

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»



**Πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) σε
ποικιλίες ελιάς.**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΓΙΟΒΑΝΟΥΛΗΣ

2012

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Κ. Ματθιόπουλος Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Κ.Παπαδοπούλου Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Θ.Σαραφίδου Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΗΡΙΑ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του, το ενδιαφέρον του και τις παρατηρήσεις του τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συναδέλφους μου στο εργαστήριο της Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας στο πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, όπου και διεκπεραίωσα την εργασία μου.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη αν ξεχνούσα να ευχαριστήσω τα προσφιλή μου πρόσωπα, την οικογένεια και τους φίλους μου για τη στήριξη που μου παρείχαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Abstract	5
Περίληψη	6
1. Εισαγωγή	8
1.1 Καταγωγή και εξάπλωση της ελιάς.....	8
1.2 Η ελιά και τα είδη της.....	9
1.3 Ελαιοκαλλιέργεια.....	12
1.4 Η συγκομιδή της ελιάς.....	13
1.5 Οι ευεργετικές δράσεις του ελαιοκάρπου.....	14
1.6 Χημική σύσταση ελαιοκάρπου.....	15
1.7 Χημική σύσταση ελαιόλαδου.....	16
1.8 Περιγραφή ποικιλιών ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	17
1.9 Ποικιλομορφία και γενετική παραλλακτικότητα της ελιάς.....	22
1.10 Ταυτοποίηση της ελιάς.....	23
1.11 Μοριακοί δείκτες SNPs (single-nucleotide polymorphism).....	24
1.12 Γενετικές αποστάσεις.....	25
1.13 Φαινόμενο ετεροζυγωτίας.....	25
Σκοπός	27
2. Υλικά και Μέθοδοι	28
2.1 Φυτικό υλικό.....	28
2.2 Συσκευές.....	28
2.3 TE buffer.....	29
2.4 TBE 5x.....	29

2.5 Διάλυμα φόρτωσης (<i>Loading buffer</i>) 10X.....	30
2.6 Μάρτυρας DNA (<i>Ladder</i>).....	30
2.7 EtBr (βρωμιούχο αιθίδιο).....	30
2.8 Εξαγωγή DNA από καρπό ελιάς.....	31
2.9 Καθαρισμός DNA (κατακρήμνιση με αιθανόλη).....	32
2.10 DNA template.....	32
2.11 Ρυθμιστικά διαλύματα (<i>buffers</i>).....	32
2.12 MgCl ₂	33
2.13 dNTPs.....	33
2.14 Primers.....	33
2.15 Taq DNA πολυμεράση.....	34
2.16 PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).....	34
2.17 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	37
2.18 Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	39
2.19 Συστήματα βιο-πληροφοριακής επεξεργασίας.....	40
3. Αποτελέσματα – Επεξεργασία	41
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα	57
4.1 Συζήτηση.....	57
4.2 Συμπεράσματα.....	58
Παράρτημα	60
Βιβλιογραφία	76

ABSTRACT

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) have become the most widely used markers in many current genetic applications. Here we report the discovery of SNPs in olives by direct partial sequencing of four genes (Calcium-binding protein, Anthocyanidin synthase, Cycloartenol synthase, Chalcone synthase) in six Greek cultivars. To minimize false positives due to sequencing artefacts, potential SNPs were re-sequenced in the opposite direction. Genetic relationships of the 6 olive samples based on their genotype using polymorphic markers were tested with Omiga and Clustalw analysis and the simple matching similarity coefficient. The high level of SNPs found in olive genes suggests that only a small number of cultivars are required for effective SNP identification.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο παρόν πείραμα μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου, SNPs (Single nucleotide Polymorphisms), σε Ελληνικές ποικιλίες ελιάς. Οι ποικιλίες ελιάς που έλαβαν μέρος στην πειραματική διαδικασία ήταν οι επιτραπέζιες (ή βρώσιμες) ποικιλίες 'Αμφίσης' και 'Καλαμών', οι ελαιοποιήσιμες 'Κολοβές' και οι διπλής χρήσης ποικιλίες 'Χαλκιδικής' και 'Μεγάρων'. Επίσης εξετάστηκε δείγμα ελιάς από την περιοχή του Πηλίου που βιβλιογραφικά αναφέρεται να ανήκει στην ποικιλία 'Αμφίσης' λόγω της ευρείας κυριάρχησης της στην ευρύτερη περιοχή της κεντρικής Ελλάδας. Η διαπίστωση τέθηκε υπό αμφισβήτηση και επέδειξε το πρόβλημα των ομωνύμων ποικιλιών ελιάς.

Υγιείς καρποί από το δέντρο της ελιάς συλλέχτηκαν από κάθε ποικιλία και απομονώθηκε το DNA με τη μέθοδο CTAB (Busconi *et al.*, 2003). Η μοριακή ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τέσσερα διαφορετικά ζευγάρια SNPs εκκινητών και τα προϊόντα τους από τη μέθοδο της Polymerase Chain Reaction (PCR) διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v παρουσία διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τα συστήματα βιοπληροφορικής Omiga, ChromasLite, Blast nucleotide (NCBI) και τέλος με το ClustalW, όπου και δημιουργήθηκαν δεντρογράμματα.

Οι μοριακοί δείκτες πολυμορφισμού που χρησιμοποιήθηκαν, επέδειξαν ικανοποιητικό αριθμό πολυμορφικών ζωνών με συνέπεια να καταστεί εφικτός ο γονοτυπικός διαχωρισμός των δειγμάτων. Πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των ποικιλιών ελιάς που έδωσαν αποτελέσματα αλληλούχισης και σύγκριση με ξένα είδη ελιάς από τη βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Στο πρώτο κομμάτι που ενισχύθηκε της Anthocyanidin synthase (Ant) έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα πολυμορφισμού για τρεις Ελληνικές ποικιλίες (Αμφίσης, Καλαμών, Πηλίου) ελιάς στις 582 βάσεις. Και οι τρεις διαχωρίστηκαν από την ισπανική ποικιλία Μανζανίλο με 8 SNPs, καθώς και μεταξύ τους με 6 SNPs και αρκετές περιπτώσεις ετεροζυγωτίας. Η βιβλιογραφική πληροφορία που θέλει την ποικιλία της Αμφίσης να είναι πιο κοντά φυλογενετικά στη Μανζανίλο σε σχέση με τις υπόλοιπες Ελληνικές ποικιλίες επιβεβαιώθηκε. Διαχωρισμός όλων επετεύχθη και σε σχέση με ένα είδος θάμνου συγγενικό με την οικογένεια του δέντρου της ελιάς.

Στο κομμάτι του Calcium Binding Protein (Cbp) προέκυψαν αποτελέσματα πολυμορφισμού για τέσσερις ποικιλίες (Αμφίσης, Χαλκιδικής, Μεγάρων, Καλαμών) στις 476 βάσεις. Με τη σύγκριση στα συστήματα βιοπληροφορικής είχαμε τη δημιουργία τριών πιο κοινών ζευγαριών Καλαμών-Χαλκιδικής, Αμφίσης-Μεγάρων και του ζευγαριού PCA18-PCA23 που αφορά ποικιλία της *Olea Europaea* και μας υποδείχτηκε λόγω μεγάλου ποσοστού ομοιότητας από τη βάση δεδομένων.

Τέλος στο κομμάτι του Cycloartenol synthase (Cycl) αφορούσε 802 βάσεις είχαμε ξεκάθαρα αποτελέσματα πολυμορφισμού μόνο για τις ποικιλίες Καλαμών και Αμφίσσης με 9 SNPs συνολικά. Συγκρίθηκαν και διαχωρίστηκαν με μια ποικιλία ελιάς από την Πορτογαλία γνωστή ως Cordovil de Serra. Η μέθοδος της PCR δεν επέδωσε αποτελέσματα ικανά για επεξεργασία για το ζευγάρι εκκινητών της Chalcone synthase (Chs).

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καταγωγή και εξάπλωση της ελιάς

Εδώ και χιλιάδες χρόνια η ελιά και ο καρπός της «ζει» στην περιοχή της Μεσογείου. Η ελιά είναι ένα από τα λίγα δέντρα που είναι αυτοφυόμενα στην μεσανατολική περιοχή και σε όλο το φάσμα της μεσογειακής λεκάνης. Η ελιά με την πάροδο των χρόνων κατάφερε να διαδοθεί και σε πολλές άλλες περιοχές της υφηγίου με εδαφολογικές και κλιματολογικές συνθήκες ανάλογες με εκείνες του μεσογειακού χώρου. Εξελίχθηκε περισσότερο δια μέσου του αγενούς πολλαπλασιασμού και την διάδοση κλωνικών μεταλλαγών, παρά με την σεξουαλική αναπαραγωγή. Αυτόστειρη και ανεμόφιλη, αλλά και προικισμένη από μια εύπλαστη κληρονομική ουσία που μεταλλάσσεται εύκολα, πέρασε γρήγορα μέσω του υβριδισμού από το στάδιο της αγριελιάς στην ήμερη μορφή της. Τα χαρακτηριστικά αυτά της επέτρεψαν να προσαρμοστεί σε διάφορες περιοχές και να αναπτύξει πλήθος ποικιλιών που από την αρχαιότητα τράβηξαν την προσοχή των καλλιεργητών αλλά και των ανθρώπων της σκέψης.



Υπεραιωνόβιο δέντρο ελιάς, περιοχή Πηλίου, Ελλάδα.

Ο πιθανότερος τόπος προέλευσης της ελιάς θεωρείται η περιοχή της Συρίας και της Μικράς Ασίας, όπου οι βουνοπλαγιές είναι κατάφυτες με αγριελιές. Το στοιχείο όμως αυτό δε θεωρείται καθοριστικό, γιατί αγριελιές συναντώνται διάσπαρτες σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου, στα βόρεια παράλια της Αφρικής, στην Ισπανία, τη Νότια Ιταλία, στην Ελλάδα και κυρίως στην Τουρκία. Η άποψη ότι η ελιά από τη Βόρεια Συρία διαδόθηκε στα ελληνικά νησιά, έπειτα στην ηπειρωτική Ελλάδα

από τους Φωκείς και το 600 π.Χ. στην Ιταλία, στη Σικελία, στη Σαρδηνία και στις υπόλοιπες μεσογειακές χώρες, θεωρείται ιδιαίτερα βάσιμη. Η παρουσία άγριων ελαιόδεντρων αποτελεί σε γενικές γραμμές τον καλύτερο βιοδείκτη προσδιορισμού των περιοχών που καλύπτονται από τη Μεσογειακή χλωρίδα. Οι αρχαιότερες ενδείξεις ύπαρξης ελιάς στον Ελλαδικό χώρο εντοπίζονται στη Σαντορίνη και τη Νίσυρο, όπου ανακαλύφθηκαν απολιθώματα φύλλων ελιάς αρκετές χιλιετίες πριν (Friedrich & Venizelos, 1986). Τέλος αρχαιολογικά ευρήματα ελιάς που μεταφέρουν την ιστορία της κοντά στα 6500 χρόνια πίσω, εντοπίζονται σε περιοχές όπως η Κύπρος, ο Λίβανος, η Συρία και η Παλαιστίνη.

1.2 Η ελιά και τα είδη της

Το δέντρο της ελιάς κατατάσσεται στα ξηρόφυτα και θεωρείται από την παλιά εποχή σαν δέντρο με μικρές απαιτήσεις σε νερό, που μπορεί για το λόγο αυτό να καλλιεργηθεί επιτυχώς στην «περιθωριακή» για την γεωργική εκμετάλλευση γη. Σε ηλικία 7 έως 15 ετών, αρχίζει να παράγει καρπούς. Σε ηλικία 30-70 ετών, βρίσκεται σε πλήρη ανάπτυξη και στην «τρίτη ηλικία» η ελιά φτάνει από 150- 1000 χρόνια ζωής. Το κύριο χαρακτηριστικό του γένους *olea* είναι η μακροζωία και η διατήρηση της παραγωγικότητας. Υπάρχουν δένδρα στην περιοχή της Μεσογείου πολλών εκατοντάδων ετών, τα οποία παράγουν ακόμη καρπό. Πολλά μάλιστα ξεπερνούν την χιλιετία. Το γένος *olea* περιλαμβάνει τριάντα (30) είδη, από τα οποία μόνον το είδος *Olea Europaea* L παρουσιάζει οικονομικό ενδιαφέρον και περιλαμβάνει την ήμερη, τυπική ή κοινή ελιά και την άγρια ελιά ή αγριελιά. Εν συνεχεία, παρατίθενται οι πιο διαδεδομένες ποικιλίες του δέντρου της ελιάς σε παγκόσμιο επίπεδο.

Αμφίσσης μια εξαιρετικής ποιότητας ελληνική επιτραπέζια ελιά που καλλιεργείται στην κεντρική Ελλάδα. Οι ελιές Αμφίσσης απολαμβάνουν προστατευόμενη ονομασία προέλευσης, γεγονός που καθιστά περιζήτητη την εξαγωγή ελαιόλαδου αυτής της προέλευσης. Ο ελαιώνας της Αμφίσσης, αποτελείται από 1.200.000 ελαιόδεντρα.

Arbequina καφέ είδος ελιάς αρκετά μικρού μεγέθους που καλλιεργείται στην Αραγονία και Καταλονία της Ισπανία.

Barnea είδος ελιάς ιδιαίτερα ανθεκτικό στις ασθένειες, γεγονός που οδηγεί σε μια γενναϊόδωρη συγκομιδή. Καλλιεργείται ευρέως στο Ισραήλ, στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία.

Bosana αποτελεί την πιο κοινή ελιά στη περιοχή της Σαρδηνίας και χρησιμοποιείται κυρίως για τη παραγωγή λαδιού.

Cornicabra με καταγωγή από το Τολέδο της Ισπανίας, συμβάλει περίπου στο 12% της παραγωγής της Ισπανίας. Χρησιμοποιείται κυρίως για το ελαιόλαδο.

Empeltre μια μεσαίου μεγέθους μαύρη ελιά που καλλιεργείται στην περιοχή της Αραγονίας, Ισπανία.

Frantoio και Leccino ιταλικές ποικιλίες ελιάς που αποτελούν την κύρια πρώτη ύλη για το ιταλικό ελαιόλαδο, από την Τοσκάνη. Λόγω της μεγάλης γευστικής τους αξίας, καλλιεργούνται σήμερα και σε άλλες χώρες.

Gemlik είναι μια ποικιλία από την περιοχή της βόρειας Τουρκίας. Είναι μικρού και μεσαίου μεγέθους μαύρες ελιές με υψηλή απόδοση σε λάδι.

Hojiblanca προέρχεται από την επαρχία της Κόρντοβα, Ισπανία. Το ελαιόλαδο που παράγει χαίρει ευρείας εκτίμησης λόγω της ελαφρώς πικρής του γεύσης.

Καλαμών μια μεγάλη, μαύρη ελιά με μια ομαλή και βαριά γεύση, το όνομά της προέρχεται από την πόλη της Καλαμάτας στην Ελλάδα. Χρησιμοποιείται ως επιτραπέζια ελιά και διαθέτει μεγάλη παραγωγή ελαιόλαδου. Οι ελιές Καλαμών απολαμβάνουν καθεστώς προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης.

Κορωνέικη με καταγωγή από τη νότια Πελοπόννησο, στις πόλεις της Καλαμάτας και της Μάνης στην Ελλάδα. Αυτή η μικρή ελιά, αν και είναι δύσκολο να καλλιεργηθεί, έχει υψηλή απόδοση σε ελαιόλαδο εξαιρετικής ποιότητας.

Manzanilla ένα είδος ελιάς με μεγάλο, στρογγυλό, οβάλ σχήμα και μοβ-πράσινο χρώμα. Προέρχεται από τη Σεβίλλη της νότιας Ισπανίας. Γνωστή για την πλούσια γεύση, γεγονός που συντελεί στην τεράστια παραγωγή και καλλιέργειες σε όλο τον κόσμο.

Lucques βρίσκεται στο νότο της Γαλλίας.

Maalot είδος ελιάς ιδιαίτερα ανθεκτικό στις ασθένειες, ευρέως διαδεδομένο στην Ανατολική Μεσόγειο, προερχόμενο από την ποικιλία

της Βόρειας Αφρικής Chemlali. Η ελιά είναι μεσαίου μεγέθους, στρογγυλή, διαθέτει φρουκτώδη γεύση και χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά για την παραγωγή λαδιού.

Mission καλλιεργείται σε όλη την πολιτεία της Καλιφόρνιας στην Αμερική. Μαύρου χρώματος ποικιλία κατάλληλη για βρώση.

Nabali ποικιλία που ευδοκίμει στην Παλαιστίνη, η οποία παράγει υψηλής ποιότητα ελαιόλαδο με φήμη παγκοσμίως.

Πατρινά ελληνική ποικιλία ελιάς που καλλιεργείται κυρίως στην Ελλάδα, συγκεκριμένα στην ευρύτερη περιοχή της Αιγιαλείας.

Picholine ευδοκίμει στο νότιο τμήμα της Γαλλίας. Αποτελεί μεσαίου και μεγάλου μεγέθους ελιά, με πράσινη χροιά.

Picual προερχόμενη από τη νότια Ισπανία, πρωταθλήτρια ελιά στην καλλιέργεια της Ισπανίας, κατέχοντας περίπου το 20% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου. Διαθέτει ισχυρή, αλλά γλυκιά γεύση και χρησιμοποιείται ευρέως στην Ισπανία ως επιτραπέζια ελιά.

Σουρή είδος καλλιεργούμενο στο Λίβανο, αρκετά διαδεδομένη στην Ανατολή, με υψηλή απόδοση σε λάδι και εξαιρετικά αρωματική γεύση.

Οι ποικιλίες της ελιάς προέρχονται από αγνή πολλαπλασιασμό μεμονωμένων αγριελιών που παρουσίασαν επιθυμητά χαρακτηριστικά ως προς το μέγεθος ή την ελαιοπεριεκτικότητα του καρπού.



1.3 Ελαιοκαλλιέργεια

Η ελιά αποτελεί ένα πολύτιμο δώρο της φύσης και είναι μια ζωντανή κληρονομιά, που συνδέεται με πολλούς τομείς της ζωής μας. Η καλλιέργεια της έχει μεγάλη κοινωνική, οικονομική, πολιτιστική, πολιτική και οικολογική σημασία για την ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου, καλύπτοντας σημαντικό μέρος της γεωργικής έκτασης. Η παρατήρηση του πίνακα που παρατίθεται παρακάτω αποκαλύπτει ότι περίπου το 95% της παγκόσμιας ελαιοκαλλιέργειας ανήκει στις Μεσογειακές χώρες. Ένα σημαντικότατο κομμάτι αυτής ανήκει στην Ελλάδα.

Κατάταξη	Χώρα	Παραγωγή (in tons)	Καλλιεργούμενη έκταση (in hectares)
—	Παγκοσμίως	18,241,809	9,922,836
1		6,204,700	2,500,000
2		3,600,500	1,159,000
3		2,444,230	765,000
4		1,290,654	727,513
5		885,942	635,691

Κυριότερες χώρες παραγωγής ελιάς (FAOSTAT για το έτος 2009)

Όπως εύκολα κανείς συμπεραίνει και από τον παραπάνω πίνακα της παγκόσμιας ελαιοκαλλιέργειας, τα κράτη συχνά επιδίδονται σε αγώνα κυριάρχησης στην παραγωγή της ελιάς και των προϊόντων της, γεγονός που θα τους δώσει μεγαλύτερο μερίδιο στο χρηματιστήριο τροφίμων. Παρατηρούνται φαινόμενα προώθησης ποικιλιών ελιάς που είναι πιο ανταγωνιστικές, αφού καλλιεργούνται σε πεδινές περιοχές και συλλέγονται με τη μέθοδο της μηχανοσυλλογής, με συνέπεια την

επίτευξη άριστης ποιότητας (μηδενική οξύτητα). Οι πρακτικές αυτές ήδη εφαρμόζονται στην Ισπανία, η οποία παρεμπιπτόντως είναι πρώτη παγκοσμίως σε ελαιοκαλλιέργεια, όπου το επιστημονικό δυναμικό με τη βοήθεια των πολιτικών, συνεχώς προτείνει νέες ανθεκτικές ποικιλίες πιο παραγωγικές. Η διαρκής αύξηση στη ζήτηση ελαιολάδου σε παγκόσμιο επίπεδο επιτάσσει την ανάπτυξη τέτοιου είδους νέων ποικιλιών που θα ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των νέων ανταγωνιστικών συστημάτων παραγωγής. Η διερεύνηση ποικιλιών που περιορίζονται μόνο στον τόπο καταγωγής τους και οι άγριοι πληθυσμοί μπορεί να παρουσιάσουν αγρονομικά χαρακτηριστικά κατάλληλα για τις σημερινές απαιτήσεις της αγοράς. Η επιστημονική κοινότητα θα πρέπει να εισηγηθεί τη χρήση επιλεγμένων και πιστοποιημένων ποικιλιών της ελιάς μέσω της ανάλυσης της γενετικής διαφοροποίησης που υφίσταται, ώστε να επιτευχθεί αύξηση στην παραγωγή και την ποιότητα του ελαιολάδου (Gemmas *et al.*, 2002).

2005	Καλλιεργούμενη έκταση (in hectares)	Δέντρα	Βρώσιμες ελιές (in tons)	Ελαιοποιήσιμες ελιές (in tons)
Πεδινές	3,124,906	55,338,693	156,694	1,102,607
Ημιορεινές	2,915,890	50,741,764	118,449	794,056
Ορεινές	1,929,497	31,012,442	45,852	442,086
Σύνολο	7,920,292	137,092,899	320,995	2,339,731

Καλλιέργεια της ελιάς στην Ελλάδα (Στατιστική Επετηρίδα Ελλάδος 2006)

1.4 Η συγκομιδή της ελιάς

Υπάρχουν ελαιόδεντρα που κάνουν καρπούς για λάδι και ελαιόδεντρα που ο καρπός τους είναι για φαγητό. Με αυτόν τον τρόπο διαχωρίζονται σε βρώσιμες επιτραπέζιες και ελαιοποιήσιμες ελιές. Η περίοδος συγκομιδής των καρπών της ελιάς είναι μεταξύ Νοέμβρη και Φεβρουάριο και εξαρτάται από την ποικιλία του ελαιόδεντρου. Αυτό είναι και το πρώτο στάδιο επεξεργασίας της ελιάς. Στη συνέχεια επεξεργάζονται σε κατάλληλους χώρους (ελαιοτριβεία ή επιχειρήσεις επεξεργασίας) για να παραχθεί το τελικό αποτέλεσμα. Η συσκευασία του ελαιοκάρπου καθώς και η εξαγωγή του ελαιόλαδου γίνεται σε ειδικά τυποποιητήρια και ελαιοτριβεία αντίστοιχα, τα οποία πληρούν όλες τις προϋποθέσεις της βιολογικής διαδικασίας, ενώ παράλληλα διαθέτουν συγκεκριμένα πρότυπα και διαδικασίες ποιότητας. Ο χυμός του ελαιοκάρπου της ελιάς λαμβάνεται με μηχανική έκθλιψη. Η θερμοκρασία της ελαιοπάστας κατά τη μάλαξη και των υγρών εκχύλισης του ελαιόλαδου, δεν υπερβαίνει

τους 27 °C, ώστε να διατηρούνται αναλλοίωτα τα φυσικά χαρακτηριστικά και η θρεπτική του αξία. Η αποθήκευση του ελαιόλαδου, μέχρι την τυποποίηση του προϊόντος, γίνεται σε ανοξείδωτες δεξαμενές.

Το παρθένο ελαιόλαδο μπορεί να είναι βρώσιμο ή μειονεκτικό. Το βρώσιμο προορίζεται για άμεση κατανάλωση ή επεξεργάζεται, αναμειγνύεται και τυποποιείται, το δε μειονεκτικό εξευγενίζεται. Υπάρχουν ωστόσο κάποιοι παράγοντες κατά τη διαδικασία συλλογής και επεξεργασίας της ελιάς που επηρεάζουν την ποιότητα του ελαιόλαδου, οι οποίοι παρατίθενται ακολούθως:

- Το κλίμα/έδαφος: το ελαιόδεντρο αναπτύσσεται καλύτερα σε γόνιμα εδάφη καθώς και σε θερμές περιοχές με ήπιο χειμώνα.
- Η εποχή συλλογής του ελαιόκαρπου: ο ελαιόκαρπος πρέπει να συλλέγεται όταν είναι φυσιολογικά ώριμος, καθώς τότε περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα λαδιού και όλα τα απαραίτητα συστατικά σε αναλογία τέτοια, ώστε να χαρακτηρίζεται ως λάδι εξαιρετικής ποιότητας.
- Ο τρόπος συλλογής του ελαιόκαρπου: η συλλογή του καρπού με τα χέρια, με κτένες κτλ επηρεάζει την ποιότητα του ελαιόλαδου, ανάλογα με το βαθμό τραυματισμού που προκαλείται στον καρπό.

1.5 Οι ευεργετικές δράσεις του ελαιόκαρπου

Η ευεργετική δράση του καρπού της ελιάς ανακαλύφτηκε χιλιάδες χρόνια πίσω στην ιστορία τεκμηριώνοντας και την άποψη ότι το ελαιόλαδο τρέφει, συντηρεί, προστατεύει, τονώνει, θεραπεύει, εμπνέει. Ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της ιατρικής, πίστευε στις θεραπευτικές ιδιότητες του ελαιόλαδου, αναφέροντάς το σαν την «ιδανική θεραπεία». Οι αρχαίοι Έλληνες θεραπευτές χρησιμοποιούσαν ελαιόλαδο για να επουλώσουν πληγές, για να θεραπεύσουν την αϋπνία, τη ναυτία και τη χολέρα. Επίσης το χρησιμοποιούσαν για να ενυδατώσουν και να μαλακώσουν το δέρμα τους ή το έβαζαν στα μαλλιά τους για να είναι υγιή και λαμπερά. Στη σύγχρονη εποχή, οι επιστήμονες πιστεύουν ότι το ελαιόλαδο βοηθά τον άνθρωπο στις λειτουργίες του εγκεφάλου, των εσωτερικών οργάνων και ιδιαίτερα της καρδιάς, αφού προλαβαίνουν και παίρνουν τη θέση από τα βλαβερά ζωικά λίπη, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη συγκέντρωση λίπους στην καρδιά και οδηγούν στο έμφραγμα.

Το ελαιόλαδο είναι ο χυμός που προκύπτει από τον καρπό της ελιάς. Το εν λόγω προϊόν διακρίνεται σε βρώσιμο και σε μη βρώσιμο, ταξινομείται δε σε διάφορες κατηγορίες βάσει της επεξεργασίας που έχει υποστεί και της οξύτητας σε ελαικό οξύ που διαθέτει (ICAP, 2007).

- i. Παρθένο ελαιόλαδο. Το λάδι που παραλαμβάνεται από τον καρπό της ελιάς με μηχανικά ή φυσικά μέσα και κατά την παραλαβή του

- εφαρμόζονται συνθήκες οι οποίες δεν προκαλούν αλλοιώσεις στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του.
- ii. Παρθένο ελαιόλαδο κατάλληλο για κατανάλωση. Η εν λόγω κατηγορία περιλαμβάνει το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (βρώσιμο, οξύτητας 0-1 βαθμών), το εκλεκτό ή φίνο παρθένο ελαιόλαδο (βρώσιμο, οξύτητας 1-1,5 βαθμών) και το κουράντε ή κανονικό παρθένο ελαιόλαδο (βρώσιμο, οξύτητας 3 βαθμών που μπορεί να φτάσει ακόμα και τους 3,3 βαθμούς).
 - iii. Παρθένο ελαιόλαδο Λαμπάντε. Πρόκειται για μη βιώσιμο ελαιόλαδο (οξύτητας μεγαλύτερης των 3,3 βαθμών) και προορίζεται για ραφινάρισμα ή για βιομηχανική χρήση.
 - iv. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Βρώσιμο, οξύτητας που δε ξεπερνά τους 0,5 βαθμούς. Λαμβάνεται από παρθένο (κυρίως μειονεκτικό) ελαιόλαδο, με εξευγενισμένο (ραφινάρισμα) που δεν προκαλεί αλλαγές στην αρχική δομή των γλυκεριδίων.
 - v. Ελαιόλαδο Γνήσιο ή Κουπέ ή Αγνό. Βρώσιμο, οξύτητας έως 1,5 βαθμούς. Πρόκειται για μίγμα παρθένου και εξευγενισμένου.

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο είναι ένα από τα λίγα φυτικά έλαια που μπορούν να καταναλωθούν χωρίς χημική επεξεργασία. Η πλειονότητα των υπόλοιπων φυτικών ελαίων υπόκεινται σε χημική επεξεργασία και εξευγενισμό με ατμό και διαλύτες. Το ελαιόλαδο που παράγεται φρέσκο μπορεί να καταναλωθεί άμεσα, διατηρώντας τις φυσικές γεύσεις, τις βιταμίνες, τα μέταλλα, τα αντιοξειδωτικά και άλλα υγιεινά προϊόντα του ώριμου καρπού της ελιάς.

1.6 Χημική σύσταση του ελαιοκάρπου

Ένα σημαντικό τομέα διαφοροποίησης των ποικιλιών της ελιάς αποτελεί η χημική σύσταση του καρπού, η οποία είναι ιδιαίτερα ευμετάβλητη και ποικίλει σημαντικά. Η χημική σύσταση εξαρτάται επίσης από το στάδιο ανάπτυξης και το βαθμό ωριμότητας του ελαιοκάρπου (Wiesman, 2009).

-	Υγρασία	Λίπη	Σάκχαρα	Πρωτεΐνες	Φυτικές Ίνες	Τέφρα
(%w/w)	65-75	12-30	3-6	1-2	2-5	1-1,5

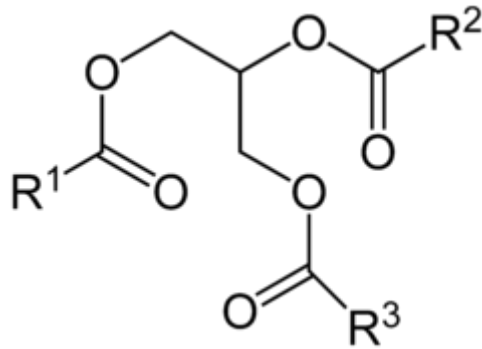
Ο παραπάνω πίνακας αναφέρει τα σημαντικότερα συστατικά του νωπού ελαιοκάρπου και γίνεται άμεσα αντιληπτή η ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Η λιπαρότητα του καρπού αυξάνεται με την ωρίμανση, άρα οι ώριμες ελιές περιέχουν περισσότερα λιπαρά από τις πράσινες ελιές. Σε ότι αφορά τα σάκχαρα σε μια επιτραπέζια ποικιλία ελιάς είναι πολύ σημαντικό να μειωθούν κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, γιατί αποτελούν την κύρια πηγή άνθρακα για τη μικροβιακή ανάπτυξη. Επίσης ο καρπός της ελιάς διαθέτει διαιτητικές ίνες

(κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη), κάλιο και ένα σημαντικό ποσοστό φαινολικών ενώσεων που αποτελούν το 3-6% επί ξηράς ουσίας. Το χρώμα του καρπού οφείλεται στην παρουσία της χλωροφύλλης, που προσδίδει το αρχικό πράσινο χρώμα στην ελιά και στο σχηματισμό των ανθοκυανών, που προσδίδει το πορφυρό χρώμα στην ώριμη ελιά. Οι πράσινοι καρποί είναι πλούσιοι καροτινοειδή που πολλές φορές δίνουν κιτρινωπό χρώμα στην επιδερμίδα του καρπού. Τέλος η ουσία της ελευρωπεΐνης (oleuropein) είναι υπαίτια για τη φυσική πικρότητα του ελαιόκαρπου σε ώριμα στάδια, τα επίπεδα της οποίας υποχωρούν είτε με την ωρίμανση είτε μέσω επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς (Μπαλατσούρας, 1995).

1.7 Χημική Σύσταση του ελαιόλαδου

Περίπου το 98-99% του ελαιόλαδου αποτελείται από τριγλυκερίδια. Περιέχει επίσης ελεύθερα λιπαρά οξέα (free fatty acids), το ποσοστό των οποίων είναι μεταβλητό και εξαρτάται από την έκταση της υδρόλυσης τριγλυκεριδίων (Lesage *et al.*, 2001). Το προφίλ των λιπαρών οξέων του λαδιού, ωστόσο, ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία, τις κλιματολογικές συνθήκες και τον τόπο παραγωγής. Το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιόλαδου (IOOC) πρότυπο του εμπορίου του ελαιόλαδου και του πυρηνέλαιου έχει καθορίσει τα τιμές για την κατανομή των λιπαρών οξέων στο ελαιόλαδο. Το ελαιόλαδο ουσιαστικά αποτελείται από μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Οι πιο συχνές κατανομές ποσοστών του είδους των λιπαρών οξέων είναι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (14%), τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (72%) και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (14%). Τα δευτερεύοντα συστατικά της ελιάς, τα οποία είναι αυτά που αποδεικνύουν την φυσικοχημική της αυθεντικότητα είναι τα εξής (Tsimidou *et al.*, 1992):

- i. Σκουαλένιο
- ii. Τριτερπενικές αλκοόλες
- iii. Στερόλες
- iv. Τοκοφερόλες
- v. Φαινολικές ενώσεις
- vi. Εκατό περίπου άλλες αρωματικές ενώσεις των οποίων η χημική σύσταση ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς



Χημική δομή του ελαιόλαδου

1.8 Περιγραφή ποικιλιών ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

- i. Οι ελιές καλαμών αποτελούν μια ανδρόκαρπη ποικιλία επίσης γνωστή και ως αετονύχι, καλαματιανή, χονδρολιά, μπουράκλα ή τσιγκέλι. Συναντάται κυρίως στις περιοχές της Μεσοητίας, Λακωνίας και Φθιώτιδας, με την καλλιέργεια της να επεκτείνεται συνεχώς και σε άλλες περιοχές εντός και εκτός Ελλαδικών συνόρων. Ανήκει στις μεσόκαρπες επιτραπέζιες ελληνικές ποικιλίες ελιάς και το δέντρο της είναι ορθόκλαδο, αναπτύσσοντας ζωηρή 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 επιμήκης και αιχμηρός με βάρος 5-6 g. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 17%. Η βρώσιμη ελιά της ποικιλίας καλαμών είναι μαύρου χρώματος με εξαιρετική ποιότητα. Οι μαύρες ελιές είναι πλουσιότερες σε συνολικές τοκοφερόλες σε σχέση με τις πράσινες και είναι οι μόνες που εμπεριέχουν β-τοκοφερόλες και α-τοκοτριενόλες (Fooks, 2000). Περιέχουν ζυμώσιμες ουσίες και ο φλοιός τους είναι ανθεκτικός, λεπτός και ελαστικός. Η εξαιρετική γεύση τους και η άριστη ποιότητά τους οφείλεται εκτός από τον τρόπο καλλιέργειας και συγκομιδής τους (το μάζεμα του καρπού γίνεται με τα χέρια) και στον τρόπο διατήρησής τους. Οι ελιές Καλαμών σε αντίθεση με άλλους τύπους επιτραπέζιων ελιών, δεν υφίστανται κανενός είδους ειδική ζύμωση προκειμένου να αποβάλουν την χαρακτηριστική πικρή γεύση τους ούτε υπόκεινται σε τεχνητό χρωματισμό τον οποίο ήδη διαθέτουν από τη φύση τους.



Ελιές καλαμών

- ii. Η κολοβή ελιά που είναι επίσης γνωστή ως μυτιληνιά, βαλανολιά, βαλάνα ή μηλολιά αποτελεί τα 7/10 των δέντρων στους ελαιώνες της Λέσβου και καλύπτουν κυρίως την νότια και νοτιοανατολική έκταση του νησιού. Προτιμούν τοποθεσίες με υψόμετρο χαμηλότερο των 500 m. Τα δέντρα αυτά είναι μέτρια σε ανάπτυξη, έχουν κλαδιά ακανόνιστα και ευδοκιμούν σε εδάφη από σχιστόλιθο που δεν είναι απαραίτητο να είναι πλούσια και να θέλουν ιδιαίτερη καλλιέργεια. Τα φύλλα τους είναι κάπως πλατύτερα από τις άλλες ποικιλίες δέντρων ελιάς και το μυστικό της για να κάνει αρκετές ελιές είναι ότι στο διάστημα που ανθοφορεί για 3-4 εβδομάδες την άνοιξη, θέλει ευνοϊκές καιρικές συνθήκες για να γονιμοποιηθεί περισσότερος ανθός, οπότε το φορτίο του δένδρου γίνεται υπερβολικό και η περιεκτικότητα σε λάδι φθάνει έως και στο 30%. Η κολοβή ελιά έχει κάπως μακρουλό σχήμα και αργεί να ωριμάσει. Αποτελεί μια από τις καλύτερες ελαιοποιήσιμες ποικιλίες της χώρας. Οι επιτραπέζιες κολοβές ελιές διακρίνονται από τον λεπτό φλοιό του καρπού τους και διαλέγονται συνήθως οι μεγάλες σε μέγεθος, που έχουν πολύ μεγάλη περιεκτικότητα σε σάκχαρα, ώστε να ευνοείται η καλύτερη συντήρησή τους.
- iii. Οι ελιές Χαλκιδικής, γνωστές επίσης και ως καρυδολιές, συναντώνται κατά κύριο λόγο στη Χαλκιδική και στην Πιερία. Αποτελούν ποικιλία ελιάς διπλής χρήσης (επιτραπέζια και ελαιοποιήσιμη). Είναι αδρόκαρπη ποικιλία ελιάς (περισσότερο κι από την κονσερβολιά ή κοινώς ποικιλία Αμφίσης). Το βάρος του καρπού της καρυδολιάς φτάνει και τα 14 g. Χαρακτηρίζεται από μεγάλο μέγεθος καρπού με μεγάλη αναλογία σάρκας προς πυρήνα, λαμπερό πράσινο – πρασινοκίτρινο χρώμα, λεπτό φρουτώδες άρωμα και γεύση ελαφρώς πικρή και πικάντικη. Το σχήμα της είναι κυλινδροκωνικό που καταλήγει σε θηλή και με σάρκα που δεν είναι πολύ συμπαγής και υστερεί στην περιεκτικότητα ζυμώσιμων συστατικών. Επίσης τη χαρακτηρίζει η απουσία της

αίσθησης λιπαρότητας, λόγω της από αιώνων προσαρμογής των ελαιοδέντρων στις ιδιαίτερες εδαφολογικές και κλιματικές συνθήκες της περιοχής. Κατά την ωρίμανση το χρώμα της επιδερμίδας περνάει διαδοχικά από το πράσινο στο αχυροκίτρινο, στο ρόδινο και τελικά στο ξεθωριασμένο ερυθρόμαυρο. Η περιεκτικότητα σε λάδι αγγίζει το 20%. Ο καρπός αυτής της ποικιλίας υφίσταται ζύμωση με δυσκολία, τόσο όταν το χρώμα του είναι πράσινο όσο και όταν ωριμάσει. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη σακχάρων καθώς και στην έλλειψη χρώματος.



Ελιές Χαλκιδικής

- iv. Οι ελιές Αμφίσσης αποτελούν μια ποικιλία ελιάς επίσης γνωστή και ως βολιώτικη, χοντροελιά, μαυροελιά ή κονσερβολιά. Είναι η πιο μεγαλόκαρπη επιτραπέζια Ελληνική ποικιλία ελιάς και καλλιεργείται συνήθως κάτω από ξηρικές συνθήκες, σε μεγάλες εκτάσεις στην περιοχή Πηλίου - Βόλου και γύρω από την πόλη της 'Αμφίσσης από όπου πήρε και το όνομα της. Πρόκειται για την καλύτερη ποικιλία για την παραγωγή μαύρης ελιάς σε άλμη. Στην ποικιλία της κονσερβοελιάς ανήκουν οι πράσινες ελιές, οι μαύρες ελιές και οι ξανθές ή ασπροκόκκινες ελιές. Το δέντρο της συγκεκριμένης ποικιλίας είναι ύψους 6-10 m ορθόκλαδο. Ο καρπός είναι μεγάλος 5,5-8 g υποστρόγγυλος, σφαιρικός ή ωοειδής, με κουκούτσι μεγάλο υποστρόγγυλο. Η επιδερμίδα λεπτή και ελαστική αλλάζει σταδιακά χρώμα από πράσινο, ρόδινο, ερυθροϊώδες, ιώδες και μαύρο στην πλήρη ωρίμανση. 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. Οι ελιές Αμφίσσης καλύπτουν σχεδόν το 50% της συνολικής Ελληνικής παραγωγής και παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με την ισπανική ποικιλία Μανζανίλο.



Ελιές Αμφίσσης

- v. Η ελιά της ποικιλίας Μεγάρων, γνωστή και ως βοβωδίτικη, περαχωρίτικη ή λαδολιά. Καλλιεργείται στην Αττική, στην Βοιωτία, στην Κορινθία, στην Ακροναυπλία και στην Κυνουρία. Θεωρείται ελιά διπλής χρήσης καθώς και ελαιοποιήσιμη και βρώσιμη. Είναι μεσαίου μεγέθους και χρησιμοποιείται για την παραγωγή λαδιού καλής ποιότητας και παρασκευή κονσερβών (πράσινες τσακιστές και μαύρες πατητές). Διαθέτει κυλινδροκωνικό σχήμα στον καρπό με μικρή κάμψη. Θεωρείται ποικιλία παραγωγική και ανεκτική στο ψύχος, ενώ ταυτόχρονα είναι και η πιο ανθεκτική ποικιλία στην ξηρασία. Μειονέκτημα αποτελεί η μεγάλη της ευαισθησία στην προσβολή από παράσιτα και συγκεκριμένα στο δάκο. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 21%.



Ελιές Μεγάρων

- vi. Η ελιά Μανζανίλο αποτελεί την πιο διαδεδομένη ισπανική ποικιλία. Είναι μεσόκαρπη και μικροπύρηνη επιτραπέζια ποικιλία και συναντάται πλέον σε πολλά μέρη παγκοσμίως, ακόμα και στην Αυστραλία. Το δέντρο αναπτύσσει ζωηρή βλάστηση και μέτριο ύψος (8-10 m) και είναι ορθόκλαδο. Τα φύλλα είναι στενά και μέτρια, λογχοειδή, επιμήκη. Ο καρπός είναι στρογγυλός και μοιάζει με μικρό μήλο, από όπου πήρε και το όνομά της (Μανζανίλο στα ισπανικά σημαίνει μικρό

μήλο). Το χρώμα του είναι σιλιπνό πράσινο και γίνεται μαύρο κατά την ωρίμανση. Υφή συμπαγής με λεπτή επιδερμίδα ανθεκτική στο ζάρωμα. Σχέση σάρκας/πυρήνα 6:1 (ποσοστό σάρκας 84%). Η περιεκτικότητά της σε λάδι είναι 18% περίπου και διαθέτει άριστες οργανοληπτικές ιδιότητες (Barranco, 2000).



Ελιές Manzanillo

vii. Φορσύθια είναι το όνομα που φέρει μια ομάδα που αποτελείται από επτά φυλλοβόλους, ανθεκτικούς θάμνους, ένας από τους οποίους είναι ενδημικός της νότιας Ευρώπης, ενώ οι υπόλοιποι έξι είναι ενδημικοί της ανατολικής Ασίας. Αποτελούν ένα γένος ανθοφόρων φυτών στην οικογένεια Oleaceae της ευρύτερης οικογένειας της ελιάς. Το τυπικό ύψος του είδους αυτού φτάνει συνήθως τα 3 m. Οι θάμνοι Forsythia, επίσης γνωστοί και ως Golden Bells, εκτιμώνται για τα πανέμορφα χρυσοκίτρινα άνθη τους, σε σχήμα άστρου που εμφανίζονται πάνω στους βραχίονες των φύλλων κατά την διάρκεια της άνοιξης.



Θάμνος Forsythia

1.9 Ταυτοποίηση της ελιάς

Οι επιμέρους ποικιλίες της ελιάς που προέκυψαν με την πάροδο των χρόνων, ταξινομήθηκαν και εκπονήθηκαν οι φυλογενετικές τους σχέσεις διαμέσου της χρήσης μορφολογικών, καρυοτυπικών, βιοχημικών και μοριακών δεικτών (Χατζόπουλος, 2001).

- i. Η πρώτη κατηγορία των μορφολογικών δεικτών περιλαμβάνει τα κληρονομήσιμα, μορφολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία χρησιμοποιούνται στον εντοπισμό των διαφορών μεταξύ των ποικιλιών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της καταγραφής μονό- ή ολιγό- γονιδιακών χαρακτηριστικών.
- ii. Η δεύτερη κατηγορία των καρυοτυπικών δεικτών περιλαμβάνει τα χρωμοσωμικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της ελιάς, με ειδικά πρωτόκολλα χρώσης του κυττάρου και *in situ* υβριδισμό. Τα κυτταρομορφολογικά γνωρίσματα που αναγνωρίζονται απαιτούν βαθειά γνώση και εμπειρία του επιστημονικού προσωπικού που τα επεξεργάζεται (Bretting and Widrlechner, 1995).
- iii. Στην τρίτη κατηγορία, αυτή των βιοχημικών δεικτών ανήκουν οι λεγόμενοι δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι στην ουσία οργανικές ενώσεις από δευτερογενή μεταβολισμό ανώτερων φυτών, όπως η ελιά. Αποτελούν κληρονομήσιμους, πολυμορφικούς δείκτες με ενδοειδικό και διεϊδικό επίπεδο. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν επίσης πρωτεΐνες, που ονομάζονται πρωτεϊνικοί δείκτες και εξυπηρετούν συγκεκριμένες εφαρμογές διαχείρισης του γενετικού υλικού. Οι πληροφορίες που παρέχονται εκπροσωπούν τα προϊόντα γονιδίων που κωδικοποιούν πολυπεπτίδια συγκεκριμένων θέσεων και όχι τυχαίας διασποράς εντός του γονιδιώματος της ελιάς.
- iv. Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν τα τμήματα του DNA που ονομάζονται μοριακοί δείκτες. Αυτοί παρουσιάζουν τις διαφορές μεταξύ των ποικιλιών της ελιάς μέσα από τις οποίες διεξάγονται συμπεράσματα σχετικά με την κληρονομικότητα και την ποικιλομορφία της ελιάς. Οι μοριακοί δείκτες δεν επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και είναι πλήρως ανιχνεύσιμοι καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης της ελιάς. Εμφανίζουν υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού και έχουν απεριόριστο αριθμό. Με τη χρήση τους δίνεται η δυνατότητα σχηματισμού φυλογενετικών δέντρων από τα οποία εκτιμάται η συγγένεια και η εξέλιξη των ποικιλιών της ελιάς. Μια πρώτη μορφή μοριακών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs), ιδιότητα των οποίων είναι να κόβουν τα μόρια του DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων (Bolstein *et al.*, 1980), με συνέπεια τη δημιουργία θραυσμάτων DNA ποικίλου μεγέθους. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των θραυσμάτων αυτών, ακολουθούμενη από υβριδισμό με κατάλληλο ανιχνευτή DNA και λήψη της οπτικής εικόνας με αυτοραδιογραφία ραδιενεργών

ισότοπων, ολοκληρώνουν τη χρήση τους. Χαρακτηριστικά των RFLPs είναι η επαναληψιμότητα και η συγκυριαρχία στην κληρονομικότητα τους (Tanksley *et al.*, 1989). Εν συνεχεία των μοριακών δεικτών αυτού του τύπου και εξαιτίας της ανακάλυψης της PCR τεχνικής, εμφανίστηκαν δείκτες που βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων του DNA (Williams *et al.*, 1990). Οι μοριακοί δείκτες πολυμορφισμού Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs) και Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) υπακούουν σε αυτό το είδος πολλαπλασιασμού των τμημάτων του DNA. Άλλες κατηγορίες μοριακών δεικτών είναι οι Intron Fragment Length Polymorphisms (IFLPs), Simple Sequence Repeat (SSRs), Sequence Characterize Amplified Regions (SCARs), Simple Primer Amplification Reaction (SPARs) και Marker Assisted Selection (MAS). Τέλος αναφέρουμε τους μοριακούς δείκτες Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) με χρήση των οποίων και πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη.

1.10 Μοριακοί δείκτες 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. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μια τεχνική ανάλυσης της γενετικής ποικιλότητας αποτελούν οι μοριακοί δείκτες τρίτης γενιάς Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Οι μοριακοί δείκτες SNPs είναι τμήματα DNA με πολυμορφισμό και βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό των τμημάτων του DNA με τη PCR τεχνική. 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). Ο πολυμορφισμός έγκειται μεταξύ των ατόμων σε επίπεδο μήκους τμημάτων DNA από πολυμερισμό με PCR, καθώς επίσης και από κοπή με ένζυμα περιορισμού, ή αλλιώς μοριακά ψαλίδια τα οποία κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις ανάλογα με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη της κληρονομικότητας των χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ του πληθυσμού της ελιάς. Ένα SNP είναι μια παραλλαγή της ακολουθίας του DNA που συμβαίνει όταν ένα νουκλεοτίδιο A, T, C ή G στο γονιδίωμα διαφέρει μεταξύ των μελών ενός βιολογικού είδους ή ζεύγη χρωμοσωμάτων σε ένα άτομο (Θεοδόσιος Ντομπιζάνοκι, 1999).

Για παράδειγμα, δύο τμήματα DNA αλληλουχίας από διαφορετικά άτομα, AAGCCTA και AAGCTTA, περιέχει μια διαφορά σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Σε αυτή την περίπτωση λέμε ότι υπάρχουν δύο αλληλόμορφα C και T, περίπτωση που είναι και η πιο συνήθης. Η κατανομή του γονιδιώματος SNP δεν είναι ομοιογενής, αφού τα SNPs εμφανίζονται συχνότερα σε μη κωδικοποιημένες περιοχές παρά σε περιοχές κωδικοποίησης ή εν γένει όπου η φυσική επιλογή ενεργεί δημιουργώντας το αλληλόμορφο του SNP, γεγονός που αποτελεί την πλέον ευνοϊκή γενετική προσαρμογή (Marth *et al.*, 1999).

Ο έλεγχος του πολυμορφισμού με μοριακούς δείκτες SNPs στην παρούσα μελέτη Ελληνικών ποικιλιών ελιάς, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μιας σειράς εκκινητικών μορίων. Με την Calcium binding protein (Cbp), που αποτελεί δεσμευτική πρωτεΐνη ασβεστίου. Με την Anthocyanidin synthase (Ant), η οποία είναι εξαρτώμενη από την οξυγενεάση και καταλύει το προτελευταίο βήμα στη βιοσύνθεση των ανθοκυανινών που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Με την Cycloartenol synthase (Cycl), που είναι ένα σημαντικό είδος στανολεστέρων που εντοπίζονται στα φυτά. Αποτελεί την πρώτη πρόδρομη ένωση στη βιοσύνθεση από φυτοστερόλες και φυτοστανόλες, χαρακτηριστικές ενός φυτικού είδους. Τέλος με την Chalcone synthase (Chs), μια οικογένεια πολυκετονικών ενζύμων που συνδέονται με την παραγωγή χαλκονών, οργανικές ενώσεις που εντοπίζονται στα φυτά και συνδέονται με φυσικούς μηχανισμούς άμυνας και συνθετικά στην παραγωγή χρωστικών ουσιών (Theios, 2009).

1.11 Ποικιλομορφία και γενετική παραλλακτικότητα της ελιάς

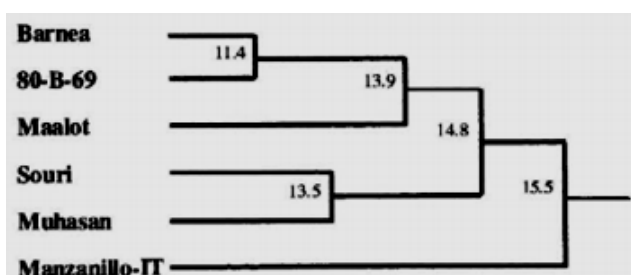
Το δέντρο της ελιάς εξαιτίας της μακροβιότητας του, εμφανίζει την πλουσιότερη γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ όλων των καρποφόρων. Περισσότερες από 2500 ποικιλίες ελιάς έχουν καταγραφεί παγκοσμίως, παρότι πολλές από αυτές είναι αποτέλεσμα διασταύρωσης μεταξύ γειτονικών ατόμων ή οικοτύποι.

Οι Ελληνικές ποικιλίες που έχουν καταγραφεί φτάνουν τις 40 και κατάφεραν να προσαρμοστούν στις εκάστοτε τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Επίσης η μειωμένη έκταση της γενετικής διάβρωσης μέσα στο γενετικό υλικό επιτρέπει τη διατήρηση της ποικιλομορφίας του δέντρου της ελιάς. Η ελιά παρουσιάζει υψηλό επίπεδο διασταυρώσεων των καλλιεργούμενων ποικιλιών της, δίνοντας καινούριους απογόνους. Ο βαθμός των διασταυρώσεων διαφέρει κάθε φορά ανάλογα με τις ποικιλίες και τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν.

Μέσω της επιστημονικής έρευνας των ειδών της ελιάς προκύπτουν σημαντικές πληροφορίες που αφορούν την παγκόσμια αγορά, καθότι το κάθε είδος διαφέρει ως προς την ελαιοπεριεκτικότητα και το μέγεθος του καρπού, το χρώμα, το σχήμα και την προσαρμοστικότητα στις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες. Το εγχείρημα ταξινόμησης της ελιάς είναι δύσκολο, εξαιτίας του πλούσιου γενετικού υπόβαθρου και του συχνού φαινομένου σύγχυσης στα ονόματα των ποικιλιών με περιπτώσεις ομωνυμίας και συνωνυμίας. Σε αυτή την περίπτωση ανήκει και η αμφισβητούμενη ποικιλία του 'Πηλίου', η οποία πάρα το ότι αφορά ξεχωριστό κλώνο σε επίπεδο γενετικό και διαθέτει διαφορετικό μορφολογικό χαρακτήρα, συχνά εντάσσεται στον ποικιλιακό πληθυσμό της 'Αμφίσης' (Quazzani *et al.*, 1996). Σε γενικές γραμμές όμως, μεγάλος αριθμός ποικιλιών έχει διαχωριστεί με βάση τα μορφολογικά και φυσιολογικά γνωρίσματα μέχρι ένα σημείο και μετά έγινε χρήση διάφορων γενετικών δεικτών σε συνδυασμό με τις μοριακές τεχνικές. Με αυτόν τον τρόπο έχουμε πλέον ακριβή γενετική περιγραφή και γνώση για την καταγωγή της κάθε ποικιλίας ελιάς και του τρόπου διασποράς της (Angiolillo *et al.*, 1999). Το πλεονέκτημα των μοριακών δεικτών να είναι

περιβαλλοντικά ανεξάρτητοι, δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης ανάμεσα σε ομώνυμες και συνώνυμες ποικιλίες.

Αυτού του είδους μελέτες πραγματοποιήθηκαν με τους RAPDs, τυχαίως πολλαπλασιαζόμενα πολυμορφικά τμήματα DNA, καθώς και με τους ISSRs, ενδοεπαναλαμβανόμενες απλές αλληλουχίες, παρουσιάζοντας αποτελέσματα για αναγνώριση καρπών ελιάς διάφορων ποικιλιών και αναγνώριση ελαιολάδου με προστατευόμενη ονομασία και προέλευση (Sanz-Cortés *et al.*, 2001). Γενετικές μελέτες με χρήση μικροδορυφόρων και οι δείκτες SSRs μελετούν την ποικιλομορφία στην ελιά και εμβαθύνουν σε θέματα υψηλού πολυμορφισμού και ετεροζυγωτίας (Pashou *et al.*, 2006).



Φυλογενετικό δέντρο 6 ποικιλιών ελιάς στο Israel με χρήση μοριακών δεικτών RAPDs

Παρόμοιου τύπου μελέτες έχουν εκτελεστεί με χρήση δεικτών SCARs και SNPs. Το υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού που εντοπίστηκε στο γονίδιο της ελιάς υποδηλώνει ότι μόνο ένας μικρός αριθμός από ποικιλίες απαιτούνται για τον αποτελεσματικό εντοπισμό SNPs και ετεροζυγωτών, χωρίς να απαιτείται η κλωνοποίηση των PCR προϊόντων (Rafalski, 2002).

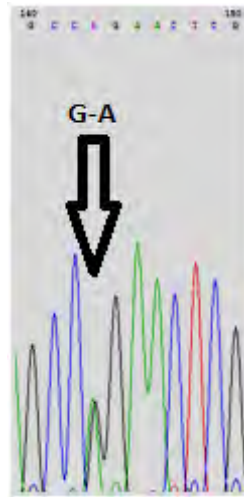
1.12 Γενετικές αποστάσεις

Οι γενετικές αποστάσεις αποτελούν μεθόδους σύγκρισης της γενετικής ποικιλότητας ανάμεσα σε δύο πληθυσμούς. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των ποικιλιών της ελιάς, με στόχο την παρατήρηση της διαφοροποίησης του είδους της, εξαιτίας της γεωγραφικής εξάπλωσης και της μακροβιότητας που διαθέτει. Οι πολλαπλές γενετικές αποστάσεις είναι άμεσα εξαρτώμενες από το δείκτη που χρησιμοποιείται και το βιολογικό μοντέλο που ο κάθε ένας προϋποθέτει. Η επιλογή της απόστασης πραγματοποιείται ανάλογα με την περίπτωση και το δείκτη που χρησιμοποιείται. Συχνά χρησιμοποιούνται ειδικά προγράμματα για τον υπολογισμό των μεγεθών αυτών.

1.13 Φαινόμενο ετεροζυγωτίας

Η ποικιλότητα της ελιάς, όπως μελετήθηκε σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, αφορούσε τη σύγκριση σε αλληλουχίες για τον εντοπισμό του ποσοστού των θέσεων στο DNA που είναι πολυμορφικό. Σε κάποια σημεία της αλληλούχισης εμφανίζονται ετεροζυγώτες, που σημαίνει ότι δύο αντίγραφα του συγκεκριμένου είδους είναι διαφορετικά, τις περισσότερες φορές αποτέλεσμα από SNPs που μας καταδεικνύουν τις γενετικές παραλλαγές. Πιο συγκεκριμένα η γενετική ποικιλομορφία και η

επεξεργασία των δεδομένων της μας παραθέτει ότι για κάθε δείκτη το συχνότερα εμφανιζόμενο αλληλόμορφο θα χαρακτηρίζεται ως μείζων και το λιγότερα εμφανιζόμενο ως έλασσον (Schneider *et al.*, 2000). Εν συνεχεία παρατηρείται η παρουσία ή απουσία των μείζωνων ή ελασσόνων αλληλόμορφων (περίπτωση ομοζυγώτη) ή η παρουσία των δύο αλληλόμορφων (περίπτωση ετερόζυγη) για κάθε ένα από τα δείγματα των αλληλόμορφων. Η συχνότητα εμφάνισης της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας εκτιμάται μέσω προγραμμάτων γεννητικού ελέγχου των πληθυσμών (Rousset and Raymond, 1995).



Περίπτωση ετεροζυγώτη σε ποικιλία ελιάς Πηλίου με Ant

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) είναι η πιο κοινότυπη μορφή πολυμορφισμού του DNA, οι οποίοι είναι σε θέση να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες για πολλές εφαρμογές αναπαραγωγής, για τις μελέτες του πληθυσμού, για τη λήψη δακτυλικών αποτυπωμάτων και γενετικού υλικού. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ανιχνεύσει γενετικές ομοιότητες και τις αποστάσεις μεταξύ των καλλιεργούμενων τύπων ελιάς με τη χρήση της PCR τεχνικής. Η εύρεση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των τύπων ελιάς που καλλιεργούνται, μπορεί να βοηθήσει και να βελτιώσει τις γνώσεις μας για τους γενετικούς πόρους και το εξελικτικό υπόβαθρο. Στην πειραματική διαδικασία μελέτης της γενετικής παραλλακτικότητας συμμετείχαν έξι είδη Ελληνικών ποικιλιών ελιάς (Αμφίσης, Καλαμών, Πηλίου, Χαλκιδικής, Μεγάρων, Κολοβές).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Η εργαστηριακή μελέτη της απομόνωσης του DNA στηρίχθηκε σε φυτικό υλικό το οποίο συλλέχθηκε από έξι διαφορετικές περιοχές της Ελλαδικής επικράτειας. Συνολικά συλλέχθηκαν έξι δείγματα που άνηκαν στις ποικιλίες Καλαμών, Αμφίσης, Χαλκιδικής, Πηλίου, Κολοβές και Μεγάρων. Κατά τη διαδικασία συγκομιδής τους κόπηκαν καρποί ελιάς από τυχαία σημεία του δέντρου με ιδιαίτερα μεγάλη προσοχή ώστε να αποτελούνται από υγιή βλάστηση. Εν συνεχεία κατά τη μεταφορά τους τοποθετήθηκαν σε φορητό ψυγείο μέσα σε αλουμινόχαρτο. Τελικά τα δείγματα αρχειοθετήθηκαν και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνθήκες βαθιάς ψύξης στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Περιοχή	Ποικιλία ελιάς	Αριθμός δειγμάτων
Άγριλος Μεσσηνίας	Καλαμών	1
Τέμπη Ολύμπου	Αμφίσης	1
Καρυά Ολύμπου	Χαλκιδικής	1
Θήβα Βοιωτίας	Μεγάρων	1
Πύργοι Λέσβου	Κολοβές	1
Πήλιο	Πηλίου	1

2.2 Συσκευές

Υδατόλουτρο, απαγωγός εστία, συσκευή φυγοκέντρησης, ζυγός ακριβείας, συσκευή PCR, συσκευή ηλεκτροφόρησης, τροφοδοτικό ρεύματος, συσκευή vortex, πεχάμετρο, θερμικός αναδευτήρας, τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, κάλυμμα, φωτογραφική μηχανή.



Κάλυμμα



Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας



Συσκευή PCR



Τροφοδοτικό ρεύματος



Συσκευή ηλεκτροφόρησης



Συσκευή φυγοκέντρησης

2.3 TE buffer

10 mM trisCl pH = 7,4

1 mM EDTA pH = 8

Εργαστηριακά παρασκευάσαμε ποσότητα των 10 ml TE buffer και αποθηκεύτηκε.

2.4 TBE 5x

Tris—Borate (TBE)

54 g Tris base

27,5 g boric acid

20 ml 0,5 EDTA pH = 8

800 ml H₂O

Ανάδευση με μαγνητάκι και ήπια θέρμανση.

2.5 Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 10X

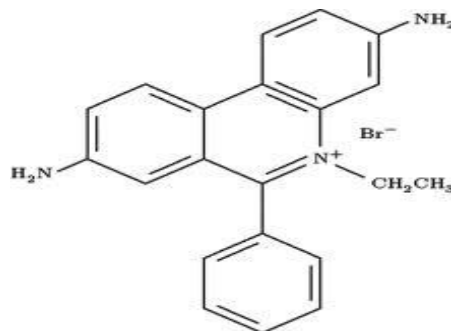
Η χρήση του επιβάλλεται κατά τη διαδικασία ηλεκτροφόρησης του DNA δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης, αφού η προσθήκη του εξασφαλίζει την αύξηση της πυκνότητας του DNA και δεν επιτρέπει κατά αυτόν τον τρόπο τη διάχυση του από τα πηγαδάκια φόρτωσης στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Επίσης με τη βοήθεια των χρωστικών ουσιών που περιέχει δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της ηλεκτροφορητικής πορείας. Η ακριβής σύσταση του διαλύματος φόρτωσης είναι 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης και 15% φικκόλη σε νερό.

2.6 Μάρτυρας DNA (Ladder)

Ο μάρτυρας χρησιμοποιείται κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία του DNA με πήκτωμα αγαρόζης και είναι αυτός που επιτρέπει τον προσδιορισμό των ζωνών του DNA και το κατάλληλο πρότυπο μεγεθών DNA. Εργαστηριακά χρησιμοποιήθηκε DNA Ladder Mix με περιεκτικότητα 0,1 μg/μl της Fermentas GeneRuler.

2.7 EtBr (βρωμιούχο αιθίδιο)

Αποτελεί μια χημική αρωματική ένωση, που παρεμβάλλεται σε μόρια DNA/RNA χρησιμεύοντας ως φθορίζουσα σήμανση όταν οι βάσεις του DNA ηλεκτροφορούνται μέσα σε πήκτωμα αγαρόζης και μετά τοποθετούνται σε σύστημα έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία UV. Το DNA μεταβιβάζει την UV ακτινοβολία στα 260 nm και την εκπέμπει στα 590 nm (ερυθρό πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος) με αποτέλεσμα τα μόρια του να φθορίζουν κατά την έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η αντίστοιχη μεταβίβαση της UV ακτινοβολίας από τη χρωστική είναι στα 302 nm και 366 nm και εκπέμπεται στα 590nm. Η τελική συγκέντρωση του EtBr στο πήκτωμα αγαρόζης πρέπει να είναι 1 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο αποδείχθηκε ότι έχει έντονη μεταλλαξιογόνο δράση, επειδή η παρεμβολή μέσα στα μόρια DNA προκαλεί αλλαγή στη στερεοδομή των μορίων και προκαλεί μεταλλάξεις πλαισίου ανάγνωσης και διακοπή αντιγραφής DNA. Στον άνθρωπο πολύ μικρές συγκεντρώσεις (0.25 mg/ml έως 1 mg/ml) φαίνεται ότι δεν έχουν αντίκτυπο στην εμφάνιση μεταλλάξεων. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θεωρείται ύποπτο, καθώς και υπεύθυνο για τη μείωση του μιτοχονδριακού DNA, για αυτό και είναι πάντοτε απαραίτητη η χρήση γαντιών κατά το χειρισμό του.



Βρωμιούχο αιθίδιο

2.8 Εξαγωγή DNA από καρπό ελιάς

Λαμβάνουμε ένα καρπό ελιάς από μια ξεχωριστή ποικιλία για να διενεργηθεί η διαδικασία εξαγωγής DNA. Η ελιά κόβεται προσεκτικά με ένα νυστέρι μέσα σε γουδί. Ο πυρήνας της ελιάς συνθλίβεται προσεκτικά και προστίθεται στο γουδί. Ξεκινάει έντονη λειοτρίβηση με το γουδοχέρι μέχρι να υπάρξει ένα ομογενοποιημένο δείγμα ελιάς. Εν συνεχεία, ζυγίζουμε σε αναλυτικό ζυγό 0,5 g σε erpendorf tube των 2 ml. Το δείγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 65 °C για 10 min. Έπειτα παγώνουμε άμεσα το δείγμα με υγρό άζωτο και το επανατοποθετούμε στο υδατόλουτρο. Η διαδικασία ψύξης-απόψυξης (freeze-thaw procedure) επαναλαμβάνεται ακόμα δύο φορές. Στο λιπαρό πλέον δείγμα μας προστίθεται με πιπέτα 750 μl CTAB extraction buffer (10% w/v CTAB, 75 mM Tris—HCl pH 8, 15 mM EDTA pH 8, 1 M NaCl, 1% v/v b-mercaptoethanol) προθερμασμένο στους 65 °C. Στη συνέχεια, ο σωλήνας με το δείγμα βυθίζεται σε λουτρό στους 65 °C και επώαζεται για 1,5 h με δυναμική ανακίνηση περιοδικά ανά 10 min χωρίς τη χρήση vortex. Μετά το πέρας της επώασης, ακολουθεί προσθήκη 750 ml chloroform:octanol (24:1—v/v), με αναστροφή για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 14,000 x g στροφές για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε καθαρό erpendorf tube των 2 ml και η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά. Στο τελικό υπερκείμενο υγρό του δείγματος που προκύπτει προστίθεται 0,1 του υπερκείμενου όγκου του 10% (w/v) CTAB (in water) με ανακίνηση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (Gawel and Jarret, 1991). Επιπλέον προσθήκη 1,5 του υπερκείμενου όγκου του CTAB precipitation buffer (1% w/v CTAB, 50 mM Tris—HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) και ανάμιξη ξανά με αναστροφή για 10 min. Μετά από φυγοκέντρηση στις 14.000 x g για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30 min. Στο σωλήνα με το ίζημα ακολουθεί προσθήκη 200 μl H₂O και 20 μl CH₃COONa 3 M, καθώς και αντίστοιχης ποσότητας 220 μl (CH₃)₂CHOH. Ύστερα από φυγοκέντρηση στα 14.000 x g για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου πραγματοποιείται πλύση με 70% CH₃CH₂OH και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η τελική προσθήκη 50 μl TE buffer στο ίζημα και η ακόλουθη επώαση του για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου αποδίδουν το επιθυμητό DNA solution (Busconi *et al.*, 2003).



Eppendorf tube



Πιπέτα

2.9 Καθαρισμός DNA (κατακρήμνιση με αιθανόλη)

Στη διαδικασία καθαρισμού όπως διεξήχθη εργαστηριακά, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (100%), $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (70%), CH_3COONa 3 M, γλυκογόνο και διπλά αποσταγμένο αποστειρωμένο νερό.

Στο δείγμα του DNA προστίθεται 2,5V $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (100%), 0,1V CH_3COONa 3 M, 0,5 μl γλυκογόνο και τοποθετείται στους -80°C για 15 min. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται το δείγμα στις 14000 x g για χρονικό διάστημα 10 min. Πραγματοποιείται προσεκτική αφαίρεση της υπερκείμενης ποσότητας και προστίθεται $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (70%) σε ποσότητα 0,5V. Φυγοκέντρηση στις 14000 x g για 5 min και αφαιρείται η υπερκείμενη ποσότητα. Τέλος το ίζημα που προκύπτει αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλυτοποιείται σε 20 μl διπλά αποσταγμένο αποστειρωμένο νερό.

2.10 DNA template

Οι αλληλουχίες του γενετικού υλικού προστίθενται στο μείγμα αντίδρασης της PCR σε μονόκλωνη ή δίκλωνη μορφή. Όσο μεγαλύτερα κομμάτια DNA (μετά τη διάσπαση από τα ένζυμα περιορισμού) χρησιμοποιούνται, τόσο καλύτερα τα αποτελέσματα της μεθόδου. Επίσης αποφεύγεται η αποδόμηση στην περιοχή του στόχου, ώστε να επιτευχθεί πολλαπλασιασμός της με μεγάλη καθαρότητα χωρίς την προσθήκη ανασταλτικών παραγόντων, όπως διάφορες φαινόλες, EDTA, πολυσακχαρίτες και λοιπές χημικές ενώσεις.

2.11 Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers)

Η μέγιστη απόδοση μιας αντίδρασης διασφαλίζεται μέσω της διατήρησης των κατάλληλων συνθηκών (ιοντική ισχύ, pH) με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων. Το πιο κοινότυπο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στη PCR αποτελείται από 50 mM KCl, 10 mM Tris—HCl (pH = 8,3) και 1,5 mM MgCl_2 .

2.12 MgCl₂

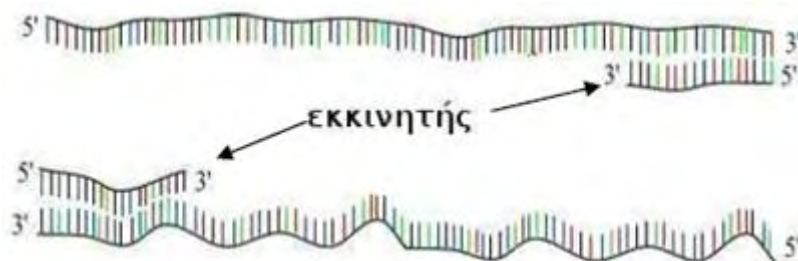
Το υπόστρωμα της πολυμεράσης αποτελείται από διαλυτά σύμπλοκα πολυμεράσης και dNTPs. Τα ιόντα Mg²⁺ έχουν βασικό ρόλο στη δημιουργία των συμπλόκων ενώσεων με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 0,5 mM έως 4 mM. Σε απουσία των ιόντων Mg²⁺ η πολυμεράση είναι ανενεργή, ενώ η αύξηση στην τιμή της συγκέντρωσης του άλατος μειώνει την ακρίβεια της πολυμεράσης και οδηγεί στη μη ειδική ενίσχυση.

2.13 dNTPs

5' τριφωσφορικά δεόξυριβονουκλεοτίδια dATP, dCPT, dGTP, dTTP είναι τέσσερα σε αριθμό και άκρως απαραίτητα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR για την επέκταση των εκκινητών. Η επιθυμητή συγκέντρωση των dNTPs κυμαίνεται μεταξύ 20 μM έως 200 μM (Tabor & Richardson, 1995).

2.14 Primers

Ολιγονουκλεοτίδια – εκκινητές που αποτελούν εκκινητικά μέρη για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων και χρησιμοποιούνται πάντα σε ζευγάρι. Το μήκος αυτών κυμαίνεται μεταξύ 20 – 30 νουκλεοτιδίων και η θερμοκρασία υβριδισμού τους εκτιμάται βάση των σημείων τήξεώς τους, τα οποία είναι παρόμοια κάθε φορά και για τους δύο εκκινητές. Η επιθυμητή συγκέντρωση των εκκινητών έχει εύρος τιμών μεταξύ 0,4 mM έως 0,6 mM.



Παρακάτω παρατίθενται τα ονόματα και οι αλληλουχίες των εκκινητών (5' → 3') που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη PCR τεχνική στο εργαστήριο.

Anthocyanidin synthase

Ant-F: *GCCCAGCAACAAGTGAGTATGCAAAAC*

Ant-R: *AACCCAATTTTCAACTCATTTTCTTCACC*

Calcium-binding protein

Cbp-F: *CACGGACAGGAATTCCAAGCCTTCA*

Cbp-R: *TGCCGCTTTTGTTCGTCATCATTTTCT*

Chalcone synthase

Chs-F: TCGGAGATTACTGCGGTTACTTTC

Chs-R: ACGCAATTTTTTCGGGGTTTAGG

Cycloartenol synthase

Cycl-F: GCCCATTTTCAGATTGCAC

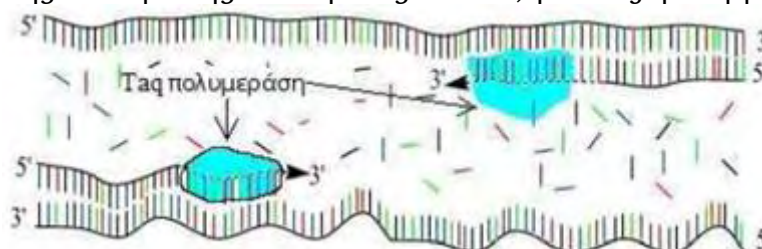
Cycl-R: GGGATTCTCAGGTCAGGA

(Forward, Reverse)

Primers	MgCl ₂ (mmol/L)	T _a (°C)	Amplicon Size (bp)
Ant	2	58	582
Cbp	3	58	476
Chs	2	58	672
Cycl	2,5	57	802

2.15 Ταq DNA πολυμεράση

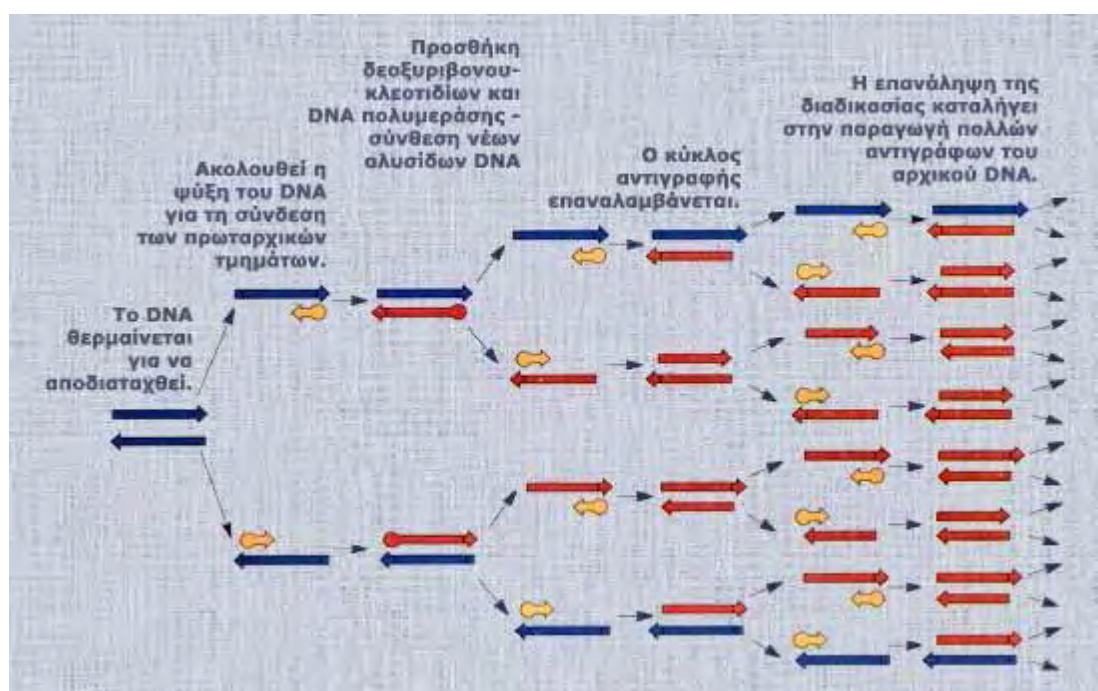
Η επέκταση των εκκινητών από το ένζυμο της ειδικής DNA πολυμεράσης οφείλεται στην αντοχή του ενζύμου σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες, όπου έχουμε τον υβριδισμό των εκκινητών και την επέκταση της αλληλουχίας, με μειωμένη μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών και αύξηση της αποτελεσματικότητας και της απόδοσης του τελικού προϊόντος. Οι απαιτήσεις της αντίδρασης είναι μόλις 1 unit, μια ενζυμική μονάδα.



2.16 PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

Polymerase Chain Reaction, αποτελεί τεχνική η οποία επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό in vitro επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Πραγματοποιείται εκλεκτική ενίσχυση του τμήματος DNA, με τη χρήση δύο πλευρικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών έπειτα από μια σειρά επαναληπτικών κύκλων επιμήκυνσης, παρουσία μιας ειδικής DNA πολυμεράσης. Η εκλεκτικότητα της μεθόδου βασίζεται στις γνωστές αλληλουχίες εκατέρωθεν της περιοχής που πρόκειται να ενισχυθεί, ώστε να υπάρξει προσχεδιασμός των εκκινητών. Ταq DNA πολυμεράση που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* με δραστηριότητα μέχρι και 95 °C και ιδιαίτερα θερμοσταθερή, διάλυμα dNTPs για την επέκταση

των νεοσχηματιζόμενων αλυσίδων, ρυθμιστικό διάλυμα για την Taq πολυμεράση, καθώς και απαραίτητη ποσότητα διπλά αποσταγμένου νερού για τη συμπλήρωση του τελικού όγκου. Η PCR τεχνική πραγματοποιείται σε κύκλους, με κάθε ένα από αυτούς να έχει ως αποτέλεσμα τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Κατά το πρώτο στάδιο της αντίδρασης έχουμε τη θερμική αποδιάταξη του DNA στόχου με το δίκλωνο DNA να μετατρέπεται σε μονόκλωνο, ενώ στο δεύτερο στάδιο έχουμε τη θερμική επαναδιάταξη του DNA με τους δύο εκκινητές να συνδέονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου. Κατά το τρίτο στάδιο γίνεται η σύνθεση του DNA με το διπλασιασμό του DNA στόχου, με συνέπεια την εκθετική αύξηση της ελάχιστης αρχικής ποσότητας του DNA, αφού επιτυγχάνεται ο διπλασιασμός του στο τέλος κάθε κύκλου. Ο πολλαπλασιασμός της αρχικής αλληλουχίας x (2^n) μετά το πέρας (n) αριθμού κύκλων είναι γεγονός με τη σύνθεση πλέον (2^n) νέων δίκλωνων μορίων DNA. Η παραπάνω διαδικασία εκτελείται σε θερμικό ανακυκλωτή, ο οποίος προσαρμόζει κυκλικά τις επιθυμητές θερμοκρασίες για τα συγκεκριμένα διαστήματα.



Στάδια αντίδρασης PCR τεχνικής.

Συνθήκες προγράμματος PCR στο εργαστήριο:

Αρχική αποδιάταξη: 95 °C για 4 min	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη DNA: 95 °C για 30 sec	
Υβριδισμός εκκινητών: T_a για 30 sec	
Επιμήκυνση αλυσίδων: 72 °C για 1 min	
Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 7 min	
Διατήρηση: 4 °C για πάντοτε	1 κύκλος

Ο τελικός όγκος του δείγματος DNA που χρησιμοποιήθηκε για τη PCR τεχνική είναι 10 µl και παρατίθεται αναλυτικά η σύνθεση του.

DNA template	2 µl
Reaction buffer	1 µl
MgCl ₂	0,4 µl
dNTPs	0,4 µl
Ant Forward primer	1 µl
Ant Reverse primer	1 µl
Taq DNA polymerase	0,2 µl
H ₂ O double distilled	4 µl

DNA template	2 µl
Reaction buffer	1 µl
MgCl ₂	0,6 µl
dNTPs	0,4 µl
Cbp Forward primer	1 µl
Cbp Reverse primer	1 µl
Taq DNA polymerase	0,2 µl
H ₂ O double distilled	3,8 µl

DNA template	2 µl
Reaction buffer	1 µl
MgCl ₂	0,4 µl
dNTPs	0,4 µl
Chs Forward primer	1 µl
Chs Reverse primer	1 µl
Taq DNA polymerase	0,2 µl
H ₂ O double distilled	4 µl

DNA template	2 µl
Reaction buffer	1 µl
MgCl ₂	0,5 µl
dNTPs	0,4 µl
Cycl Forward primer	1 µl
Cycl Reverse primer	1 µl
Taq DNA polymerase	0,2 µl
H ₂ O double distilled	3,9 µl

Στο DNA template 10 έως 60 ng genomic DNA, 2 μl.

Τα αρχικά stock όλων των primers που χρησιμοποιήθηκαν, διαλυτοποιήθηκαν με dd H₂O σε συγκέντρωση στα 100 pmol/μl και έπειτα αραιώθηκαν στα 10 pmol/μl (3 μl primer stock + 27 μl H₂O dd, σε όγκο τελικού διαλύματος 30 ml για κάθε primer), προτού προστεθούν στο δείγμα του DNA για τη PCR τεχνική

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_1 = 100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$$

$$V_1 = ; \mu\text{l}$$

$$C_2 = 10 \text{ pmol}/\mu\text{l}$$

$$V_2 = 30 \mu\text{l}$$

$$V_1 = (10)(30) / 100 = 3 \mu\text{l} \text{ προστίθενται σε } 27 \mu\text{l H}_2\text{O double distilled.}$$

Συγκέντρωση των dNTPs (4 x 10 mM) = 40 mM

$$(40)(0,4) / 10 = 1,6 \text{ mM}$$

Συνεπώς έχουμε 0,4 μl dNTPs 10 mM.

Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X buffer), μετατροπή του σε (1X buffer) με την προσθήκη 1 μl.

Συγκέντρωση διαλύματος του MgCl₂ 50 mM

$$(2 \text{ mM})(10 \mu\text{l}) / (50 \text{ mM}) = 0,4 \mu\text{l}$$

$$(3 \text{ mM})(10 \mu\text{l}) / (50 \text{ mM}) = 0,6 \mu\text{l}$$

$$(2 \text{ mM})(10 \mu\text{l}) / (50 \text{ mM}) = 0,4 \mu\text{l}$$

$$(2,5 \text{ mM})(10 \mu\text{l}) / (50 \text{ mM}) = 0,5 \mu\text{l}$$

Taq DNA πολυμεράση (5 U/μl), 0,2 μl.

2.17 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωριστούν μόρια DNA με βάση το μήκος τους. Χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στο διαχωρισμό τμημάτων DNA που έχουν προκύψει μετά από επεξεργασία με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα δείγματα DNA τοποθετούνται σε μια χαραγή που

έχει δημιουργηθεί στο ένα άκρο μιας πλάκας από πήκτωμα αγαρόζης και καλύπτονται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στα άκρα της πλάκας εξασφαλίζεται η εφαρμογή τάσης μεταξύ τους. Η τάση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση των διαφόρων θραυσμάτων DNA προς το θετικό πόλο, καθώς αποτελούνται από νουκλεοτίδια που είναι αρνητικά φορτισμένα (η φωσφορική ομάδα λόγω απόδοσης πρωτονίων φέρει αρνητικό φορτίο). Επειδή όμως η ταχύτητα μετακίνησης ενός θραύσματος DNA εξαρτάται από το μοριακό του βάρος και συνεπώς από το μέγεθός του (τα μεγάλα θραύσματα κινούνται πιο αργά από τα μικρά) σε μια δεδομένη χρονική στιγμή τα μικρότερα θραύσματα «προπορεύονται» έναντι των μεγαλύτερων κατά την κίνησή τους προς το θετικό πόλο, με αποτέλεσμα να μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους. Επίσης όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση του πηκτώματος σε αγαρόζη τόσο πιο εύκολα γίνεται ο διαχωρισμός των θραυσμάτων. Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε αγαρόζη Regular, διάλυμα TBE 1X, διάλυμα TBE 10X, βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και διπλά αποσταγμένο νερό. Εργαστηριακά παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης 1% με 0,5X TBE με τον ακόλουθο τρόπο:

- Ζυγίστηκαν 0,4 g αγαρόζης σε κωνική φιάλη.
- Προσθήκη 40 ml TBE 0,5X στην παραπάνω ποσότητα.
- Θέρμανση της κωνικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων για 5 min με διαρκή παρακολούθηση μέχρι της πλήρους διαλυτοποίησης της αγαρόζης.
- Ψύξη της φιάλης με τρεχούμενο νερό βρύσης.
- Προσθήκη 2 ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και ανακίνηση.
- Έκχυση του διαλύματος αγαρόζης στις ειδικές βάσεις της ηλεκτροφορητικής συσκευής με ειδικά χτενάκια που διαμορφώνουν τα πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης για την τοποθέτηση του DNA δείγματος.
- Μετά την πάροδο 20 min έχουμε τη στερεοποίηση του πηκτώματος με 8 πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης (για τη δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης με 16 πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης απλά προσθέτουμε αρχικά 0,8 g αγαρόζης, 80 ml TBE 0,5X και 3 ml EtBr).

Εν συνεχεία, αφαιρέθηκε το ειδικό χτενάκι και τοποθετήθηκε το πήκτωμα στην ηλεκτροφορητική συσκευή, παρουσία αρκετής ποσότητας TBE 0,5X ώστε να υπάρξει πλήρης κάλυψη στα πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης. Με πιπέτα φορτώνονται τα DNA δείγματα προς ηλεκτροφόρηση μαζί με 2 ml Loading buffer σε ξεχωριστά πηγαδάκια. Σε ένα από τα πηγαδάκια φορτώνεται ο μάρτυρας, 2 ml DNA Ladder Mix

(0,1 µg/µl, 50 µg) της Fermentas GeneRuler. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε τάση 100V για περίπου 1 h. Τελικά παρατηρούνται σε υπεριώδη ακτινοβολία UV οι ζώνες υπολογίζοντας το μέγεθος και την ποσότητα του τελικού προϊόντος DNA δείγματος. Η λήψη φωτογραφίας και η αρχειοθέτηση είναι απαραίτητη (Aaij & Borst, 1972).

2.18 Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε εργαστηριακά είναι το Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System της Promega. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι: το διάλυμα πρόσδεσης στη μεμβράνη (Membrane Binding Solution) όπου σε κάθε 10 mg διαλύματος έχουμε 10 µl MBS, διάλυμα πλύσης μεμβράνης (Membrane Wash Solution), υδατικό διάλυμα ελεύθερο από νουκλεάσες (Nuclease-Free Water) και δείγμα του πηκτώματος (gel). Εντοπίζεται η επιθυμητή ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης, κόβεται με ιδιαίτερη προσοχή και τοποθετείται εντός προζυγισμένου erpendorf tube των 2 ml κατάλληλο για φυγοκέντρηση. Υπολογίζεται το βάρος της ζώνης μέσω αφαίρεσης του βάρους ενός αντιστοικού άδειου erpendorf tube των 2 ml. Προσθήκη 10 µl Membrane Binding Solution για κάθε 10 mg gel. Εν συνεχεία εκτελείται vortex και επώαση σε υδατόλουτρο στους 50 – 65 °C με συνεχή παρατήρηση, μέχρι το κομμάτι του gel να διαλυθεί εντελώς. Τοποθετείται το διαλυμένο μίγμα gel σε στήλη (SV mini column), η οποία είναι τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και φυγοκέντρηση σε 14000 x g για 1 min. Απόρριψη και επανατοποθέτηση της SV mini column σε σωληνάριο συλλογής. Προσθήκη 700 µl Membrane Wash Solution (περιεκτικότητα 95% σε αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14000 x g για 1 min. Απόρριψη και επανατοποθέτηση της στήλης σε καθαρό erpendorf tube των 2 ml κατάλληλο για φυγοκέντρηση. Προσθήκη 500 µl Membrane Wash Solution (περιεκτικότητα 95% σε αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14000 x g για 5 min. Το σωληνάριο συλλογής αδειάζεται και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση της στήλης για 1 min με το καπάκι της φυγόκεντρος ανοικτό ώστε να επιτευχθεί η εξάτμιση της υπολειπόμενης αιθανόλης. Προστίθενται 50 µl Nuclease-Free Water η οποία έχει προθερμανθεί σε υδατόλουτρο στους 50-65 °C, στο κέντρο της στήλης και επωάζεται για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντρηση σε 14000 x g για 1 min. Απορρίπτεται η στήλη και αποθηκεύεται το DNA σε θερμοκρασία 4 °C ή -20 °C.

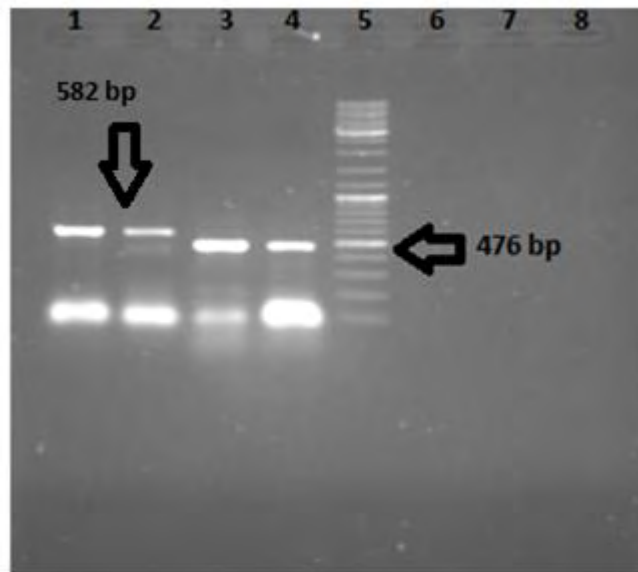
2.19 Συστήματα βιο-πληροφοριακής επεξεργασίας

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων στο εργαστήριο έγινε με χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) στην υποκατηγορία blastn, μέσω του οποίου πραγματοποιήθηκε σύγκριση κάθε αλληλουχίας, με μια ευρύτερη βάση καταχωρημένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Το πρόγραμμα δίνει την δυνατότητα αξιόπιστων αποτελεσμάτων, μέσω της παροχής επιλογών που περιορίζουν την αναζήτηση, αποκλείοντας κάποιες βάσεις δεδομένων εκτός του πεδίου ενδιαφέροντος της ελιάς. Επιπλέον, υπάρχει μια πολύ σημαντική παράμετρος, μέσω της οποίας μπορούμε να αξιολογήσουμε το αποτέλεσμα της σύγκρισης και αυτό είναι ο αλγόριθμος e-value. Το e-value αποτελεί μέτρο της στατιστικής σημαντικότητας του αποτελέσματος που παρέχεται και είναι αναγκαίο προκειμένου να διαχωριστούν τυχαία ευρήματα από σημαντικά. Η μηδενική τιμή του e-value παρέχει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, καθώς ελαχιστοποιείται η πιθανότητα αντιστοίχισης της αλληλουχίας του δείγματος της ελιάς στη βάση δεδομένων με τυχαίο τρόπο. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του μορίου στόχου, το οποίο ενισχύθηκε μέσω της PCR τεχνικής και απεστάλει για αλληλούχιση, λαμβάνεται σε μορφή FASTA και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα για σύγκριση στο BLAST (Tatusova & Madden, 1999). Σε περιπτώσεις όπου το αρχικό ή τελικό τμήμα της ακολουθίας δε δύναται να διαβαστεί μέσω του προγράμματος επεξεργασίας των χρωματογραφημάτων Chromas Lite καθαρίζεται τόσο από το τέλος όσο και από την αρχή, πριν την εισαγωγή της στο Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ώστε να διευκολυνθεί η σύγκριση. Στη συνέχεια, με το πρόγραμμα Omiga παρέχεται η δυνατότητα περαιτέρω επεξεργασίας των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και στοίχισης με βάση των εντολών dot plot και align, ώστε να συγκριθούν περιοχές με σχετική ομολογία μεταξύ τους. Τέλος, δίνεται η δυνατότητα σύγκρισης και δημιουργίας ενός φυλογενετικού δέντρου με τις ποικιλίες ελιάς που διατέθηκαν πειραματικά στο εργαστήριο, καθώς και αλληλουχίες άλλων αποθηκευμένων από τη λίστα δεδομένων του NCBI, μέσω της χρήσης του προγράμματος ClustalW2 – Multiple Sequence Alignment στην υποκατηγορία του DNA.

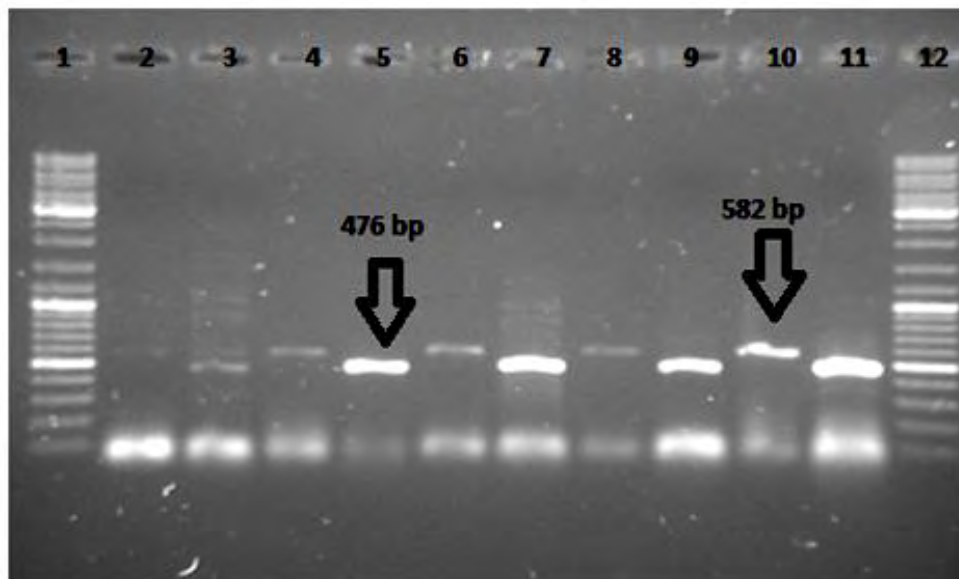
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα αντιδραστήρια της PCR τεχνικής, τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (συνθήκες βαθιάς ψύξης), τοποθετήθηκαν στον εργαστηριακό πάγκο για να επιτευχθεί απόψυξη και στη συνέχεια όλα τα αντιδραστήρια αναδεύτηκαν ελαφρώς πριν την χρησιμοποίησή τους, εκτός των dNTPs και της Taq πολυμεράσης. Η γενική εργαστηριακή οδηγία επιτάσσει την εργασία μέσα στον πάγκο κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, για τη σωστή διατήρησή τους. Σε ότι αφορά τη διαδικασία που ακολουθήθηκε, επειδή η αντίδραση εκτελέστηκε ταυτόχρονα για όλα τα δείγματα, προετοιμάστηκε ένα mix το οποίο περιείχε όλα τα αντιδραστήρια για τη διεξαγωγή της αντίδρασης, εκτός από το DNA template, σε αναλογίες αντίστοιχες με τον αριθμό των δειγμάτων προς ενίσχυση μέσω της PCR τεχνικής. Το mix περιείχε αποστειρωμένο νερό, το reaction buffer, τα dNTPs, τους εκκινητές και την Taq πολυμεράση και παρασκευάστηκε σε αποστειρωμένο erpendorf tube των 1,5 ml. Πολύ σημαντικό γεγονός αποτελεί η προσθήκη της Taq πολυμεράσης στο mix να πραγματοποιείται πάντοτε στο τέλος, πριν αυτό διαμοιραστεί στα ειδικά PCR tubes που φέρουν το DNA των προς ενίσχυση δειγμάτων, καθώς το ένζυμο είναι υπερευαίσθητο και η ενεργότητα που διαθέτει εξασθενεί σημαντικά εάν παραμείνει αρκετή ώρα εκτός κατάψυξης. Επιπλέον, καθώς η πολυμεράση αρχίζει να λειτουργεί άμεσα μετά την προσθήκη της, τα δείγματα πρέπει να διατηρούνται στον πάγκο κατά το διάστημα της διαμοίρασης, όπου το ένζυμο αδρανοποιείται μερικώς σε χαμηλές θερμοκρασίες. Μέσα σε σχετικά σύντομο διάστημα από την προσθήκη της Taq, τα δείγματα πρέπει να εισαχθούν στην συσκευή PCR, προκειμένου να εξαλειφτεί η πιθανότητα να πραγματοποιηθούν μη ειδικές ενσωματώσεις από το ένζυμο. Η αντίδραση, όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10 μl για κάθε δείγμα. Έτσι, σε κάθε PCR tube, προστέθηκαν 8 μl από το mix και 2 μl δείγματος DNA template. Όλα τα αντιδραστήρια αναδεύτηκαν ελαφρώς με vortex πριν την χρησιμοποίησή τους, πλην των dNTPs και της Taq πολυμεράσης.

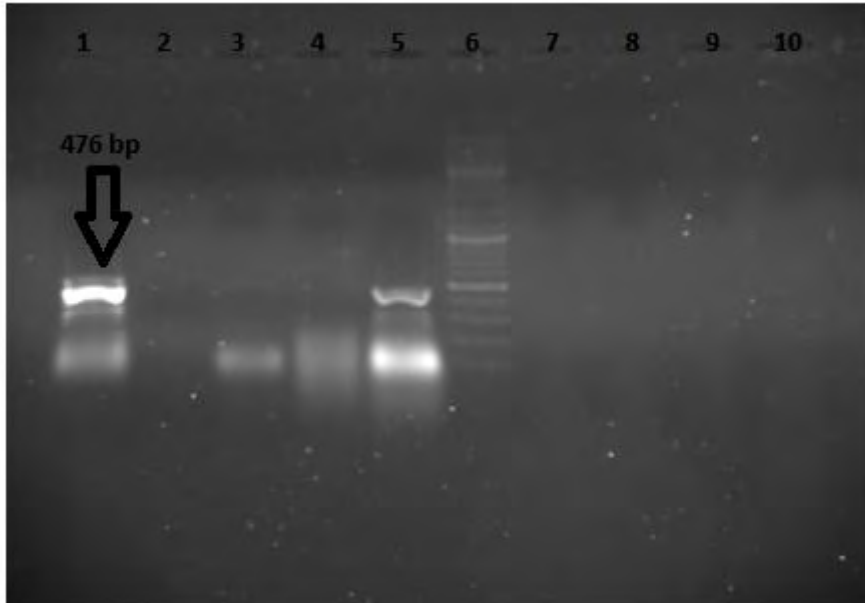
Μετά την εφαρμογή του προγράμματος της PCR στα δείγματα, επετεύχθη η επιθυμητή ενίσχυση του DNA και μετά το πέρας της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας σε gel αγαρόζης ελήφθησαν οι παρακάτω φωτογραφίες. Σε κάθε περίπτωση ξεχωριστά, έχουμε εμφανείς μπάντες του DNA, οι οποίες εμφανίζονται κατά την υποβολή του gel σε λάμπες φθορισμού με UV ακτινοβολία.



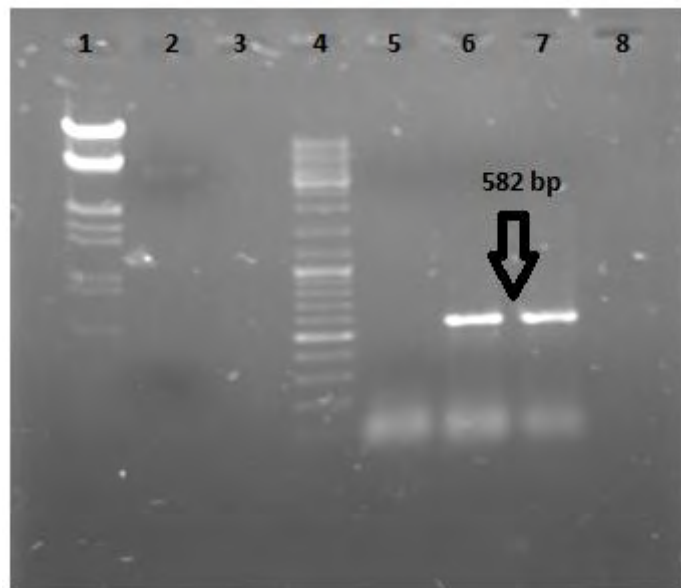
1.Ant-Kalam 2.Ant-Meg 3.Cbp-Meg 4.Cbp-Xalk 5.Ladder



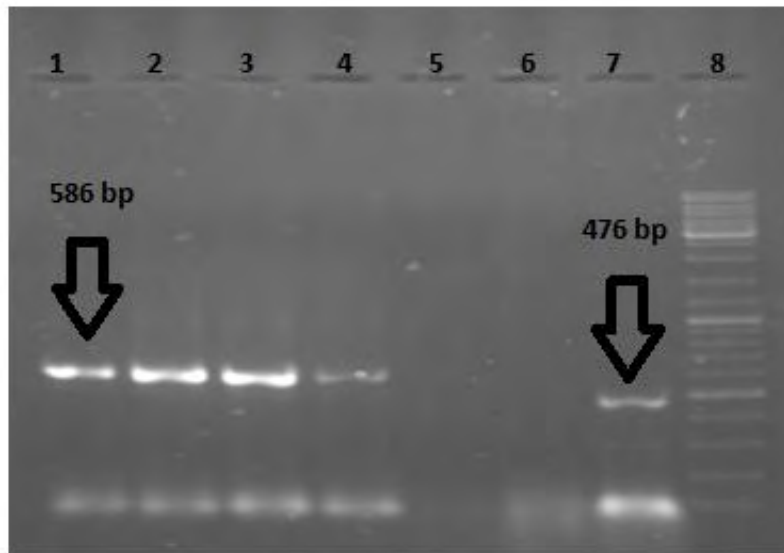
1.Ladder 2.Ant-Pil 3.Cbp-Ant 4.Ant-Amf 5.Cbp-Amf 6.Ant-Kalam 7.Cbp-Kalam
8.Ant-Xalk 9.Cbp-Xalk 10.Ant-Meg 11.Cbp-Meg 12.Ladder



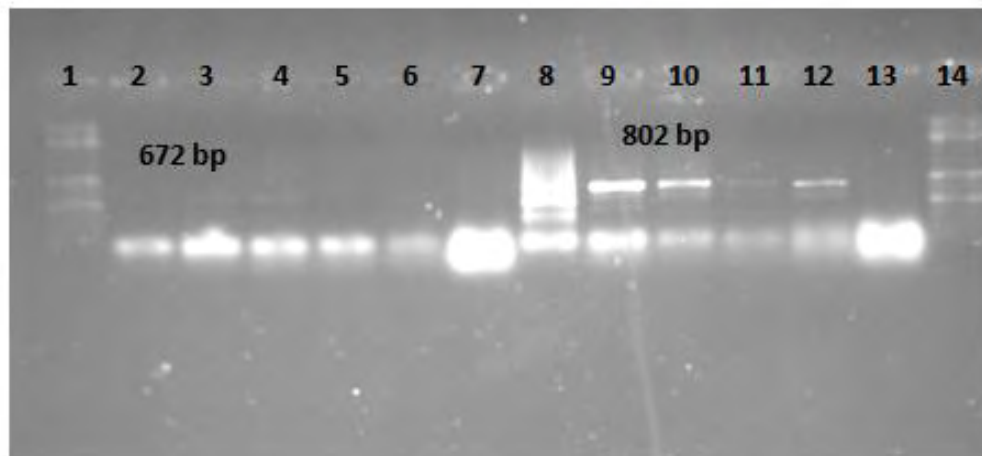
1. *Cbp-Pil*(RePCR) 2. *Ant-Pil* 3. *Cbp-Pil* 4. *Ant-Kol* 5. *Cbp-Kol* 6. *Ladder*



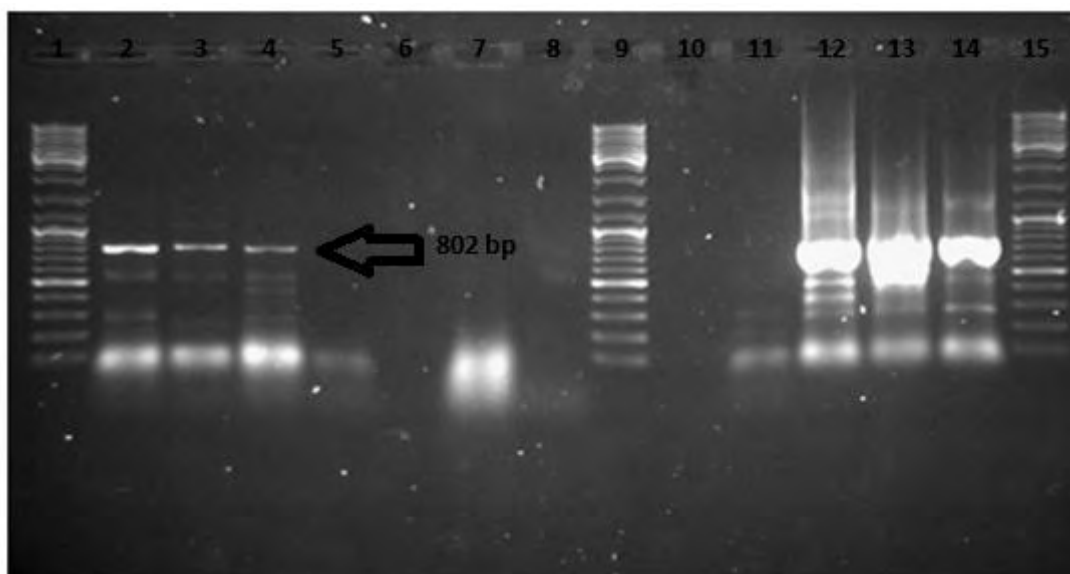
4. *Ladder* 5. *Ant-Xalk* 6. *Ant-Kalam* 7. *Ant-Amf*



*1.Ant-Pil(RePCR) 2.Ant-Amf(RePCR) 3.Ant-Kalam(RePCR) 4.Ant-Xalk(RePCR)
5.Ant-Meg 6.Ant-Kol 7.Cbp-Kol 8.Ladder*



*1.Ladder 2.Chs-Pil 3.Chs-Amf 4.Chs-Kalam 5.Chs-Xalk 6.Chs-Meg 7.Chs-Kol
8.Cycl-Pil 9.Cycl-Amf 10.Cycl-Kalam 11.Cycl-Xalk 12.Cycl-Meg 13.Cycl-Kol
14.Ladder*



1.Ladder 2.Cycl-Amf 3.Cycl-Kalam 4.Cycl-Meg 5.Cycl-Xalk 6.Cycl-Kol 7.Cycl-Pil 8.Cycl-Pil 9.Ladder 12.Cycl-Amf(RePCR) 13.Cycl-Kalam(RePCR) 14.Cycl-Meg(RePCR) 15.Ladder

Όλες οι παραπάνω μπάντες του DNA κόπηκαν και καθαρίστηκαν με τη μέθοδο της ανάκτησης του DNA από το πήκτωμα της αγαρόζης.

Από τις ποσότητες των εκκινητών (primers) της αρχικής διαλυτοποίησης των stock σε συγκέντρωση 100 pmol/μl στάλθηκαν τελικά για τη διαδικασία της αλληλούχισης με τη μέθοδο 5 pmol/ μl από κάθε εκκινητή ποσότητας τουλάχιστον 5 μl.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_1 = 100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$$

$$V_1 = ; \mu\text{l}$$

$$C_2 = 5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$$

$$V_2 = 5 \mu\text{l}$$

$$V_1 = (5)(5) / 100 = 0,25 \mu\text{l} \text{ προστίθενται σε } 4,75 \mu\text{l H}_2\text{O double distilled.}$$

PRIMERS PROVIDED			
Provide at least 5µL at 3.2pmol/µL per reaction, 18-22bp, GC content of 50-55%, T _a of 55-60°C.			
Name	Concⁿ (pmol/µL)	Sequence (optional)	T_a
CbpF	5	CACGGACAGGAATTCCAAGCCTTCA	58
CbpR	5	TGCCGCTTTTGTTCGTCATCATTTTCT	58
AntF	5	GCCCAGCAACAAGTGAGTATGCAAAC	58
AntR	5	AACCCAATTTTCAACTCATTTTCTTCACC	58
CyclF	5	GCCCATTTCAGATTGCAC	57
CyclR	5	GGGATTCTCAGGTCAGGA	57
ChsF	5	TCGGAGATTACTGCGGTTACTTTC	58
ChsR	5	ACGCAATTTTTCGGGGTTTAGG	58

Τα δείγματα DNA που προωθήθηκαν για αλληλούχιση στο τμήμα Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δίνονται στον παρακάτω πίνακα και πληρούσαν τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις των 50 ng/ml. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα DNA που εξετάστηκαν δεν απέδωσαν ικανοποιητικά φωτεινές μπάντες που να εγγυούνται την απαραίτητη ποσότητα DNA για τη διαδικασία της αλληλούχισης (Jaeckel & *et al.*, 1998).

SAMPLES PROVIDED						
Provide for each reaction: PCR products (50ng/Ml, min 5Ml). Please attach, a picture of the samples after purification (include MW markers)						
Sample name	Type (PCR, Plasmid, BAC)	Concⁿ (ng/ml)	Purified (PCR, Gel, None)	Type of Purification requested (PCR, Gel, None)	Size(bp)	Primer to be used
Meg.Ant	PCR	50			582	AntF
Meg.Ant	PCR	50			582	AntR
Amf.Cbp	PCR	50			476	CbpF
Amf.Cbp	PCR	50			476	CbpR
Kalam.Cbp	PCR	50			476	CbpF
Kalam.Cbp	PCR	50			476	CbpR
Xalk.Cbp	PCR	50			476	CbpF

Xalk.Cbp	PCR	50			476	CbpR
Meg.Cbp	PCR	50			476	CbpF
Meg.Cbp	PCR	50			476	CbpR
Pil.Ant	PCR	50			582	AntF
Amf.Ant	PCR	50			582	AntF
Kalam.Ant	PCR	50			582	AntF
Amf.Cycl	PCR	50			802	CyclF
Amf.Cycl	PCR	50			802	CyclR
Kalam.Cycl	PCR	50			802	CyclF
Kalam.Cycl	PCR	50			802	CyclR
Meg.Cycl	PCR	50			802	CyclF
Meg.Cycl	PCR	50			802	CyclR

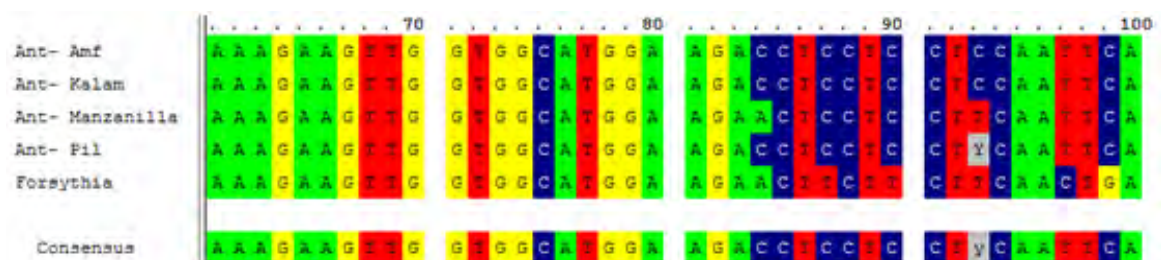
Cultivar name	Population	Primer in use
Amfissa	Greek	Ant
Kalamon	Greek	Ant
Manzanilla	Australian	Ant
Pilio	Greek	Ant
Forsythia	Balkan	Ant

Στον παραπάνω πίνακα τις Ελληνικές ποικιλίες (Αμφίσσης, Καλαμών, Πηλίου) πλαισιώνουν, άλλη μια ισπανική ποικιλία ελιάς που καλλιεργείται στην Αυστραλία, καθώς και ένα είδος θάμνου από την περιοχή των Βαλκανίων, πολύ κοντά συγγενικά στο δέντρο της ελιάς. Αυτές προέκυψαν από τη βάση δεδομένων του NCBI (National Center for Biotechnology Information), όπου και πραγματοποιήθηκε BLAST, στην υποκατηγορία για νουκλεοτίδια, στις αλληλουχίες για τις ποικιλίες της Άμφισσας, Καλαμών και Πηλίου αντίστοιχα. Και στις τρεις περιπτώσεις καταλήξαμε στον παρακάτω πίνακα και αυτό διότι οι Ελληνικές ποικιλίες που ενισχύθηκαν στο κομμάτι του Ant (Anthocyanidin synthase) έχουν ομοιότητα που αγγίζει το 98% της μέγιστης ταυτοποίησης (Max Identity) γεγονός που τεκμηριώνεται και μέσω σύγκρισης τους στο Dot Plot του Omiga (βλέπε παράρτημα).

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF384050.1	Olea europaea anthocyanidin synthase mRNA, partial cds	944	944	97%	0.0	98%
Y12489.1	Forsythia x intermedia mRNA for anthocyanidin synthase	669	669	96%	0.0	89%
Y07623.1	Forsythia x intermedia mRNA for anthocyanidin synthase	442	442	59%	1e-120	90%
HQ141989.1	Ipomoea wrightii anthocyanidin synthase (ANS) mRNA, partial cds	340	340	83%	5e-90	80%
XM_002298045.1	Populus trichocarpa anthocyanidin synthase (ANS2), mRNA	337	337	89%	6e-89	79%
EF148007.1	Populus trichocarpa clone WS0126_K18 unknown mRNA	337	337	89%	6e-89	79%

BLAST Nucleotide Sequence

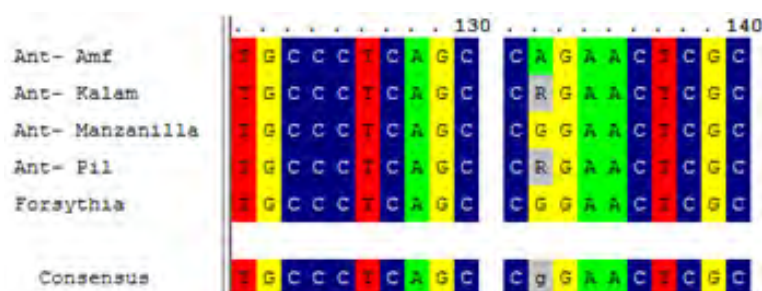
Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν βάση της χρήσης του πληροφοριακού προγράμματος Chromas Lite παρατηρούνται μεικτές κορυφές από δύο διαφορετικές βάσεις του νουκλεϊκού οξέος του DNA στα παρακάτω σημεία.

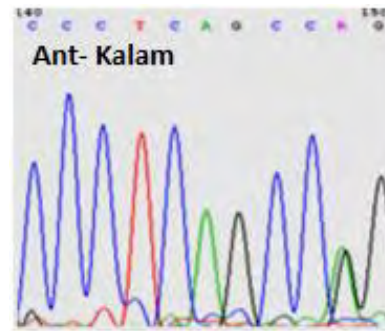
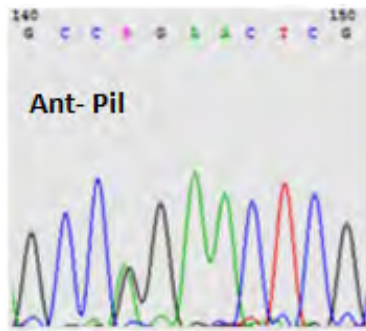


Στις 84 βάσεις παρατηρείται το πρώτο SNP με τις Ελληνικές ποικιλίες να έχουν κυτοσίνη, ενώ η Μανζανίλο και θάμνος Φορούθια αδενίνη. Τέτοιου είδους συνταύτιση των Ελληνικών ποικιλιών απέναντι στην ισπανική ποικιλία οδηγούν στο διαχωρισμό τους στο φυλογενετικό δέντρο.

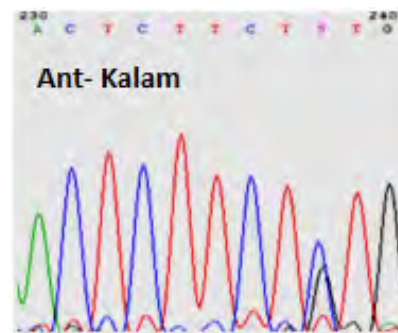
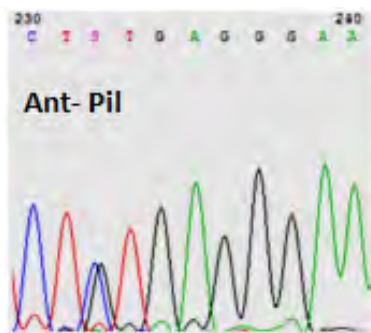
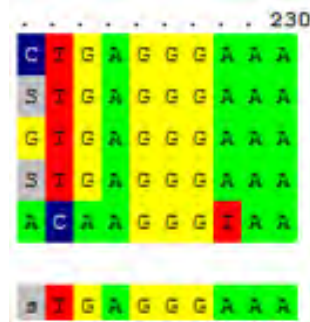


Περίπτωση ετεροζυγωτίας στην ποικιλία του Πηλίου με μεικτή κορυφή κυτοσίνης-θυμίνης στο συγκεκριμένο σημείο. Οι ποικιλίες Αμφίσης και Καλαμών διαθέτουν κυτοσίνη, ενώ οι Manzanilla και Forsythia θυμίνη.

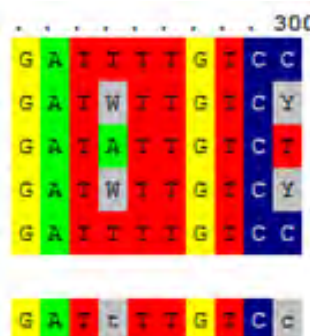


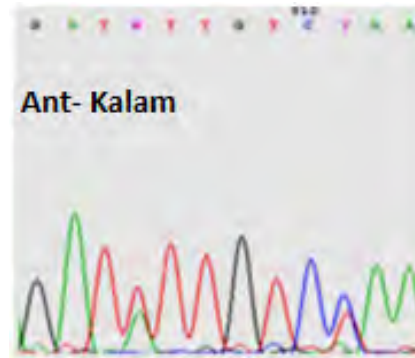
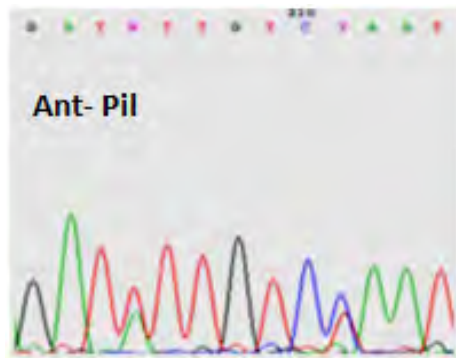


Παρατηρείται καθαρή περίπτωση ετεροζυγωτίας στις ποικιλίες του Πηλίου και της Καλαμών με μεικτές κορυφές αδενίνης-γουανίνης, ενώ στην Αμφίσσης έχουμε αδενίνη, στις Manzanilla και Forsythia έχουμε γουανίνη.



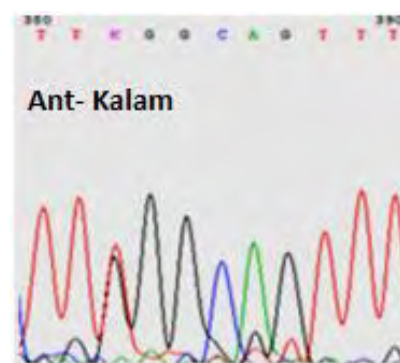
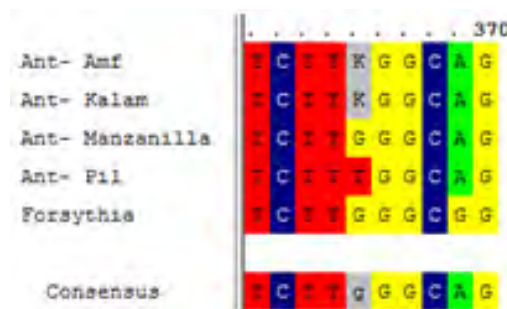
Ετεροζυγωτία στις ποικιλίες Πηλίου και Καλαμών στο συγκεκριμένο σημείο με μεικτές κορυφές κυτοσίνης-γουανίνης, ενώ η Αμφίσσης έχει κυτοσίνη, η Manzanilla γουανίνη και η Forsythia αδενίνη.





Στις 294 βάσεις του align έχουμε επίσης ετεροζυγωτία στις ποικιλίες Πηλίου και Καλαμών με μεικτή κορυφή από κυτοσίνη-αδενίνη, στις ποικιλίες Αμφίσης και Forsythia θυμίνη, ενώ τέλος στην Manzanilla αδενίνη.

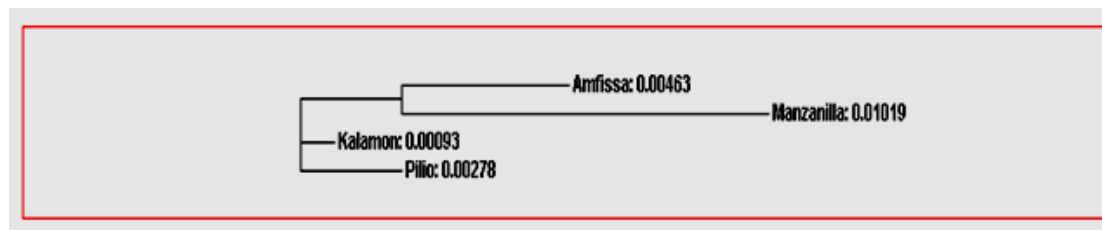
Στις 300 βάσεις του align έχουμε επίσης ετεροζυγωτία στις ποικιλίες Πηλίου και Καλαμών με μεικτή κορυφή από κυτοσίνη-θυμίνη, στις ποικιλίες Αμφίσης και Forsythia κυτοσίνη, ενώ τέλος στην Manzanilla θυμίνη.



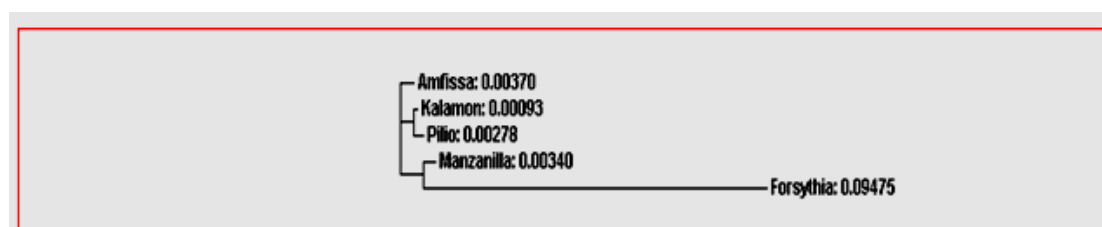
Στις Αμφίσης και Καλαμών έχουμε ετεροζυγωτία με γουανίνη-θυμίνη, ενώ στην Πηλίου έχει θυμίνη και οι ποικιλίες Manzanilla, Forsythia γουανίνη.

Συνολικά εντοπίστηκαν 8 διαφορετικά SNPs στο σύνολο των ποικιλιών της ελιάς που συγκρίθηκαν σε αυτή την ενίσχυση με PCR τεχνική. Επίσης είχαμε αρκετές περιπτώσεις ετεροζυγωτίας, όπως αυτές παρουσιάστηκαν παραπάνω. Ο θάμνος Φορούθια διαχωρίστηκε

εμφανίζοντας 38 SNPs γεγονός που επιβεβαιώνει ότι δεν ανήκει στο είδος της ελιάς, αλλά σε συγγενικό (μεγαλύτερη γενετική απόσταση από τις άλλες ποικιλίες ελιάς).



Phylogram tree



Phylogram tree

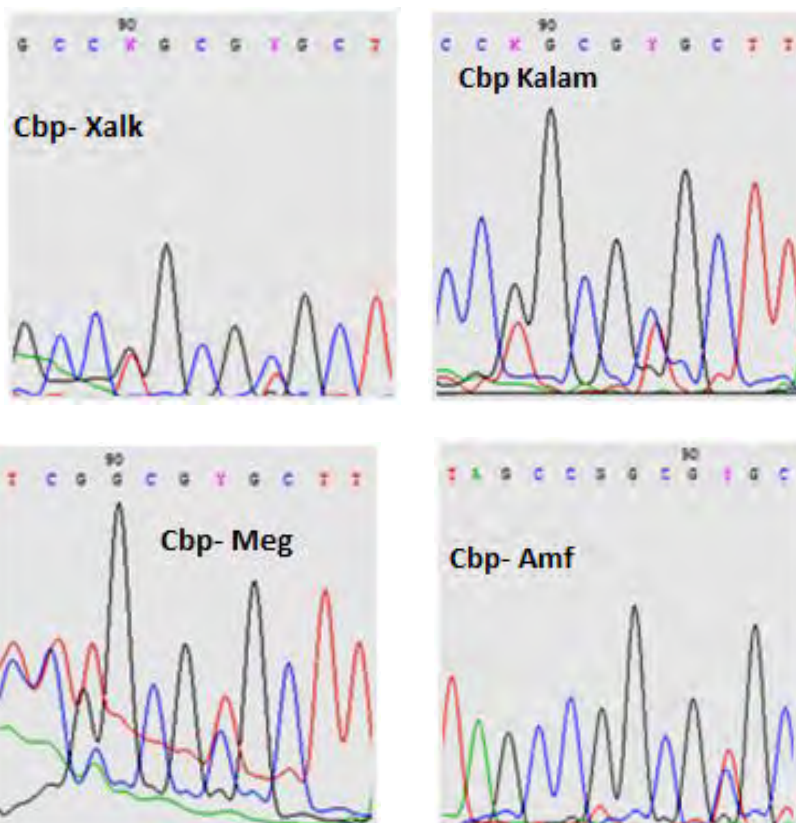
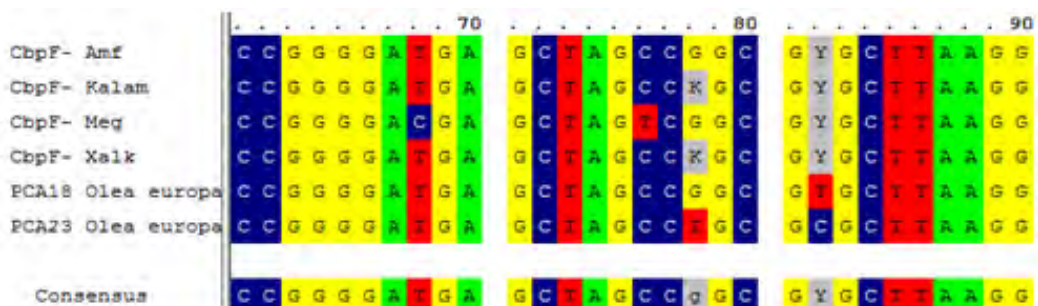
Όπως παρατηρούμε από τα φυλογενετικά δέντρα παραπάνω και σύμφωνα πάντα με τις γενετικές αποστάσεις που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των ποικιλιών ελιάς σε 582 βάσεις του Anthocyanidin synthase στο CLUSTALW, συμπεραίνουμε ότι το Πήλιο είναι πολύ κοντά στην ποικιλία Καλαμών παρουσιάζοντας 4 ετεροζυγωτίες στα ίδια σημεία και άλλα 2 SNPs. Η Αμφίσση ξεχωρίζει από τις άλλες δύο σχεδόν πανομοιότυπες ποικιλίες παρουσιάζοντας 1 ετεροζυγωτία στο ίδιο σημείο με την ποικιλία Καλαμών, καθώς και 3 SNPs. Η ισπανική ποικιλία της Manzanilla απομακρύνεται περαιτέρω από την Καλαμών που είναι και η πρόδρομη ποικιλία ελιάς όλων των υπολοίπων, με 8 SNPs. Ο θάμνος Φορσύθια ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα, ιξού και συγγενικό είδος με την ελιά με αρκετά SNPs όπως βλέπουμε στο Align του Omiga (βλέπε παράρτημα).

Cultivar name	Population	Primer in use
Amfissa	Greek	Cbp
Kalamon	Greek	Cbp
Megaron	Greek	Cbp
Xalkidikis	Greek	Cbp
PCA18 Olea europaea	-	Cbp
PCA23 Olea europaea	-	Cbp

Η βάση δεδομένων του NCBI (National Center for Biotechnology Information), όπου και πραγματοποιήθηκε BLAST σε επίπεδο νουκλεοτιδίων στις αλληλουχίες των ποικιλιών Αμφίσης, Καλαμών, Μεγάρων και Χαλκιδικής, ανευρυγμένες με Cbp (Calcium binding proteins) σε 476 βάσεις του DNA, έδωσε μέγιστη ταυτοποίηση (Max Ident) 99% με δύο ποικιλίες ελιάς του γένους *Olea europaea*, PCA18 και PCA23.

Sequences producing significant alignments:

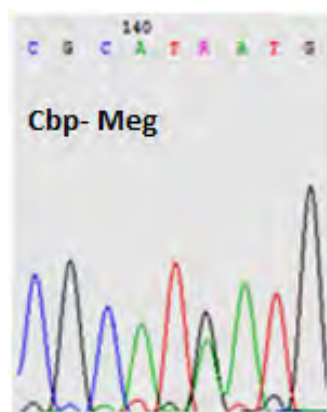
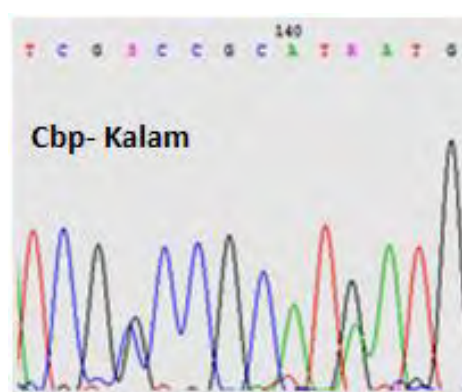
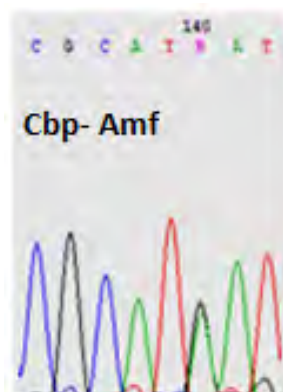
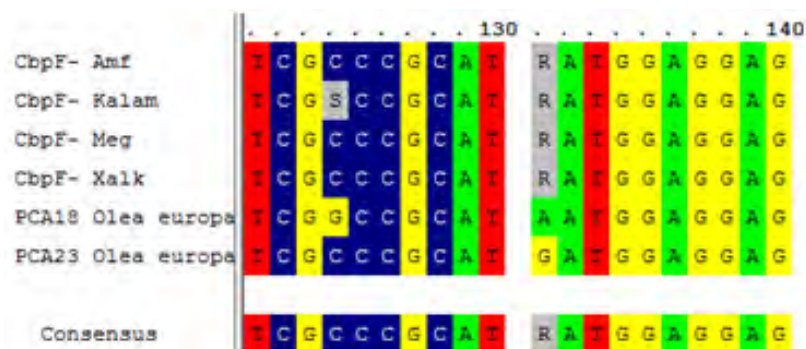
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF228451.1	<i>Olea europaea</i> calcium-binding protein (PCA23) mRNA, complete c	235	798	100%	0.0	99%
AF228451.1	<i>Olea europaea</i> calcium-binding protein (PCA18) mRNA, complete c	235	798	100%	0.0	99%
XM_002181811.1	PREDICTED: Glycine max calcium-binding allergen Ole e 8-like (LOC	113	31.6	38%	4e-13	77%
CG28411.1	Vitis vinifera clone SSOAE81Y021	111	31.4	34%	5e-12	75%
XM_002181811.1	PREDICTED: Glycine max calcium-binding allergen Ole e 8-like (LOC	103	30.1	38%	5e-12	74%



Στις 68 και 76 βάσεις έχουμε δύο SNPs για την ποικιλία Μεγάρων, αφού διαθέτει κυτοσίνη και θυμίνη στα συγκεκριμένα σημεία, ενώ όλες οι υπόλοιπες έχουν θυμίνη και κυτοσίνη αντίστοιχα.

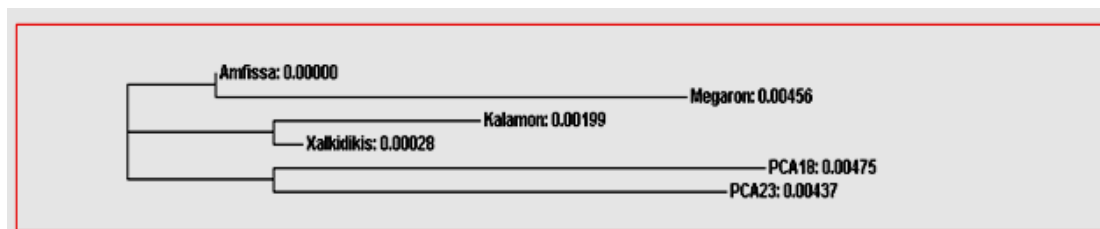
Στις 78 βάσεις έχουμε ετεροζυγώτες στις ποικιλίες Καλαμών και Χαλκιδικής με θυμίνη-γουανίνη να δρουν ανταγωνιστικά, ενώ στις Αμφίσης, Μεγάρων και PCA18 έχουμε γουανίνη. Στη PCA23 έχουμε θυμίνη.

Στις 82 βάσεις παρατηρείται ετεροζυγωτία στις ποικιλίες Αμφίσης, Καλαμών, Μεγάρων, Χαλκιδικής με μεικτές κορυφές κυτοσίνης-θυμίνης. PCA18 θυμίνη και PCA23 κυτοσίνη.



Φαινόμενο ετεροζυγωτίας στις 124 βάσεις για την ποικιλία Καλαμών με γουανίνη-κυτοσίνη, ενώ στις υπόλοιπες έχουμε κυτοσίνη, πλην της PCA18 όπου έχουμε γουανίνη.

Στις 131 βάσεις η PCA18 έχει αδενίνη, ενώ η PCA23 γουανίνη. Σε όλες τις ελληνικές ποικιλίες βλέπουμε ετεροζυγωτία με μεικτές κορυφές γουανίνης-αδενίνης.



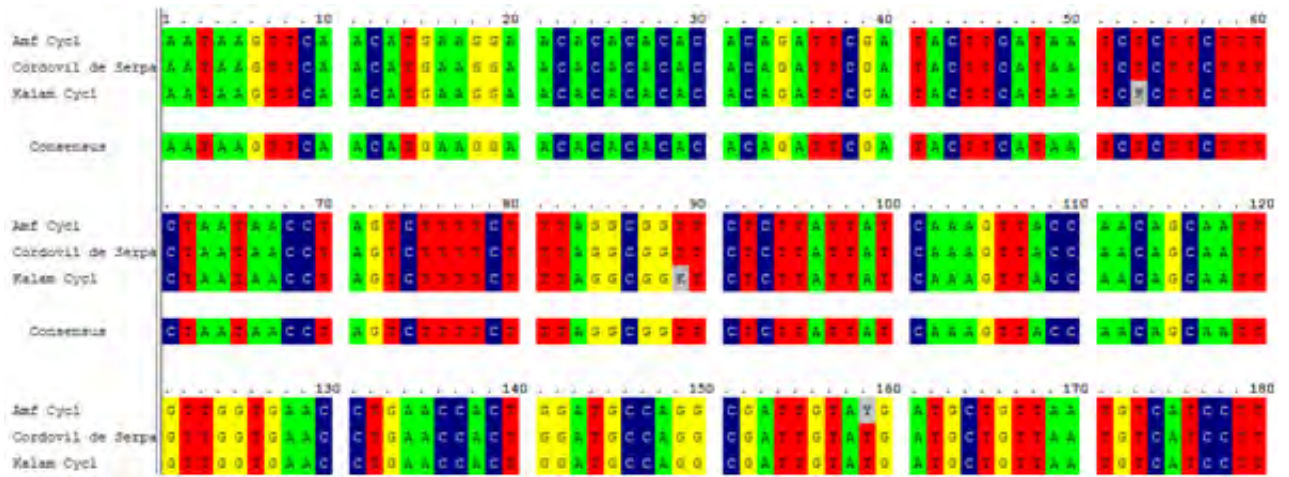
Phylogram tree

Το παραπάνω φυλογενετικό δέντρο δίνει τις γεννητικές αποστάσεις των Ελληνικών ποικιλιών και τις διαχωρίζει ξεκάθαρα από τις ποικιλίες ελιάς του γένους *olea europaea* (PCA18, PCA23) οι οποίες αναπτύχθηκαν με Calcium binding proteins. Η Μεγαρίτικη ποικιλία διαχωρίστηκε σαν απόγονος της ευρύτατα διαδεδομένης ποικιλίας της Αμφίσης, ενώ οι Χαλκιδικής και Καλαμών παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό γενετικής ομοιότητας μεταξύ τους σε σχέση με την ποικιλία των Μεγάρων.

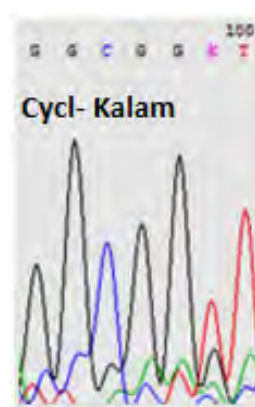
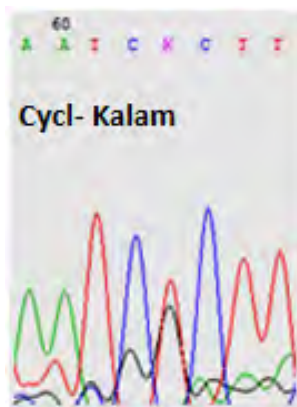
Cultivar name	Population	Primer in use
Amfissa	Greek	Cycl
Kalamon	Greek	Cycl
Cordovil de Serpa	Portugal	Cycl

Η βάση δεδομένων του NCBI (National Center for Biotechnology Information), όπου και πραγματοποιήθηκε BLAST σε επίπεδο νουκλεοτιδίων στις αλληλουχίες των ποικιλιών Καλαμών και Αμφίσης, ανεπτυγμένες στο κομμάτι του Cycloartenol synthase έδωσε μέγιστη ταυτοποίηση (Max Ident) 99% με ποικιλία ελιάς που εντοπίζεται στην Πορτογαλία, Cordovil de Serpa.

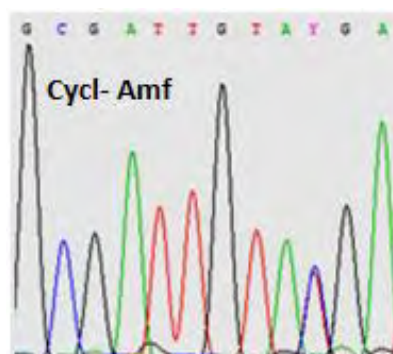
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY247055.1	Olea europaea cycloartenol synthase gene, partial cds	1247	1247	100%	0.0	99%
AB025344.1	Olea europaea OEX mRNA for cycloartenol synthase, partial cds	147	147	15%	1e-31	92%



Η ποικιλία Καλαμών με Cycl επίσης 53 και 89 βάσεις παρουσιάζει φαινόμενο ετεροζυγωτίας επίσης φαίνεται άλλωστε και στα χρωματογραφήματα, με μεικτές κορυφές θυμίνης-γουανίνης. Στα ίδια σημεία οι ποικιλίες Αμφίσηση και Cordovil de Serpa εμφανίζουν θυμίνη.

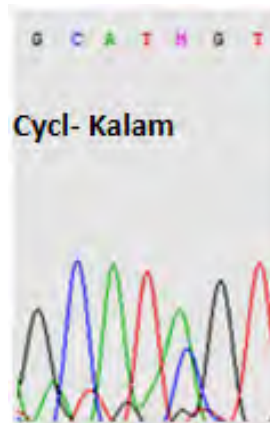


Η ποικιλία Αμφίσηση με Cycl επίσης 159 βάσεις παρουσιάζει φαινόμενο ετεροζυγωτίας με μεικτές κορυφές θυμίνης-κυτοσίνης, ενώ οι επίσης δύο έχουν θυμίνη.

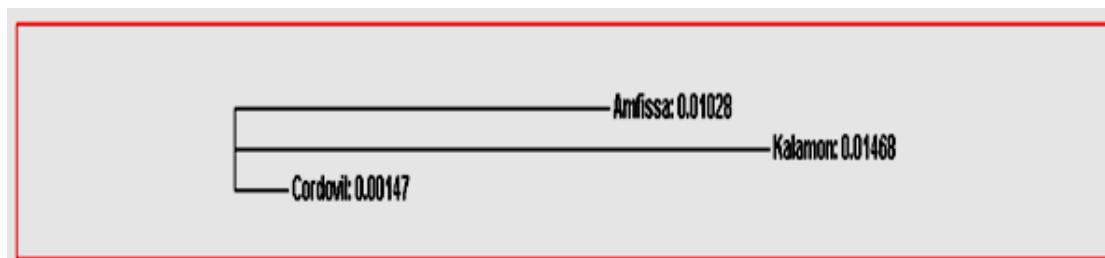




Η ποικιλία Καλαμών με Cycl επίσης 371 βάσεις παρουσιάζει φαινόμενο ετεροζυγωτίας επίσης φαίνεται και στο χρωματογράφημα παρακάτω, με μεικτές κορυφές αδενίνης-κυτοσίνης, ενώ στο ίδιο σημείο η Αμφίσσης έχει αδενίνη. Η ποικιλία επίσης Cordovil de Serpa στο ίδιο σημείο εμφανίζει και αυτή φαινόμενο ετεροζυγωτίας. Επίσης 416 βάσεις η Cordovil επίσης εμφανίζει ετεροζυγώτη, τη στιγμή που οι ποικιλίες Αμφίσσης και Καλαμών ταυτίζονται εμφανίζοντας αδενίνη.



Τα 5 SNPs που εντοπίστηκαν σε σύνολο για τις δύο Ελληνικές ποικιλίες διαχώρισαν το γένος τους από αυτό της Πορτογαλικής Cordovil de Serpa και οι τρεις περιπτώσεις ετεροζυγωτίας της Καλαμών έναντι μιας της ποικιλίας της Αμφίσσης έδωσαν το παρακάτω φυλογενετικό δέντρο.



Phylogram tree

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Συζήτηση

Η ελιά αποτελεί μια δενδρώδη, πολυετή καλλιέργεια όπου είναι πιθανές οι σωματικές μεταλλάξεις αλλά και οι σταυρογονιμοποιήσεις, όπως άλλωστε έχει φανεί και από τις αναλύσεις ισοενζύμων (Hamrick, 1989). Συνεπώς, είναι αναμενόμενο ένα ποσοστό παραλλακτικότητας σε επίπεδο ποικιλιών της ίδιας περιοχής. Η ποικιλιακή ποικιλομορφία μπορεί να είναι αποτέλεσμα δύο αντίθετων τάσεων, της χαμηλής γενετικής διάβρωσης και της μειωμένης γενετικής ετερογένειας. Η γενετική βάση της καλλιεργούμενης ελιάς μπορεί να εμπλουτίζεται με περιστασιακές τυχαίες διασταυρώσεις μεταξύ καλλιεργούμενων κλώνων και άγριων μορφών.

Η μελέτη (Gemmas *et al.*, 2000) στις φυλογενετικές σχέσεις αλλά και της παραλλακτικότητας των τριών ελαιοποιήσιμων Πορτογαλικών ποικιλιών 'Galega Vulgar', 'cordovil de Serpa' και 'Verdeal Alentejana', χρησιμοποίησαν 20 RAPD εκκινητές για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα στις τρεις ποικιλίες και 7 RAPD εκκινητές κατά την ανάλυση της ενδοποικιλιακής παραλλακτικότητας. Κατέληξαν ότι η τεχνική των RAPD εκκινητών αποτελεί ένα χρήσιμο όργανο για την ανάλυση του γενετικού υλικού, καθώς είναι ικανή να ανιχνεύσει τις διαποικιλιακές σχέσεις χρησιμοποιώντας ένα πολύ περιορισμένο αριθμό δειγμάτων. Οι Ozkaya *et al.* (2006) χρησιμοποίησαν 10 RAPD εκκινητές σε συγκριτική μελέτη όπου εξετάστηκε η ομοιότητα δέκα δειγμάτων της τουρκικής ποικιλίας 'Derik Halhalı' με ένα επίσημο δείγμα της ποικιλίας. Η μοριακή ανάλυση έδειξε αξιοσημείωτη παραλλακτικότητα ανάμεσα στο επίσημο δείγμα και τα δείγματα της περιοχής. Ο Λίνος και Χατζηδημητρίου (2007) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο των RAPD εκκινητών στην ταυτοποίηση και μελέτη παραλλακτικότητας μητρικών φυτών ελιάς σε φυτώρια και κατέληξαν ότι η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε κρίνεται επαρκής για την ξεκάθαρη διαφοροποίηση ποικιλιών.

Η συνδυαστική χρήση SNPs και RAPDs μοριακών δεικτών σε ελαιόλαδο 65 ποικιλιών από Ιταλία, Ελλάδα, Γαλλία και χωρών της Ιβηρικής χερσονήσου (Reale *et al.*, 2006) έδωσε αποτελέσματα υψηλού πολυμορφισμού, μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, ακόμα και σε περιπτώσεις συνωνύμων και εμφάνισε ετεροζυγώτες στα γονίδια που αναπτύχθηκαν.

Οι μοριακοί δείκτες SNPs έχουν γίνει πλέον οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι δείκτες σε πολλές σύγχρονες εφαρμογές της γενετικής. Η έρευνα των Hakim *et al.* (2010) απεκάλυψε 9 νέα SNPs με άμεση μερική αλληλουχία δύο γονιδίων σε 16 ποικιλίες ελιάς από την Τυνησία. Τα εντοπιζόμενα SNPs στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτυπική ανάλυση των ποικιλιών ελιάς και στην αξιολόγηση του επιπέδου της γενετικής ποικιλομορφίας. Στη συνέχεια η διακριτική ισχύς των μοριακών δεικτών SNPs συγκρίθηκε με εκείνη των μικροδορυφόρων SSRs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συνδυασμός των δεικτών SSRs και SNPs μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του γονοτυπικού κόστους και προσφέρει ένα γρήγορο και εύκολο τρόπο για τη δημιουργία δακτυλικού αποτυπώματος σε κάθε ποικιλία, γεγονός που χρησιμεύει στην ταυτοποίηση της ποικιλίας και στην ικνηλασιμότητα του ελαιόλαδου.

Ο αριθμός των δειγμάτων σε μελέτες του γονιδιώματος κάτω από το επίπεδο της ποικιλίας με μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα (Martins-Lopes *et al.*, 2009). Έτσι σε μελέτες όπου ο αριθμός των δειγμάτων είναι υψηλός ήταν δυνατό να ανιχνευτεί γενετική παραλλακτικότητα και το εύρος του πολυμορφισμού. Αντίθετα, σε εργασίες όπου ο αριθμός των δειγμάτων κυμαίνεται από 1 έως 5, τα αποτελέσματα δεν ήταν πάντα επιτυχή και αξιόπιστα.

Τέλος, συγκρίνοντας το εύρος του πολυμορφισμού των Ελληνικών ποικιλιών με χρήση μοριακών δεικτών SNPs και RAPDs με αποτελέσματα αντίστοιχων μελετών της διεθνούς βιβλιογραφίας, παρατηρείται ότι οι ελληνικές ποικιλίες παρουσιάζουν μικρότερη γενετική παραλλακτικότητα γεγονός που δείχνει την ομοιογένεια των ποικιλιών.

4.2 Συμπεράσματα

Κατά τη μελέτη του πολυμορφισμού που παρουσιάζουν έξι Ελληνικές ποικιλίες ελιάς, των επιτραπέζιων ποικιλιών 'Καλαμών' και 'Αμφίσης', της ελαιοποιήσιμης ποικιλίας 'Κολοβή', των διπλής χρήσης ποικιλιών ελιάς 'Χαλκιδικής' και 'Μεγάρων' και της ποικιλίας από την περιοχή του 'Πηλίου', η χρήση της μοριακής μεθόδου SNPs κρίθηκε αρκετά αποτελεσματική.

Οι μοριακοί δείκτες τρίτης γενιάς Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) απέδωσαν ικανοποιητικό αριθμό πολυμορφικών περιοχών ικανών

για να επέλθει ο διαχωρισμός των Ελληνικών ποικιλιών της ελιάς που εμφάνισαν μπάντες DNA μετά την ενίσχυση με PCR τεχνική. Καμία από τις ποικιλίες ελιάς δεν απέδωσε αποτελέσματα σαν PCR products με τη Chalcone synthase γεγονός που εμπόδισε την περαιτέρω ανάλυση του ζητούμενου πολυμορφισμού.

Σε ότι αφορά την πρώτη ανάπτυξη με χρήση Anthocyanidin synthase οι γενετικές αποστάσεις των δοκιμαζόμενων ποικιλιών Αμφίσης, Καλαμών και Πηλίου κυμάνθηκαν μεταξύ 0,00093-0,00463 γεγονός που εκφράζει ότι υπάρχει μεγάλη γενετική συγγένεια των Ελληνικών ποικιλιών. Η ποικιλία Πηλίου που συγκαταλέγεται στην ποικιλία της Αμφίσης, έδειξε τελικά περισσότερες ομοιότητες με την ποικιλία Καλαμών, αν και η γενετική της απόσταση από τις άλλες δύο ήταν περίπου στη μέση με 0,00278. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται και σε ενδοποικιλιακή παραλλακτικότητα εξαιτίας της περιβαλλοντικής προσαρμογής, της ανθρώπινης επέμβασης μέσω επιλογής και των τεχνικών πολλαπλασιασμού. Επίσης επιβεβαιώθηκε από τη γενετική απόσταση της ισπανικής ποικιλίας 'Μανζανίλο' 0,01019 η πληροφορία ότι έχει μεγαλύτερες ομοιότητες με την Ελληνική ποικιλία της Αμφίσης.

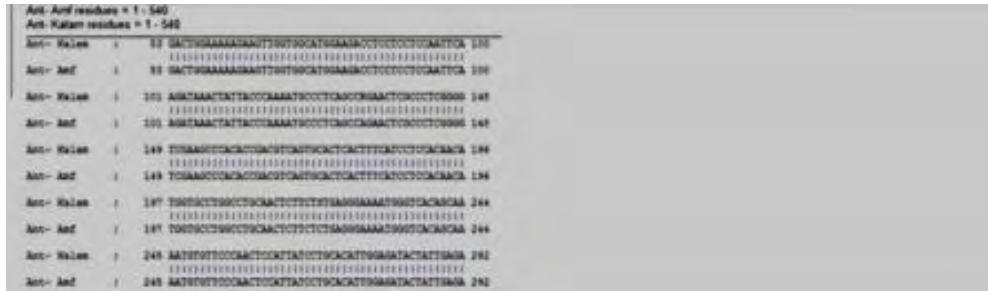
Η δεύτερη ενίσχυση με χρήση Calcium binding proteins ανέδειξε σαφή ομαδοποίηση της ποικιλίας των 'Μεγάρων' και αυτής της 'Αμφίσης', γεγονός που καταδεικνύει τη Μεγαρίτικη ποικιλία να είναι απόγονος αυτής της Αμφίσης. Το σύνολο των γενετικών αποστάσεων κυμάνθηκε μεταξύ 0-0,00456. Οι ελιές 'Καλαμών' ομαδοποιήθηκαν με την ποικιλία της Χαλκιδικής. Επίσης όλες οι Ελληνικές ποικιλίες διαχωρίστηκαν από τις PCA18 και PCA23 επίσης ανεπτυγμένες με Cbp.

Το γονιδίωμα της ελιάς που αναπτύχθηκε με Cycloartenol synthase στις 802 βάσεις έδειξε έναν απλό διαχωρισμό των ποικιλιών 'Αμφίσης' και 'Καλαμών' με την Πορτογαλική ποικιλία 'Cordovil de Serra' και μελετήθηκαν οι μεταξύ τους πολυμορφισμοί. Ο αριθμός των δειγμάτων που απέδωσαν καθαρές αλληλουχίες του PCR product δεν ήταν αρκετά μεγάλος ώστε να έχουμε περαιτέρω συγκρίσεις.

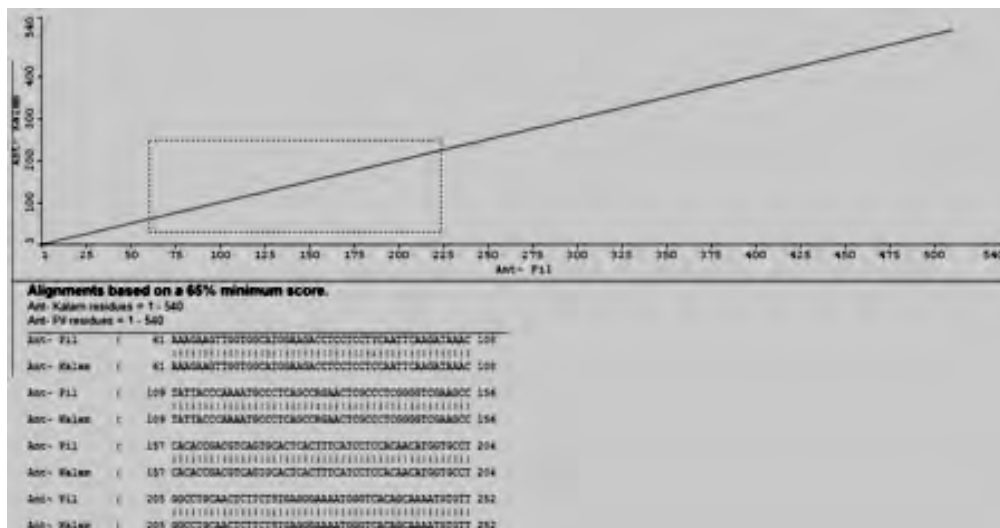
Η μέθοδος που ακολουθήθηκε κρίνεται ιδιαίτερος επαρκής για την ταυτοποίηση δέντρων που πρόκειται να εγκατασταθούν σε ελαιώνες. Επίσης αποτελεί μια καλή πρόταση σε ότι αφορά τη διαχείριση και διατήρηση του γενετικού υλικού, καθώς και στην επίλυση θεμάτων ονοματολογίας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

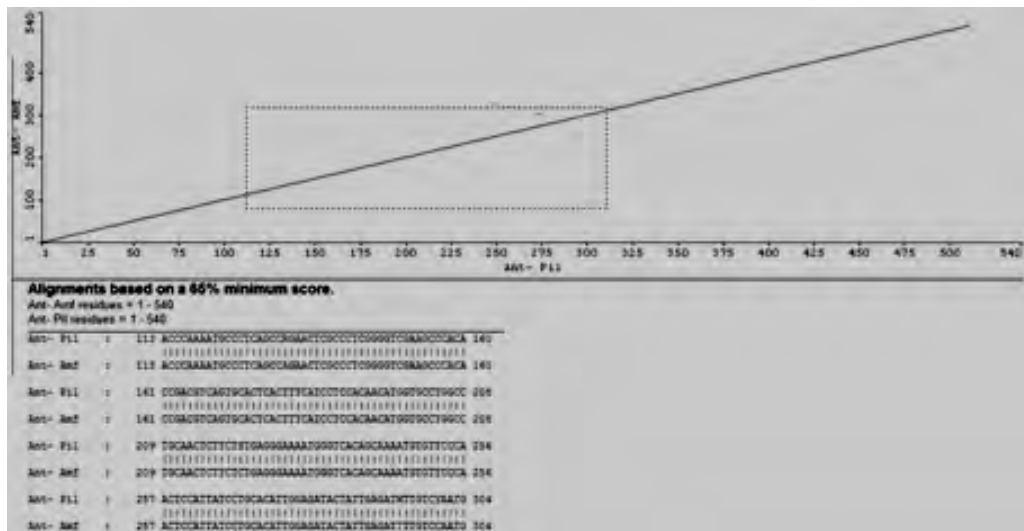
Cultivar name	Population	Primer in use
Amfissa	Greek	Ant
Kalamon	Greek	Ant
Manzanilla	Australian	Ant
Pilio	Greek	Ant



Dot Plot result Ant- Kalam vs Ant- Amf

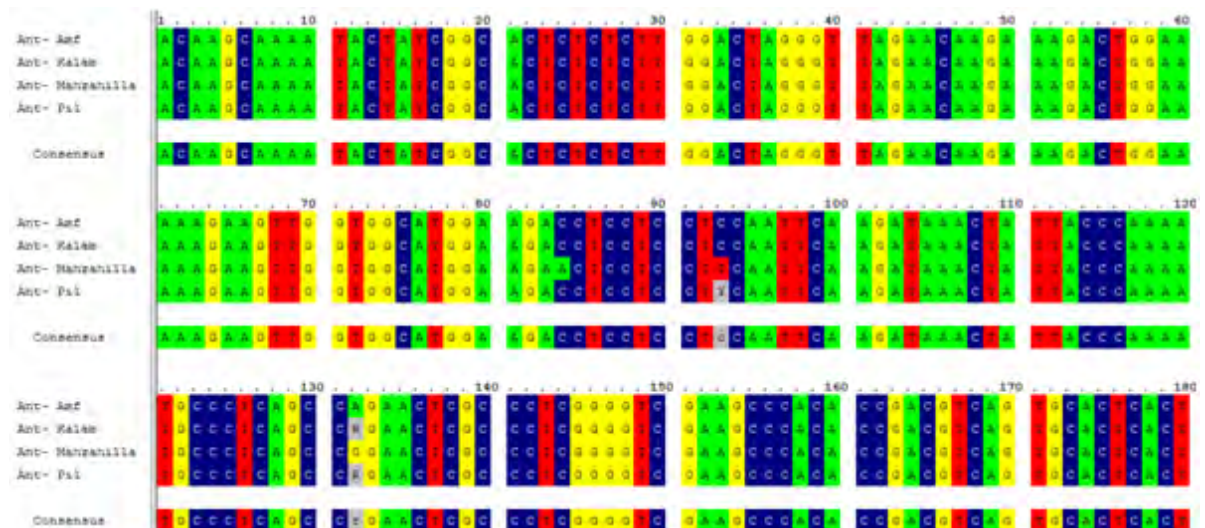


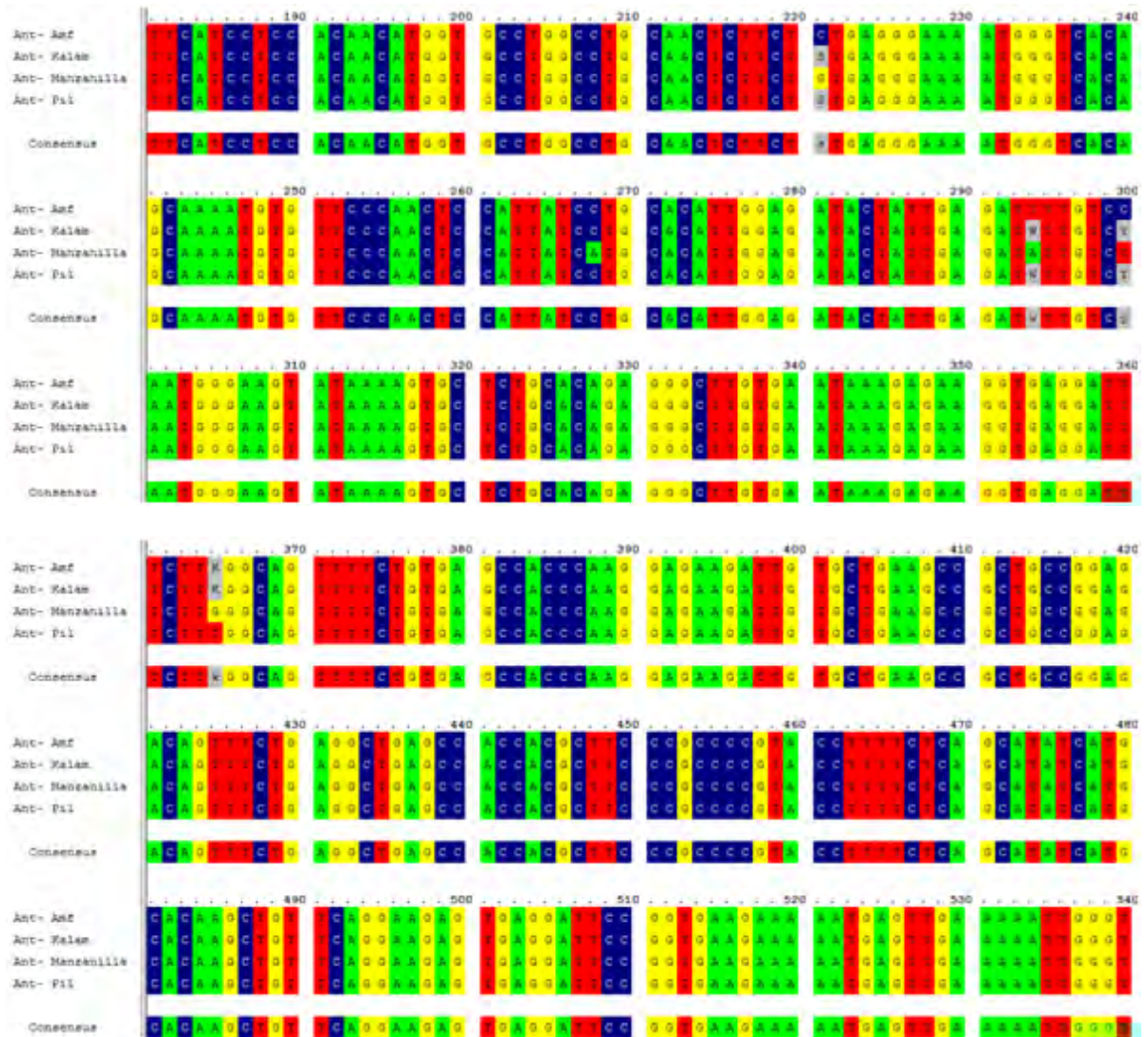
Dot Plot result Ant- Pil vs Ant- Kalam



Dot Plot result Ant- Pil vs Ant- Amf

Αποτελέσματα αλληλούχισης DNA ελίας ενισχυμένο στο κομμάτι του Ant, βάση του Omiga Align.





Με χρήση του προγράμματος ClustalW δύναται η δυνατότητα σύγκρισης των ανωτέρω αλληλουχιών, καθώς επίσης και το φυλογενετικό δένδρο.

CLUSTAL multiple sequence alignment

```

Kalamon      ACAAGCAAATACTATCGGCACCTCTCTCTGGACTAGGGTTAGAACAAGAAAGACTGGAA 60
Pilio       ACAAGCAAATACTATCGGCACCTCTCTCTGGACTAGGGTTAGAACAAGAAAGACTGGAA 60
Amfissa     ACAAGCAAATACTATCGGCACCTCTCTCTGGACTAGGGTTAGAACAAGAAAGACTGGAA 60
Manzanilla  ACAAGCAAATACTATCGGCACCTCTCTCTGGACTAGGGTTAGAACAAGAAAGACTGGAA 60
*****

Kalamon      AAAGAAGTTGGTGGCATGGAAGACCTCCTCCTCAATTCAAGATAAACTATTACCCAAA 120
Pilio       AAAGAAGTTGGTGGCATGGAAGACCTCCTCCTCAATTCAAGATAAACTATTACCCAAA 120
Amfissa     AAAGAAGTTGGTGGCATGGAAGACCTCCTCCTCAATTCAAGATAAACTATTACCCAAA 120
Manzanilla  AAAGAAGTTGGTGGCATGGAAGACCTCCTCCTCAATTCAAGATAAACTATTACCCAAA 120
*****

Kalamon      TGCCCTCAGCCRGAACCTCGCCCTCGGGGTCGAAGCCCACACCGACGTCAAGTGCACACT 180
Pilio       TGCCCTCAGCCRGAACCTCGCCCTCGGGGTCGAAGCCCACACCGACGTCAAGTGCACACT 180
Amfissa     TGCCCTCAGCCRGAACCTCGCCCTCGGGGTCGAAGCCCACACCGACGTCAAGTGCACACT 180
Manzanilla  TGCCCTCAGCCRGAACCTCGCCCTCGGGGTCGAAGCCCACACCGACGTCAAGTGCACACT 180
*****

Kalamon      TTCATCTCCACAACATGGTGCCTGGCCTGCAACTCTTCTSTGAGGGAAAATGGGTCACA 240

```

Pilio	TTCATCCTCCACAACATGGTGCCTGGCCTGCAACTCTTCTSTGAGGGAAAATGGGTCACA	240
Amfissa	TTCATCCTCCACAACATGGTGCCTGGCCTGCAACTCTTCTCTGAGGGAAAATGGGTCACA	240
Manzanilla	TTCATCCTCCACAACATGGTGCCTGGCCTGCAACTCTTCTGTGAGGGAAAATGGGTCACA	240

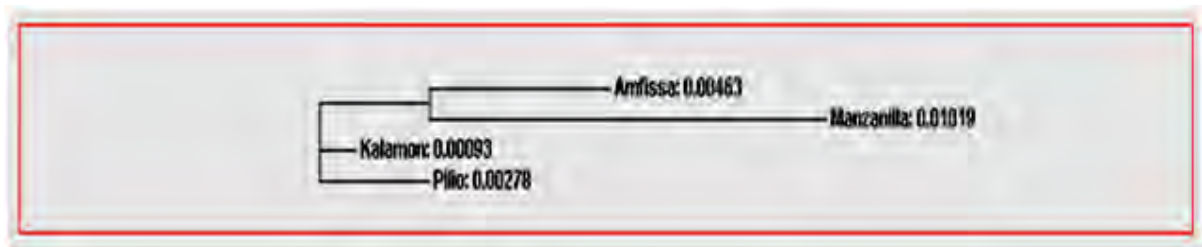
Kalamon	GCAAAATGTGTTCCCAACTCCATTATCCTGCACATTGGAGATACTATTGAGATWTTGTCY	300
Pilio	GCAAAATGTGTTCCCAACTCCATTATCCTGCACATTGGAGATACTATTGAGATWTTGTCY	300
Amfissa	GCAAAATGTGTTCCCAACTCCATTATCCTGCACATTGGAGATACTATTGAGATTTTGTCC	300
Manzanilla	GCAAAATGTGTTCCCAACTCCATTATCATGCACATTGGAGATACTATTGAGATATTGTCT	300

Kalamon	AATGGGAAGTATAAAAGTGCTCTGCACAGAGGGCTTGTGAATAAAGAGAAGGTGAGGATT	360
Pilio	AATGGGAAGTATAAAAGTGCTCTGCACAGAGGGCTTGTGAATAAAGAGAAGGTGAGGATT	360
Amfissa	AATGGGAAGTATAAAAGTGCTCTGCACAGAGGGCTTGTGAATAAAGAGAAGGTGAGGATT	360
Manzanilla	AATGGGAAGTATAAAAGTGCTCTGCACAGAGGGCTTGTGAATAAAGAGAAGGTGAGGATT	360

Kalamon	TCTTKGGCAGTTTTCTGTGAGCCACCCAAGGAGAAGATTGTGCTGAAGCCGCTGCCGGAG	420
Pilio	TCTTKGGCAGTTTTCTGTGAGCCACCCAAGGAGAAGATTGTGCTGAAGCCGCTGCCGGAG	420
Amfissa	TCTTKGGCAGTTTTCTGTGAGCCACCCAAGGAGAAGATTGTGCTGAAGCCGCTGCCGGAG	420
Manzanilla	TCTTKGGCAGTTTTCTGTGAGCCACCCAAGGAGAAGATTGTGCTGAAGCCGCTGCCGGAG	420

Kalamon	ACAGTTTCTGAGGCTGAGCCACCACGCTTCCCGCCCCGTACCTTTTCTCAGCATATCATG	480
Pilio	ACAGTTTCTGAGGCTGAGCCACCACGCTTCCCGCCCCGTACCTTTTCTCAGCATATCATG	480
Amfissa	ACAGTTTCTGAGGCTGAGCCACCACGCTTCCCGCCCCGTACCTTTTCTCAGCATATCATG	480
Manzanilla	ACAGTTTCTGAGGCTGAGCCACCACGCTTCCCGCCCCGTACCTTTTCTCAGCATATCATG	480

Kalamon	CACAAGCTGTTTCAGGAAGAGTGAGGATTCCGGTGAAGAAAAATGAGTTGAAAAATTGGGT	540
Pilio	CACAAGCTGTTTCAGGAAGAGTGAGGATTCCGGTGAAGAAAAATGAGTTGAAAAATTGGGT	540
Amfissa	CACAAGCTGTTTCAGGAAGAGTGAGGATTCCGGTGAAGAAAAATGAGTTGAAAAATTGGGT	540
Manzanilla	CACAAGCTGTTTCAGGAAGAGTGAGGATTCCGGTGAAGAAAAATGAGTTGAAAAATTGGGT	540



Phylogram tree



Cladogram tree

Στο παραπάνω φυλογενετικό δέντρο με ποικιλίες ελιάς ενισχυμένες στην περιοχή του Ant (anthocyanidin synthase gene), προστίθεται μια (out group) ποικιλία θάμνου **Forsythia** με **cultivar name “Spring Glory”**.

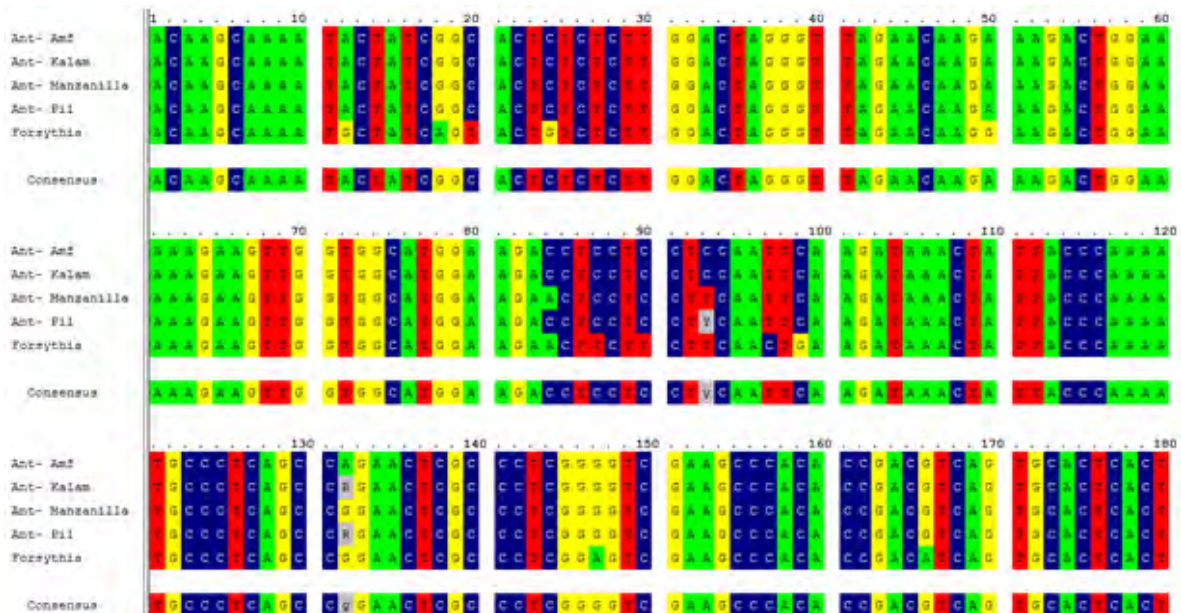
FASTA sequence view

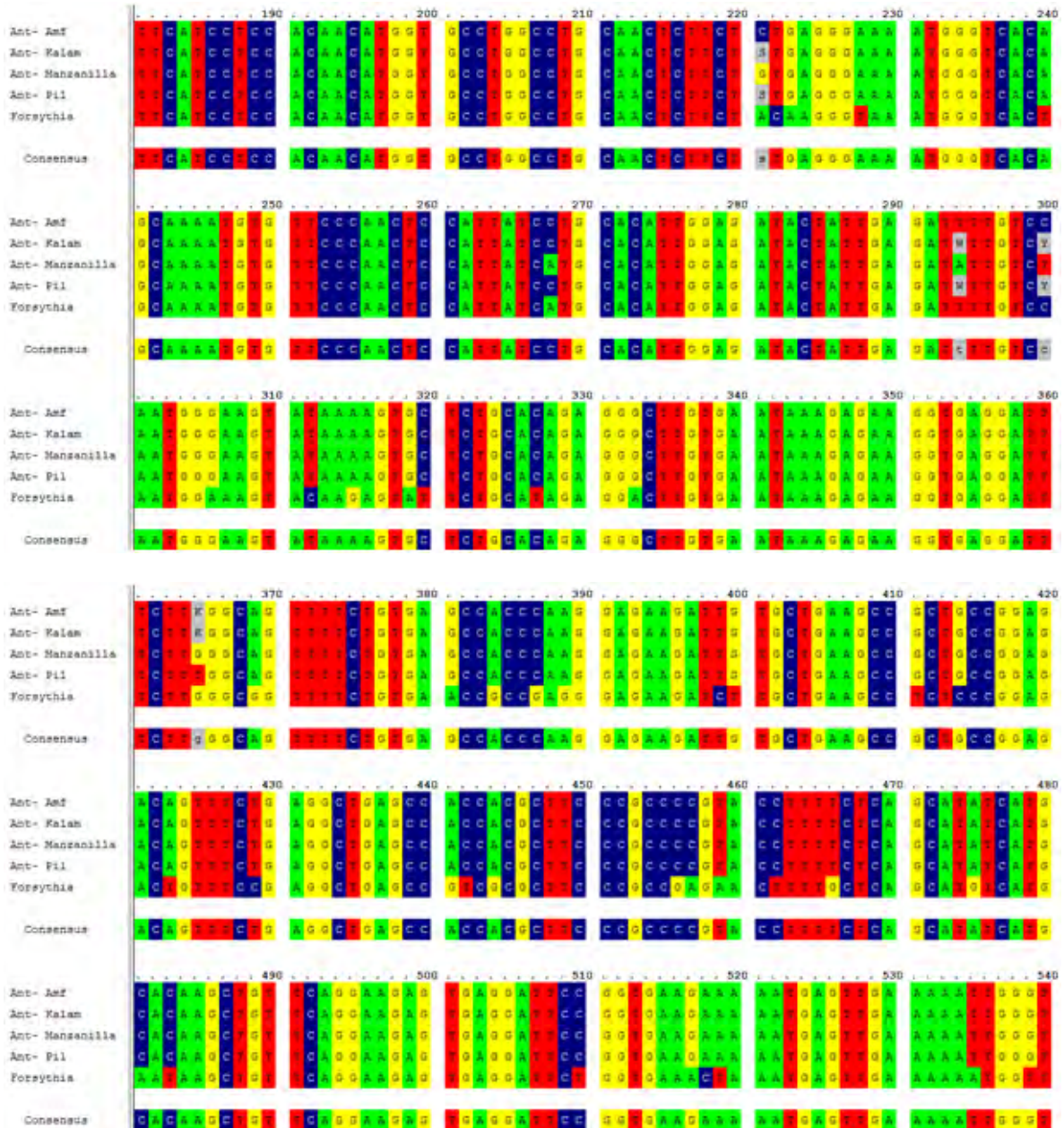
```

AGCCGAAGATTAGGCAAGGACAAGAACCACAAAAATAAATCCCTTAATTGTTTTGAAAAATAAGTTTGAACAAATGGCTAAGGTGGTGA
ATCCGAGAGTAGAAATCCCTTGCCAGCAATGGAATTCATCAATCCCCAAAGAGTACGTGAGGCCACAAGAAGAGCTAGAAAGCATA
AGAGACGTTTTTTGAGGAAGAAATGAGCGACGAGGGGCCCAATTGCCGACAATAGATTTGGAGGGCCTTGATTCGGACGATAAACA
AGTTCGTGAAAAGTGTCAACAAGAATTAATTAAGGCTTCTAAGGAGTGGGGTGTAAATGCACCTCGTCAAAACATGGCATTTTCGGATG
AGCTTATCGATCGTGTAAAGATGGCCGAAAAGCGTTTCTCAACCAGTCCGGTGGAGAAGGAGAAATATGCTAATGATCAAGCCTCC
GGCAATGTTCAAGGATATGGTAGCAAGTTAGCCAACAATGCTAGTGGTCAACTTGAGTGGCAGGACTATTTCTTCCACTGTATTTT
CCCTGAGGAGAAGAGGGACCTGTCCATTTGTCTAAGACCCCGACCGATTACATTCAGCAATAAGCGAGTATGCAAAGCAACTGA
GAGACCTAACAAGCAAAATGCTATCAGTACTGTCTCTTGACTAGGGTTAGAACAAGGAAGACTGGAAAAAGAAGTTGGTGGCATG
GAAGAAGTCTTCTTCAACTGAAGATAAACTATTACCCAAAATGCCCTCAGCCGGAACCTCGCCCTCGGAGTCAAGCCACACCGA
CATCAGTGCACCTCACTTTCATCCTCCACAACATGGTGCCTGGCCTGCAACTCTTCTACAAGGGTAAATGGGTCACTGCAAAATGTC
TTCCCAACTCCATTCATCACATTTGGAGATACATTTAGAGATTTTGTCCAATGGAAAGTACAAGAGTATTCCTGCATAGAGGACTT
GTGAATAAAGAGAAGGTGAGGATTTCTTGGGCGTTTTCTGTGAACCGCCGAGGAGAAGATCTTGCTGAGCCTCTCCCGGAGAC
TGTTTCCGAGGCTGAGCCGTCGCGCTTCCCGCCGAGAACTTTGTCTCAGCATGTCATGAATAAGCTGTTCCAGGAAGAGTGAGGATT
CTGGTGAACATAAATGAGTTGAAAAAATGGTTTGTATTATGTTGTTGTGCAAAATATGTAGCAGTCTTTTGTAAAGTCTACATTATA
GGTAATGTTTCGAGCCTGAATGATGAATGATTTTATTATTGTCTCTAGTAGTCAGATATTTTTTATAATTGAATAATATCAGTA
TCATTTCTTTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA

```

Η αλληλουχία της FASTA μορφής από τη βάση δεδομένων του Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) προσαρμόζεται σε 540 βάσεις μέσω της εντολής Align του προγράμματος Omiga, ώστε να συγκριθεί με τα κομμάτια των υπόλοιπων ποικιλιών ελιάς.





CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Kalamon      ACAAGCAAATACTATCGGCACCTCTCTCTGGACTAGGGTTAGAACAAAGAAAGACTGGAA 60
Pilio        ACAAGCAAATACTATCGGCACCTCTCTCTGGACTAGGGTTAGAACAAAGAAAGACTGGAA 60
Amfissa      ACAAGCAAATACTATCGGCACCTCTCTCTGGACTAGGGTTAGAACAAAGAAAGACTGGAA 60
Manzanilla   ACAAGCAAATACTATCGGCACCTCTCTCTGGACTAGGGTTAGAACAAAGAAAGACTGGAA 60
Forsythia    ACAAGCAAATGCTATCAGTACTGTCTCTGGACTAGGGTTAGAACAAAGAAAGACTGGAA 60
*****      ***** * *** *****

```

```

Kalamon      AAAGAAGTTGGTGGCATGGAAGACCTCCTCCTCAATTCAAGATAAACTATTACCCAAAA 120
Pilio        AAAGAAGTTGGTGGCATGGAAGACCTCCTCCTCAATTCAAGATAAACTATTACCCAAAA 120
Amfissa      AAAGAAGTTGGTGGCATGGAAGACCTCCTCCTCAATTCAAGATAAACTATTACCCAAAA 120
Manzanilla   AAAGAAGTTGGTGGCATGGAAGACCTCCTCCTCAATTCAAGATAAACTATTACCCAAAA 120
Forsythia    AAAGAAGTTGGTGGCATGGAAGACTTCTTCTTCAACTGAAGATAAACTATTACCCAAAA 120
*****      ***** ** * * * * *

```

```

Kalamon      TGCCCTCAGCCRGAACCTCGCCCTCGGGGTCGAAGCCCACACCGACGTCAGTGCACCTCACT 180
Pilio        TGCCCTCAGCCRGAACCTCGCCCTCGGGGTCGAAGCCCACACCGACGTCAGTGCACCTCACT 180
Amfissa      TGCCCTCAGCCGAACTCGCCCTCGGGGTCGAAGCCCACACCGACGTCAGTGCACCTCACT 180

```

Manzanilla	TGCCCTCAGCCGGAACCTCGCCCTCGGGGTCGAAGCCCACACCGACGTCACTGACTCACT	180
Forsythia	TGCCCTCAGCCGGAACCTCGCCCTCGGAGTCGAAGCCCACACCGACATCACTGACTCACT	180

Kalamon	TTCATCCTCCACAACATGGTGCCTGGCCTGCAACTCTTCTSTGAGGGAAAATGGGTCA	240
Pilio	TTCATCCTCCACAACATGGTGCCTGGCCTGCAACTCTTCTSTGAGGGAAAATGGGTCA	240
Amfissa	TTCATCCTCCACAACATGGTGCCTGGCCTGCAACTCTTCTGAGGGAAAATGGGTCA	240
Manzanilla	TTCATCCTCCACAACATGGTGCCTGGCCTGCAACTCTTCTGTGAGGGAAAATGGGTCA	240
Forsythia	TTCATCCTCCACAACATGGTGCCTGGCCTGCAACTCTTCTACAAGGGTAAATGGGTCA	240

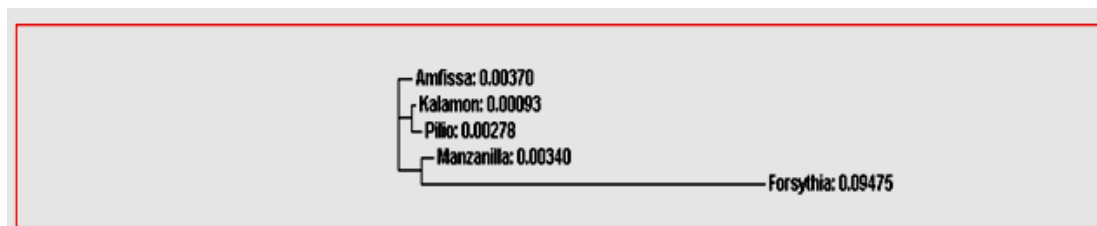
Kalamon	GCAAAATGTGTTCCCAACTCCATTATCCTGCACATTGGAGATACTATTGAGATWTTGT	300
Pilio	GCAAAATGTGTTCCCAACTCCATTATCCTGCACATTGGAGATACTATTGAGATWTTGT	300
Amfissa	GCAAAATGTGTTCCCAACTCCATTATCCTGCACATTGGAGATACTATTGAGATWTTGT	300
Manzanilla	GCAAAATGTGTTCCCAACTCCATTATCCTGCACATTGGAGATACTATTGAGATWTTGT	300
Forsythia	GCAAAATGTGTTCCCAACTCCATTATCCTGCACATTGGAGATACTATTGAGATWTTGT	300

Kalamon	AATGGGAAGTATAAAAGTCTCTGCACAGAGGGCTTGTGAATAAAGAGAAGGTGAGG	360
Pilio	AATGGGAAGTATAAAAGTCTCTGCACAGAGGGCTTGTGAATAAAGAGAAGGTGAGG	360
Amfissa	AATGGGAAGTATAAAAGTCTCTGCACAGAGGGCTTGTGAATAAAGAGAAGGTGAGG	360
Manzanilla	AATGGGAAGTATAAAAGTCTCTGCACAGAGGGCTTGTGAATAAAGAGAAGGTGAGG	360
Forsythia	AATGGGAAGTATAAAAGTCTCTGCACAGAGGGCTTGTGAATAAAGAGAAGGTGAGG	360

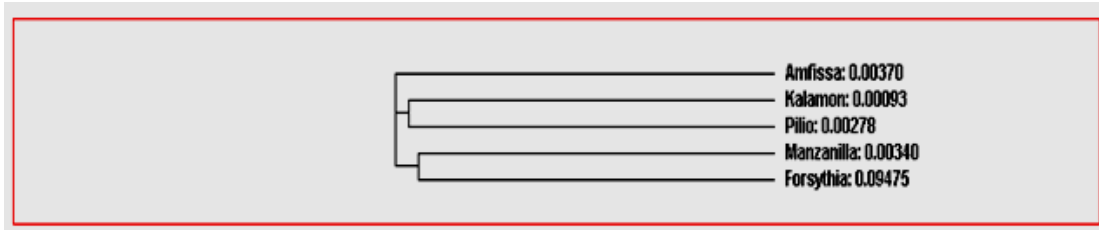
Kalamon	TCTTKGGCAGTTTTCTGTGAGCCACCCAAGGAGAAGATTGTGCTGAAGCCGCTGCCGG	420
Pilio	TCTTKGGCAGTTTTCTGTGAGCCACCCAAGGAGAAGATTGTGCTGAAGCCGCTGCCGG	420
Amfissa	TCTTKGGCAGTTTTCTGTGAGCCACCCAAGGAGAAGATTGTGCTGAAGCCGCTGCCGG	420
Manzanilla	TCTTKGGCAGTTTTCTGTGAGCCACCCAAGGAGAAGATTGTGCTGAAGCCGCTGCCGG	420
Forsythia	TCTTKGGCAGTTTTCTGTGAGCCACCCAAGGAGAAGATTGTGCTGAAGCCGCTGCCGG	420

Kalamon	ACAGTTTCTGAGGCTGAGCCACCACGCTTCCCGCCCCGTACCTTTTCTCAGCATATCAT	480
Pilio	ACAGTTTCTGAGGCTGAGCCACCACGCTTCCCGCCCCGTACCTTTTCTCAGCATATCAT	480
Amfissa	ACAGTTTCTGAGGCTGAGCCACCACGCTTCCCGCCCCGTACCTTTTCTCAGCATATCAT	480
Manzanilla	ACAGTTTCTGAGGCTGAGCCACCACGCTTCCCGCCCCGTACCTTTTCTCAGCATATCAT	480
Forsythia	ACTGTTTCCGAGGCTGAGCCGTCGCGCTTCCCGCCGAGAACTTTTCTCAGCATATCAT	480

Kalamon	CACAAGCTGTTTCAGGAAGAGTGAGGATTCGGTGAAGAAAAATGAGTTGAAAAATTGG	540
Pilio	CACAAGCTGTTTCAGGAAGAGTGAGGATTCGGTGAAGAAAAATGAGTTGAAAAATTGG	540
Amfissa	CACAAGCTGTTTCAGGAAGAGTGAGGATTCGGTGAAGAAAAATGAGTTGAAAAATTGG	540
Manzanilla	CACAAGCTGTTTCAGGAAGAGTGAGGATTCGGTGAAGAAAAATGAGTTGAAAAATTGG	540
Forsythia	AATAAGCTGTTTCAGGAAGAGTGAGGATTCGGTGAAGAAAAATGAGTTGAAAAATTGG	540

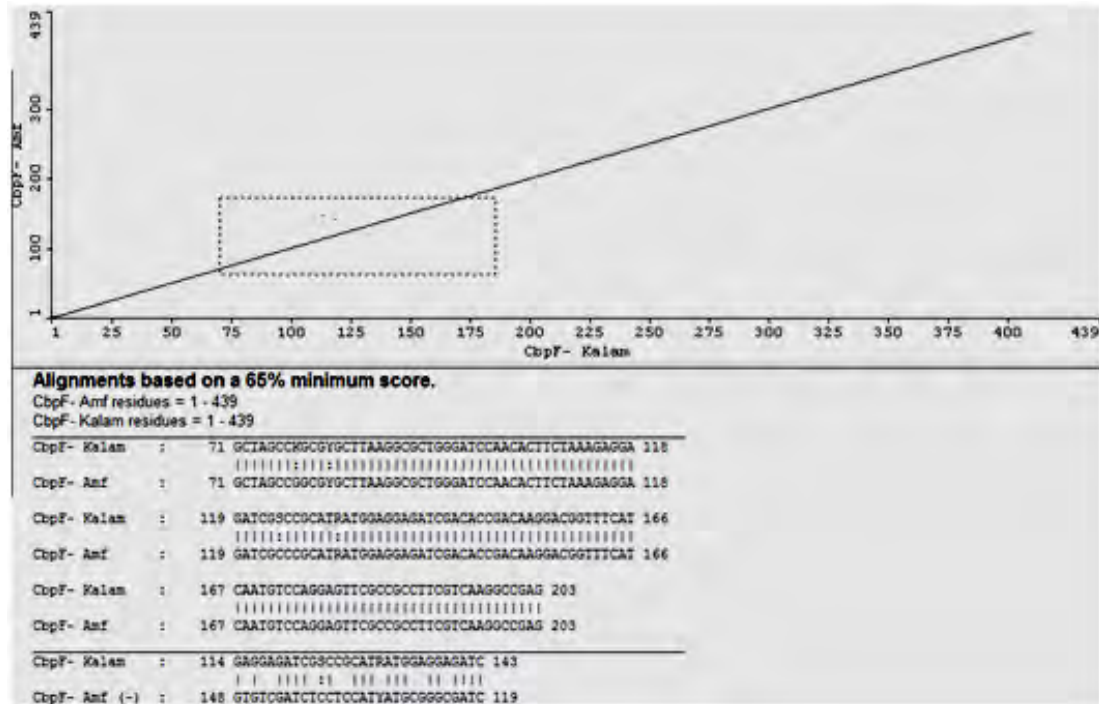


Phylogram tree

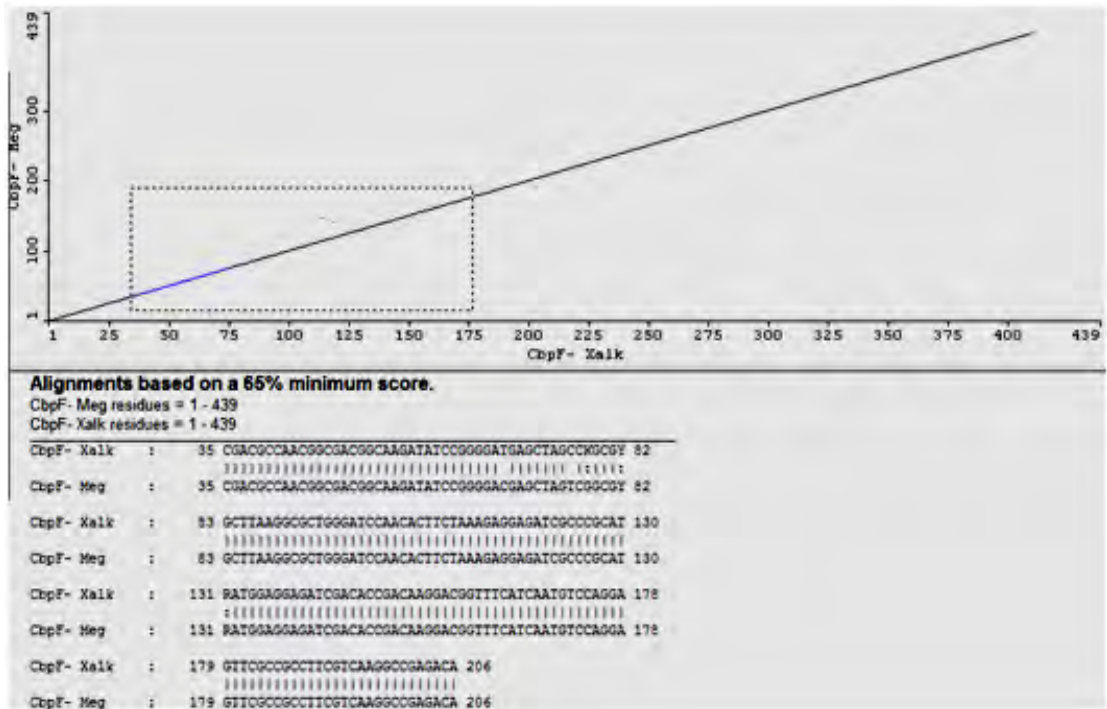


Caldogram tree

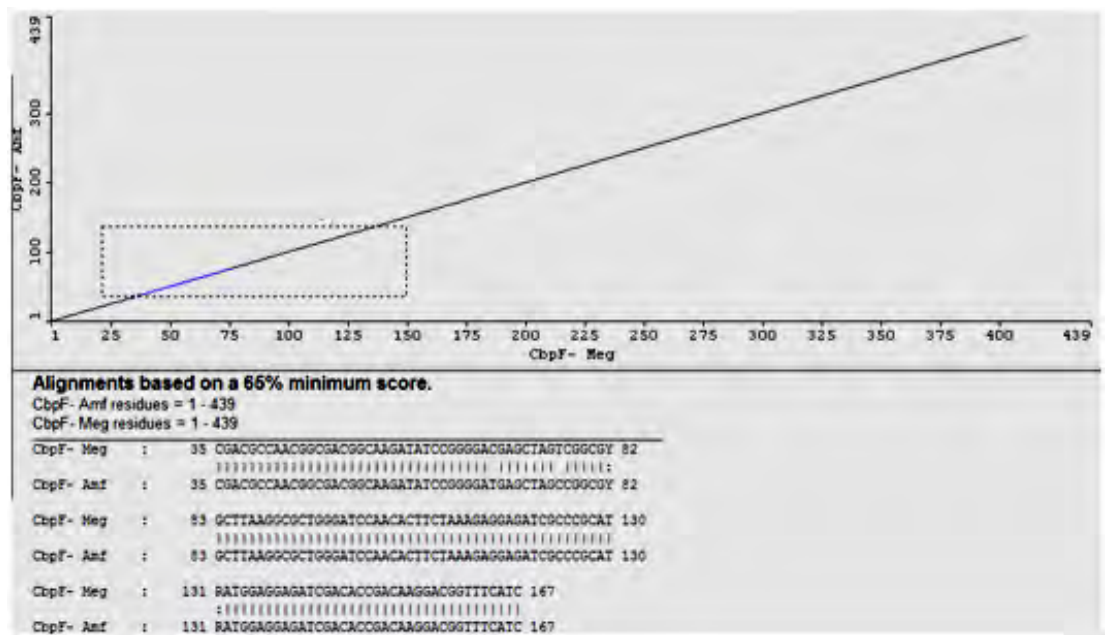
Cultivar name	Population	Primer in use
Amfissa	Greek	Cbp
Kalamon	Greek	Cbp
Megaron	Greek	Cbp
Xalkidikis	Greek	Cbp
PCA18 Olea europaea	-	Cbp
PCA23 Olea europaea	-	Cbp



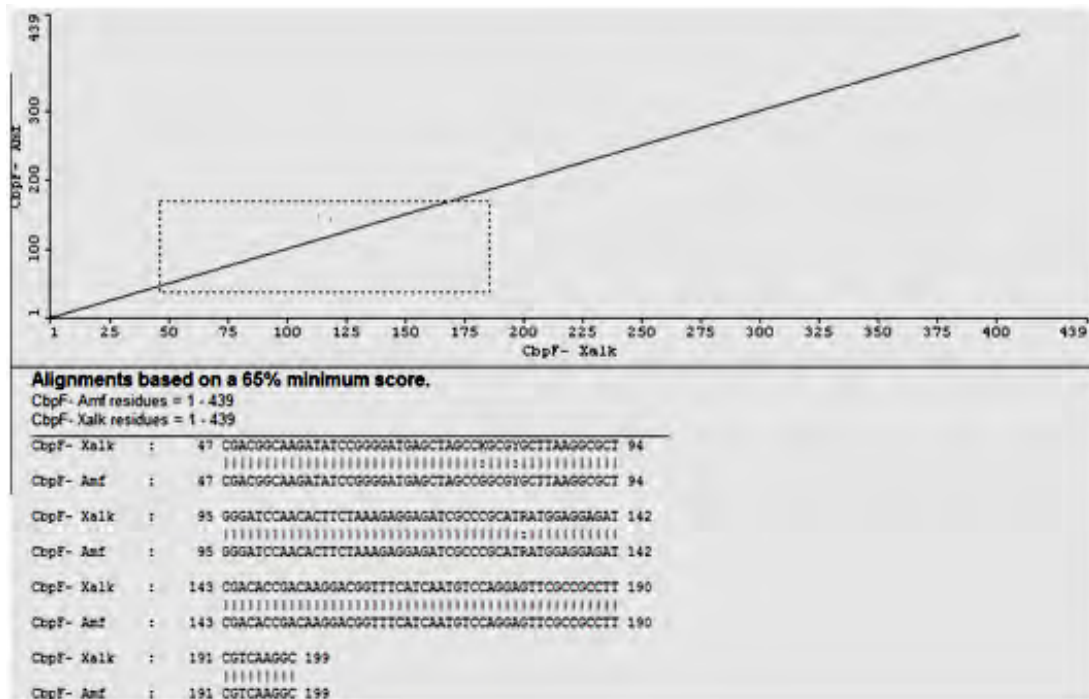
Dot Plot result CbpF- Kalam vs CbpF- Amf



Dot Plot result CbpF- Xalk vs CbpF- Meg

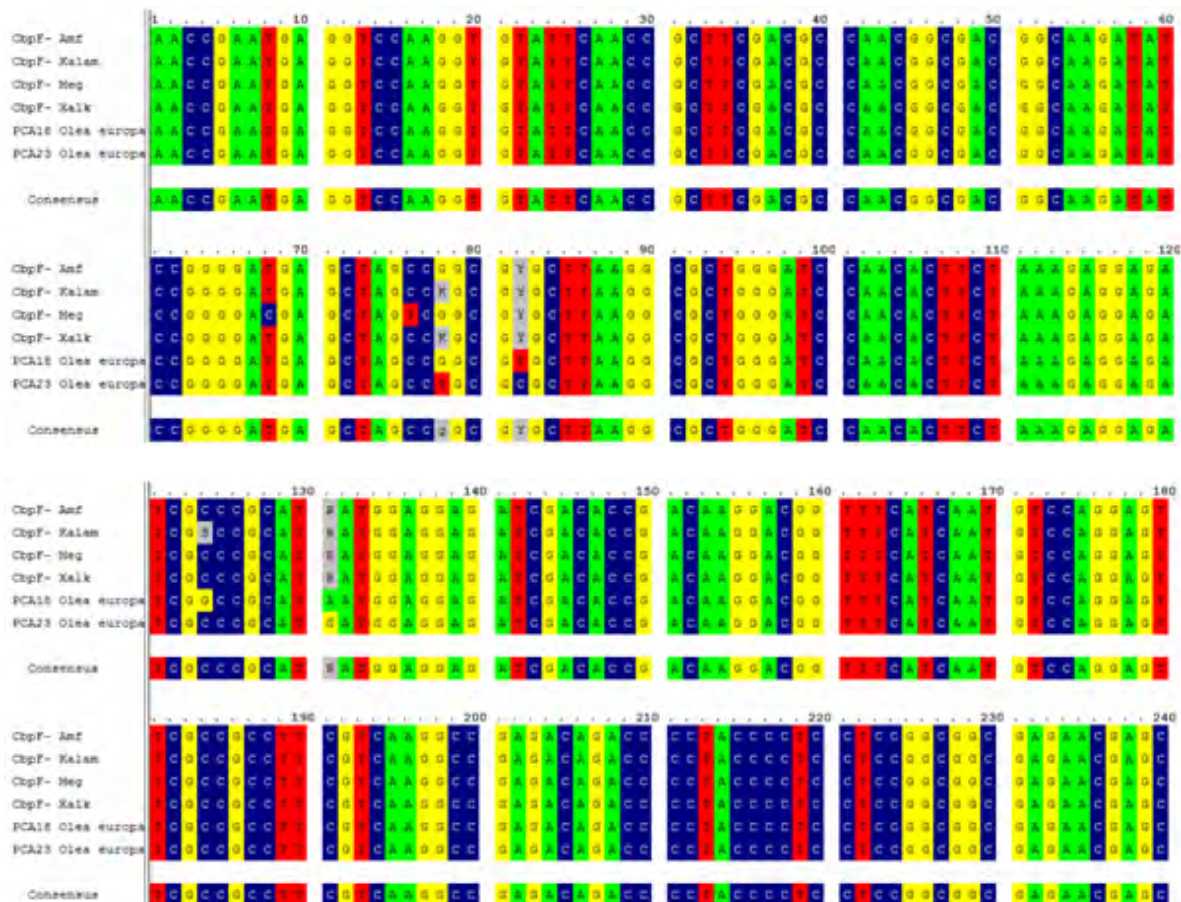


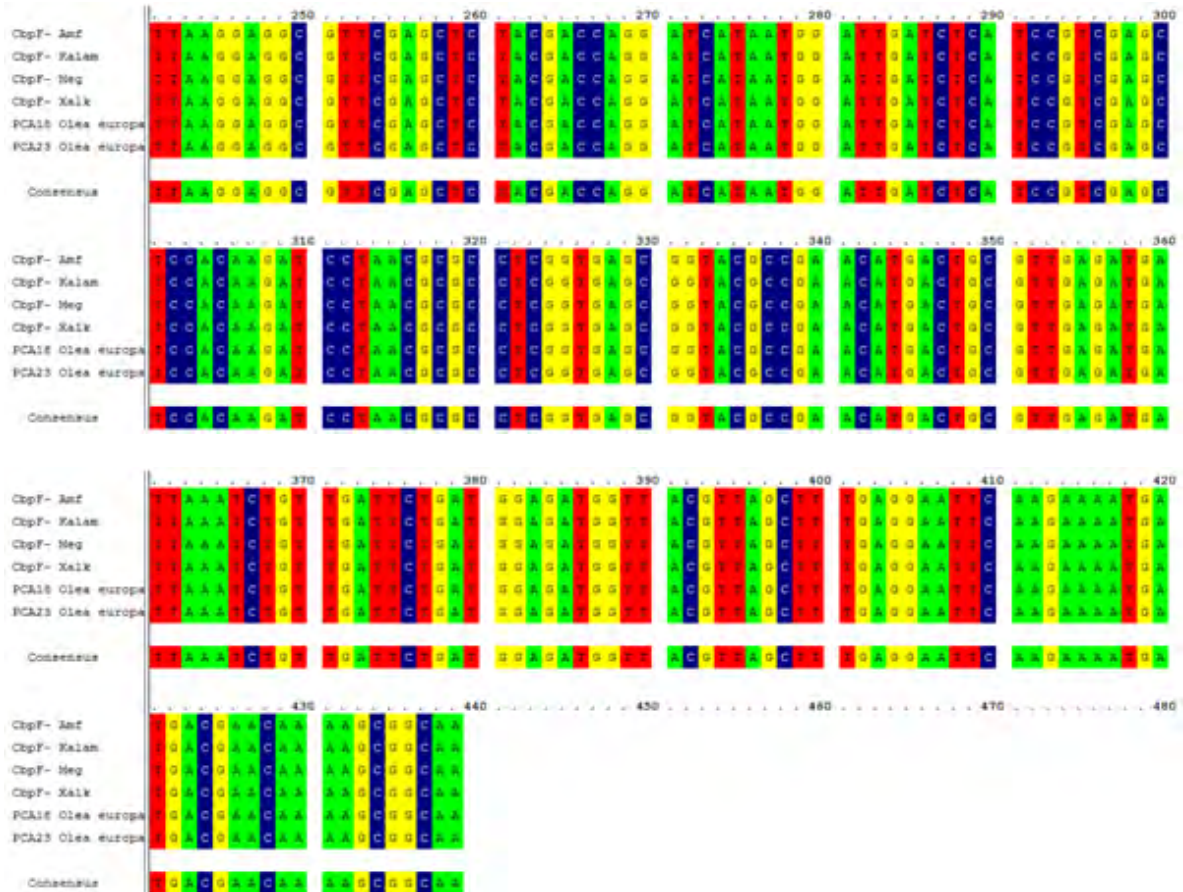
Dot Plot result CbpF- Meg vs CbpF- Amf



Dot Plot result CpbF- Xalk vs CbpF- Amf

Αποτελέσματα αλληλούχισης DNA βάση του Omiga Align.





Με τη χρήση ClustalW

CLUSTAL multiple sequence alignment

```

Amfissa      AACCGAATGAGGTCCAAGGTGTATTCAACCGCTTCGACGCCAACGGCGACGGCAAGATAT 60
Megaron      AACCGAATGAGGTCCAAGGTGTATTCAACCGCTTCGACGCCAACGGCGACGGCAAGATAT 60
Kalamon      AACCGAATGAGGTCCAAGGTGTATTCAACCGCTTCGACGCCAACGGCGACGGCAAGATAT 60
Xalkidikis   AACCGAATGAGGTCCAAGGTGTATTCAACCGCTTCGACGCCAACGGCGACGGCAAGATAT 60
PCA23        AACCGAATGAGGTCCAAGGTGTATTCAACCGCTTCGACGCCAACGGCGACGGCAAGATAT 60
PCA18        AACCGAATGAGGTCCAAGGTGTATTCAACCGCTTCGACGCCAACGGCGACGGCAAGATAT 60
*****

Amfissa      CCGGGGATGAGCTAGCCGGCGYGCTTAAGGCGCTGGGATCCAACACTTCTAAAGAGGAGA 120
Megaron      CCGGGGACGAGCTAGTCGGCGYGCTTAAGGCGCTGGGATCCAACACTTCTAAAGAGGAGA 120
Kalamon      CCGGGGATGAGCTAGCCKGCGYGCTTAAGGCGCTGGGATCCAACACTTCTAAAGAGGAGA 120
Xalkidikis   CCGGGGATGAGCTAGCCKGCGYGCTTAAGGCGCTGGGATCCAACACTTCTAAAGAGGAGA 120
PCA23        CCGGGGATGAGCTAGCCTGCGCGCTTAAGGCGCTGGGATCCAACACTTCTAAAGAGGAGA 120
PCA18        CCGGGGATGAGCTAGCCGGCGTCTTAAGGCGCTGGGATCCAACACTTCTAAAGAGGAGA 120
*****

Amfissa      TCGCCCGCATRATGGAGGAGATCGACACCGACAAGGACGGTTTCATCAATGTCCAGGAGT 180
Megaron      TCGCCCGCATRATGGAGGAGATCGACACCGACAAGGACGGTTTCATCAATGTCCAGGAGT 180
Kalamon      TCGCCCGCATRATGGAGGAGATCGACACCGACAAGGACGGTTTCATCAATGTCCAGGAGT 180
Xalkidikis   TCGCCCGCATRATGGAGGAGATCGACACCGACAAGGACGGTTTCATCAATGTCCAGGAGT 180
PCA23        TCGCCCGCATGATGGAGGAGATCGACACCGACAAGGACGGTTTCATCAATGTCCAGGAGT 180
PCA18        TCGCCCGCATAATGGAGGAGATCGACACCGACAAGGACGGTTTCATCAATGTCCAGGAGT 180
*****

Amfissa      TCGCCGCCTTCGTCAAGGCCGAGACAGACCCCTACCCCTCCTCCGGCGGCGAGAACGAGC 240
Megaron      TCGCCGCCTTCGTCAAGGCCGAGACAGACCCCTACCCCTCCTCCGGCGGCGAGAACGAGC 240
Kalamon      TCGCCGCCTTCGTCAAGGCCGAGACAGACCCCTACCCCTCCTCCGGCGGCGAGAACGAGC 240
Xalkidikis   TCGCCGCCTTCGTCAAGGCCGAGACAGACCCCTACCCCTCCTCCGGCGGCGAGAACGAGC 240
PCA23        TCGCCGCCTTCGTCAAGGCCGAGACAGACCCCTACCCCTCCTCCGGCGGCGAGAACGAGC 240

```

```

PCA18      TCGCCGCCTTCGTCAAGGCCGAGACAGACCCCTACCCCTCCTCCGGCGGCGAGAACGAGC 240
*****

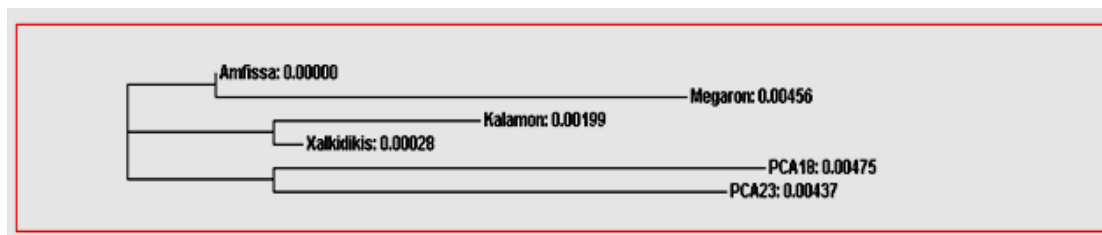
Amfissa    TTAAGGAGGCGTTTCGAGCTCTACGACCAGGATCATAATGGATTGATCTCATCCGTCGAGC 300
Megaron    TTAAGGAGGCGTTTCGAGCTCTACGACCAGGATCATAATGGATTGATCTCATCCGTCGAGC 300
Kalamon    TTAAGGAGGCGTTTCGAGCTCTACGACCAGGATCATAATGGATTGATCTCATCCGTCGAGC 300
Xalkidikis TTAAGGAGGCGTTTCGAGCTCTACGACCAGGATCATAATGGATTGATCTCATCCGTCGAGC 300
PCA23      TTAAGGAGGCGTTTCGAGCTCTACGACCAGGATCATAATGGATTGATCTCATCCGTCGAGC 300
PCA18      TTAAGGAGGCGTTTCGAGCTCTACGACCAGGATCATAATGGATTGATCTCATCCGTCGAGC 300
*****

Amfissa    TCCACAAGATCCTAACGCGCCTCGGTGAGCGGTACGCCGAACATGACTGCGTTGAGATGA 360
Megaron    TCCACAAGATCCTAACGCGCCTCGGTGAGCGGTACGCCGAACATGACTGCGTTGAGATGA 360
Kalamon    TCCACAAGATCCTAACGCGCCTCGGTGAGCGGTACGCCGAACATGACTGCGTTGAGATGA 360
Xalkidikis TCCACAAGATCCTAACGCGCCTCGGTGAGCGGTACGCCGAACATGACTGCGTTGAGATGA 360
PCA23      TCCACAAGATCCTAACGCGCCTCGGTGAGCGGTACGCCGAACATGACTGCGTTGAGATGA 360
PCA18      TCCACAAGATCCTAACGCGCCTCGGTGAGCGGTACGCCGAACATGACTGCGTTGAGATGA 360
*****

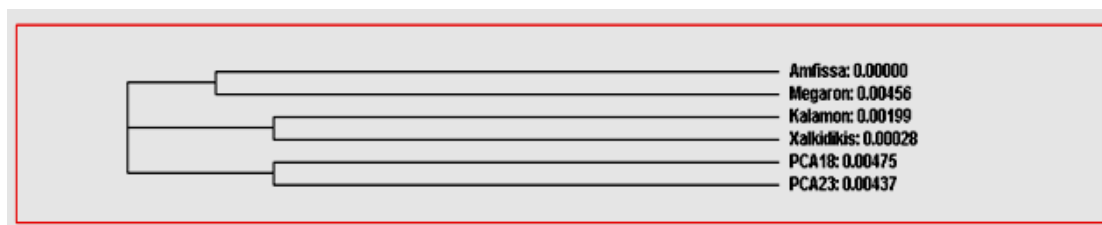
Amfissa    TTAATCTGTTGATTCTGATGGAGATGGTTACGTTAGCTTTGAGGAATTCAGAAAAATGA 420
Megaron    TTAATCTGTTGATTCTGATGGAGATGGTTACGTTAGCTTTGAGGAATTCAGAAAAATGA 420
Kalamon    TTAATCTGTTGATTCTGATGGAGATGGTTACGTTAGCTTTGAGGAATTCAGAAAAATGA 420
Xalkidikis TTAATCTGTTGATTCTGATGGAGATGGTTACGTTAGCTTTGAGGAATTCAGAAAAATGA 420
PCA23      TTAATCTGTTGATTCTGATGGAGATGGTTACGTTAGCTTTGAGGAATTCAGAAAAATGA 420
PCA18      TTAATCTGTTGATTCTGATGGAGATGGTTACGTTAGCTTTGAGGAATTCAGAAAAATGA 420
*****

Amfissa    TGACGAACAAAAGCGGCAA 439
Megaron    TGACGAACAAAAGCGGCAA 439
Kalamon    TGACGAACAAAAGCGGCAA 439
Xalkidikis TGACGAACAAAAGCGGCAA 439
PCA23      TGACGAACAAAAGCGGCAA 439
PCA18      TGACGAACAAAAGCGGCAA 439
*****

```

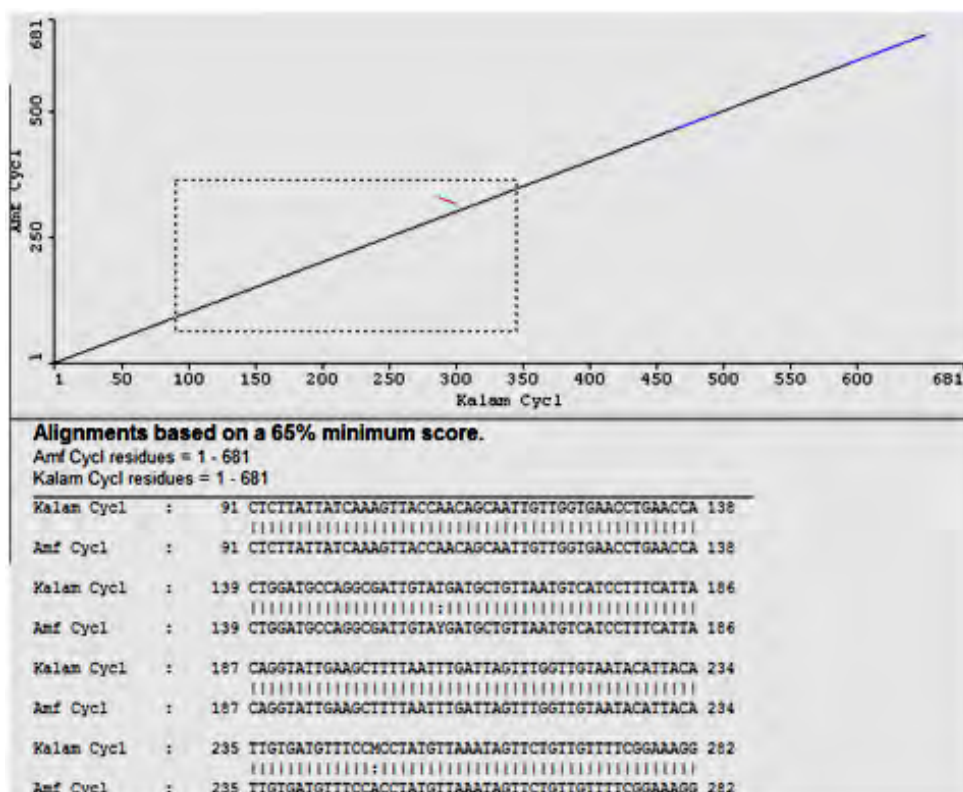


Phylogram tree

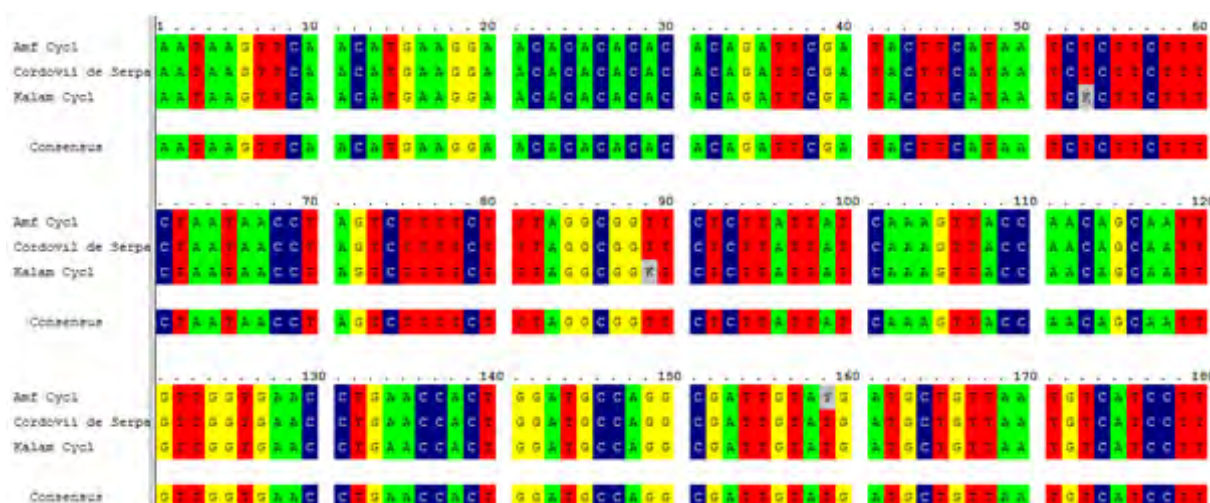


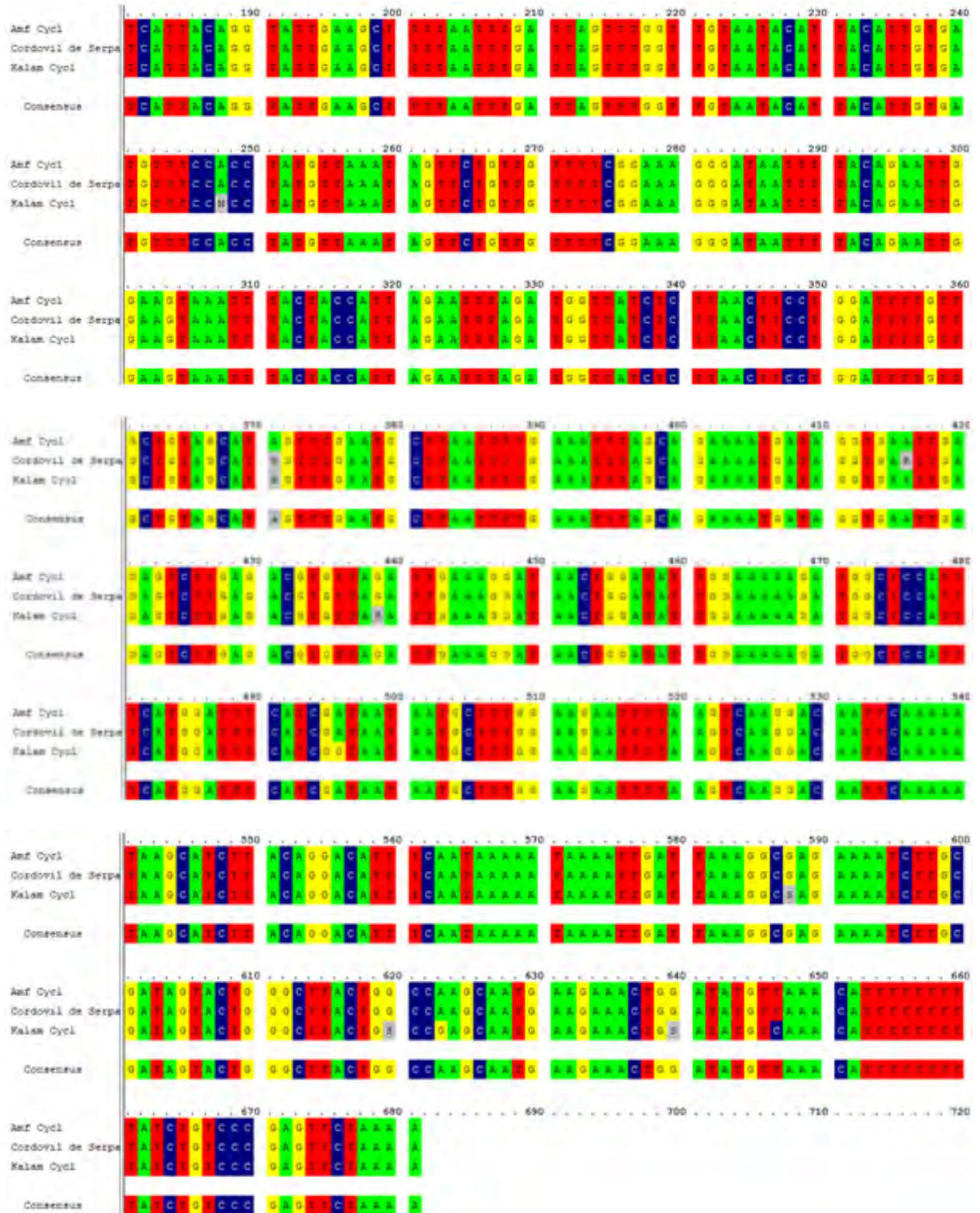
Cladogram tree

Cultivar name	Population	Primer in use
Amfissa	Greek	Cycl
Kalamon	Greek	Cycl
Cordovil de Serpa	Portugal	Cycl



Dot Plot result Kalam Cycl vs Amf Cycl





CLUSTAL multiple sequence alignment

```

Amfissa      AATAAGTTCAACATGAAGGAACACACACACAGATTCGATACTTCATAATCTCTCTTT 60
Cordovil    AATAAGTTCAACATGAAGGAACACACACACAGATTCGATACTTCATAATCTCTCTTT 60
Kalamon     AATAAGTTCAACATGAAGGAACACACACACAGATTCGATACTTCATAATCKCTTCTTT 60
*****

Amfissa      CTAATAACCTAGTCTTTTCTTTAGGCGGTTCTCTTATTATCAAAGTTACCAACAGCAAT 120
Cordovil    CTAATAACCTAGTCTTTTCTTTAGGCGGTTCTCTTATTATCAAAGTTACCAACAGCAAT 120
Kalamon     CTAATAACCTAGTCTTTTCTTTAGGCGGKTCTCTTATTATCAAAGTTACCAACAGCAAT 120

```

```

*****
Amfissa      GTTGGTGAACCTGAACCACTGGATGCCAGGCGATTGTAYGATGCTGTTAATGTCATCCTT 180
Cordovil    GTTGGTGAACCTGAACCACTGGATGCCAGGCGATTGTATGATGCTGTTAATGTCATCCTT 180
Kalamon     GTTGGTGAACCTGAACCACTGGATGCCAGGCGATTGTATGATGCTGTTAATGTCATCCTT 180
*****

Amfissa      TCATTACAGGTATGAAGCTTTTAAATTTGATTAGTTTGGTTGTAATACATTACATTGKGA 240
Cordovil    TCATTACAGGTATGAAGCTTTTAAATTTGATTAGTTTGGTTGTAATACATTACATTGKGA 240
Kalamon     TCATTACAGGTATGAAGCTTTTAAATTTGATTAGTTTGGTTGTAATACATTACATTGKGA 240
*****

Amfissa      TGTTTCCACCTATGTTAAATAGTTCTGTGTTTTTCGGAAAGGGATAATTTTACAGAATTG 300
Cordovil    TGTTTCCACCTATGTTAAATAGTTCTGTGTTTTTCGGAAAGGGATAATTTTACAGAATTG 300
Kalamon     TGTTTCCACCTATGTTAAATAGTTCTGTGTTTTTCGGAAAGGGATAATTTTACAGAATTG 300
*****

Amfissa      GAAGTAAATTTACTACCATTAGAATTTAGATGGTTATCTCTTAACTTCCTGGATTTTGT 360
Cordovil    GAAGTAAATTTACTACCATTAGAATTTAGATGGTTATCTCTTAACTTCCTGGATTTTGT 360
Kalamon     GAAGTAAATTTACTACCATTAGAATTTAGATGGTTATCTCTTAACTTCCTGGATTTTGT 360
*****

Amfissa      GCTGTAGCATAGTTTGAATGCTTAAATTTGAAATTTAGCAGAAAATGATAGGTGAATTGA 420
Cordovil    GCTGTAGCATMGTTTGAATGCTTAAATTTGAAATTTAGCAGAAAATGATAGGTGARTTGA 420
Kalamon     GCTGTAGCATMGTTTGAATGCTTAAATTTGAAATTTAGCAGAAAATGATAGGTGAATTGA 420
*****

Amfissa      GAGTCTTGAGACGTGTTAGATTGAAAGGATAACTGGATATTGGAAAAAGATGGCTCCATT 480
Cordovil    GAGTCTTGAGACGTGTTAGATTGAAAGGATAACTGGATATTGGAAAAAGATGGCTCCATT 480
Kalamon     GAGTCTTGAGACGTGTTAKATTGAAAGGATAACTGGATATTGGAAAAAGATGGCTCCATT 480
*****

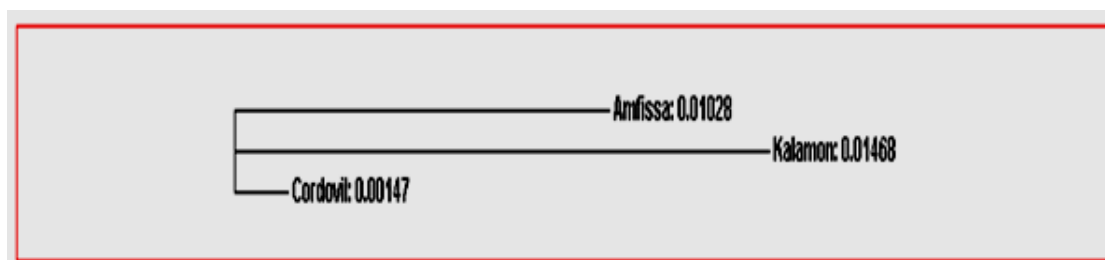
Amfissa      TCATGGATTTTCATCGATAAATAATGCTTTGGAAGAATTTTAAGTCAAGGACAATTCAAAA 540
Cordovil    TCATGGATTTTCATCGATAAATAATGCTTTGGAAGAATTTTAAGTCAAGGACAATTCAAAA 540
Kalamon     TCATGGATTTTCATCGATAAATAATGCTTTGGAAGAATTTTAAGTCAAGGACAATTCAAAA 540
*****

Amfissa      TAAGCATCTTACAGGACATTTCAATAAAAAATAAAATGATTAAAGCGAGAAAATCTTGC 600
Cordovil    TAAGCATCTTACAGGACATTTCAATAAAAAATAAAATGATTAAAGCGAGAAAATCTTGC 600
Kalamon     TAAGCATCTTACAGGACATTTCAATAAAAAATAAAATGATTAAAGGCSAGAAAATCTTGC 600
*****

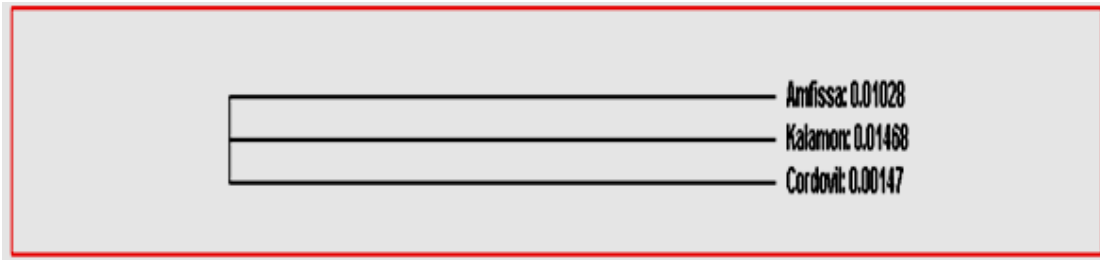
Amfissa      GATAGTACTGGGCTTACTGGCCAAGCAATGAAGAACTGGATATGTTAAACATTTTTTTT 660
Cordovil    GATAGTACTGGGCTTACTGGCCAAGCAATGAAGAACTGGATATGTTAAACATTTTTTTT 660
Kalamon     GATAGTACTGGGCTTACTGSCCGAGCAATGAAGAACTGSATATGTCAAACATTTTTTTT 660
*****

Amfissa      TATCTGTCCCAGTTCTAAAA 681
Cordovil    TATCTGTCCCAGTTCTAAAA 681
Kalamon     TATCTGTCCCAGTTCTAAAA 681
*****

```



Phylogram tree



Cladogram tree

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akashi T., Furuno T., Takahashi, T. & Ayabe S., 1994, *Biosynthesis of triterpenoids in cultured cells, and regenerated and wild plant Organs taraxacum officinale*. *Phytochemistry* 36, pp 303-308
- Antonella Pasqualone, Cinzia Montemurro, Francesco Caponio, Rosanna Simeone, 2003, *MULTIPLEX AMPLIFICATION OF DNA MICROSATELLITE MARKERS TO FINGERPRINT OLIVE OILS FROM SINGLE CULTIVARS*. *POLISH JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION SCIENCES*, Vol. 12/53, SI 2, pp 96-99
- Αναγνωστόπουλος Π., 1939, *Αι ποικιλίαι και η οικολογία της ελληνικής ελιάς*. Εκδόσεις Λαμπρόπουλος, Αθήνα
- Aaij C., Borst P., 1972, *The gel electrophoresis of DNA*. *Biochim Biophys Acta* 269: 192-200
- Angiolillo A., Mencuccini M., Baldoni, L., 1999, *Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms*. *Theoret. Appl. Genet.*, 10, 411-421
- Barranco D., Rallo L., 2000, *Olive cultivars in Spain*. *Hortech*, 10, 107-110
- B. Lazović, R. Boskovic, C. James, K.R. Tobutt, K. Gasic, 1996, *GENETIC DIVERSITY OF OLIVES GROWN ALONG THE COAST OF MONTENEGRO*. International Society for Horticultural Science
- Besnard G.; Bervillé A., 2000, *Multiple origins for mediterranean olive (Olea europaea L. subsp. europaea) based upon mitochondrial DNA polymorphisms*. *CR Acad. Sci Ser. III*, 19, 81-100
- Bretting P.K. and Widrlechner M.P., 1995, *Genetic markers and plant genetic resource management, Plant Breeding Reviews*. WILEY & Sons, Inc, 13, 11-86

Cultivars of the Olea europaea olive tree
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Olive>)

David A. Micklos, Greg A. Freyer, David A. Crotty, 2002, *DNA Science A FIRST COURSE (second edition)*

Fredrich W.L. and E. Venizelos, 1986, *Bemerkungen zur spt quartater flora von Santorin (Griechenland)*. Cour. Forsch. Inst. Senckenberg, 86: 387-395, Frankfurt am Main

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

Fooks R., 2000, *To Βιβλίο της ελιάς*. Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα

Gandul-Rojas B, Minguez-Mosquera MI, 1996, *Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties*. J Sci Food Agric 72:31–39

Gawel N.G. and Jarret R.L., 1991, *A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea*. Plant Molecular Biology Reporter, Volume 9 pages 262-266

Gemas V.J.V., Rijo-Johansen M.J. and Feveireiro P., 2002, *Intravariability of the Portuguese olive Cultivar Galega Vulgar expressed by RAPD, ISSR and SPAR*. Acta Hort. 586: 175-178

Gemas V.J.V., Almadanim M.C., Tenreiro R., Martins A. and Feveireiro P., 2004, *Genetic diversity in the Olive tree (Olea europea L. subsp. Europea) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers*. Genet. Resour. Crop Evol 51:501-511

Gemas V.J.V., Rijo-Johansen M.J., Tenreiro R. and Fevreiro P., 2000, *Inter- and intra-varietal analysis of tree Olea europaea L. cultivars using the RAPD technique*. J. Hort & Biotech, 75 (3): 312-319

Girman D, 1996, *The use of PCR-based single-stranded conformation polymorphism analysis (SSCP-PCR) in conservation genetics*. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press, pp 167-182

Hayashi K, 1991, *PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA*. PCR Methods and Applications, 1, 34–38

Holden M, 1976, *Analytical methods—chlorophylls*. In: Goodwin TW chemistry and biochemistry of plant pigments. Academy New York, vol 2, pp 2–32

Hakim Imen Rekik, Kammoun Naziha Grati, Makhloufi Emna and Ahmed Rebaï, 2010, *Discovery and Potential of SNP Markers in Characterization of Tunisian Olive Germplasm*. Molecular Diversity Preservation International

Θεοδόσιος Ντομπζάνοκι, 1999, *Η Γενετική της εξελικτικής πορείας*. Εκδόσεις Κυριακίδη Αφοί

Jaekel S, Epplen JT, Kauth M *et al.*, 1998, *Polymerase chain reaction — single strand conformation polymorphism or how to detect reliably and efficiently each sequence variation in many samples*. Electrophoresis, 19, 3055–3061

Jules Janik and Robert E. Paull, 2006, *The Encyclopedia of Fruits and Nuts*. C A B International

ICAP :Κλαδική μελέτη, τυποποιημένου Ελαιόλαδου, 2007, Ανθή Π. Λυμπεράκου, «Ανάλυση κλάδου τυποποιημένου ελαιόλαδου στην Ελλάδα, Μελέτη περίπτωσης ΕΛΑΪΣ Α.Ε.»

Ioannis Therios, 2009, *Olives*. C A B International

Khadari B., Breton C., Moutier N., Roger J.P., Besnard G., Berville A. and Dosba F., 2003, *The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection*. Theor. Appl. Genet. 106: 521–529

Kloosterman A.D., Budowle B. and Daselaar P., 1993, *PCR amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis*. Int. J. Legal Med. 105: 257–264

K. Roubos, M. Moustakas and F.A. Aravanopoulos, 2010, *Molecular identification of Greek olive (Olea europaea) cultivars based on microsatellite loci*. Genetics and Molecular Research

Kramer J.A., 2001, *Omiga TM: A PC-based sequence analysis tool*. Mol Biotech 19: 97-106

Lesage – Meessen L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot J.C. Lorquin J., Dellatre M., Simon J.L., Asther M. and M. Labat, 2001, *Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems*. Food Chemistry 75, 501 – 507

Λίνος, Α. και Μ. Χατζηδημητρίου, 2007, *Μελέτη της παραλλακτικότητας των μυτρικών φυτών ελιάς σε φυτώρια της περιοχής Ευλόκαστρου*. 23^ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας της επιστήμης των οπωροκηπευτικών, Χανιά 23-26 Οκτωβρίου. Πρακτικά συνεδρίου, Τόμος 13, τεύχος Α, σελ. 247

Martins-Lopens, P., S. Gomes, J. Lima-Brito, J. Lopes, H. Guedes-Pinto, 2009, *Assesment of clonal genetic variability in Olea europea L. 'Cobrancosa' by molecular markers*. Sc. Hort. 123: 82 -89

Μπαλατσούρας Γ.Δ., 1995, *Η επιτραπέζια ελιά (ποικιλίες - χημική σύσταση – ποιοτικά χαρακτηριστικά)*. Β Έκδοση, Εκδόσεις Πελεκάνος, Αθήνα

Matteo Busconi, Chiara Foroni, Massimiliano Corradi, Cristina Bongiorno, Federica Cattapan, Corrado Fogher, 1999, *DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar*. Analytical, Nutritional and Clinical Methods, pages 127-134

Marth G.T., Korf I., Yandell M.D., Yeh R.T., Gu Z., Zakeri H., Stitzel N.O., Hillier L., Kwok P.Y., and Gish W.R., 1999. *A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery*. Nat. Genet. 23: 452-456

Mullis K.B., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G et al. ,1986, *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction*. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 51: 263-273

Michele Cargill, David Altshuler, James Ireland, Pamela Sklar, Kristin Ardlie, Nila Patil, Charles R. Lane, Esther P. Lim, Nilesh Kalyanaraman, James Nemesh, Liuda Ziaugra, Lisa Friedland, Alex Rolfe, Janet Warrington, Robert Lipshutz, George Q. Daley & Eric S. Lander, 1999, *Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes*. Nature Genetics vol 22, Nature America Inc

Ozkaya, M.T., E. Cakir, Z. Gokbayrak, H. Ercan, N. Taskin, 2006, *Morphological and molecular characterization of 'Derik Halhali' olive (Olea europea L.) accessions grown in Derik-Mardin province of Turkey*. Sc. Hort. 108: 205-209

Page R.D.M., 1996, *TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers*. Comput. Applic. Biosci. 12, 357±358

Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev 2006, *The history of PCR*. AISmithsonian Institution Archives, Institutional History Division

Peristera Paschou, Michael W. Mahoney, Asif Javed, Judith R. Kidd, Andrew J. Pakstis, Sheng Gu, Kenneth K. Kidd and Petros Drineas, 2006, *Intra- and interpopulation genotype reconstruction from tagging SNPs*. Genome research, pages 97-107

Pui-Yan Kwok, MD, PhD, 2003, *Single Nucleotide Polymorphisms, Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*. HUMANA PRESS

P. SUNNUCKS, A. C. C. WILSON, L. B. BEHEREGARAY, K. ZENGER, J. FRENCH and A. C. TAYLOR, 2000, *SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology*. Blackwell Science Ltd *Molecular Ecology* 9, 1699–1710

Rafalski A., 2002, *Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 94–100

Reale S.; Doveri S.; Díaz A.; Angiolillo A.; Lucentini L.; Pilla F.; Martín A.; Donini P.; Lee D., 2006, *SNP-based markers for discriminating olive (Olea europaea L.) cultivars*. *Genome*, 15, 1193-1209

Rousset F. and Raymond M., 1995, *Testing heterozygote excess and deficiency*. *Genetics*, 140: 1413–1419. PMID:7498780

Sanz-Cortés F., Badenes M.L., Paz S., Iniguez A., and Yacer G., 2001, *Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126: 7–12

Schneider S., Roessli D., and Excoffier L. 2000. *Arlequin: A software for population genetics data analysis*. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.

Tatusova T.A.; Madden L.T. , 1999, *BLAST 2 sequences. A new tool for comparing protein and nucleotide sequences*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 3, 247-250.

Tanksley S.D., Young N.D., Paterson A.H. and Bonierbale M.W., 1989. *RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science*, *Biotechnology* 7: 257-264

Tabor S. and Richardson C.C., 1995, *A single residue in DNA polymerases of the Escherichia coli DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92:6339-6343

Tsimidou M., Papadopoulos G. and D. Boskou, 1992, *Phenolic compounds and stability of virgin olive oil*. *Food Chemistry* 45, pages 141-144

V J V Gemas, M C Almadanim, R Tenreiro, A Martins, P Feveiro, 2004, *Genetic diversity and relationships between wild and cultivated olives (Olea europaea L.) in Sardinia as assessed by SSR markers*

Williams J.J., 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

Williams J. and McClelland M., 1990, *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. *Nucleic Acids Res.* 18(24): 7213-8

Χατζόπουλος Π., 2001, *Βιοτεχνολογία φυτών*. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα

Zeev Wiesman, 2009, *Desert olive oil Cultivation, Advanced Biotechnologies*. Academic Press