr. NaCl) κάτω υπό ασηπτικές συνθήκες.
- Ενοφθαλμισμός του θρεπτικού με *E.coli* DH5a κύτταρα.
- Επωάζουμε στις 220 στροφές, στους 37°C για 12-16 ώρες.
- Μετά το τέλος της επώασης, μεταφέρουμε τη βακτηριακή καλλιέργεια σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού υλικού.
- Επωάζουμε στους 37°C για 2,5 ώρες στις 210 στροφές μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι μεταξύ 0,4-0,5 σε 600nm.

- Μεταφέρουμε τη καλλιέργεια σε παγωμένα falconτων 50ml και επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκεντρούμε σε 4.000g στους 4°C για 15 λεπτά.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 500μl H₂O. Έπειτα βάζουμε νερό ως 50ml.
- Φυγοκεντρούμε σε 4.000g στους 4°C για 15 λεπτά.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο με προσοχή, γιατί τα κύτταρα ξεκολλούν. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 500μl H₂O και στη συνέχεια βάζουμε νερό ως 50ml.
- Φυγοκεντρούμε σε 4.000g στους 4°C για 15 λεπτά, αδειάζουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 4ml falcon γλυκερόλη 10%.
- Φυγοκεντρούμε σε 4.000rpm στους 2°C για 10 λεπτά.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 250μl falcon γλυκερόλη 10%.
- Μοιράζουμε τα κύτταρα σε παγωμένα erpendorfs (από 40μl).
- Αποθηκεύουμε στους -80°C.

2.12. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ – ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μηχανική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την εισαγωγή DNA σε δεκτικά κύτταρα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Κατά τη μέθοδο αυτή ηλεκτρικοί παλμοί αποδιοργανώνουν τη φωσφολιπιδική στοιβάδα προκαλώντας το σχηματισμό πόρων επιτρέποντας το DNA να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου (Purves et al., 2001).

Υλικά που χρησιμοποιήσαμε:

- ✓ Δεκτικά κύτταρα
- ✓ Ανασυνδιασμένα πλασμίδια
- ✓ Θρεπτικό υλικό SOC
- ✓ Τριβλία LB Agar-Amp
- ✓ X-Gal
- ✓ IPTG
- ✓ Θρεπτικό υλικό LB Broth-Amp

Πειραματική διαδικασία:

- Αφήνουμε τα δεκτικά κύτταρα στον πάγο να ξεπαγώσουν.
- Από τα 10μl της αντίδρασης ligation, κάνουμε αραιώση 1:10 και από αυτή την αραιώση προσθέτουμε 2μl στα δεκτικά κύτταρα.
- Επωάζουμε για 1 λεπτό στον πάγο.
- Μεταφέρουμε όλο το υγρό (δεκτικά και ανασυνδιασμένα πλασμίδια) σε ειδική κυψελίδα.

- Τοποθετούμε την κυβελίδα στην θέση υποδοχής της συσκευής ηλεκτροδιάτρησης οπότε διέρχεται το ρεύμα.
- Προσθέτουμε 700ml θρεπτικού υλικού SOC(20gr. Tryptone, 5gr. Yeast extract, 0,5 NaCl, 20ml glucose 1M) στηκυβελίδα.
- Αναδεύουμε με πιπέτα και μεταφέρουμε όλη τη ποσότητα σε αποστειρωμένο σωλήνα.
- Επωάζουμε στους 37°C στις 180 στροφές για 45 λεπτά.

2.13. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΡΙΒΛΙΩΝ ΥΠΟ ΑΣΗΠΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΛΟΓΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ

Η επιλογή των μετασηματισμένων κλώνων, αυτών δηλαδή που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο, ανασυνδυασμένο ή μη, πραγματοποιείται με την παρουσία του αντιβιοτικού που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο των τρυβλίων. Τα πλασμίδια-φορείς που χρησιμοποιούνται φέρουν: α) ένα τμήμα του DNA της *E.coli* που περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες και την κωδική πληροφορία των πρώτων 146 αμινοξέων του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*) και β) την αλληλουχία του πολυσυνδέτη ενσωματωμένη στο γονίδιο *lacZ*. Εάν το πλασμίδιο δεν έχει ανασυνδυαστεί, το γονίδιο *lacZ* εκφράζεται κανονικά και σε συνδυασμό με τα γονίδια βακτηρίου-ξενιστή επιτρέπει το μεταβολισμό της ουσίας X-gal και της δημιουργίας μπλε αποικιών. Αντίθετα, εάν το πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *lacZ* διακόπτεται, το X-gal δε μεταβολίζεται και ως αποτέλεσμα οι αποικίες που παράγονται έχουν χρώμα λευκό.

Πειραματική διαδικασία:

- Παρασκευάζουμε την επιθυμητή ποσότητα θρεπτικού υλικού LBAgar(10gr. Tryptone, 15gr. agar, 5gr. Yeastextract, 5gr. NaCl) και αποστειρώνουμε.
- Όταν κρυώσει λίγο, προσθέτουμε ίση ποσότητα απ' το αντιβιοτικό αμικικιλίνη, υπό ασηπτικές συνθήκες (φλόγα).
- Στη συνέχεια, τοποθετούμε το LBAgar – αμικικιλίνη στα τριβλία και αφήνουμε να στερεοποιηθεί.
- Προσθέτουμε στην επιθυμητή ποσότητα των μετασηματισμένων κυττάρων μας, 30μl X-gal και 3μl IPTG και επιστρώνουμε τα τριβλία.
- Αφήνουμε τα τριβλία σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσουν και στη συνέχεια, τα τοποθετούμε ανάποδα στον επωαστήρα στους 37°C για 12 – 16 ώρες.
- Ελέγχουμε τα τριβλία για ύπαρξη μπλέ – άσπρων αποικιών.
- Παρασκευάζουμε 50ml LBBroth σε φιάλη και την αποστειρώνουμε. Μόλις κρυώσει, προσθέτουμε 50μl απ' το αντιβιοτικό αμικικιλίνη.

- Μοιράζουμε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα σε αποστειρωμένους και σημασμένους σωλήνες.
- Επιλέγουμε άσπρες αποικίες, υπό ασηπτικές συνθήκες (φλόγα), με οδοντογλυφίδα και τη τοποθετούμε μέσα στον αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Επωάζουμε τους σωλήνες στους 37°C στις 210 στροφές για 12 ώρες έτσι ώστε να πολλαπλασιαστούν τα βακτήρια.

2.14. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA (MiniPreps)

Σκοπός αυτής της μεθόδου είναι η απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση και περιλαμβάνει: α) την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων, β) την τήρηση συνθηκών οι οποίες καταστρέφουν τα διάφορα αποικοδομητικά ένζυμα που απελευθερώνονται κατά την λύση των βακτηριακών κυττάρων και γ) το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό DNA και τις πρωτεΐνες.

Συγκεκριμένα, το GetSolII επιτελεί την αναδιάλυση των βακτηριακών κυττάρων. Το alkali περιέχει SDS το οποίο διαλυτοποιεί τα φωσφολιπίδια ενώ το NaOH καταστρέφει τους δεσμούς της δίκλωνης δομής του DNA και των πρωτεϊνών. Η υψηλή συγκέντρωση των αλάτων στο οξικό κάλιο, προκαλεί την κατακρήμνιση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών, του χρωμοσωμικού DNA και των υπολειμμάτων του κυττάρου ενώ η πλειονότητα του πλασμιδιακού DNA παραμένει διαλυτή και μπορεί να συλλεχθεί μέσω φυγοκέντρωσης του υπερκείμενου, εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Υλικά που χρησιμοποιήσαμε:

- ✓ Διάλυμα Get Sol I
- ✓ Διάλυμα alkali
- ✓ Διάλυμα οξικού καλίου
- ✓ 70% αιθανόλη
- ✓ TE-RNase

Πειραματική διαδικασία:

- Αναδεύουμε ήπια τους σωλήνες με την καλλιέργεια.
- Μεταφέρουμε 1,5ml απ' τη καλλιέργεια σε eppendorf.
- Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτά σε 12.000g και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
- Προσθέτουμε 100μl απ' το διάλυμα Getsol I (50mM glucose, 25mM TrisCl, 10mM EDTA) και αναδεύουμε με Vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.

- Τοποθετούμε τα erpendorf στον πάγο και προσθέτουμε στο καθένα 200μl διαλύματος alkali (0,2 NNaOH, 1% SDS) και ανακινούμε αργά. Το alkali προκαλεί τη λύση.
- Προσθέτουμε 150μλοξικό κάλιο (5M potassium acetate 60ml, glacialacetic acid 11,5ml, H₂O 28,5ml) για να σταματήσει η λύση των κυττάρων.
- Ανακινούμε δυνατά και αφήνουμε τα erpendorf για 5 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκεντρούμε σε 12.000g για 5 λεπτά.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σημασμένοerpendorf.
- Ακολουθεί κατακρήμνιση και επαναδιαλύουμε το πλασμιδιακόDNA σε 50μlTE – RNase (υποβοηθούμε με παρατεταμένο Vortex).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

1. Απομόνωση DNA και ενίσχυση τριών γενετικών τόπων.

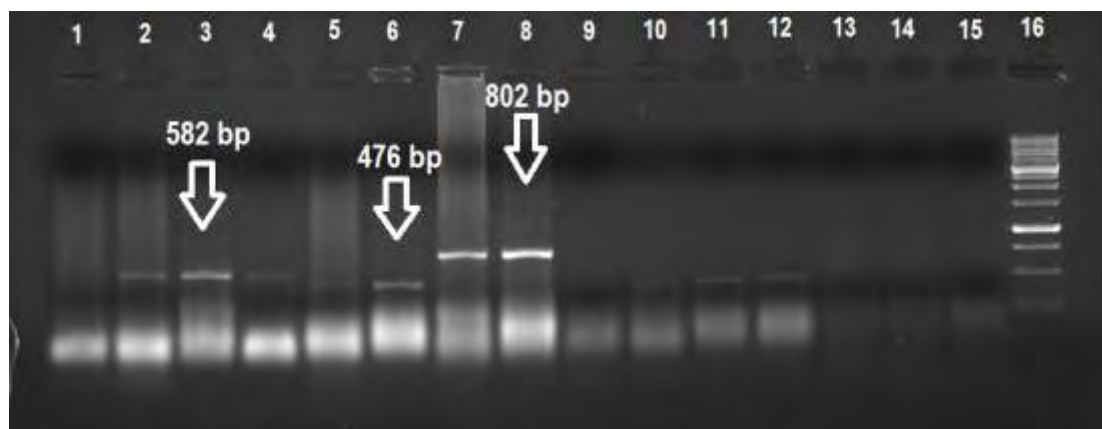
Συλλέχθηκαν υγιή φύλλα από την κάθε ποικιλία και ακολούθησε εξαγωγή του DNA σύμφωνα με τη μέθοδο CTAB (Busconi et al., 2003). Με 2μl απ' το κάθε DNA πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση τριών ζευγών εκκινητών, που ενίσχυσαν το καθένα συγκεκριμένα τμήματα του DNA (Πίνακας 3.1).

| Όνομασία εκκινητή | Αλληλουχία εκκινητή | Αναμενόμενο προϊόν |
|-------------------|-------------------------------|--------------------|
| CbpF | CACGGACAGGAATTCCAAGCCTTCA | 476bp |
| CbpR | TGCCGCTTTTGTTCGTCATCATTTTCT | |
| AntF | GCCCAGCAACAAGTGAGTATGCAAAAC | 582bp |
| AntR | AACCCAATTTTCAACTCATTTTCTTCACC | |
| CyclF | GCCCATTTCAGATTGCAC | 802bp |
| CyclR | GGGATTCTCAGGTCAGGA | |

Πίνακας 3.1.: Τα τρία ζευγάρια εκκινητών (Forward and Reverse) που χρησιμοποιήθηκαν, οι αντίστοιχες αλληλουχίες τους, καθώς και το αναμενόμενο προϊόν.

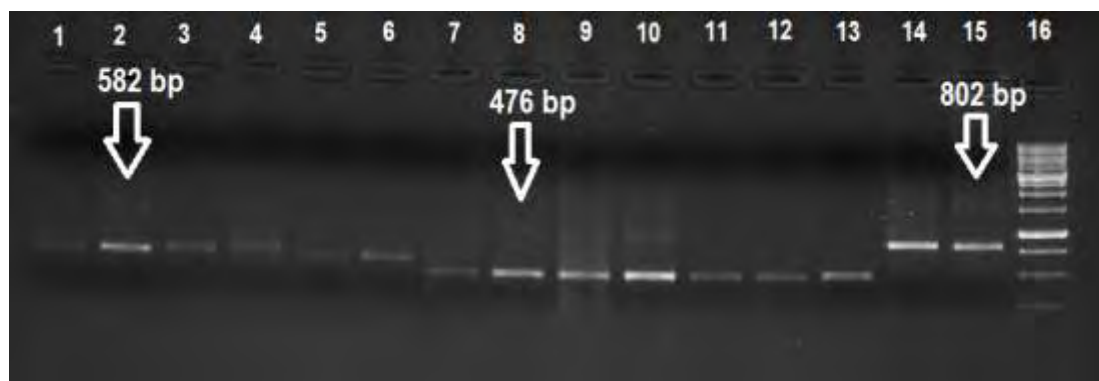
Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

Στις φωτογραφίες παρατηρούνται οι επιθυμητές ζώνες του DNA που εμφανίζονται κατά την υποβολή του gel σε λάμπες φθορισμού με UV ακτινοβολία. Στην παρακάτω ενδεικτική φωτογραφία (Εικόνα 3.1.) φαίνονται τα προϊόντα της PCR από διάφορα δείγματα, καθώς και το μέγεθος των ζωνών ενίσχυσης.



Εικόνα 3.1.: Ενίσχυση των γενετικών τόπων Ant, Cbp, Cycl και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε gel αγαρόζης 1%. 1)Κορωνέικη Ant. 2)Μεγάρων Ant. 3)Χονδρολιά Ant. 4)Χαλκιδικής Ant. 5)Κορωνέικη Cbp. 6)Χονδρολιά Cbp. 7)Κορωνέικη Cycl. 8)Χονδρολιά Cycl. 16) ladder.

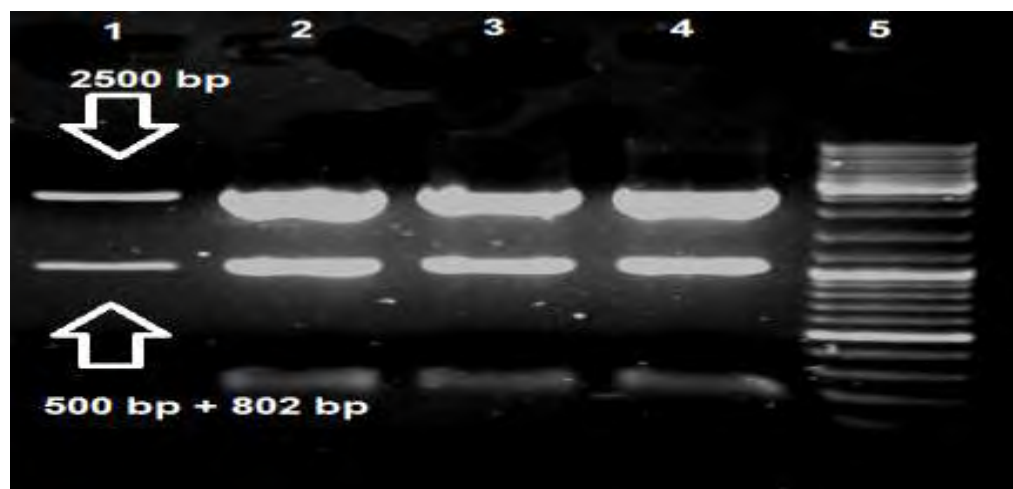
Όπως φαίνεται, το ύψος της ζώνης αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος, σύμφωνα με το ζευγάρι εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε σε κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, οι ζώνες του DNA απομονώθηκαν από το πήκτωμα της αγαρόζης. Όπου η ποσότητα του ενισχυμένου DNA δεν επαρκούσε για τις περαιτέρω διεργασίες, ακολούθησε επαναληπτική PCR (re-PCR). Στην παρακάτω φωτογραφία (Εικόνα 3.2.) φαίνονται τα αποτελέσματα της re-PCR από κάποια ενδεικτικά δείγματα.



Εικόνα 3.2.: Ενίσχυση των γενετικών τόπων Ant, Cbp, Cycl και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της re-PCR σε gel αγαρόζης 1%. 1)Αμφίσησης Ant. 2)ΜανάκιAnt. 3)Χαλκιδικής Ant. 4)Χονδρολιά Ant. 5)Κορωνέικη Ant. 6)Μεγάρων Ant. 7)Καλαμών Cbp. 8)Κορωνέικη Cbp. 9)Αμφίσησης Cbp. 10)Χονδρολιά Cbp. 11)Μεγάρων Cbp. 12)Χαλκιδικής Cbp. 13)Μανάκι Cbp. 14)Μανάκι Cycl. 15)Χονδρολιά Cycl. 16)ladder.

2. Κλωνοποίηση προϊόντων ενίσχυσης

Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα προϊόντα ενίσχυσης εισήχθησαν μέσω της αντίδρασης σύνδεσης (ligation) σε φορέα pBlueScriptII με άκρα θυμίνης. Έπειτα πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση και έγινε διάκριση των μετασχηματισμένων και ανασυνδυασμένων κλώνων με βάση το χρώμα των αποικιών. Απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA από τις αποικίες και ακολούθησε πέψη με το ένζυμο περιορισμού PvuII. Στην ηλεκτροφόρηση της πέψης παρατηρούνται τα επιθυμητά αποτελέσματα. Δηλαδή, μια ζώνη 2.500bp που αντιστοιχεί στο φορέα και μια ζώνη 500bp μαζί με το μέγεθος του ενθέματος (Εικόνα 3.3.).



3.3.: Επιβεβαίωση της κλωνοποίησης Cycl με πέψη των δειγμάτων με ένζυμο PvuII και ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1%. 1)Μεγάρων Cycl.4)Χαλκιδικής Cycl. 5)ladder.

3. Φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών

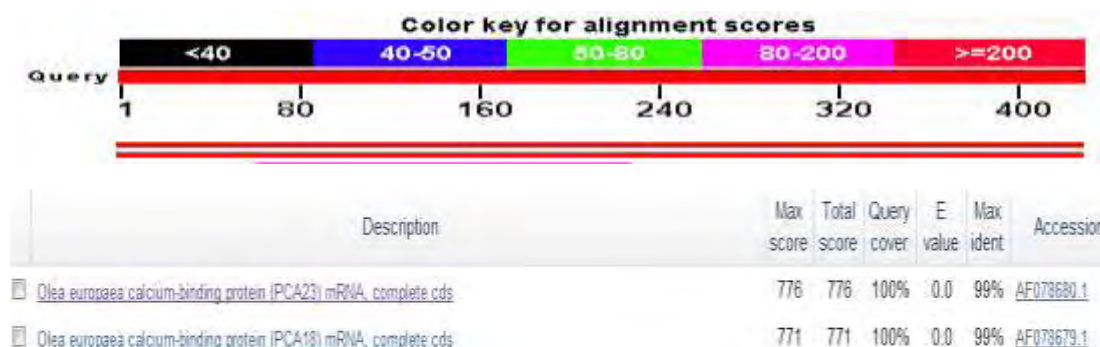
Τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση (συγκέντρωση 50ng/μl) και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με προγράμματα βιοπληροφορικής. Στις περιπτώσεις ετεροζυγωτίας που παρουσιάστηκαν και στους δυο γενετικούς τόπους τα νουκλεοτίδια αντικαταστάθηκαν με αρχικά σύμφωνα με τον κώδικα IUPAC.

Παρακάτω (Πίνακας 3.2.) συνοψίζονται σε έναν πίνακα οι ποικιλίες και τα αντίστοιχα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και ενίσχυσαν το επιθυμητό γονίδιο στην κάθε ποικιλία.

| Όνομα ποικιλίας | Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν |
|-----------------|--------------------------------|
| Αμφίσσης | Cbp |
| Αμφίσσης | Cycl |
| Καλαμών | Cbp |
| Καλαμών | Cycl |
| Μεγάρων | Cbp |
| Μεγάρων | Cycl |
| Χαλκιδικής | Cbp |
| Χαλκιδικής | Cycl |
| Κορωνέικη | Cbp |
| Κορωνέικη | Cycl |
| Χονδρολιά | Cycl |

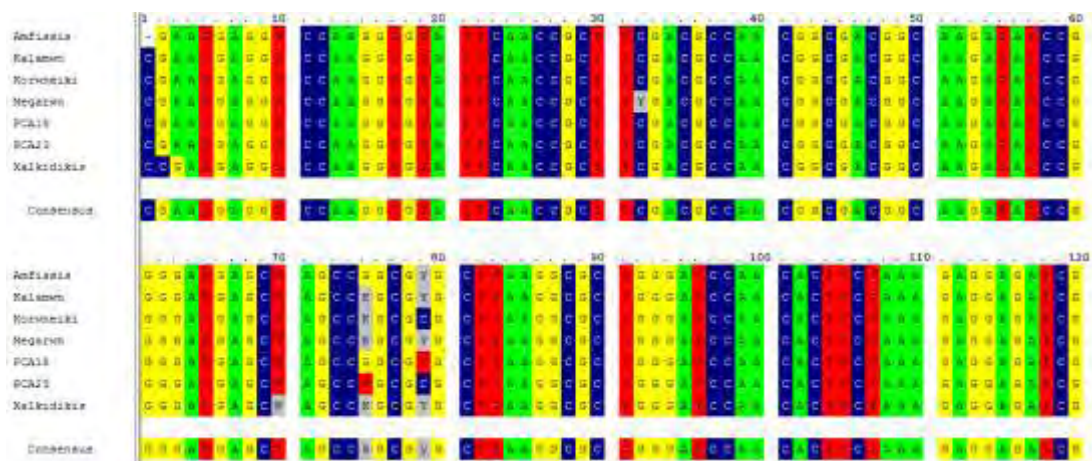
Πίνακας 3.2.: Όλες οι ποικιλίες και τα αντίστοιχα ζευγάρια εκκινητών που αναλύονται στην εργασία.

Για το ζεύγος εκκινητών Cbp ενισχύθηκε κομμάτι 476 bp για τις ποικιλίες Αμφίσσης, Καλαμών, Μεγάρων, Χαλκιδικής και Κορωνέικη. Αρχικά μέσω του προγράμματος Blast επιβεβαιώθηκε η ενίσχυση του γονιδίου Cbp (Εικόνα 3.4.) με μέγιστη ταυτοποίηση (Max ident) 99% με δύο άλλες γνωστές αλληλουχίες (PCA23 και PCA18). Αυτές οι αλληλουχίες προέκυψαν από τη βάση δεδομένων του NCBI (National Center for Biotechnology Information), με σκοπό να βοηθήσουν στην σύγκριση των αλληλουχιών.



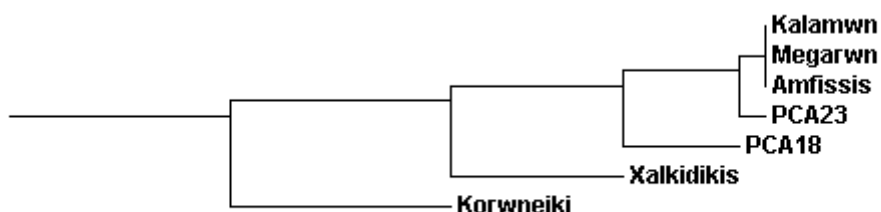
Εικόνα 3.4.: Επιβεβαίωση της ενίσχυσης του γονιδίου Cbp στις παραπάνω ποικιλίες, με ομοιότητα 99%.

Στη συνέχεια μέσω του προγράμματος Omiga πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση των αλληλουχιών ώστε να εντοπιστούν πολυμορφισμοί. Στην Εικόνα 3.5. παρουσιάζεται ένα ενδεικτικό κομμάτι της ομοπαράθεσης (Παράρτημα).



Εικόνα 3.5.: Σύγκριση των αλληλουχιών των παραπάνω ποικιλιών με δύο ήδη γνωστές αλληλουχίες (PCA18, PCA23).

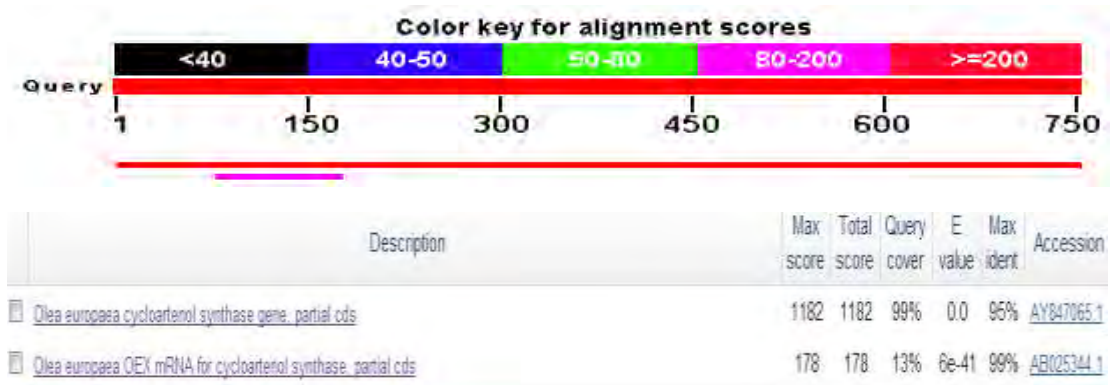
Μέσω του προγράμματος ClustalW κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 3.6.) στο οποίο ομαδοποιήθηκαν οι ποικιλίες ανάλογα με τις γενετικές αποστάσεις που παρουσιάζουν στο συγκεκριμένο γενετικό τόπο.



Εικόνα 3.6.: Φυλογενετικό δέντρο. Ομαδοποίηση των ποικιλιών με βάση τις γενετικές αποστάσεις που παρουσιάζουν στο συγκεκριμένο γενετικό τόπο (Cbp–Calcium Binding Protein).

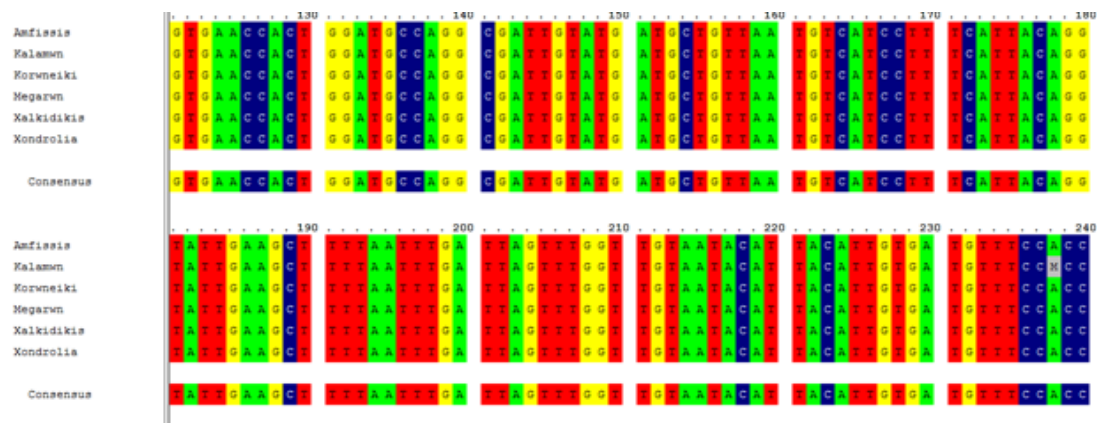
Για το ζεύγος εκκινητών *Cycl* ενισχύθηκε κομμάτι 802 bp για τις ποικιλίες Αμφίσσης, Καλαμών, Μεγάρων, Χαλκιδικής, Κορωνέικη και Χονδρολιά.

Όπως και με το προηγούμενο ζεύγος εκκινητών επιβεβαιώθηκε μέσω του προγράμματος Blast η ενίσχυση του γονιδίου *Cycl* (Εικόνα 3.7.) με μέγιστη ταυτοποίηση (Max ident) 95% με μια άλλη γνωστή αλληλουχία (*Olea europaea*). Αυτή η αλληλουχία προέκυψε από τη βάση δεδομένων του NCBI (National Center for Biotechnology Information), με σκοπό να βοηθήσει στην σύγκριση των αλληλουχιών.



Εικόνα 3.7.: Επιβεβαίωση της ενίσχυσης του γονιδίου στις παραπάνω ποικιλίες με ομοιότητα 95%.

Στη συνέχεια μέσω του προγράμματος Ompiga πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση των αλληλουχιών ώστε να εντοπιστούν πολυμορφισμοί. Στην Εικόνα 3.8. παρουσιάζεται ένα ενδεικτικό κομμάτι της ομοπαράθεσης (Παράρτημα).



Εικόνα 3.8.: Σύγκριση των αλληλουχιών των παραπάνω ποικιλιών με μια ήδη γνωστή αλληλουχία (*Olea europaea*).

Μέσω του προγράμματος ClustalW κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 3.9.) στο οποίο ομαδοποιήθηκαν οι ποικιλίες ανάλογα με τις γενετικές αποστάσεις που παρουσιάζουν στο συγκεκριμένο γενετικό τόπο.



Εικόνα 3.9.: Φυλογενετικό δέντρο. Ομαδοποίηση των ποικιλιών με βάση τις γενετικές αποστάσεις που παρουσιάζουν στο συγκεκριμένο γενετικό τόπο (Cycl – Cycloartenol synthase).

Για το ζεύγος εκκινητών Ant ενισχύθηκε κομμάτι 582 bp για μόνο τρεις απ' τις παραπάνω ποικιλίες (Αμφίσσης, Καλαμών, Κορωνέικη), με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η κατασκευή αντίστοιχων δέντρων για σύγκριση. Πιθανή αιτία μη ενίσχυσης ορισμένων ποικιλιών είναι η ύπαρξη πολυμορφισμού στην περιοχή των εκκινητών στις ποικιλίες αυτές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ελιά καλλιεργείται από τους αρχαίους χρόνους για τα πολύτιμα προϊόντα της, το ελαιόλαδο και τις βρώσιμες ελιές, που αποτελούν βασικά είδη διατροφής του ανθρώπου. Από το στάδιο της αγριελιάς, πέρασε γρήγορα μέσω του υβριδισμού στην ήμερη μορφή της. Αυτά τα χαρακτηριστικά της, την βοήθησαν να προσαρμοστεί σε διάφορες περιοχές και να αναπτύξει πλήθος ποικιλιών. Η διάκριση και ταξινόμηση όλων αυτών των ποικιλιών στηρίζεται στην περιγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών του δέντρου, όπως το μέγεθος και η μορφή του, στην περιγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών του πυρήνα και του καρπού και στην περιγραφή των φύλλων και των ανθέων.

Οι Williams et al (1990), Welsh, McClelland (1990) and Newbury, Ford-Lloyd (1993) περιέγραψαν τους μοριακούς δείκτες RAPDs οι οποίοι απέδειξαν ότι είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για γενετική ταυτοποίηση. Αυτοί ανέφεραν ότι η μέθοδος των RAPDs είναι ανεξάρτητη από περιβαλλοντικές συνθήκες και παρουσιάζει μεγαλύτερο βαθμό πολυμορφισμού (Ozkaya et al., 2004). Οι Gemas et al (2000) στη μελέτη για τις φυλογενετικές σχέσεις αλλά και για την παραλλακτικότητα τριών ελαιοποιήσιμων Πορτογαλικών ποικιλιών, κατέληξαν στο ότι η τεχνική των RAPD εκκινήτων αποτελεί ένα χρήσιμο όργανο για την ανάλυση του γενετικού υλικού, καθώς αυτή η μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύσει τις σχέσεις μεταξύ των ποικιλιών, χρησιμοποιώντας ένα πολύ περιορισμένο αριθμό δειγμάτων. Εμείς χρησιμοποιήσαμε μια άλλη μέθοδο, τα SNPs, ενισχύοντας μέσω PCR τρεις διαφορετικούς γενετικούς τόπους και συγκρίναμε τους μεταξύ τους πολυμορφισμούς.

Για το γενετικό τόπο Cbr η ομοπαράθεση των αλληλουχιών παρουσιάζει πολυμορφισμούς. Συγκεκριμένα, οι ποικιλίες Κορωνέικη, PCA23 και PCA18 έχουν από 2 SNPs η κάθε μια. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα στο φυλογενετικό δέντρο, ομαδοποιούνται οι ποικιλίες Καλαμών, Αμφίσσης και Μεγάρων, ενώ οι ποικιλίες Χαλκιδικής και Κορωνέικης είναι γενετικά απομακρυσμένες από τις υπόλοιπες αλλά και μεταξύ τους.

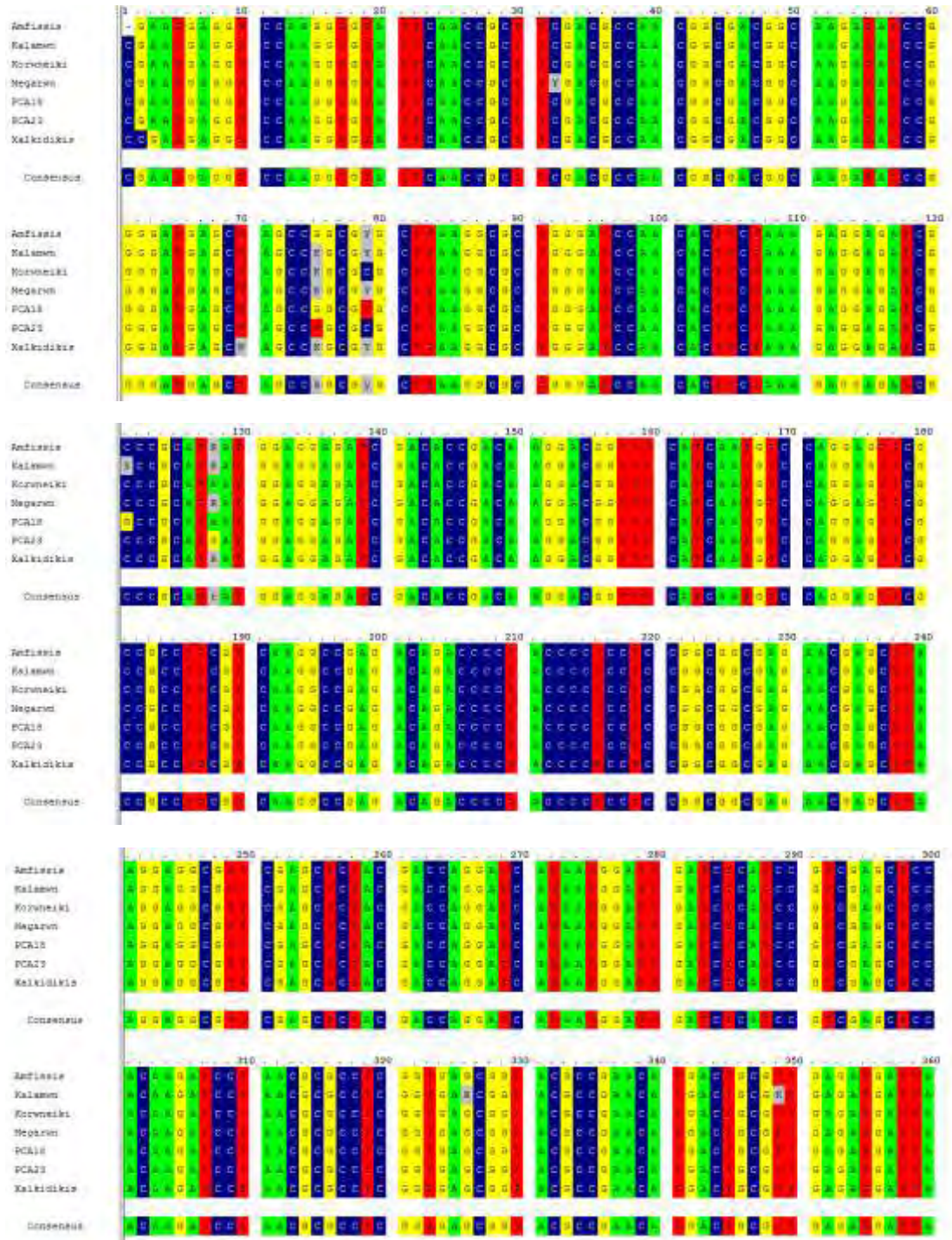
Για το γενετικό τόπο Cyl η ομοπαράθεση των αλληλουχιών παρουσιάζει πολυμορφισμούς. Συγκεκριμένα, η ποικιλία Χαλκιδικής έχει 10 SNPs, η Μεγάρων 3 SNPs, η Χονδρολιά 1 SNP και οι ποικιλίες Κορωνέικη και Καλαμών από 2 SNPs. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα στο φυλογενετικό δέντρο, ομαδοποιούνται οι ποικιλίες Αμφίσσης, Καλαμών και οι ποικιλίες Μεγάρων, Χονδρολιά, Κορωνέικη και *Olea europaea*. Ενώ η ποικιλία Χαλκιδικής είναι και εδώ γενετικά απομακρυσμένη από τις υπόλοιπες, όπως και στον προηγούμενο γενετικό τόπο.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των ποικιλιών Μεγάρων και Κορωνέικης. Η ποικιλία Μεγάρων ενώ για τον γενετικό τόπο Cbr ομαδοποιείται με τις ποικιλίες Καλαμών και Αμφίσσης, στο γενετικό τόπο Cyl απέχει σημαντικά από αυτές. Η ποικιλία Κορωνέικη ενώ στο γενετικό τόπο Cyl βρίσκεται κοντά με την ποικιλία Μεγάρων, στο γενετικό τόπο Cbr ομαδοποιείται χωριστά από τις άλλες ποικιλίες έχοντας μεγάλη γενετική απόσταση.

Σαφώς χρειάζεται η ανάλυση περισσότερων ποικιλιών ελιάς καθώς και η ανάλυση περισσότερων δειγμάτων από τις ίδιες ποικιλίες (επανάληψη δειγμάτων). Ακόμη, αναγκαία είναι και η ανάλυση περισσότερων γενετικών τόπων. Το γενικό συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι οι γενετικοί τόποι που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία, παρουσιάζουν πολυμορφισμούς, οι οποίοι θα μπορούσαν να αποτελέσουν την βάση για την ανάπτυξη μοριακών διαγνωστικών για το διαχωρισμό ποικιλιών στο μέλλον.

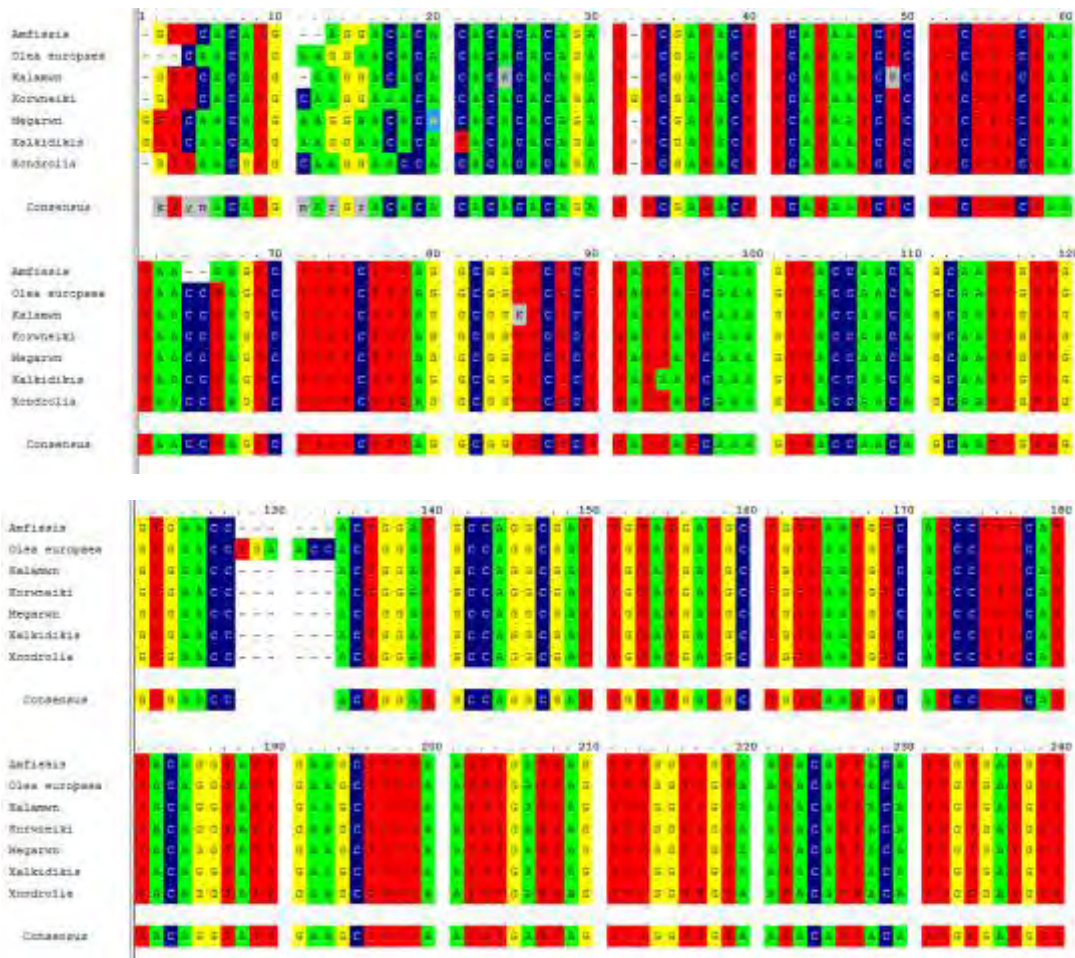
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

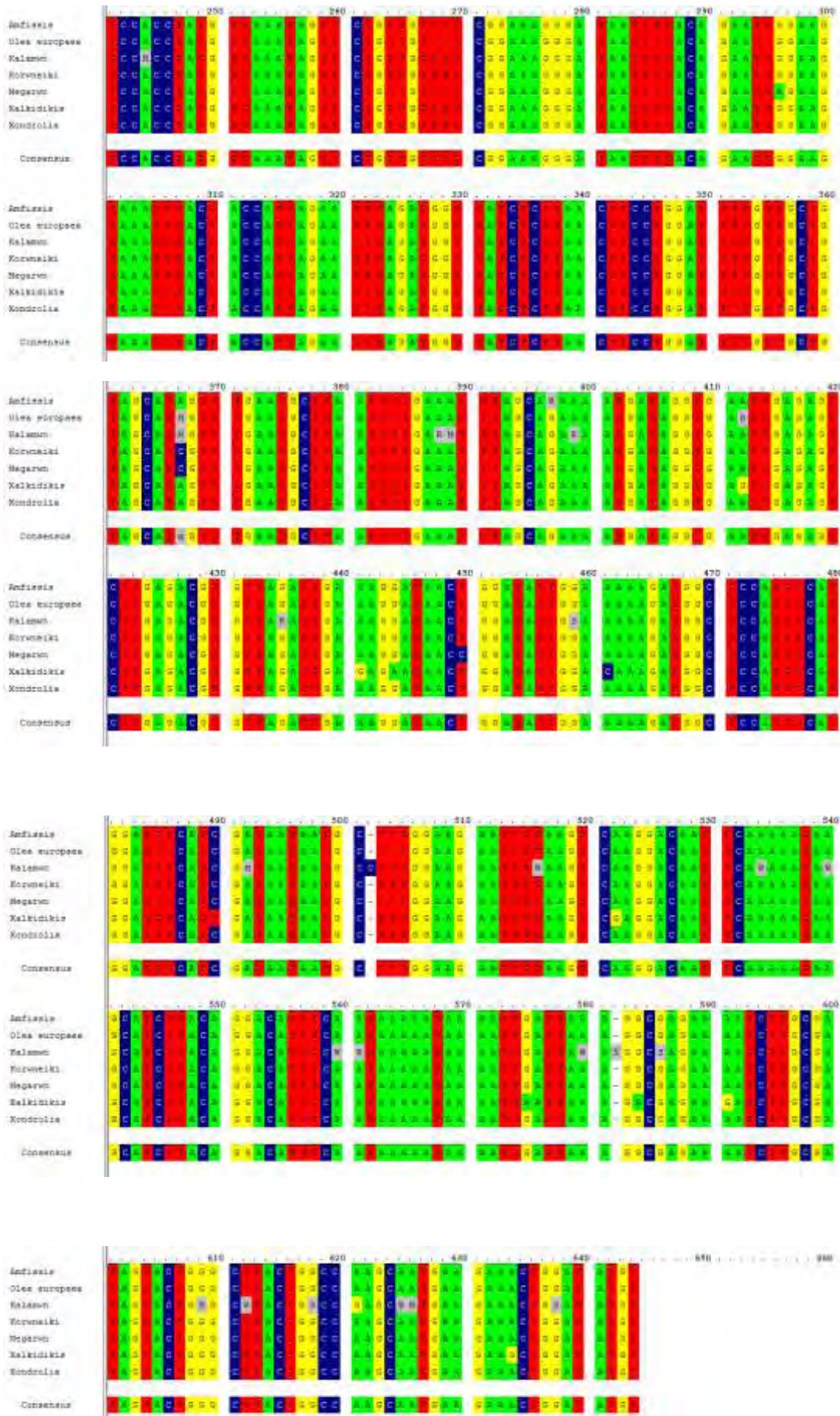
Ομοπαράθεση αλληλουχιών για τον γενετικό τόπο Cbr, μέσω του προγράμματος Omiga.





Ομοπαράθεση αλληλουχιών για τον γενετικό τύπο CysI, μέσω του προγράμματος Omiga.





ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία:

- Αθανασιάδης, Ν.Η. 1986. Δασική βοτανική ΙΙ. Εκδόσεις Γιαχούδι-Γιαπούλη. Θεσσαλονίκη.
- Αναγνωστόπουλος Π., 1939. Αι ποικιλίαι και η οικολογία της ελληνικής ελαιάς. Εκδόσεις Λαμπρόπουλος. Αθήνα.
- Γρηγοριάδου, Α.Κ. 2003. Μελέτη της in vitro αναπαραγωγής ελληνικών ποικιλιών ελιάς. Θεσσαλονίκη.
- Κωστελένος Δ. Γεώργιος, Ιανουάριος 2011. Στοιχεία ελαιοκομίας.
- Μπαλατσούρας Γ.Δ., 1995. Η επιτραπέζια ελιά (ποικιλίες-χημική σύσταση-ποιοτικά χαρακτηριστικά). Β Έκδοση. Εκδόσεις Πελεκάνος. Αθήνα.
- Σίρκου, Δ. 2009. Αξιολόγηση των αντιδράσεων ξυλώδων ειδών στη βόσκηση με μεθόδους μορφομετρικής και γενετικής ανάλυσης. Θεσσαλονίκη.
- Στεφανάκη-Νικηφοράκη Μ., 1999. Συστηματική βοτανική. Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα.
- Adriano Del Fabro, 2009. Η ελιά. Εκδόσεις Ψυχαλού. Αθήνα.
- Fooks, R. 1998. Το βιβλίο της ελιάς. Εκδόσεις Ψυχαλού. Αθήνα.

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία:

- Bandelj D, Jakše J, Javornik B (2002) DNA fingerprinting of olive varieties by microsatellite markers. Food Technol Biotech 40: 185- 190
- Bartolucci, P. and B.R. Dhakal., 1999. Prospects for olive growing in Nepal.
- Bebeli, P.J. and Kaltsikes P.J.,1993. New developments in varietal identification. In: Seed Science and Technology, Ed.: A.J.G. van Gastel, M.A. Pagnotta and E. Porceddu. ICCARDA, pp: 161-172.

- Botstein D., K.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Bretting P.K. and Widrechner M.P., 1995. Genetic markers and plant genetic resource management. In: *Plant Breeding Reviews*, Ed: Jules Janink John Wiley & Sons. Inc, 13, pp: 11-86.
- Cantini C., A. Cimato & G. Sani, 1999. Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. *Euphytica.* 109: 173-181.
- Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. (1988). High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145.
- Doyle J.J. and Doyle J.L., 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19, 11-15.
- Fanourakis N., H. Pavlikaki and C.P. Navarro, 2004. Genetic relationships of different Greek landraces of cucumber. *Euphytica Plant breeding* 136: 143-147.
- Frascaroli E., Schrag T.A., Melchinger A.E., 2012. Genetic diversity analysis of elite European maize (*Zea mays* L.) inbred lines using AFLP, SSR, and SNP markers reveals ascertainment bias for a subset of SNPs. *TheorAppl Genet.* DOI 10.1007/s00122-012-1968-6.
- Frohman M.A., Dush M.K. & Martin G.R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 8998±9002.
- Gemas V.J.V., Rijo-Johansen M.J., Tenreiro R. and Feveiro P., 2000, *Inter- and intra-varietal analysis of tree Oleaeuropaea L. cultivars using the RAPD technique.* *J. Hort&Biotech*, 75 (3): 312-319.

- Hamrick J.L., Godt M.J.W. and Sherman – Broyles S.L., 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95-124.
- Hearne C.M., Ghosh S. and Todd J.A., 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.* 1992 (8): 288-94.
- Landegren U., Nilsson M., Kwok P.-Y., 1998. Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphisms analysis. *Genome Res.* 8: 769-776.
- Liphshitz, N., R. Gophna, M. Hartman and G. Biger 1991. The beginning of olive (*OleaEuropaea*) cultivation in the Old World: a reassessment.
- Mataix, J. and F.J. Barbancho, 2006. Olive oil in Mediterranean Food.
- Matteo Busconi, Chiara Foroni, Massimiliano Corradi, Cristina Bongiorni, Federica Cattapan, Corrado Fogher, 2003. DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar.
- Mulas, M. 1999. Characterization of olive wild ecotypes.
- Nakbi Amel, Tayeb Wafa, Grissa Abir, IssaouiManel, Dabbou Samia, Chargui Issam, Ellouz Meriem, Miled Abdelhedi, Hammami Mohamed, 2010. Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats.
- Neumann E., Schaefer – Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1: 841-845.
- Newbury, H.J. and B.V. Ford-Lloyd, 1993. The use of RAPD for assessing variations in plants *Plant Growth Reg.* 12: 43-51.

- Ozkaya M.T., Ergulen E., Ulger S., Ozilbey N., 2004. Genetic and Biologic characterization of Some Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars Grown in Turkey. *Journal of Agricultural Sciences*. 10 (2): 231-236.
- Patterson H.D. and Weatherup S.T.C., 1984. Statistical criteria for distinctness between varieties of herbage crops. *J. agric. Sci., Camb.*, 102: 59-68.
- Purves W.K., Sadava D., Orians G.H., Heller H.C., 2001. *Life: The Science of Biology* – 6th ed. Sinauer Associates. Pp.316-317.
- Rafalski A., 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol* 5:94–100.
- Ramirez-Soriano A., Nielsen R., 2009. Correcting estimators of and Tajima's D for ascertainment biases caused by the single-nucleotide polymorphism discovery process. *Genetics* 181:701–710.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. *Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. 4839 pp.487-491.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York, USA.
- Seeb J.E., Carvalho G., Hauser L., Naish K., Roberts S., Seeb L.W., 2011. Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in non-model organisms. *MolEcol Res* 11(Suppl 1):1–8.
- Therios I., 2009. *Olives. Crop production science in horticulture*. Thessaloniki.
- Trujillo I., L. Rallo and P. Arus, 1995. Identifying olive cultivars by isoenzyme analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 120: 318-324.

- Vignal A., Milan D., San Cristobal M., Eggen A., 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34 (2002) 275-305.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.
- Welsh, J. and M. McClelland, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Williams J.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Zohary, D. 1995. Olive. *Olea europaea* (Oleaceae). In: Smartt J, Simmonds NW. *Evolution of crop plants*, 2ndedn. Longman, London.

Ιστοσελίδες:

- www.agrocert.gr Οργανισμός Πιστοποίησης & Επίβλεψης Γεωργικών Προϊόντων.
- www.Agro-Help.com
- www.wikipedia.org
- www.karpea.gr
- www.elia-diktyo.gr
- www.elies-ladikalamatiano.gr

- IOOC: International Olive Oil Council: Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου.
- Σ.Ε.ΒΙ.Τ.ΕΛ.: Σύνδεσμος Ελληνικών Βιομηχανιών Τυποποίησης Ελαιολάδου.
- ec.europa.eu:DOOR.
- www.minagric.gr: Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.