

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ & ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
Αριθμ. Πρωτοκ. 334  
Ημερομηνία 24-11-10

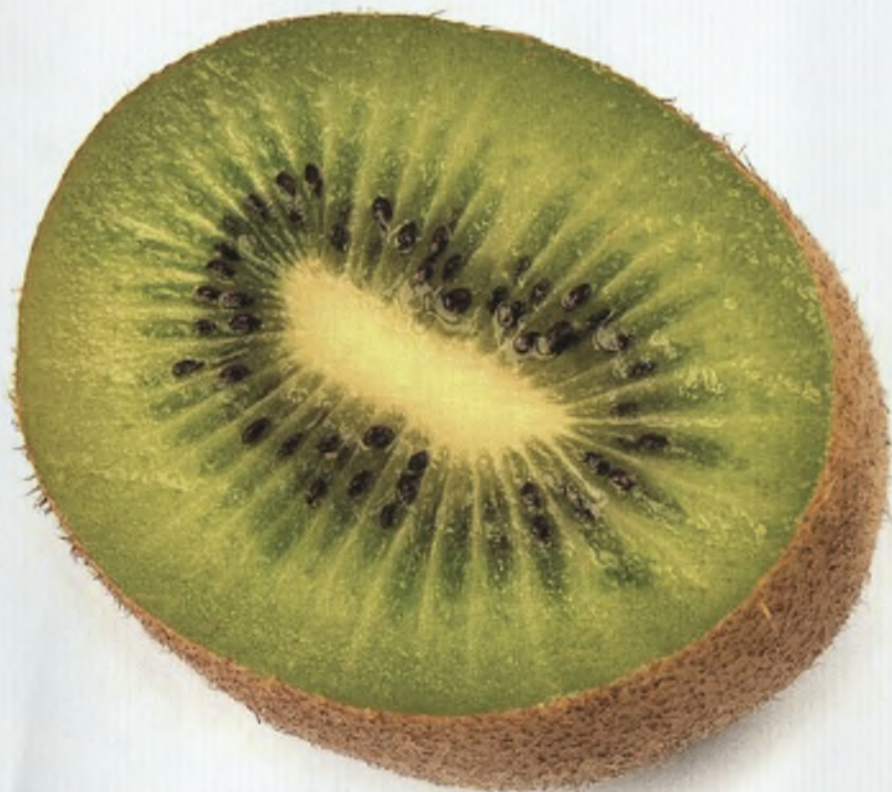
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**« Προσδιορισμός του φύλου στο ακτινίδιο με χρήση μοριακών δεικτών RAPD's »**

**Κουκλάς Ευάγγελος**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 9482/1  
Ημερ. Εισ.: 04-04-2011  
Δωρεά: Συγγραφέας  
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΦΠΑΠ  
2010  
ΚΟΥ

## Πτυχιακή διατριβή

« Προσδιορισμός του φύλου στο ακτινίδιο με χρήση  
μοριακών δεικτών RAPD's »

Κουκλάς Ευάγγελος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μαυρομάτης Αθανάσιος	Νάνος Γεώργιος	Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ
Επ. Καθηγητής	Αναπλ. Καθηγητής	Αναπλ. Καθηγητής
(Επιβλέπων)		

## Ευχαριστίες

Η ροπή και η αγάπη που ενυπάρχει για τον τομέα της γενετικής φυτών και των παρεμφερών αντικειμένων αποτέλεσε τον λόγο για τον οποίο επέλεξα να ασχοληθώ με αυτό το θέμα. Η ολοκλήρωση της πτυχιακής μου με βρίσκει έτοιμο να συνεχίσω το καταπληκτικό ταξίδι της γνώσης σε τέτοιου είδους γνωστικά αντικείμενα.

Δικαίως οι πρώτοι τους οποίους οφείλω να ευχαριστήσω ως φοιτητής είναι τα μέλη της οικογένειάς μου, τους γονείς μου, τον αδελφό μου, και την θεία μου. Η στήριξη και η συμπαράσταση τους σε όλους τους τομείς με βοήθησε να ολοκληρώσω τον κύκλο σπουδών μου καθώς και την πτυχιακή μου εργασία.

Επίσης, ευχαριστώ τον επιβλέπων καθηγητή της πτυχιακής μου, τον κύριο Μαυρομάτη Αθανάσιο ως επιβλέπων καθηγητή για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου αναθέτοντάς μου την παρούσα εργασία. Η συμβολή του εν τω συνόλω ήταν καθοριστικής σημασίας ώστε να ολοκληρωθεί η πτυχιακή. Ακόμα, ευχαριστώ τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής μου, κ. Νάνο Γεώργιο και Χα Ιμπραχίμ, όπως και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Γενετικής Φυτών του πανεπιστημίου για την βοήθεια που παρείχαν και τις άριστες συνθήκες συνεργασίας τις οποίες βίωσα εντός του εργαστηρίου.

Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους μου για την στήριξή τους, και ιδιαιτέρως τον φίλο και συνεργάτη Ηλία Γκίκα για την αμέριστη συμπαράστασή του.

## Περιεχόμενα

1. <u>Περίληψη</u> .....	5
2. <u>Εισαγωγή</u> .....	6
3. <u>Ανασκόπηση Βιβλιογραφίας</u>	
3.1. Το ακτινίδιο.....	8
3.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	12
3.3. Εξέλιξη.....	18
3.4. Καλλιεργούμενα είδη και ποικιλίες.....	20
3.5. Βελτίωση του ακτινιδίου.....	26
3.6. Καθορισμός του φύλου στα φυτά.....	40
3.7. Καθορισμός του φύλου στο ακτινίδιο-γονιδιακός έλεγχος.....	43
3.8. Αξιοποίηση των μοριακών δεικτών στον καθορισμό του φύλου.....	48
3.9. Καθορισμός του φύλου σε άλλα είδη.....	51
3.10. Μοριακή γενετική ανάλυση και κυτταρογενετική του ακτινιδίου.....	55
4. <u>Σκοπός της εργασίας</u> .....	62
5. <u>Υλικά και μέθοδοι</u> .....	63
6. <u>Αποτελέσματα και συζήτηση</u> .....	68
7. <u>Συμπεράσματα</u> .....	73
8. <u>Βιβλιογραφία</u> .....	75

## 1. Περίληψη

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας ήταν η προσπάθεια καθορισμού του φύλου μέσω μοριακών δεικτών RAPD σε δείγματα ακτινιδιών του είδους *Actinidia deliciosa*. Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι OPAL-20 και OPAL-12, οι οποίοι αναπτύχθηκαν από τους Gill & Harvey (1998) για τον καθορισμό του φύλου στο ακτινίδιο.

Η εφαρμογή των αναλύσεων στα δείγματα που εξετάστηκαν δεν οδήγησε σε ασφαλή αποτελέσματα με δεδομένο ότι δεν εμφανίστηκαν σαφείς ζώνες πολυμορφισμού για την πλειοψηφία των δειγμάτων. Σε τρεις μόνο περιπτώσεις εμφανίστηκαν αποτελέσματα με διακριτή μπάντα που κρίθηκε όμως επισφαλής λόγω έλλειψης επαναληψιμότητας στο σύνολο των πειραματικών αναλύσεων που εφαρμόστηκαν.

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι χρησιμοποιούμενοι δείκτες δεν ήταν ικανοί ώστε να εμφανίσουν διαχωρισμό ανάμεσα στα δύο φύλα. Η αιτία αυτού του αποτελέσματος μπορεί να οφείλεται στην ποιότητα ή τη φύση του γενετικού υλικού, στις ελλειπίες συγκεντρώσεις του γενετικού υλικού των δειγμάτων στις εφαρμοζόμενες συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ή και στον ανθρώπινο παράγοντα, ο οποίος σίγουρα έπαιξε τον ρόλο του στην έκβαση του συγκεκριμένου αποτελέσματος.

## 2. Εισαγωγή

Το ακτινίδιο αποτελεί ενδημικό είδος στις επαρχίες Hupeh, Szechuan, Kiangsi και Fukien της κοιλάδας του Γιανγκ - Τσε (Yangtze) της βόρειας Κίνας, καθώς και στην επαρχία Zhejiang της ανατολικής Κίνας, στις οποίες καλλιεργείται για περίπου 300 χρόνια. Δείγματα από δέντρα της περιοχής συλλέχθηκαν το 1847, από αντιπρόσωπο της «Βασιλικής Βοτανικής Εταιρίας του Λονδίνου» και κατόπιν, οι σπόροι που συλλέχθηκαν από την περιοχή Hupeh, στάλθηκαν στην Αγγλία στα 1900 από τον E.H. Wilson όπου και τα δέντρα που φυτεύτηκαν εκεί άνθησαν το 1909. Σχεδόν παράλληλα (1906) σπόροι του φυτού από την Κίνα εισήχθησαν και στην Νέα Ζηλανδία. Το δέντρο κίνησε την προσοχή των αγροτών, όπου και ασχολήθηκαν με τους σπόρους και μεγάλωσαν αρκετά σπορόφυτα. Στην συνέχεια, περίπου στα 1930 πραγματοποιήθηκε διαλογή ανάμεσά τους ως προς την καλύτερη παραγωγή και κατόπιν αυτά πολλαπλασιάστηκαν. Τα ακτινίδια ως φρούτα ξεκίνησαν να γίνονται γνωστά με τους Αμερικανούς στρατιώτες που ήταν τοποθετημένοι στην Νέα Ζηλανδία κατά τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο. Δύο είναι τα είδη της ακτινιδιάς που απασχολούν την παγκόσμια αγορά: το *Actinidia chinensis* Planch. και το *A. deliciosa* (A. Chev.), με κύριο εκφραστή της εμπορικότητας του φυτού το *A. deliciosa*, το οποίο υπερτερεί κατά πολύ όσον αφορά τις εξαγωγές. Όλες οι εμπορικές ποικιλίες που κυκλοφορούν στην αγορά έχουν προέλθει από διαλογές εντός των συγκεκριμένων ειδών.

Οι εξαγωγές των φρούτων ξεκίνησαν το 1953, με περιοχές ενδιαφέροντος την Ιαπωνία, την Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη (Morton, 1987). Η βιομηχανία εξαγωγών της Νέας Ζηλανδίας δομήθηκε την δεκαετία του 1960 με βασική ποικιλία την "Hayward" (Ferguson et al. 1996). Η παραγωγή ακτινιδίου παγκοσμίως κυμαίνεται περίπου στο 1.6 εκατομμύρια

τόνους ετησίως (στοιχεία 2008). Οι χώρες που πρωτοστατούν στον τομέα αυτό είναι η Ιταλία με μερίδιο 25% της παγκόσμιας παραγωγής, η Νέα Ζηλανδία με μερίδιο 20% , και η Χιλή με μερίδιο 7,5% . Η Ιταλία εξάγει το 66% του τελικού προϊόντος, η Νέα Ζηλανδία το 94% τουλάχιστον , και η Χιλή το 88% περίπου. Στην Ελλάδα το δέντρο της ακτινιδιάς εισήχθη το 1973 , με βασικές περιοχές εγκατάστασης την Ημαθία και την Πιερία στην βόρεια Ελλάδα. Η ελληνική παραγωγή κυμαίνεται περίπου στους 60.000 τόνους ετησίως (στοιχεία 2009), ποσότητα από την οποία το 50% του τελικού προϊόντος εξάγεται.



### 3. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

#### 3.1. Το ακτινίδιο

Το ακτινίδιο (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang et A.R. Ferguson) ανήκει στην τάξη των Ericales, στην οικογένεια Actinidiaceae και στο γένος *Actinidia*. Το γένος *Actinidia* περιλαμβάνει 66 είδη και 118 υποείδη (Kim M. et al., 2007).

Η κατάταξη του γένους *Actinidia* είναι δύσκολη, και η ταξινόμηση μερικών υποειδών είναι ακόμα αβέβαιη. Ο Dunn το 1911 αναγνώρισε 24 είδη, ο Li το 1952 ανέβασε τον αριθμό σε 36. Ο Liang το 1984 περιέγραψε πολλά νέα είδη και κατέγραψε 51 είδη στην Κίνα, και υπέθεσε ότι παγκοσμίως υπάρχουν 54. Στην τελευταία ανασκόπηση του γένους, οι Li et al, (2007) αναγνώρισαν την ύπαρξη 52 ειδών στην Κίνα και 55 παγκοσμίως (Li X. et al., 2009).

Το ακτινίδιο είναι ένα αγγειόσπερμο φυτό, το οποίο ξεχωρίζει από το γεγονός ότι κληρονομεί τους χλωροπλάστες από το πατρικό φυτό και τα μιτοχόνδρια από το μητρικό φυτό (Cipriani et al., 1995, Testolin and Cipriani, 1997, Chat et al., 1999). Στην οικογένεια των Actinidiaceae ανήκουν επίσης και τα γένη *Saurauia* και *Clematoclethra* (Dickinson 1972, Dickinson et al., 1982). Μερικά από τα είδη, όπως τα *A. polygama*, *A. arguta* και *A. chinensis* έχουν μεγάλη εξάπλωση και παρουσιάζουν ποικιλίες με βάση τις γεωγραφικές τους διαφορές στην γηγενή τους περιοχή που εκτείνεται από την Ιαπωνία μέχρι την δυτική Κίνα (Li, 1952). Τα *Actinidia* χωρίζονται σε τέσσερις υποκατηγορίες, τα *Leiocarpae*, *Maculatae*, *Stellatae*, και *Strigosae*. Τα στοιχεία τα οποία χρησιμοποιούνται ώστε να γίνει ο διαχωρισμός τους είναι η παρουσία ή απουσία φακιδίων καθώς και

άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως εάν τα τριχίδια είναι απλά ή αστεροειδή (Cui et al., 2002).

Σύμφωνα με τους Zhang και Beuzenberg (1983) και τους McNeilage και Considine (1989), ο βασικός αριθμός των χρωμοσωμάτων για το είδος με βάση τα κυτογενετικά στοιχεία που είναι διαθέσιμα είναι  $x = 29$ . Στις υποοικογένειες *Leiocarpae* και *Stellatae* εκτός από τις διπλοειδείς μορφές παρουσιάζονται και τετραπλοειδείς ( $4x = 116$ ), καθώς και εξαπλοειδείς ( $6x = 174$ ).

Τελικά, μοριακές έρευνες έδειξαν ότι η κατηγοριοποίηση με τις τέσσερις υποκατηγορίες δεν είναι εντελώς σωστή, Τα πειράματα που διεξήχθησαν εντός του γένους *Actinidia* έχοντας ως γνώμονες σύγκρισης το DNA των χλωροπλαστών και το DNA των μιτοχονδρίων, απέδειξαν ότι τα εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν είναι αρκετά για την ταξινόμηση των ειδών εντός του γένους. Επίσης, μέσω πειραμάτων έγινε κατανοητή και η συσχέτιση που υπάρχει ανάμεσα στα είδη, αφού διαφορετικά είδη μοιράζονται κοινές διαφορές ή έχουν κοινά στοιχεία στον γενετικό τους κώδικα (Chat et al., 2004).

Ανάμεσα στα είδη του γένους, είναι λογικό να υπάρχουν αρκετές βασικές διαφορές. Μια από αυτές εντοπίζεται στο επίπεδο πλοειδίας των ειδών και υποειδών. Υπάρχει μεγάλη δυσκολία στην διαδικασία δημιουργίας καρύουτουπου σε αυτά τα είδη, γιατί ο μεγάλος αριθμός και το μικρό μέγεθος των χρωμοσωμάτων είναι εμπόδια τα οποία δεν γίνεται να ξεπεραστούν (Yan G. et al., 1997). Πειράματα απέδειξαν το επίπεδο πλοειδίας βασικών ειδών και υποειδών του γένους *Actinidia*:

<u>Επίπεδο πλοειδίας</u>	<u>Είδη</u>	<u>Βασικός χρωμοσωμικός αριθμός</u>
Διπλοειδή	<i>A. chinensis</i> var. <i>chinensis</i> <i>A. glaucophylla</i> <i>A. guilinensis</i> <i>A. setosa</i> <i>A. indochinensis</i> <i>A. eriantha</i> <i>A. hypoleuca</i>	$2n = 2x = 58$
Τετραπλοειδή	<i>A. chinensis</i> var. <i>chinensis</i> <i>A. arguta</i> var. <i>arguta</i> <i>A. valvata</i> <i>A. chrysantha</i>	$2n = 4x = 116$
Εξαπλοειδή	<i>A. deliciosa</i> var. <i>deliciosa</i> <i>A. deliciosa</i> var. <i>chlorocarpa</i> <i>A. deliciosa</i> var. <i>coloris</i>	$2n = 6x = 174$
Οκταπλοειδή	<i>A. arguta</i> var. <i>purpurea</i>	$2n = 8x = 232$

Ο Stebbins (1971) υπέθεσε ότι ο βασικός χρωμοσωμικός αριθμός όλων των αγγειόσπερμων ήταν  $x=6$  και  $x=7$  και ότι η αλλαγή στα σύγχρονα είδη των αγγειόσπερμων δέντρων οφείλεται σε διαδικασίες αρχαίας πολυπλοειδίας. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι τα περισσότερα δέντρα έχουν μεγάλο βασικό χρωμοσωμικό αριθμό ενώ ορισμένες αρχέγονες οικογένειες δέντρων έχουν μικρό βασικό αριθμό χρωμοσωμάτων, όπως  $x=9$  (Yan G. et al., 1997). Έτσι καταλήγουμε στο

συμπέρασμα, ότι στην περίπτωση των *Actinidia* τα οποία έχουν  $x=29$ , η διαδικασία της πολυπλοειδίας συνέβη αρκετές φορές κατά την διάρκεια της εξέλιξης του αρχέγονου φυτού.

### 3.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το δέντρο της ακτινιδιάς είναι πολυετές φυτό, δικοτυλήδονο, αναρριχώμενο ή με αναρριχώμενες κληματίδες σχήματος όπως του αμπελιού, με διαφορά ότι οι κληματίδες της ακτινιδιάς περιελίσσονται και έχουν ταχεία ανάπτυξη. Η ετήσια βλάστηση της κληματίδας ξεπερνά τα τέσσερα μέτρα. Τα περισσότερα είδη είναι φυλλοβόλα, όμως μερικά από τα είδη που εντοπίζονται κυρίως στις υποτροπικές περιοχές είναι αειθαλή. Όλα τα γνωστά είδη είναι δίοικα, όμως μερικά φυτά παρουσιάζονται ερμαφρόδιτα, και έχουν ανακαλυφθεί κυρίως στο είδος *A. deliciosa*, το οποίο είναι εξαπλωειδές.

Οι βλαστοί του δέντρου είναι πολύ μαλακοί και σπάνε σχετικά εύκολα. Αρχικά ο βλαστός είναι καλυμμένος από τρίχες, των οποίων το χρώμα εξαρτάται από την ζωηρότητα του φυτού και την ποικιλία ( Παλούκης και Ντινόπουλος 1989). Η κατεύθυνση τους κατά την διάρκεια της αναπτύξεώς τους είναι δεξιόστροφη, και τυλίγονται επάνω στα στηρίγματα που τοποθετούνται κατά την εγκατάσταση του αγρού.



Εικόνα 3.2.1. Πρέμνο ακτινιδιάς στην περιοχή της Επισκοπής Ημαθίας

Τα φύλλα του δέντρου είναι μεγάλα, απλά, κατέναλλαγήν και στρογγυλωπά ή καρδιόσχημα. Το πάνω μέρος τους έχει πράσινο χρώμα, στα δέντρα μεγαλύτερης ηλικίας σκούρο πράσινο, ενώ το κάτω μέρος έχει πιο ανοιχτό πράσινο χρώμα (Εικόνα 3.2.2). Επίσης, διαφορές στο χρώμα του φυλλώματος παρουσιάζονται και ανάμεσα στα διαφορετικά είδη.



Εικόνα 3.2.2. Φύλλο του είδους *Actinidia deliciosa*

Η ακτινιδιά είναι δέντρο δίοικο, δηλαδή τα θηλυκά και τα αρσενικά άνθη βρίσκονται σε διαφορετικό δέντρο. Σε σπάνιες εξαιρέσεις είναι δυνατή η αυτογονιμοποίηση (McNeilage et al. 2007).

Τα άνθη έχουν λευκό χρώμα, είναι μεγάλα σε μέγεθος και μορφολογικά φαίνονται ερμαφρόδιτα διότι όλα τα όργανα του άνθους είναι εμφανή. Παρόλα αυτά, τα άνθη είναι είτε αρσενικά είτε θηλυκά, αφού στα αρσενικά οι ωοθήκες δεν είναι λειτουργικές, και αντίστοιχα στα θηλυκά άνθη, οι ανθήρες δεν λειτουργούν. Πριν τα άνθη εξελιχθούν, παρατηρείται πτώση των ανθοφόρων οφθαλμών ή ημιανεπτυγμένα άνθη ενώ το ποσοστό της ανθόρροιας διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία (Βασιλακάκης, 2004).

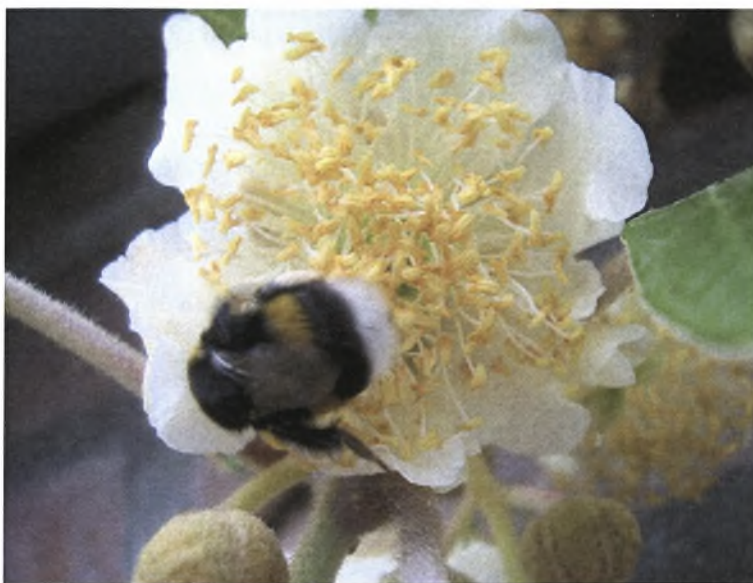
Στα θηλυκά δέντρα, τα άνθη παρουσιάζονται σε ταξιανθίες των τριών , ενώ στα αρσενικά τα άνθη παρουσιάζονται σε ταξιανθίες των τριών έως πέντε ανθέων.



Εικόνα 3.2.3. Θηλυκό άνθος του είδους *Actinidia deliciosa*

Τα άνθη και στις δύο περιπτώσεις αναπτύσσονται στα πέντε με έξι πρώτα γόνατα των ετήσιων κληματίδων, και οι ανθοφόροι μίσχοι εντοπίζονται στις μασχάλες των φύλλων. Στα θηλυκά άνθη παρατηρείται ανθόπτωση των παράπλευρων ανθέων που αναπτύσσονται , ενώ στα αρσενικά αυτό το στοιχείο απουσιάζει. Όπως φαίνεται και στις εικόνες 3.2.3. και 3.2.4., τα αρσενικά και θηλυκά παρουσιάζουν ίδιο αριθμό σεπάλων και πετάλων. Τα αρσενικά ανθίζουν συνήθως αργότερα ή ταυτόχρονα με τα θηλυκά , αρκετές φορές όμως παρατηρείται το φαινόμενο της πρωτανδρίας, χωρίς βέβαια αυτό να δημιουργεί ιδιαίτερο πρόβλημα στην καρπόδεση.

Η ακτινιδιά είναι εντομόγαμο είδος , αν και τα άνθη τους δεν έχουν νέκταρ. Για να επιτευχθεί η μεταφορά της γύρης από τα αρσενικά στα θηλυκά δέντρα, χρησιμοποιούνται κυρίως οι μέλισσες. Για να βοηθηθεί η επικοινωνία θα πρέπει να τοποθετείται μία κυψέλη ανά στρέμμα από την έναρξη της άνθησης.



Εικόνα 3.2.4. Αρσενικό άνθος του είδους *Actinidia deliciosa*

Έχει αποδειχτεί ότι το μέγεθος και η ποιότητα των ανθέων της ακτινιδιάς παίζουν ρόλο στον καθορισμό του τελικού μεγέθους του καρπού. Η αγγειακή ανάπτυξη του ποδίσκου ίσως επηρεάζει την ανάπτυξη του καρπού. Το μέγεθος του καρπού αποδείχτηκε ότι σχετίζεται σε υψηλό βαθμό ( $r^2 = 0.72$ ) με την διάμετρο των ποδίσκων των καρπών (Lai et al.,1990) , όμως επειδή οι μετρήσεις έγιναν κατά την διάρκεια της συγκομιδής δεν είναι ξεκάθαρο πότε θα ήταν σημαντική η επιρροή του συγκεκριμένου γνωρίσματος (McPherson et al.,2001). Δύο ακόμα παράγοντες που παίζουν ρόλο στο μέγεθος του καρπού είναι η απόσταση μεταξύ θηλυκών και αρσενικών δέντρων, καθώς και ο αριθμός των μελισσών στον οπωρώνα (Βασιλακάκης, 2004). Η άνθηση στις περισσότερες ποικιλίες ξεκινά στις αρχές Μαΐου, και τελειώνει στα τέλη του μήνα. Τον Ιούνιο, στα γονιμοποιημένα άνθη αρχίζει η ανάπτυξη του καρπού, ενώ παράλληλα οι κληματίδες σταματούν την αύξησή τους. Ο καρπός αποκτά σχεδόν το τελικό του μέγεθος 45-50 ημέρες μετά την γονιμοποίηση της ωοθήκης. Τα άνθη που αναπτύσσονται νωρίτερα παρουσιάζουν μεγαλύτερες ωοθήκες, κάτι που οδηγεί στην ανάπτυξη μεγαλύτερων καρπών.



Το φυτό αρχίζει να καρποφορεί από το τρίτο έτος, και μπαίνει στην πλήρη καρποφορία κατά το 5<sup>ο</sup> ή 6<sup>ο</sup> έτος. Ο καρπός της ακτινιδιάς είναι ράγα, με σχήμα κυλινδρικό τις περισσότερες φορές ή αχλαδόμορφο. Ο φλοιός του έχει χρώμα πράσινο, καφέ ή ελαφρώς κοκκινωπό αναλόγως με την ποικιλία. Τα περισσότερα είδη φέρουν πυκνές τρίχες στον φλοιό του καρπού. Η σάρκα του καρπού είναι πράσινη, αν και τα τελευταία χρόνια έχουν δημιουργηθεί ποικιλίες με χρώμα σάρκας κίτρινο. Το βάρος του καρπού κυμαίνεται από 60 έως 120 περίπου γραμμάρια, αριθμός που σε ορισμένες περιπτώσεις ξεπερνιέται. Η επικονίαση παίζει βασικό ρόλο στο μέγεθος του καρπού. Εάν δεν γίνει σωστά, οι καρποί που αναπτύσσονται έχουν πολύ μικρότερο μέγεθος συγκριτικά με τους κανονικούς (Εικ. 3.2.5.).



Εικόνα 3.2.5. Μικροκαρπία σε σύγκριση με κανονικούς καρπούς

Ο καρπός περιέχει σπέρματα σφαιρικού σχήματος , μαύρου χρώματος.  
Στο εσωτερικό του καρπού περιέχονται από 1000 - 1500 σπόροι.



Εικόνα 3.2.6. Καρπός ακτινιδίου ολόκληρος και σε τομή

### 3.3 Εξέλιξη

Σχεδόν όλες οι ποικιλίες ακτινιδίου που κυκλοφορούν στην αγορά προήλθαν από δύο θηλυκά και ένα αρσενικό φυτό που έφτασαν στην Νέα Ζηλανδία στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα από την Κίνα. Η προέλευση των φυτών ουσιαστικά είναι άγνωστη, αν και υπάρχουν αρκετές εικασίες. Αν και γενετικά η αρχική επιλογή φυτών που θα μπορούσε να γίνει ήταν περιορισμένη, εν τούτοις υπήρξε αρκετά μεγάλη παραλλακτικότητα στους πρώτους απογόνους.

Η ποικιλία «Hayward» προήλθε από επιλογή περίπου 40 νεαρών φυτών, λίγες γενιές μετά από την είσοδο των αρχικών φυτών στην Νέα Ζηλανδία. Η επιλογή τους έγινε λόγω των καλύτερων εξωτερικών χαρακτηριστικών των καρπών και της θεωρούμενης καλύτερης γεύσης τους. Παρόλα αυτά, η ποικιλία ξεκίνησε να φυτεύεται σε μικρή κλίμακα, και οι πρώτες ποικιλίες που εξήχθησαν ήταν άλλες ποικιλίες ακτινιδίου (Ferguson, 1999). Όμως, η μεγάλη ζήτηση που υπήρχε από αναπτυσσόμενες αγορές όπως αυτή στις Ηνωμένες Πολιτείες, ανάγκασαν τους καλλιεργητές να στραφούν σχεδόν αποκλειστικά στην ποικιλία αυτή στα μέσα της δεκαετίας του 1960. Παρότι υστερούσε σε βάρος καρπού και θεωρούνταν δύσκολο ως φυτό, διέθετε εκπληκτική αντοχή στην αποθήκευση, κάτι που βοήθησε στην μεταφορά με πλοία στις ξένες αγορές. Η σχεδόν πλήρης στήριξη μιας παγκόσμιας αγοράς ενός φρούτου σε μια και μοναδική ποικιλία καθιστά την καλλιέργεια ακτινιδίου μοναδική παγκοσμίως, αλλά και ιδιαίτερα ανησυχητικό γεγονός, λόγω των εχθρών ή ασθενειών που μπορεί να αναπτυχθούν και να δημιουργήσουν σημαντικό πρόβλημα στην αγορά του ακτινιδίου.

Λόγω της σημαντικότητας του ακτινιδίου στην παγκόσμια αγορά υπήρξαν αρκετές προσπάθειες από επιστήμονες στην εξελικτική προέλευση της ποικιλίας αυτής. Μέχρι και τα μέσα της δεκαετίας του 1980, τα είδη *A.*

*deliciosa* και *A.chinensis* θεωρούνταν ότι ήταν ένα είδος, μέχρι το σημείο όπου ερευνητές άρχισαν να μελετούν τα κυτταρικά χαρακτηριστικά των δύο ειδών, και παρατήρησαν την σαφή χρωμοσωμική διαφοροποίηση που υπάρχει ανάμεσά τους, όσον αφορά τον αριθμό των χρωμοσωμάτων λόγω του διαφορετικού επιπέδου πλοειδίας τους. Το *A.chinensis* είναι διπλοειδές, ενώ το *A. deliciosa* είναι εξαπλοειδές ( $2n = 6x$ ).

Στην συνέχεια, επιστήμονες έθεσαν το ερώτημα της προέλευσης του γενετικού υλικού του *Actinidia deliciosa*. Σύμφωνα με τους Chat et. al. (2004), ερευνώντας το μιτοχονδριακό DNA και το γενετικό υλικό των χλωροπλαστών βρίσκει κανείς φυλογενετικά στοιχεία, καθώς και διάφορα στοιχεία για το είδος και την εξελικτική ιστορία του.

Μέσω της έρευνας ανακαλύφθηκε ότι το ακτινίδιο είναι αλλοπολυπλοειδές, δηλαδή το γενετικό του υλικό προήλθε από δύο ή περισσότερα εντελώς διαφορετικά πυρηνικά γονιδιώματα και όχι αυτοπολυπλοειδές, δηλαδή διπλασιασμένο γενετικό υλικό ενός πυρηνικού γονιδιώματος. Μέσω της μελέτης του γονιδίου της πολυγαλακτουρονάσης (PG) , το οποίο βρίσκεται σε μικρό αριθμό αντιγράφων στο ακτινίδιο (Atkinson et al., 1997), διαπιστώθηκε εν μέρει ο τρόπος με τον οποίο δημιουργήθηκε το εξαπλοειδές *A. deliciosa*. Αρχικά το διπλοειδές *A.chinensis* διασταυρώθηκε με άγνωστο διπλοειδές είδος (γένωμα Β) και δημιουργήθηκε το τετραπλοειδές *A.chinensis* με γονιδίωμα ΑΒ. Στη συνέχεια, στο τετραπλοειδές είδος προστέθηκε ένα ακόμα διπλοειδές γονιδίωμα (γένωμα Γ) και έτσι μέσω της εξέλιξης φτάσαμε στο τελικό *A. deliciosa* (Ferguson and Huang, 2007).

### 3.4 Καλλιεργούμενα είδη και ποικιλίες

Σχεδόν όλες οι ποικιλίες του *A. deliciosa* που υπάρχουν στην παγκόσμια αγορά προήλθαν από ελεύθερες επικονιάσεις και επιλογή στον αγρό περίπου στην δεκαετία του 1920 στην Νέα Ζηλανδία. Οι βασικότερες ποικιλίες χωρίζονται σε πρώιμες και όψιμες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι: Abbot, Allison, Bruno, Monty και στην δεύτερη η ποικιλία Hayward.

Στο γένος *Actinidia* ανήκουν και τα είδη *A. chinensis* και *A. arguta*, τα οποία έχουν μεγάλη εμπορική αξία, κυρίως όμως το *A. chinensis*, το οποίο με τη δημιουργία της ποικιλίας «Hort16A» ή ZespriGold, αυξάνει το μερίδιο που καταλαμβάνει το είδος στην παγκόσμια αγορά.

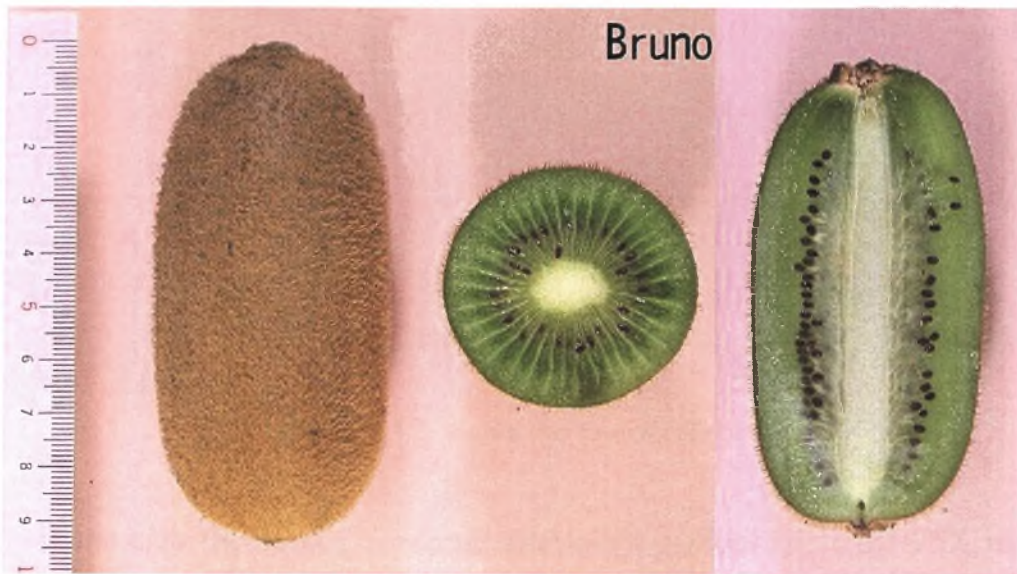
Η ποικιλία «Abbot» ανακαλύφθηκε στην Νέα Ζηλανδία περίπου στα 1920, και ξεκίνησε να καλλιεργείται ευρέως στις αρχές της δεκαετίας του 1930. Ο καρπός (Εικόνα 3.4.1.) είναι επιμήκης, κυλινδρικός, μεσαίου μεγέθους, με φλοιό χρώματος καφέ. Το βάρος του καρπού κυμαίνεται από 65 έως 75 γραμμάρια. Ξεχωρίζει λόγω των μακριών, πυκνών και μαλακών τριχών που βρίσκονται στον φλοιό. Η σάρκα είναι χρώματος ανοιχτό πράσινο, με ωραία γεύση. Παρουσιάζει καλή αντοχή στην αποθήκευση. Η ποικιλία είναι πρώιμη και ανθίζει στις αρχές Μαΐου. Η απόδοση της ποικιλίας αυτής είναι περίπου 75 κιλά ανά δέντρο.



Εικόνα 3.4.1. Καρπός της ποικιλίας Abbot

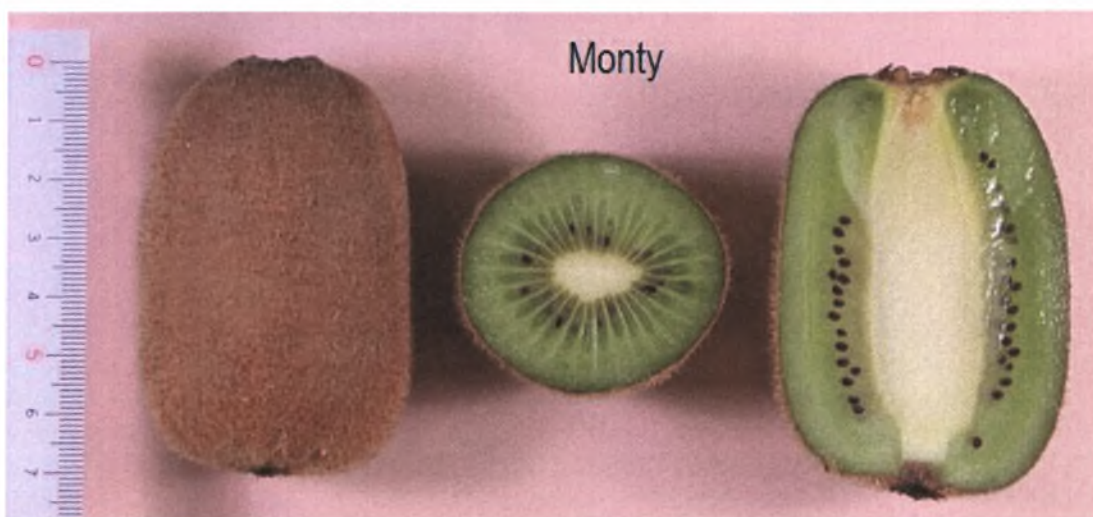
Η ποικιλία «Allison» ανακαλύφθηκε και αυτή την ίδια περίπου περίοδο με την Abbot. Ο καρπός ομοιάζει με αυτόν της προηγούμενης ποικιλίας εξωτερικά, όμως είναι πιο πλατύς, μεσαίου μεγέθους. Τα πρέμνα της συγκεκριμένης ποικιλίας παρουσιάζουν μεγάλη ευρωστία καθώς και μεγάλη γονιμότητα. Ανθίζει λίγο αργότερα από την Abbot. Το βάρος του καρπού κυμαίνεται από 70 έως 80 γραμμάρια. Η απόδοση ανά δέντρο ανέρχεται περίπου στα 70 κιλά.

Η καταγωγή της ποικιλίας «Bruno» είναι επίσης από τη Νέα Ζηλανδία. Ο καρπός της (Εικόνα 3.4.2) είναι κυλινδρικός, επιμήκης και είναι πλατύτερος στην κορυφή του. Το χρώμα του φλοιού είναι σκουρότερο από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Τα δέντρα ανθίζουν περίπου την ίδια εποχή με τις προηγούμενες ποικιλίες. Η σάρκα του καρπού παρουσιάζει χρώμα ανοιχτό πράσινο, και είναι εύγευστος. Η ποικιλία αυτή συνανθεί ή ανθίζει λίγο αργότερα από την «Allison». Τα άνθη έχουν στενότερα πέταλα και αλληλεπικαλύπτονται σε μικρότερο βαθμό από τις άλλες δύο ποικιλίες.



Εικόνα 3.4.2. Καρπός της ποικιλίας Bruno

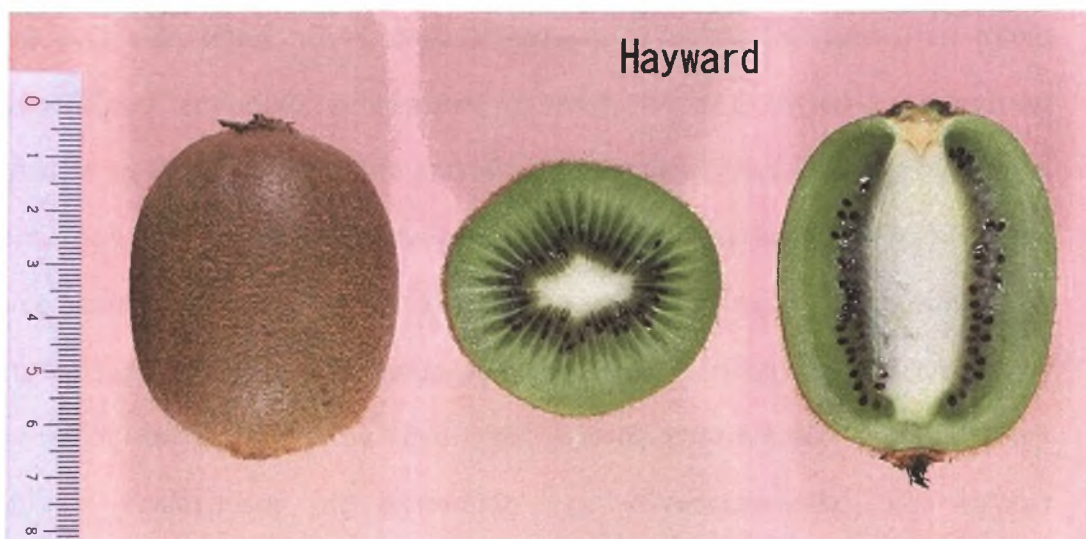
Η ποικιλία «Monty» εμφανίστηκε αργότερα από τις προηγούμενες, στις αρχές της δεκαετίας του 1950 και ξεκίνησε να καλλιεργείται περίπου στα 1957. Ο καρπός (Εικόνα 3.4.3.) είναι επιμήκης, παρουσιάζει γωνίες στις άκρες του και είναι πλατύτερος στην άκρη του. Είναι μικρού έως μεσαίου μεγέθους, με το μέσο βάρος να κυμαίνεται στα 50 γραμμάρια, χρώματος καφετί με πυκνά τριχίδια. Η σάρκα του έχει χρώμα ανοιχτό πράσινο. Οι αποθηκευτικές δυνατότητες της ποικιλίας είναι καλύτερες των Abbott και Allison αν και γενικότερα θεωρείται χαμηλότερης δυναμικότητας από την ποικιλία Hayward (Βασιλακάκης 1991).



Εικόνα 3.4.3. Καρπός της ποικιλίας Monty

Η ποικιλία της οποίας οι καρποί αποτελούν ουσιαστικά το 90-95% των ακτινιδίων που πωλούνται παγκοσμίως είναι η «Hayward». Αν και ανακαλύφθηκε στο Auckland της Νέας Ζηλανδίας το 1925, γνώρισε μεγάλη εμπορική άνθηση την δεκαετία του 1970. Πριν ονομαστεί έτσι στην χώρα προέλευσης, εισήχθη στις Ηνωμένες Πολιτείες ως P.I. 112053 και ήταν γνωστή στην Καλιφόρνια ως «Chico» (Morton, J. 1987). Οι καρποί (Εικόνα 3.4.4.) είναι μεγάλοι, με μέσο βάρος περίπου 100 γραμμάρια. Το σχήμα τους είναι οβάλ, το χρώμα της φλούδας είναι ελαφρύ καφέ, με έντονα μαλακά τριχίδια. Η σάρκα έχει χρώμα ελαφρύ πράσινο, και η γεύση της είναι εξαιρετική. Η ποικιλία έγινε γνωστή λόγω της μεγάλης αποθηκευτικής αντοχής που έχουν οι καρποί. Τα πρέμνα ανθίζουν λίγο αργότερα από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Είναι μέσης ανάπτυξης και παραγωγικότητας, και συνδυάζεται πολύ καλά με αρσενικές ποικιλίες που είναι επίσης οψιμανθείς όπως η «Tomuri». Η απόδοση ανά πρέμνο είναι περίπου 85 κιλά.





Εικόνα 3.4.4. Καρπός της ποικιλίας Hayward

Η πρώτη αξιόλογη προσπάθεια προκειμένου να αξιοποιηθούν σε παγκόσμιο επίπεδο οι ποικιλίες του *A. chinensis* πραγματοποιήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1980, με την εισαγωγή σπόρων από την Κίνα στην Νέα Ζηλανδία. Μέσω ελεγχόμενου υβριδισμού ενός θηλυκού φυτού στην φύση, δημιουργήθηκε η πρώτη κιτρινόσαρκα ποικιλία, η επονομαζόμενη «Hort16A», ή αλλιώς «Zespri™ Gold» (Εικ. 3.4.5.). Η ποικιλία αυτή είναι ιδιαίτερα παραγωγική, έως 6 τόνους ανά στρέμμα, δεν υπάρχουν τρίχες στον φλοιό του καρπού, η σάρκα του είναι κίτρινη, αρωματική, με πολύ καλή αντοχή στην αποθήκευση που φτάνει τους 4 μήνες. Ανθίζει και συγκομίζεται περίπου ένα μήνα νωρίτερα από την «Hayward», γεγονός που σημαίνει ότι καλύτερος επικονιαστής είναι η αρσενική ποικιλία «Matua» από ότι η «Tomuri». Η ποικιλία αυτή είναι πλέον υπεύθυνη για περίπου το 25% των κερδών των εξαγωγίμων καρπών της βιομηχανίας ακτινιδίου στη Νέα Ζηλανδία (A.R. Ferguson και A.G. Seal, 2008).

Είναι γεγονός ότι λόγω αυτής της ποικιλίας υπάρχει μεγάλη προσπάθεια προκειμένου να διοχετευθούν στην παγκόσμια αγορά καινούργιες ποικιλίες, είτε των γνωστών *A. deliciosa* («Summerkiwi™») και *A. chinensis* («Jintao\_R», «Hongyang» (κοκκινόσαρκο kiwi)), επίσης να παρουσιαστούν

καινούργια είδη όπως τα *A. arguta* και *A. eriantha* («Bidan»), τα οποία παρουσιάζουν εμπορικό ενδιαφέρον. Επίσης, αυτή η ποικιλία ουσιαστικά κατάφερε να αλλάξει τον τρόπο λειτουργίας στην κινέζικη αγορά ακτινιδίου, η οποία τόσα χρόνια αναλωνόταν στην προσπάθεια να βρεθούν καινούργιες άγριες ποικιλίες με καλύτερα χαρακτηριστικά από τις προηγούμενες. Τα δέντρα μέχρι πρότινος δεν καλλιεργούνταν συστηματικά, γιατί θεωρούνταν άγριο είδος και για αυτό τον λόγο απλά γινόταν συλλογή των καρπών τους. Πλέον η καλλιέργεια της ακτινιδιάς έχει εντατικοποιηθεί, και αρκετά προγράμματα βελτίωσης έχουν ξεκινήσει, με σκοπό να προσαρμόσουν στις ανάγκες της εγχώριας και της παγκόσμιας αγοράς.



Εικόνα 3.4.5. Καρπός της ποικιλίας Zespri Gold

### 3.5. Βελτίωση του ακτινιδίου

Με δεδομένο το γεγονός ότι η καλλιέργεια του ακτινιδίου είναι σχετικά πρόσφατη σε σύγκριση με άλλα δέντρα, η προσπάθεια βελτίωσης του κύριου καλλιεργούμενου είδους άργησε να ξεκινήσει. Παρόλα αυτά, οι απαιτήσεις της διεθνούς αγοράς έδειξαν ότι η ανάγκη για περαιτέρω βελτίωση των χαρακτηριστικών του ακτινιδίου είναι επιτακτική. Οι εταιρίες που εμπλέκονται στον τομέα της παραγωγής τροφίμων επεκτάθηκαν στον διαχωρισμό των καταναλωτών σε «υπό-ομάδες» (sub-groups), προκειμένου να δημιουργηθούν ξεχωριστές κατηγορίες προϊόντων τα οποία θα ικανοποιούν τους εκάστοτε καταναλωτές. Επίσης αυτή η διαδικασία επιτρέπει την αναγνώριση του γνωρίσματος «ποιότητα» και τις τάσεις που καταγράφονται (Wismer et al., 2005). Τα τελευταία χρόνια, έχουν γίνει προσπάθειες για να προστεθούν στα πάνελ προϊόντων που δημιουργούνται για τις προτιμήσεις των καταναλωτών και τα φρούτα, με αρχικές εντάξεις αυτές των μήλων (Daillant-Spinnler et al., 1996; Jaeger et al., 1998; Allan-Wojtas et al., 2003), των ροδάκινων (Harker et al., 2003, p. 340; Jaeger et al., 2003a), και των ακτινιδίων (Jaeger et al., 2003b).

Ουσιαστικά η βελτίωση των βασικών ειδών ακτινιδίου ξεκίνησε από την στιγμή που εισήλθε στην Νέα Ζηλανδία. Αν και σπόροι κατέφτασαν σχεδόν ταυτόχρονα και στις Ηνωμένες Πολιτείες και στο Ηνωμένο Βασίλειο, οι μεγαλύτερες προσπάθειες για την εδραίωση του ακτινιδίου έγιναν στην Νέα Ζηλανδία. Μετά από περίπου 20 χρόνια, άρχισαν οι εξαγωγές φρούτων και ποικιλιών. Αυτό οδήγησε τη χώρα σε θέση να κατευθύνει, ολοκληρωτικά σχεδόν, την παγκόσμια αγορά ακτινιδίου. Στο γεγονός αυτό συντέλεσε το ότι τα φρούτα των ποικιλιών που προωθούνταν από την συγκεκριμένη χώρα ήταν σαφώς ανώτερης ποιότητας από τα υπόλοιπα. Έτσι ξεκίνησε και η παντοκρατορία της ποικιλίας «Hayward», λόγω των πολύ καλών

χαρακτηριστικών που διέθετε συνολικά, και ως καλλιεργούμενη ποικιλία, και ως εμπορεύσιμο είδος, καθώς και το γεγονός ότι ήταν καρπός ο οποίος ήταν ανθεκτικός στην μακροχρόνια αποθήκευση, συνθήκη που επέτρεπε εξαγωγές μεγάλων ποσοτήτων καρπών με πλοία. Οι ποικιλίες της Νέας Ζηλανδίας ήταν τόσο πετυχημένες, ώστε να καταφέρουν να εδραιωθούν σε ένα σημαντικό κομμάτι στην συνολική καλλιεργούμενη έκταση του ακτινιδίου στην χώρα προέλευσής του την Κίνα. Μέχρι και σήμερα κατέχει ένα 20% της συνολικής έκτασης στη χώρα (A.R. Ferguson και A.G. Seal, 2008).

Μετά την μεγάλη εμπορική επιτυχία του νεοζηλανδικού εγχειρήματος, η συνέχεια δόθηκε στην Κίνα. Εκεί υπήρχε το βασικό πρόβλημα ότι η ακτινιδιά, και δύο βασικά είδη, *A. chinensis* και *A. deliciosa* ήταν γηγενή είδη. Έτσι ξεκίνησε μια πολύ μεγάλη προσπάθεια από την δεκαετία του 1950 να γίνει μια συλλογή αξιολόγηση των άγριων ποικιλιών που υπήρχαν σε όλη την επικράτεια. Στα τέλη της δεκαετίας του 1970, ξεκίνησε η επιλογή των ποικιλιών με τα καλύτερα χαρακτηριστικά. Αυτές οι προσπάθειες στηρίχτηκαν κυρίως από την κινεζική Ακαδημία Επιστημών, καθώς και τον Βοτανικό Κήπο του Πεκίνου. Η επιλογή ξεκίνησε με 1400 ελπιδοφόρα δέντρα, τα οποία μελετήθηκαν περαιτέρω (Qian and Yu 1992), και αρκετές εκατοντάδες έμειναν ως επικρατέστερες. Οι περισσότερες ποικιλίες που προέρχονται από την Κίνα προέρχονται απευθείας από άγριους γενότυπους λόγω της αγενοούς αναπαραγωγής η οποία είναι ο βασικός τρόπος αναπαραγωγής του ακτινιδίου.

Η κυριαρχία της ποικιλίας «Hayward» ακόμα και μετά από 100 χρόνια περίπου θεωρείται δεδομένη, και αυτό διότι δεν έχει εμφανιστεί μέχρι σήμερα ποικιλία η οποία να είναι εξολοκλήρου καλύτερη. Βεβαίως υπάρχουν αρκετές πρασινόσαρκες ποικιλίες ακτινιδίου που καλλιεργούνται σε παγκόσμιο

επίπεδο, όμως είναι μάλλον δύσκολο να καταφέρει να συναγωνιστεί την «Hayward».

Η άφιξη της κιτρινόσαρκης ποικιλίας «Hort16A» έδωσε μια νέα τροπή στην βελτίωση του ακτινιδίου. Πλέον, η προσπάθεια επικεντρώνεται στο να καταφέρουν οι ερευνητές να προσελκύσουν μεγαλύτερο μερίδιο αγοράς εισάγοντας ποικιλίες εξειδικευμένες για «υπό-ομάδες» του καταναλωτικού κοινού εν τω συνόλω. Αυτό γίνεται με ποικιλίες που προσφέρουν διαφορετικά χαρακτηριστικά από τις κλασσικές πρασινόσαρκες ποικιλίες. Τέτοια είναι το διαφορετικό χρώμα της σάρκας του καρπού, περιεκτικότητα σε βιταμίνη C και άλλα φυσικοχημικά ή εμφανισιακά χαρακτηριστικά.

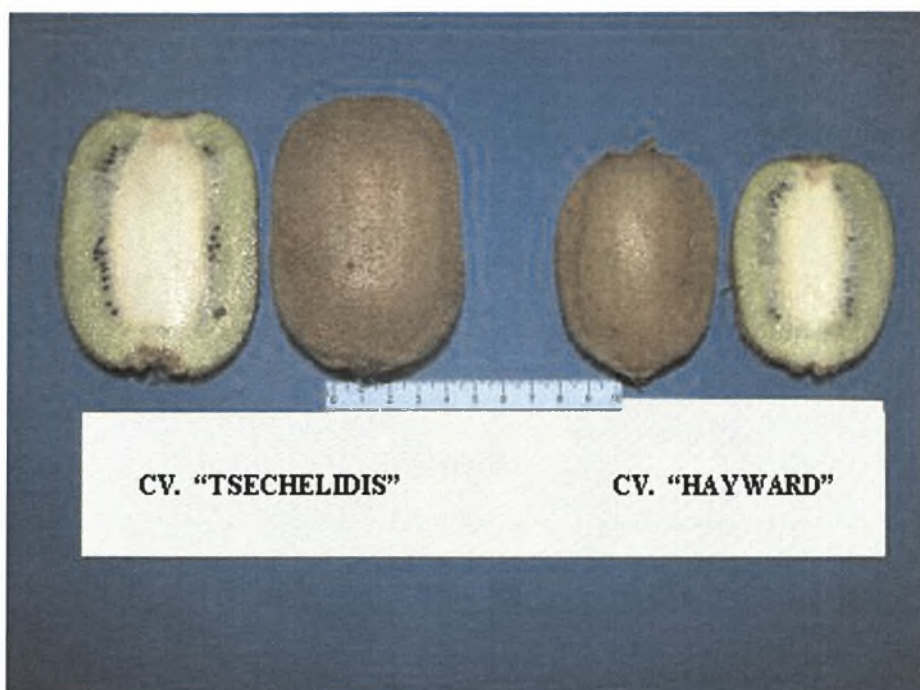
Τα τελευταία χρόνια ανακαλύφθηκε και μια ελληνική ποικιλία ακτινιδίου στην περιοχή της Επισκοπής Ημαθίας. Η ποικιλία προήλθε από φυσική μετάλλαξη σπορόφυτου της ποικιλίας «Hayward» και καρποφόρησε πρώτη φορά το 1994, και ονομάστηκε «Τσεχελίδης» (Εικόνα 3.5.1). Η διαφοροποίηση από την ποικιλία προέλευσης ήταν αρκετά μεγάλη ώστε να κινήσει το ενδιαφέρον των παραγωγών αρχικά. Τα επόμενα δέκα χρόνια περίπου, η ποικιλία πολλαπλασιάζεται μέσα στον ίδιο οπωρώνα, όπου υπάρχει και η ποικιλία Hayward. Δημιουργείται μία βάση παρατήρησης με πολλά φυτά και των δύο ποικιλιών και οι καλλιεργητικές φροντίδες είναι οι ίδιες και στις δύο ποικιλίες. Οι παρατηρήσεις έδειξαν πως συνολικά η ποικιλία εκφυλίζεται δύσκολα και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των καρπών εμφανίζονται καλύτερα από αυτά της κύριας ποικιλίας «Hayward». Με την βεβαιότητα των παρατηρήσεων αυτών ξεκινά η διαδικασία πιστοποίησης της ποικιλίας «Τσεχελίδης» ως ξεχωριστής ποικιλίας, με πρώτο βήμα την αίτηση τον Δεκέμβριο του 2003 στο Community Plant Variety Office που εδρεύει στη Γαλλία και καλύπτει νομοθετικά τα όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης, για την εξέταση των χαρακτηριστικών αλλά και την κατοχύρωση των δικαιωμάτων

της νέας ποικιλίας. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για τον οργανισμό U.P.O.V. για τις χώρες που ο οργανισμός καλύπτει νομοθετικά και οι οποίες ενδιαφέρονται για την καλλιέργεια των ακτινιδίων.



Εικόνα 3.5.1. Πρέμνο ακτινιδιάς ποικιλίας «Τσεχελίδη» με φυτά νεαρής ηλικίας

Παράλληλα έγινε η γενετική αποτύπωση της ποικιλίας από την Γεωπονική σχολή του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας υπό την επιμέλεια του καθηγητή Α. Μαυρομάτη, χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής ανάλυσης του DNA, με βάση την τεχνική PCR και την ανάλυση μικροδορυφορικών περιοχών (SSR). Τα δεδομένα της μοριακής ανάλυσης συνηγορούν στις μη αμφισβητήσιμες διαφορές μεταξύ των δύο γενότυπων (Tsechelidis - Hayward). Οι δύο γενότυποι είναι διαφορετικοί αφού εμφανίζουν πολυμορφισμό σε οκτώ (8) τουλάχιστον αλληλόμορφα, όπως φάνηκε με την μεθοδολογία που ακολουθήθηκε και στους μοριακούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν.

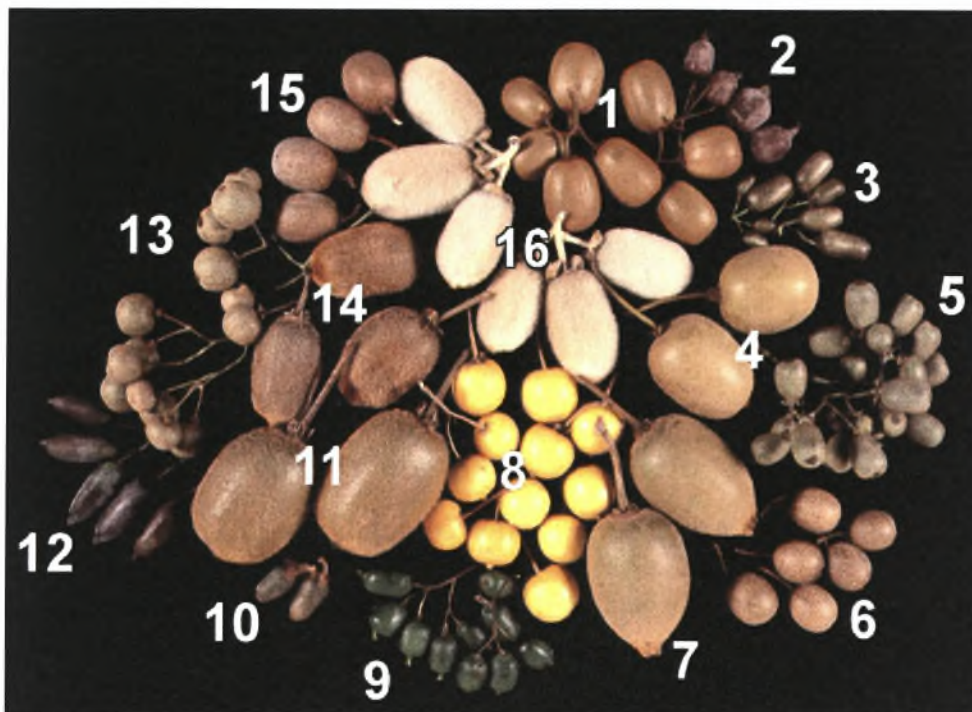


Εικόνα 3.5.2. Μορφολογική σύγκριση καρπών των ποικιλιών "Τσεχελίδης" και "Hayward"

Τα μορφολογικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά που εμφανίστηκαν μετά από μελέτη των δέντρων και των καρπών έχουν ως εξής:

1. Φυτό μεγάλης ζωηρότητας και παραγωγής (περίπου διπλάσια στρεμματική απόδοση από την Hayward).
2. Καρπός μεγάλος, κυλινδρικός, μέσου βάρους 170-180 gr (Εικόνα 3.5.2.).
3. Απουσία ατροφικών καρπών και πεπλατυσμένων.
4. Χρήση περιορισμένου αριθμού επικονιαστών (αυτογόνιμη 70%, Hayward 2 %).
5. Μεγάλη ομοιομορφία καρπών.
6. Υπερδιπλάσια περιεκτικότητα Βιταμίνης C από την Hayward..
7. Υψηλότερη ποσότητα αντιοξειδωτικών από την Hayward (περίπου 60 %).
8. Υψηλότερο ποσοστό σακχάρων.
9. Ευχάριστη γεύση με ξεχωριστό άρωμα.

## 10. Καλή συντηρησιμότητα.



Εικόνα 3.5.3. Καρποί από διάφορα είδη του γένους *Actinidia* (Ferguson 1999). 1)*A. rufa* 2)*A. melanandra* 3)*A. glaucophylla* 4)*A. chinensis* 5)*A. latifolia* 6)*A. indochinensis* 7) *A. chinensis* 'Hort16A' 8)*A. macrosperma* 9)*A. arguta* 10)*A. fulvicoma* 11)*A. deliciosa* 'Hayward' 12)*A. arguta* var. *purpurea* 13)*A. guilinensis* 14)*A. setosa* 15)*A. crysantha* 16)*A. eriantha*

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.5.3., είναι εύλογο να υπάρχει έντονη γενοτυπική και φαινοτυπική παραλλακτικότητα μέσα στην οικογένεια *Actinidiaceae*, λόγω της μεγάλης γεωγραφικής εξάπλωσης των γηγενών πληθυσμών των εκάστοτε ειδών, καθώς επίσης και λόγω των διάφορων κλιματικών συνθηκών στα οποία παρουσιάζονται τα είδη της οικογένειας. Επίσης, για τους ίδιους λόγους, υπάρχει μεγάλη παραλλακτικότητα και ενδοειδικά, τουλάχιστον στα είδη στα οποία έχει αναπτυχθεί εμπορικό ενδιαφέρον και για αυτόν τον λόγο έχουν ερευνηθεί περαιτέρω.

Οι σημερινοί στόχοι της βελτίωσης στα ακτινίδια μπορούν γενικά να συμπτυχθούν ακολούθως:



- Παραγωγή μιας ποικιλίας πολύ παρόμοιας με την «Hayward», αλλά καλύτερη από ορισμένες απόψεις, δηλαδή μια «βελτιωμένη» «Hayward» ποικιλία,

- Παραγωγή ποικιλιών φρούτων με παρόμοια αναγνωρισιμότητα με τα ακτινίδια «Hayward» (Π.χ., ποικιλίες του *A. chinensis*)

- Παραγωγή φρούτων με αρκετά νέα χαρακτηριστικά.

- Παραγωγή φρούτων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά γεύσης και μεγέθους με βάση τις υπάρχουσες ποικιλίες.

Στα περισσότερα χαρακτηριστικά η ποικιλία «Hayward» παρουσιάζεται ως εξαιρετική, αλλά υπάρχουν ακόμα πολλοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να βελτιωθεί (Ferguson et al. 1990). Οι άξονες βελτίωσης έχουν να κάνουν με τα εξής:

(Α) Φρούτα καλύτερης ποιότητας

- ◆ Μεγαλύτερο μέγεθος φρούτων

Στη Νέα Ζηλανδία, οι καλλιεργητές καλούνται να παράγουν καρπούς με μέσο βάρος περίπου 100 γραμμάρια, με εμπορικές κατηγορίες που κυμαίνονται από το ελάχιστο των 78 g μέχρι περίπου 140 g. Η προτιμώμενη που καταβάλλεται σήμερα για τα μεγαλύτερα ακτινίδια, εξαρτάται από το μέγεθος της εθνικής καλλιέργειας και την αγορά. Οι μικροί καρποί αποτελούν ένα σχετικά μεγάλο ποσοστό, μέρος των οποίων δεν εξάγεται. Υπάρχει ένας συμβιβασμός μεταξύ των καλλιεργειών και των μέσου μεγέθους των καρπών. Όταν το συνολικό φορτίο των καρπών είναι ίδιο (κατά βάρος), στη συνέχεια «η ποικιλία Hayward», τείνει να έχει λιγότερους αλλά σημαντικά μεγαλύτερους καρπούς από τις περισσότερες λοιπές ποικιλίες ακτινιδίων. Θα πρέπει να είναι δυνατή η επιλογή στις ποικιλίες των οποίων το μέσο βάρος καρπών είναι μεγαλύτερο (δηλαδή 120 g), αλλά το μέγεθος των

φρούτων να αυξάνεται με τροποποίηση των τεχνικών διαχείρισης.  
Βελτιωμένη γεύση

Η ήπια, αλλά ξεχωριστή γεύση των φρούτων «Hayward» ήταν ένας σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία αυτής της ποικιλίας. Ωστόσο, ορισμένοι καταναλωτές προτιμούν τα φρούτα να παραμείνουν περισσότερο σκληρά (0,75 - 0,85 kgf - 1kgf - 10 N), με μια ισορροπημένη γλυκιά γεύση, ενώ άλλα άτομα προτιμούν πιο μαλακά φρούτα (0,5 έως 0,6 kgf) με μια πιο αρωματική γεύση (Stec et al. 1989). Η σκληρότητα των φρούτων φαίνεται να είναι σημαντική στην αξιολόγηση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων και της συνολικής αποδοχής. Αυτές οι προτιμήσεις μπορούν κάλλιστα να ποικίλλουν ανάλογα με την εθνικότητα ή τις ηλικιακές ομάδες. Όπως μαλακώνουν τα ακτινίδια, το άρωμα μεταβάλλεται με γρήγορους ρυθμούς τόσο το συνολικό ποσό και οι σχετικές αναλογίες. Υπάρχει ένα στενό και μεταβλητό παράθυρο της αποδοχής μεταξύ των σκληρών, "πράσινων", των ανώριμων ακτινιδίων, και των υπερώριμων φρούτων με ασθενικά αρώματα. Οποιαδήποτε προσπάθεια να συγκριθούν γεύσεις φρούτων από νέες επιλογές με εκείνη της «Hayward» θα πρέπει να συμπεριληφθούν πολλοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων και των προτιμήσεων των καταναλωτών, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τη γενική αποδοχή. Φαίνεται να υπάρχει ζήτηση, ιδίως στην Ασία, για ακτινίδια με γλυκιά γεύση. Περίπου το 60% των ακτινιδίων που καλλιεργούνται στο Νομό Kagawa, στην Ιαπωνία, είναι της ποικιλίας «Kogyoku», που έχει καρπούς που θεωρούνται πιο γλυκοί. Θα μπορούσαν επομένως να παραχθούν φρούτα με μια σειρά από γεύσεις μέσα από το γένος *Actinidia*. Καρποί του *A. chinensis* και ειδικά αυτών

του *A. arguta* και *A. kolomikta* τείνουν να έχουν πιο γλυκιά γεύση από αυτά του *A. deliciosa*.

♦ Μαλακότερος πυρήνας

Οι καρποί ορισμένων επιλογών ακτινιδίων έχουν ένα πολύ σκληρό πυρήνα με μια ξυλώδη ακίδα στο τέλος του μίσχου. Ορισμένες διαλογές της «Hayward» μπορούν επίσης να έχουν ασυνήθιστα σκληρούς πυρήνες, πιθανώς λόγω των περιβαλλοντικών συνθηκών ή λόγω των μετασυλλεκτικών χειρισμών που υπόκεινται οι καρποί. Μια ποικιλία με αρκετά μαλακότερο πυρήνα στα ώριμα φρούτα θα θεωρηθεί πλεονέκτημα.

♦ Βελτίωση της διατροφικής ποιότητας

Τα ακτινίδια συχνά προωθούνται για τη θρεπτική τους αξία, την ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητά τους σε ανόργανα άλατα, φυτικές ίνες, και βιταμίνη C. Τα ακτινίδια, έχουν μία ισχυρή καθαρτική δράση, η οποία θα μπορούσε επίσης να προωθηθεί ως ένα από τα πλεονεκτήματα για την ανθρώπινη υγεία. Η βιταμίνη C έχει την μεγαλύτερη προσοχή όσον αφορά τα ευεργετικά χαρακτηριστικά των καρπών. Οι καρποί της ποικιλίας Hayward περιέχουν συνήθως περίπου 80 και 90 mg βιταμίνης C/100 g βάρος νωπού προϊόντος, σε σύγκριση με το 2 έως και 10 mg βιταμίνης C/100 g βρώσιμο τμήμα των μήλων ή τα περίπου 50 mg/100 g εδώδιμων πορτοκαλιών. Οι καρποί ορισμένων άλλων ποικιλιών του *A. deliciosa* και επιλογές του *A. chinensis* περιέχουν πολύ περισσότερο, ενώ καρποί του *A. eriantha* μπορεί να περιέχουν έως και 1000 mg βιταμίνης C/100 g νωπού βάρους, πάνω από δέκα φορές την περιεκτικότητα σε βιταμίνη C από τα Hayward (Ferguson 1990). Ο καρπός του *A. latifolia*, αν και πολύ μικρός σε μέγεθος, μπορεί να περιέχει περισσότερο από 2000 mg

βιταμίνης C/100 g νωπού προϊόντος (δηλαδή, περισσότερο από 2% του νωπού βάρους).

Ορισμένα συστατικά σε νέες επιλογές των ακτινιδίων που είναι λιγότερο επιθυμητά θα πρέπει να ελέγχονται. Μια πολύ υψηλή περιεκτικότητα της ακτινιδίνης δεν θα είναι επιθυμητή, όπως και η αύξηση των μέχρι στιγμής αγνώστων στοιχείων υπεύθυνων για την καθαρτική δράση των καρπών.

- ◆ Καρποί χωρίς χνούδι

Υπήρξε κάποιο ενδιαφέρον για την παραγωγή ακτινιδίων χωρίς χνούδι όπως π.χ., η ποικιλία «Top © Star». Μπορεί να είναι προτιμότερο να γίνει επιλογή για φρούτα που χάνουν εύκολα τα τριχίδια τους στην ωριμότητα και όχι αυτά που δεν έχουν καθόλου, διότι αυτά μπορεί να είναι πιο επιρρεπή στην κηλίδωση του δέρματος. Η αφθονία, το μέγεθος και η σκληρότητα των τριχών στους καρπούς μπορεί να επηρεάσει την συμπεριφορά των εντόμων - εχθρών.

(B) Βελτίωση σχετική με τα χαρακτηριστικά του δέντρου

- ◆ Μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα στις κλιματικές αλλαγές

Τα δέντρα Hayward είναι απαιτητικά όσον αφορά το κλίμα στο οποίο αναπτύσσονται. Απαιτείται μια μακρά περίοδο καλλιέργειας, αλλά ο εαρινός παγετός, μπορεί να προκαλέσει βλάβη στους βλαστούς (και κατά συνέπεια στην άνθηση). Ο κρύος καιρός κατά το φθινόπωρο και τον χειμώνα μπορεί επίσης να προκαλέσει ζημιές στους κορμούς. Η ποικιλία Hayward έχει μεγαλύτερες απαιτήσεις όσον αφορά τον λήθαργο των οφθαλμών για την μετέπειτα ανάπτυξή τους από πολλές άλλες ποικιλίες. Ωστόσο, τα αποτελέσματα μετά από ήπιους χειμώνες στους οφθαλμούς (και συνεπώς ο αριθμός των ανθέων) στη «Hayward» μπορεί να αντισταθμιστεί από εφαρμογή του υδρογόνου

του κυαναμιδίου, με την τροποποίηση των διαδικασιών κλαδέματος, ή από χρήση των κατάλληλων υποκειμένων.

- ◆ Ερμαφροδιτισμός

Οι ερμαφρόδιτες ποικιλίες θα μπορούσαν να αυξήσουν την παραγωγικότητα, τη βελτίωση της επικοινωνίας, καθώς και την απλοποίηση της διαχείρισης των δέντρων. Συνήθως, ένα κομμάτι του αγρού χρησιμοποιείται για φύτευση αρσενικών ποικιλιών τα οποία δεν παράγουν καρπούς. Σε έναν οπωρώνα όπου θα φυτεύονταν μόνο μια ερμαφρόδιτη ποικιλία, θα μπορούσε να είναι πιο παραγωγικός και θα επέτρεπε την ομοιόμορφη διαχείριση όλων των δέντρων. Πολλοί καλλιεργητές φαίνεται να αντιμετωπίζουν επαναλαμβανόμενα προβλήματα με ανεπαρκή ή μεταβλητή επικοινωνία που οδηγούν σε μικρούς ή παραμορφωμένους καρπούς. Η χρήση μιας ερμαφρόδιτης ποικιλίας θα μπορούσε να περιορίσει τα προβλήματα αυτά και θα ήταν μια φθηνότερη εναλλακτική λύση από τις μεθόδους μηχανικής επικοινωνίας.

- ◆ Αντοχή σε παράσιτα και ανθεκτικότητα στις ασθένειες

Αν και η βελτίωση όσον αφορά την αντοχή στα παράσιτα και τις ασθένειες δεν έχει αποτελέσει μέχρι στιγμής σημαντική παράμετρο για τα ακτινίδια αναπαραγωγής στη Νέα Ζηλανδία, παραγωγοί στην Ιαπωνία προσπαθούν να κάνουν επιλογές από ακτινίδια με αντοχή στο *Pseudomonas viridiflava* [Burkholder] Dowson. Αυτό το βακτήριο είναι ένα σοβαρό πρόβλημα στην Ιαπωνία και εμφανίζεται επίσης σε ορισμένες άλλες χώρες.

- ◆ Βελτιωμένα αρσενικά

Επί του παρόντος, ποικιλίες όπως «Chieftain», «Matua», Tomuri », «M51 / M52 / M54», και «M56» ή συνδυασμοί αυτών είναι

συνήθως χρησιμοποιούνται ως επικονιαστές της ποικιλίας «Hayward». Οι βελτιωμένες αρσενικές ποικιλίες θα πρέπει να αυξάνονται σε ικανοποιητικό βαθμό, να υπάρχει καλή επικάλυψη άνθησης με την Hayward κάθε εποχή, να εκπύει άφθονα λουλούδια (πολλά διπλά ή τριπλά άνθη, διότι αυτό επεκτείνει την περίοδο άνθισης), να έχει καλή γονιμότητα γύρης, και καλή ικανότητα παραγωγής καρπών σε μέγεθος. Νέες Θηλυκές ποικιλίες μπορεί να χρειαστούν διαφορετικούς επικονιαστές από αυτούς που διατίθενται σήμερα. Τα αρσενικά που χρησιμοποιούνται για την παροχή γύρης για επικονίαση γίνεται με την χρήση ψεκασμού, ή με άλλα μηχανικά συστήματα εφαρμογής γύρης.

◆ Βελτιωμένα υποκείμενα

Η ποικιλία «Hayward» συνήθως καλλιεργείται ως ολόκληρο μόσχευμα μόνο του ή σε υποκείμενα του *A. deliciosa*. Κατάλληλα κλωνικά υποκείμενα θα μπορούσαν να μειώσουν την μεταβλητότητα των δέντρων, να επάγουν την μεγαλύτερη ανθοφορία σε νεαρά δέντρα, και την αύξηση της παραγωγής. Επίσης θα μπορούσε με αυτό τον τρόπο να βελτιωθεί η ανοχή στους διαφορετικούς τύπους εδάφους, ή να αυξήσει την αντοχή στο ψύχος. Στην Ιταλία, κλωνικά μοσχεύματα χρησιμοποιούνται συχνά επειδή φαίνεται να αναπτύσσουν ανοχή σε ασβεστούχα εδάφη. Η ποικιλία «Καίμαι» (TR-2), που κυκλοφόρησε πρόσφατα στη Νέα Ζηλανδία, ενισχύει την άνθηση της «Hayward», ιδιαίτερα στα νεότερα δέντρα.

Η διακύμανση σε χαρακτηριστικά σχετικά με το φυτό, τα άνθη του ή τους καρπούς που παράγει και ελέγχονται σε μεγάλο βαθμό από γονίδια με αθροιστικές επιδράσεις μπορεί να είναι αποτελεσματικά σε προγράμματα βελτίωσης (Lawes et al. 1991). Η επαναλαμβανόμενη επιλογή θα είναι η

απλούστερη και ευκολότερη διαδικασία βελτίωσης των χαρακτηριστικών εντός του πληθυσμού για τα εν λόγω χαρακτηριστικά, όπως π.χ. το μέγεθος και το σχήμα φρούτων, το περιεχόμενο βιταμίνης C, και την ημερομηνία ωρίμανσης. Χαρακτηριστικά με μέτρια ή χαμηλή κληρονομικότητα υπόκεινται δυσκολότερα βελτίωση. Για αυτά, η επαναλαμβανόμενη οικογενειακή επιλογή θα ήταν πιο χρήσιμη. Ωστόσο, μια σύγκριση που πραγματοποιήθηκε από προκαθορισμένα γενετικά κέρδη με τη χρήση διαφορετικών στρατηγικών επιλογής έδειξε ότι η συνδυασμένη επιλογή (μεταξύ και εντός των οικογενειών) έδωσε το καλύτερο αποτέλεσμα, ανεξάρτητα από το επίπεδο της κληρονομικότητας (Zhu 1990). Περαιτέρω μελέτες, ειδικά για ένα ευρύτερο φάσμα γενετικού υλικού, σχετικά με το βαθμό της κληρονομικότητας ιδιαίτερων χαρακτηριστικών, θα είναι μεγάλη βοήθεια για τις στρατηγικές που αναπτύσσονται στον τομέα της βελτίωσης. Περισσότερες από 40 επιλογές του *A. chinensis* και *A. deliciosa* έχουν αναλυθεί στατιστικά για τις συσχετίσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών και την οικονομική σημασία (Xiong 1987). Για παράδειγμα, η γεύση των φρούτων βελτιώθηκε με την αλλαγή του χρώματος της σάρκας από φωτεινό πράσινο σε κίτρινο. Τέτοιες συσχετίσεις μπορούν να είναι χρήσιμες για τα προγράμματα βελτίωσης. Λίγα, ωστόσο, είναι γνωστά για τις πρόσθετες γενετικές συσχετίσεις στα ακτινίδια μεταξύ άλλων χαρακτηριστικών.

Αυτά τα γεγονότα βοηθούν την επιστήμη της βελτίωσης του συγκεκριμένου είδους σε πολλά επίπεδα. Καταρχάς, υπάρχει μεγάλη ποικιλία χαρακτηριστικών που παρουσιάζεται ανά γεωγραφική περιοχή προς παρακολούθηση και αξιολόγηση. Κατά δεύτερον, από την στιγμή που υπάρχει μεγάλο επίπεδο παραλλακτικότητας, υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα το παραγόμενο προϊόν να έχει μεγαλύτερη επιτυχία, λόγω της πλειάδας των χαρακτηριστικών που προσφέρονται προς αξιοποίηση. Σύμφωνα με όλα τα

παραπάνω δεδομένα, κυρίως λόγω της παραλλακτικότητας καθώς και του ανεπίσημου μονοπωλίου της ποικιλίας «Hayward», έχει δοθεί μεγαλύτερη έμφαση στην εμπορευματοποίηση ειδών με δυναμική και ταυτόχρονη προσπάθεια εισαγωγής καινοτόμων χαρακτηριστικών σε αυτά, παρά στην απέλπιδα προσπάθεια δημιουργίας νέων ποικιλιών που στηρίζονται στην ίδια βάση με τις κυρίαρχες καλλιεργούμενες ποικιλίες του *A. deliciosa*. Βέβαια, έχουν γίνει προσπάθειες για να ενταχθούν γονίδια από άλλα φυτά στο DNA του ακτινιδίου, όμως είναι ένα εγχείρημα που δεν έχει προχωρήσει αρκετά λόγω της χρωμοσωμικής πολυπλοκότητας του ακτινιδίου, καθώς και των ασταθών αποτελεσμάτων που εμφανίζουν οι ξεχωριστές έρευνες των Kobayashi et al. το 2000 και Nakamura et al. το 1999.



### 3.6. Καθορισμός του φύλου

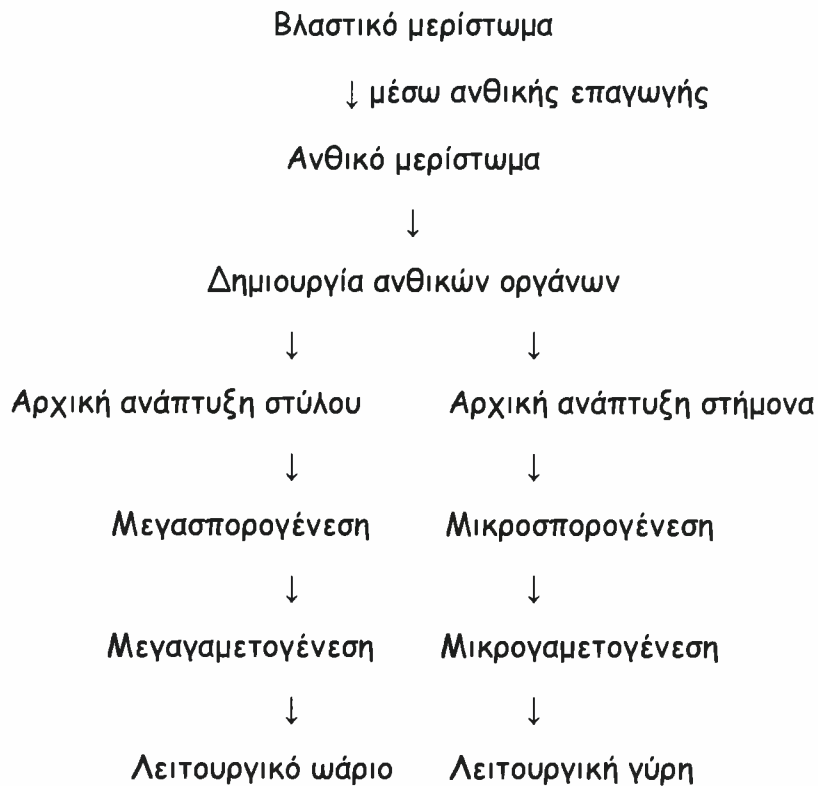
Τα φυτά, σε αντίθεση με τα ζώα, έχουν περισσότερα από έναν τρόπους αναπαραγωγής. Ουσιαστικά, το κάθε φυτό, μπορεί να ανήκει σε μία από τις παρακάτω κατηγορίες:

- Ερμαφρόδιτο,
- Μόνοικο, να φέρει αρσενικά και θηλυκά άνθη,
- Δίοικο, να φέρει είτε αρσενικά είτε θηλυκά άνθη,
- Γυνομόνοικο, να φέρει θηλυκά και ερμαφρόδιτα άνθη,
- Ανδρομόνοικο, να φέρει αρσενικά και ερμαφρόδιτα άνθη,
- Πολύγαμο, να φέρει αρσενικά, θηλυκά και ερμαφρόδιτα άνθη.

Στον παραπάνω διαχωρισμό πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη το είδος στο οποίο ανήκει το εκάστοτε φυτό. Στα περισσότερα είδη των φυτών, η αλλογαμία είναι ένας κοινός μηχανισμός πολλαπλασιασμού. Τα φυτά παρουσιάζουν πολλούς μηχανισμούς προαγωγής της αλλογαμίας, όπως την παραγωγή δίκλινων ανθέων με στήμονες ή ύπερο στα ίδια ή διαφορετικά φυτά, τα αντίστοιχα μόνοικα και δίοικα φυτά. Παρόλα αυτά, έρευνες, όπως αυτή των Renner και Ricklefs το 1995, έδειξαν ότι μόνο το 6% από τα 240.000 είδη αγγειόσπερμων είναι δίοικα, και το 7% από 13.000 γένη αγγειόσπερμων φυτών περιλαμβάνουν δίοικα είδη. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των φυτών εμφανίζουν ερμαφρόδιτα χαρακτηριστικά στα άνθη τους, και λόγω αυτού δεν μπορούν να καθοριστούν ξεκάθαρα ως αρσενικά ή θηλυκά. Κάτι τέτοιο υποστηρίζεται και από τον Cronquist, ο οποίος το 1998 υπέθεσε ότι τα φυτά που παράγουν άνθη προέρχονται όλα από έναν ερμαφρόδιτο πρόγονο, μιας και μοιράζονται όλα το μεγαλύτερο μέρος των μηχανισμών καθορισμού του φύλου.

Το παρακάτω σχήμα εξηγεί με βάση την ανατομία των φυτών πώς γίνεται η διαφοροποίηση και η πορεία της ανθοφορίας στα φυτά:





(Stephen L. Dellarorta και Alejandro Calderon-Urrea, 1993)

Οι μηχανισμοί ανταπόκρισης στο φύλο των δίοικων φυτών δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως μέχρι στιγμής, όμως είναι ξεκάθαρο ότι ο φυλετικός διμορφισμός στα φυτά είναι μια εξελικτική απόφαση που λαμβάνεται αργότερα στον βιολογικό κύκλο ενός φυτού, όπως φάνηκε στο παραπάνω σχήμα, και περιορίζεται στην οργανογένεση των ανθέων ή στην διαφοροποίηση των αναπαραγωγικών οργάνων (Negrutiu, Vyskot et al., 2001). Σε περιπτώσεις ειδών όπου υπάρχει φανερή διαφοροποίηση στα φυλετικά χρωμοσώματα, ο φυλετικός διμορφισμός φαίνεται σε πολύ αρχικά στάδια της ανάπτυξης των ανθέων. Ουσιαστικά, το αποτέλεσμα της συσσώρευσης στα φυλετικά χρωμοσώματα σημαντικών γενετικών συστατικών, που αναφέρονται αλλιώς ως μοριακοί διακόπτες, καθορίζει τον φυλετικό διμορφισμό, και ως εκ τούτου, το φύλο στα φυτά.

Έτσι, η γενετική βάση στον καθορισμό του φύλου στα άνθη των φυτών αποδίδεται σε ένα ζευγάρι φυλετικών χρωμοσωμάτων (σύστημα XX,XY), όπως για παράδειγμα στο σπαράγγι και στον λυκίσκο, ή αποδίδεται σε γονίδια φυλοκαθορισμού όπως στο αγγούρι και στο σπανάκι. Στα γονίδια αυτά περιλαμβάνονται και γονίδια ελέγχου ανθικής καταβολής, όπου καθορίζουν τη δημιουργία ερμαφρόδιτων ή δίκλινων ανθέων (Χρήστος Κ. Γούλας, Αθανάσιος Γ. Μαυρομάτης, 2003).

Συνοψίζοντας, θα μπορούσε να αναφερθεί ότι η διαδικασία καθορισμού φύλου αποτελεί ίσως ένα από τα μεγαλύτερα σημάδια της εξέλιξης στα φυτά, μιας και εμφανίζεται πλειάδα «λύσεων», ώστε να αναπτυχθούν απόγονοι σε ένα φυτικό είδος. Περαιτέρω, η επιστήμη της εξελικτικής βιολογίας θεωρεί τον φυλετικό καθορισμό στα φυτά ως ένα βασικό αντικείμενο μελέτης, γιατί αποκτά μέσω αυτού πρόσβαση στα πρώτα στάδια της ιστορίας των φυλετικών χρωμοσωμάτων, και έτσι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να εξαχθούν από αυτά κρίσιμα συμπεράσματα και για ανώτερους οργανισμούς.

### 3.7. Καθορισμός του φύλου στο ακτινίδιο-γονιδιακός έλεγχος

Στο είδος *Actinidia deliciosa* ο καθορισμός του φύλου φαίνεται ότι είναι του τύπου ΧηΧ/ΧηΥ, με το αρσενικό να είναι ετερογαμετικό (Testolin et al. 1995, Harvey et al. 1997). Μελέτη των Harvey et al. το 1997 έδειξε ότι δύο γονίδια εμπλέκονται στην έκφραση του φύλου στο είδος *Actinidia chinensis*. Το πιθανό μοντέλο αυτών των δύο γονιδίων έχει ένα κυρίαρχο αλληλόμορφο για την καταστολή του ύπερου το οποίο είναι στενά συνδεδεμένο με άλλο κυρίαρχο αλληλόμορφο για την ανάπτυξη της γύρης, ενδεχομένως έναν επιδιορθωτή βιωσιμότητας της γύρης και συσχετίζεται με το Υ χρωμόσωμα, και το αντίστοιχο τμήμα του Χ έχει δύο αλληλόμορφα τα οποία λειτουργούν ως υποτελή, και επιτρέπουν την ανάπτυξη του ύπερου καθώς και τον προγραμματισμένο θάνατο της γύρης. Έρευνες των Testolin et al. (1995) και Harvey et al. (1997) σε διάφορες χρονικές περιόδους έδειξαν ότι το χαρακτηριστικό του φύλου επηρεάζεται από ορισμένα βασικά γονίδια, ακλουθώντας τον κανόνα της Μενδελικής κληρονομικότητας.

Όλα τα γένη των *Actinidia* εμφανίζονται δίοικα (Εικόνα 3.7.1), κάτι που σημαίνει ότι η αναπαραγωγή τους γίνεται με εξωτερική διασταύρωση. Αυτό βοηθά στην εκτεταμένη ετεροζυγωτία, η οποία εμφανίζεται σε πολλά μορφολογικά χαρακτηριστικά στο είδος, ακόμα και σε είδη που είναι πολύ συγγενικά μεταξύ τους. Μοριακές μελέτες των Zhen et al. το 2004 έδειξαν υψηλά επίπεδα ετεροζυγωτίας στο *A. deliciosa* (6x), τα οποία ήταν υψηλότερα από το *A. chinensis* (4x), το οποίο με τη σειρά του εμφάνιζε υψηλότερα επίπεδα από το διπλοειδές *A. chinensis* (2x). Μία εξήγηση του πολύ υψηλού επιπέδου ετεροζυγωτίας στο *A. deliciosa* ο μεγάλος χρωμοσωμικός αριθμός του είδους. Τα υψηλά επίπεδα πολυαλληλομόρφων εξηγούνται εν μέρει από την θεωρία των Huang et al. το 1998, που

ισχυρίστηκε ότι το διπλοειδές είδος είχε διπλασιασμένα παλαιοπολυπλοειδή, τα λεγόμενα μυστικά πολυπλοειδή.



Εικόνα 3.7.1. Θηλυκό άνθος *Actinidia deliciosa*

Οι Zhang και Beuzenberg (1983) εκτίμησαν τον αριθμό των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων σε περίπου 170 στο *A. deliciosa* (6x), ο οποίος είναι μικρότερος κατά 4 από τον αριθμό που αναμενόταν μέσω συνδυασμού τριών διπλοειδών γενομάτων ( $x = 29$ ). Πρότειναν ότι τα εξαπλοειδή έχουν μόνο ένα ζευγάρι χρωμοσωμάτων του φύλου αντί των τριών, ώστε να λειτουργεί ο δισωμικός διαχωρισμός που ενυπάρχει στην εξαπλοειδία. Εντούτοις, έχουν γίνει και άλλες μετρήσεις με 174 χρωμοσώματα για τα *A. deliciosa* και πολλά τετραπλοειδή ταχα έχουν αποδειχτεί ότι έχουν 116 χρωμοσώματα (ακριβώς διπλάσιο από το διπλοειδές συμπλήρωμα). Η τακτική, προφανώς, του δισωμικού διαχωρισμού μπορεί να εξελιχθεί σε πολυπλοειδείς οργανισμούς εφόσον το ανδρικό χρωμόσωμα ή αλληλόμορφο καθορίζει έντονα τα αρσενικά (Stebbins 1950).

Η διοικία αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην βελτίωση των ακτινιδίων για τουλάχιστον τρεις λόγους: (1) Δεν υπάρχει καμία αξιόπιστη μέθοδος για διάκριση μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών φυτών πριν από την άνθηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι παραγωγοί θα ήθελαν να είναι σε θέση να απορρίψουν τα αρσενικά πριν από την φύτευση των σπορόφυτων. (2) Δύο επιλεγμένα θηλυκά δεν μπορούν να διασταυρωθούν άμεσα. (3) Είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η αξία των μεμονωμένων αρσενικών γονέων.

Οι φαινότυποι που εμφανίζονται στο *A. deliciosa* όσον αφορά το φύλο είναι οι εξής:

- Αρσενικό
- Ανδρομόνοικο
- Ουδέτερο
- Γυνομόνοικο
- Θηλυκό
- Ερμαφρόδιτο

Τα άνθη του αρσενικού και θηλυκού φαινότυπου διαφέρουν εμφανώς στην μορφολογία του ύπερου. Ο ύπερος, ως αναπαραγωγικό όργανο είναι εμφανής και στα δύο φύλα, όμως οι κοιλότητες της ωοθήκης παραμένουν συμπιεσμένες, επομένως δεν σχηματίζονται wάρια. Οι στύλοι είναι ελλειπείς και κοντοί χωρίς στίγμα. Αντιθέτως, τα θηλυκά άνθη περιέχουν δύο σειρές wαρίων σε κάθε ωοθήκη, ο στύλος είναι επιμήκης και το άνω τμήμα του έχει μορφή V. Οι στήμονες είναι παρόμοιοι μορφολογικά και στα δύο φύλα, όμως τα αρσενικά παράγουν βιώσιμη διπύρινη γύρη, ενώ τα θηλυκά μόνο άδειους κόκκους γύρης.

Μια περίεργη αντίδραση που έχει καταγραφεί είναι και η αλλαγή φύλου σε κλάδο από αρσενικό σε θηλυκό, καθώς και το φαινόμενο κατά το οποίο φυτά

τα οποία έχουν αναβλαστήσει από πρωτοπλάστες θηλυκού φυτού να αποδεικνύονται αρσενικά κατά την ωρίμανση τους.



Εικόνα 3.7.2. Καρπός *Actinidia arguta*, ποικιλία Issai

Ένα από τα βασικά προγράμματα βελτίωσης που αναπτύσσεται στο ακτινίδιο είναι η δημιουργία πλήρως ερμαφρόδιτων δέντρων ακτινιδιάς, τα οποία να είναι αυτογόνιμα καθ' ολοκληρία ή κατά ένα μεγάλο ποσοστό. Κάτι τέτοιο είναι δυνατό στα περισσότερα είδη του γένους *Actinidia*, όπως έχει παρατηρηθεί στα *A. arguta* (ποικιλία Issai, αυτογόνιμη (Εικόνα 3.7.2)), *A. chinensis* (ποικιλία Jenny, αυτογόνιμη (Εικόνα 3.7.3)), *A. deliciosa* και *A. eriantha*, τα οποία όμως εμφανίζουν φυλετική αστάθεια.



Εικόνα 3.7.3. Καρπός *Actinidia chinensis*, ποικιλία Jenny

Συγκεκριμένα, στο *A. deliciosa*, ο ερμαφροδιτισμός είναι χαρακτηριστικό το οποίο εμφανίζεται σταθερά και είναι κληρονομήσιμο. Έρευνες των McNeillage και Steinhagen το 1998, καθώς και του McNeillage το 2007 παρήγαγαν εντελώς ερμαφρόδιτα φυτά από διασταυρώσεις ασταθών αρσενικών φυτών ή ερμαφρόδιτων. Τα φρούτα που παρήχθησαν από αυτά τα φυτά ήταν μεγάλα, με αρκετά ποιοτικά χαρακτηριστικά που διαθέτουν εμπορικές ποικιλίες. Βασικό ρόλο στο συγκεκριμένο εγχείρημα, όπως και στην πλειοψηφία των πειραμάτων που σχετίζονται με το φύλο έπαιξαν οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να υπάρξουν αποτελέσματα. Το κέντρο έρευνας HortResearch στη Νέα Ζηλανδία αποτελεί πρωτοπόρο στην έρευνα του ακτινιδίου παγκοσμίως, και από εκεί έχουν εμφανιστεί πολλά αξιολογικά συμπεράσματα σχετικά με το αντικείμενο.



### 3.8. Αξιοποίηση των μοριακών δεικτών στον καθορισμό του φύλου

Γενικά είναι αποδεκτή η αρχή πως η διερεύνηση της γενετικής παραλλακτικότητας στα φυτά, της κληρονομικότητας χαρακτηριστικών και της συγγένειας μεταξύ ειδών αποτελεί βασικό πυλώνα έρευνας για περαιτέρω βελτίωση των φυτών. Η έρευνα όλων των παραπάνω στηριζόταν παλαιότερα στην χρησιμοποίηση μεθόδων όπου εμπλέκονταν μορφολογικοί και βιοχημικοί δείκτες. Λόγω της αμφιλεγόμενης αποτελεσματικότητας που παρείχαν, καθώς και περαιτέρω μειονεκτημάτων όπως ο άγνωστος τρόπος λειτουργίας ελέγχου των χαρακτηριστικών για παράδειγμα, οδήγησαν στην επιτακτική ανάγκη για εύρεση μεθόδων οι οποίες θα έδιναν ακριβέστερες αναλύσεις σε γενετικό επίπεδο.

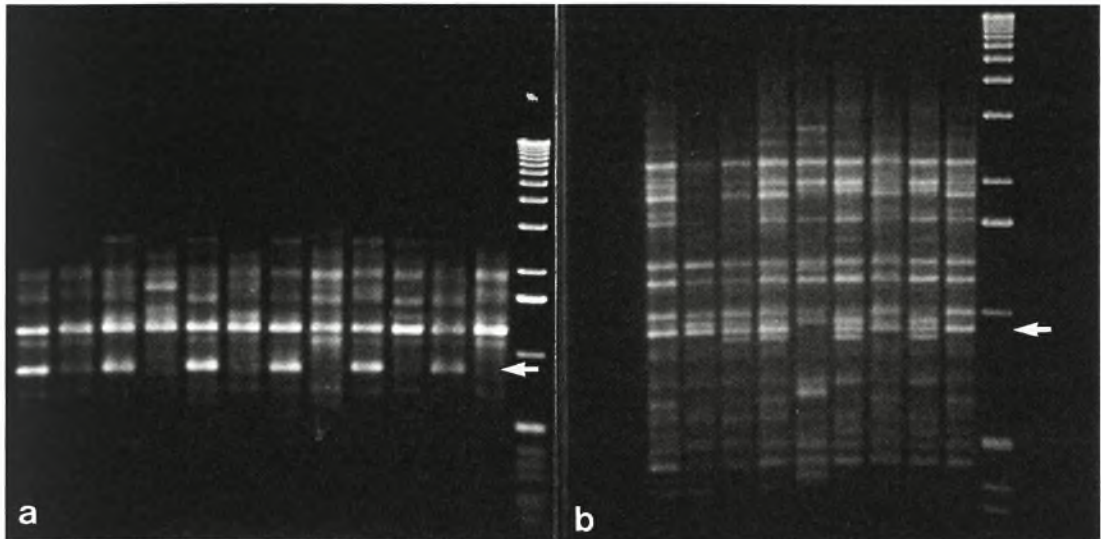
Οι κατηγορίες δεικτών που χρησιμοποιούνται σε αναλύσεις γενετικού υλικού είναι οι: RAPD, SSR, AFLP και RFLP. Οι τρεις πρώτοι βασίζονται στην τεχνική της PCR, ενώ οι RFLP στηρίζονται στην τεχνική του υβριδισμού. Μια ακόμα κατηγορία δεικτών σχετίζεται άμεσα με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και αναφέρεται ως SNP. Συνήθως, οι RFLP και SSR δείκτες αναπτύσσονται από βιβλιοθήκες γενομικού DNA, ενώ οι RAPD από τυχαία ενίσχυση μέσω της PCR του γενομικού DNA. Οι AFLP αναπτύσσονται και από τις δύο τεχνικές. Οι RAPD δείκτες, προκειμένου να διευκολυνθεί η επιλογή μέσω δεικτών (Marker-assisted selection, MAS), μπορούν να τροποποιηθούν σε δείκτες τύπου SCAR (Sequence-characterized amplified region) (Barzen et al., 1997; Gill et al., 1998; Kim et al., 2000; Vidal et al., 2000; Cao et al., 2001).

Οι δείκτες RAPD στηρίζονται βασικά στην τεχνική του τυχαία πολλαπλασιαζόμενου πολυμορφικού DNA και λειτουργεί ως αναγνωριστικό του πολυμορφισμού στα φυτά. Έχει χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση δίοικων ειδών ή ποικιλιών, όπως επίσης και σε φυλογενετικές μελέτες. Η μετατροπή

των RAPD σε SCAR (Paran & Michelmore, 1993), με την ανάπτυξη μεγαλύτερων, κι έτσι περισσότερο συγκεκριμένων εκκινήτων από τις υπάρχουσες αλληλουχίες RAPD βελτίωσε σημαντικά την αναπαραγωγικότητα και την αξιοπιστία των δεικτών κατά την διάρκεια των αναλύσεων PCR. Αυτός είναι και ένας λόγος για τον οποίο οι έρευνες που διεξάγονται σχετικά με το φύλο στηρίζονται κυρίως σε αυτού του είδους τους δείκτες.

Το βασικό πρόβλημα που κυριαρχεί στα ακτινίδια και έχει σχέση με το φύλο είναι ότι τα νεαρά σπορόφυτα δεν διακρίνονται μέσω μορφολογικών χαρακτηριστικών στα πρώτα στάδια ανάπτυξής τους. Έτσι, αυτό προσδιορίζεται μόνο όταν τα φυτά φτάσουν στο στάδιο της σεξουαλικής τους ωριμότητας. Αυτό συμβαίνει μετά από τέσσερα με έξι έτη, όπου και αναπτύσσονται τα άνθη.

Η έρευνα σχετικά με τον καθορισμό του φύλου στο ακτινίδιο σε επίπεδο φαινότυπου παρουσιάζεται πρώτη φορά το 1991 από τον M. A. McNeilage. Όμως, η πρώτη έρευνα σχετικά με αναγνώριση δεικτών που σχετίζονται με το φύλο εμφανίζεται για το φιστίκι (*Pistacia vera*) από τους Hormaza et al. το 1994, και αφορά δείκτες RAPD. Κατόπιν, οι Harvey et al. το 1997 στηριζόμενοι στα πειράματα που προηγήθηκαν με το φιστίκι, χρησιμοποιούν ίδιο τύπο δεικτών τροποποιημένων ως SCAR και για το ακτινίδιο. Αν και ο αριθμός των φυτών δεν ήταν αρκετά μεγάλος, οι δείκτες SmX και SmY που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζουν διαφορετικές μπάντες στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 3.8.1) που πραγματοποιήθηκε, όπου στο (α) εμφανίζεται η μπάντα του SmY και στο (β) η μπάντα του SmX.



Εικόνα 3.8.1.: Φωτογραφία από την έρευνα των Harvey, Gill, Fraser και McNeillage (1997) σχετικά με τους δείκτες καθορισμού του φύλου στα ακτινίδια

Η έρευνα θεωρείται μερικώς επιτυχημένη, και συνεχίστηκε, όσον αφορά τον σκοπό της, με ακόμα καλύτερα αποτελέσματα στην έρευνα που πραγματοποίησαν οι Shirkot *et al.* το 2002. Εκεί παρουσιάζονται 6 RAPD δείκτες που εμφανίζονται στα θηλυκά, (OPA-011031, OPA-022000, OPA-08700, OPA-112800, OPA-163000 και OPB-012000) όπως και 2 RAPD δείκτες που εμφανίζονται στα αρσενικά, (OPC-05350 και OPN-01600).

Βέβαια, έγιναν προσπάθειες καθορισμού του φύλου στα ακτινίδια από τους Harvey *et al.* και Hirsch *et al.* και μέσω βιοχημικών δεικτών, όπως για παράδειγμα με τις δοκιμές υπεροξειδασών, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά.

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από έρευνες σχετικές με τους μοριακούς δείκτες στο ακτινίδιο δεν είναι ξεκάθαρα, διότι το πρόβλημα του μεγέθους των φυλετικών χρωμοσωμάτων στα ακτινίδια καθιστά την έρευνα αρκετά δύσκολη. Το πρόβλημα ίσως ξεπεραστεί με προσεκτικότερο σχεδιασμό και ενδεχομένως αλλαγή στον τύπο των δεικτών που χρησιμοποιούνται.

### 3.9. Καθορισμός του φύλου σε άλλα είδη

Ο καθορισμός του φύλου στα φυτά είναι ένας τομέας στον οποίο οι παρατηρήσεις ξεκίνησαν ήδη το 1923 από τους Kihara, Ono και Blackburn. Όμως η έρευνα εντατικοποιήθηκε ουσιαστικά στις αρχές της δεκαετίας του 1990 λόγω της χρήσης των μοριακών δεικτών. Για αυτό το λόγο τα αποτελέσματα των ερευνών είναι συγκεχυμένα και τα είδη που ερευνήθηκαν είναι περιορισμένα.

Στα δίοικα φυτά η μορφολογική διαφοροποίηση των ανθέων των δύο φύλων γίνεται με την καταστολή του ενός εκ των δύο συνόλων των οργάνων που καθορίζουν το φύλο κατά την διάρκεια της δημιουργίας των ανθικών καταβολών. Βέβαια, λόγω της πλειάδας των δίοικων ειδών υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση όσον αφορά το χρονικό σημείο στο οποίο συμβαίνει αυτή η διαδικασία. Πάντως στα περισσότερα φυτά και τα δύο σύνολα οργάνων αναπτύσσονται μέχρι ενός σημείου πέραν του οποίου σταματά η ανάπτυξη ενός εκ των δύο συστημάτων. Έτσι, για παράδειγμα υπάρχει στα αρσενικά άνθη, υπανάπτυκτος στύλος και ωθήκες. Τέτοια φυτά είναι τα *Silene latifolia*, *Rumex acetosa* και *Pistacia vera*. Υπάρχουν και αποκλίσεις από τον παραπάνω γενικό κανόνα. Σε φυτά όπως τα *Mercurialis annua* και *Spinacia oleracea* τα μονοπάτια εξέλιξης του φύλου στα άνθη διαφοροποιούνται πολύ νωρίς και με αυτόν τον τρόπο δεν υπάρχουν «αχρείαστα» θηλυκά όργανα στα αρσενικά φυτά και το αντίστροφο. Αυτό έχει ως συνέπεια τα αρσενικά άνθη να θυμίζουν τέλεια άνθη ενώ τα θηλυκά να είναι ευδιακρίτως διαφορετικά. Μία ακόμη παρέκκλιση από τη βασική θεωρία εμφανίζεται σε ένα μικρό αριθμό ειδών δίοικων φυτών όπως τα *Actinidia deliciosa* και *Asparagus officinalis*, στα οποία η διαφοροποίηση του φύλου γίνεται σε πολύ αργοπορημένο στάδιο και έτσι είναι εξαιρετικά δύσκολο να ξεχωρίσει κανείς τα αρσενικά από τα θηλυκά άνθη. Μία ακόμη διαφορά εκτός του χρόνου κατά

τον οποίο διαχωρίζονται τα όργανα είναι και η διαφορά που παρουσιάζουν τα είδη μεταξύ τους όσον αφορά την φύση της αναστολής ανάπτυξης των μη απαραίτητων οργάνων. Έτσι ορισμένα φυτά κατά την διάρκεια του διαχωρισμού του φύλου τους στα άνθη οδηγούν τα κύτταρα που παρεκκλίνουν από τον γενότυπο σε κυτταρικό θάνατο, ενώ σε άλλα φυτά τα κύτταρα των μη απαραίτητων οργάνων παραμένουν ζωντανά.

Σε χρωμοσωμικό επίπεδο, ο καθορισμός του φύλου στα φυτά είναι αρκετά πιο περίπλοκος από ότι στα θηλαστικά. Έτσι για παράδειγμα υπάρχουν φυτά στα οποία η παρουσία του Y χρωμοσώματος προάγει την αρρενότητα των φυτών, όπως αυτά του γένους *Silene*. Σε άλλα φυτά, όπως στο *Rumex acetosa*, το φύλο καθορίζεται από την αναλογία ανάμεσα στα X και στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Εάν ο λόγος τους υπερβαίνει το 1,0 τότε το φυτό είναι θηλυκό, ενώ εάν ο λόγος είναι μικρότερος από 0,5 τα φυτά είναι αρσενικά. Γενικότερα, μόνο σε έξι οικογένειες έχουν βρεθεί ξεκάθαρα διαφοροποιημένα φυλετικά χρωμοσώματα, που αντιπροσωπεύουν δύο μεγάλες ομάδες ειδών. Τα φυλετικά χρωμοσώματα στα φυτά έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα, αλλά μοιράζονται ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Τα X και Y χρωμοσώματα είναι πάντα τα μεγαλύτερα χρωμοσώματα σε μέγεθος και τα χρωμοσώματα Y είναι πολύ μεγαλύτερα από το X σε όλα τα είδη που έχουν μελετηθεί, με εξαιρέσεις τα φυτά *Humulus lupulus* καθώς επίσης και το φυτό *Viscum* (Parker, 1990). Αν και είναι σαφές ότι η εξέλιξη των φυλετικών χρωμοσωμάτων των φυτών συνδέεται με μεγάλες αυξήσεις του ποσού του DNA, οι λόγοι αυτών των αυξήσεων και τα είδη της ακολουθίας δεν είναι ακόμα εντελώς κατανοητά. Στο φυτό *Rumex acetosa*, έχουν περιγραφεί στα χρωμοσώματα του φύλου συγκεκριμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Ruix Rejon et al., 1994, Shibata et al., 1999) και τα φυλετικά χρωμοσώματα εμφανίζονται να περιέχουν μεγάλες

ποσότητες ακολουθιών που εμφανίζουν συνάφεια με ρετροϊούς και ιούς. Σύμφωνα με τους Guttman και Charlesworth (1998) διαφαίνονται στοιχεία που δείχνουν πως τα φυλετικά χρωμοσώματα των φυτών εμφανίζουν ορισμένες ακολουθίες εκφυλισμού, όπως συμβαίνει στα ζωικά Y χρωμοσώματα, όταν το μη αντίστοιχο τμήμα του Y χρωμοσώματος δεν εμφανίζει σε μεγάλο βαθμό λειτουργικές θέσεις. Η εφαρμογή των τεχνικών της μοριακής βιολογίας θα ρίξει περαιτέρω φως για τα φυλετικά χρωμοσώματα των φυτών, τα γονίδια τους και τον τρόπο με τον οποίο έχουν εξελιχθεί (Ainsworth, 2000).

Οι μελέτες σχετικά με τον καθορισμό του φύλου έχουν ως βασικό εργαλείο την χρήση των μοριακών δεικτών για αναγνώριση του φύλου των φυτών. Οι μοριακοί δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως γενετικοί δείκτες, είναι οι τυχαία πολλαπλασιαζόμενοι πολυμορφικού DNA (RAPD), συντεθειμένου τμήματος μήκους πολυμορφισμούς (AFLP) και απλής επαναλαμβανόμενης ακολουθίας (SSR). Σε σύγκριση με άλλους μοριακούς δείκτες, οι δείκτες RAPD έχουν ένα πλεονέκτημα επειδή δημιουργούνται εύκολα και είναι ιδιαίτερα κατάλληλοι για γενετική μελέτη πολυμορφισμού σε φυτικά είδη των οποίων, οι λεπτομερείς πληροφορίες της ακολουθίας του γονιδιώματος δεν είναι διαθέσιμες. Ο περιορισμός των RAPD δεικτών είναι η διακύμανση μεταξύ των DNA παρασκευασμάτων τους και των συνθηκών δοκιμασίας. Ωστόσο, οι RAPDs μπορούν να μετατραπούν σε σταθερούς και αξιόπιστους δείκτες με την κλωνοποίηση των ενισχυμένων ζωνών, με αλληλούχιση των άκρων τους, και χρησιμοποιώντας τις ακολουθίες για τη δημιουργία εκτεταμένων ολιγομερών εκκινητών. Τα εν λόγω ολιγομερή, όταν υποστούν ανόπτηση υπό αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης, αναπαράγουν την επέκταση της ενιαίας μπάντας, που αντιστοιχεί σε καθορισμένα γενετικά γνωρίσματα, με ακολουθία χαρακτηριζόμενη από ενισχυμένες περιοχές

(SCAR) (Zhang et al., 1998). Αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί για να αναπτύξει διάφορους φυλοσύνδετους μοριακούς δείκτες στα δίοικα φυτά, συμπεριλαμβανομένων των *Silene latifolia*, *Pistacia vera*, *Cannabis sativa*, *Humulus lupulus*, *Actinidia chinensis*, *Atriplex garettii*, *Carica papaya*, *Salix viminalis*, *Rumex acetosa*, *Mercurialis annua*, και *Eucommia ulmoides* (Gao et al., 2006).

Η έρευνα των Horimaza et al. το 1994 όπου για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκαν δείκτες RAPD για την ταυτοποίηση του φύλου στην φυσικιά (*Pistacia vera*) καθόρισαν την πορεία των ερευνών για την επόμενη δεκαπενταετία στο συγκεκριμένο θέμα. Αυτό συνέβη επειδή κατά την διάρκεια του πειράματος ανακαλύφθηκε ο δείκτης OP008, με την αλληλουχία 5'-CCTCCAGTGT-3' ο οποίος ήταν σε θέση να ξεχωρίσει στην θέση 945-bp τα θηλυκά από τα αρσενικά γονιδιώματα. Λόγω του υψηλού ποσοστού επιτυχίας θεωρήθηκε από τους ερευνητές ως ένας αξιόλογος δείκτης στον καθορισμό του φύλου στην φυσικιά.

Παρομοίως, οι Xu, Wang και Cui ανακάλυψαν το 2004 ανάμεσα σε 560 εκκινητές, που παρήγαγαν περίπου 2500 μπάντες, τον δείκτη OPF08 με την ακολουθία 5'-GGGATATCGG-3', ο οποίος ενίσχυε διαφορετικά την περιοχή 569-bp ανάμεσα στα θηλυκά και αρσενικά δέντρα του δίοικου είδους *Eucommia ulmoides* Oliv. . Σε αυτό το πείραμα εξετάστηκαν δέντρα διαφορετικών ηλικιών (30,20 ετών και 7 ετών) και καθώς και 10 σπόροι δέντρων ώστε το αποτέλεσμα να είναι όσο το δυνατό πιο σαφές. Ο δείκτης SCAR που παρήχθη από τον OPF08 (SCARmr) έδωσε 100% επιτυχή αποτελέσματα, έχοντας χαρακτηρίσει σε όλες τις περιπτώσεις τα θηλυκά από τα αρσενικά φυτά.

### 3.10. Μοριακή γενετική ανάλυση και κυτταρογενετική ακτινιδίων

Το γεγονός ότι η οικογένεια των *Actinidiaceae* είναι σχετικά καινούργιο σε εμπορική κλίμακα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δενδρώδη είδη δεν σημαίνει πως δεν έχει αποκτήσει πλέον δεσπόζουσα σημασία στον πρωτογενή τομέα ορισμένων κρατών.

Τα περισσότερα είδη του γένους που καλλιεργούνται για εμπορική χρήση προέρχονται από επιλογές σπορόφυτων σε συνδυασμό με συστηματικές διασταυρώσεις. Επομένως, υπάρχουν αρκετά χαρακτηριστικά τα οποία ενδέχεται να ενδιαφέρουν σημαντική μερίδα των καταναλωτών ώστε αυτά να ενσωματωθούν σε εμπορικά είδη. Η αποτελεσματικότητα της ενσωμάτωσης των χαρακτηριστικών άπτεται στην καλύτερη γνώση της ρύθμισης των γονιδίων. Τα βασικά χαρακτηριστικά που απασχολούν τους καταναλωτές είναι η γεύση, το άρωμα, η εμφάνιση και τα υγιεινά χαρακτηριστικά. Η γεύση και το άρωμα των καρπών του ακτινιδίου καθορίζονται από χημικά συστατικά. Μέσα στο γένος των *Actinidia* έχει βρεθεί ένα ευρύ φάσμα από μείγματα που το καθένα οδηγεί σε ιδιαίτερες και διαφορετικές γεύσεις του καρπού (Atkinson & MacRae, 2007). Τέτοιες ενώσεις περιέχουν οξέα, πολυφαινόλες, αλκοόλες, τερπένια και εστέρες. Βελτιώσεις σχετικές με το χρώμα της σάρκας του καρπού έχουν ως αποτέλεσμα να δημιουργηθούν καρποί χρώματος μωβ, κίτρινο, κόκκινο και πορτοκαλί, πέραν του χαρακτηριστικού πράσινου χρώματος των εμπορικών ποικιλιών. Το εύρος των χρωμάτων οφείλεται στην παρουσία ή απουσία της χλωροφύλλης, των ανθοκυανών και των καροτενοειδών (Atkinson & MacRae, 2007). Στα χαρακτηριστικά του ακτινιδίου που έχουν σχέση με την ανθρώπινη υγεία ανήκουν τα επίπεδα του ασκορβικού οξέος, η παρουσία των τριτερπενίων και του φολικού οξέος.

Το επόμενο βήμα στην βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των καρπών του ακτινιδίου είναι η μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας μέσω



βάσεων δεδομένων από ESTs (Expressed Sequence Tags) που πραγματοποιήθηκε από τους Crowhurst et al. το 2008. Τα εκφρασμένα κομμάτια ακολουθίας (EST) είναι μικρά τμήματα ακολουθίας DNA που προέρχονται από μια μεταγραφόμενη cDNA αλληλουχία. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό αντιγράφων των γονιδίων, αποτελούν όμως και μέσο για την ανακάλυψη γονιδίων και για τον γονιδιακό καθορισμό μια αλληλουχίας, όπως επίσης και σημαντική πηγή δεικτών SSR και πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (SNP). Και τα δύο είναι βασικοί δείκτες για την δημιουργία γενετικών χαρτών στα φυτά. Η επιστήμη της ανάπτυξης των ESTs προχωράει με ραγδαίο ρυθμό, καθώς υπάρχουν περίπου 65,9 εκατομμύρια ESTs διαθέσιμα σε δημόσιες βάσεις δεδομένων, όπως η GenBank (στοιχεία 6<sup>ος</sup>/2010, όλα τα είδη). Το φυτό το οποίο ερευνηθεί περισσότερο είναι το φυτό-μοντέλο *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*, 1.279.945 καταχωρήσεις EST στην GenBank), ακολουθούμενο από το ρύζι (*Oryza sativa*, 1.211.418 καταχωρήσεις EST στην GenBank). Επίσης έχουν μελετηθεί τα εξής φυτά: τομάτα (*Lycopersicon esculentum*), σταφύλι (*Vitis vinifera*), μήλο (*Malus x domestica*) και ανανάς (*Ananas comosus*).

Οι cDNA βιβλιοθήκες που κατασκευάστηκαν από το γένος των Actinidia προέρχονται κυρίως από τέσσερα είδη: *A. deliciosa*, *A. chinensis*, *A. eriantha* και *A. arguta* (Πίνακας 3.10.1.). Το DNA που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη των EST προήλθε κυρίως από τα πέταλα, τους καρπούς, τα μπουμπούκια και τα φύλλα, με ένα μικρό αριθμό να προέρχεται από τις ρίζες των δέντρων και από καλλιέργειες κυττάρων. Τα κενά κελιά στον πίνακα 3.10.1 αντιπροσωπεύουν το γεγονός ότι δεν υπήρξαν εκφρασμένα κομμάτια ακολουθίας στα οποία έγινε αλληλούχιση. Το μέσο επεξεργασμένο μήκος ακολουθίας των 132.577 ESTs να είναι 503 βάσεις.

Πίνακας 3.10.1: Αριθμός των EST που συλλέχθηκαν ανά είδος

Ιστός	Είδος					Σύνολο
	<i>A. arguta</i>	<i>A. chinensis</i>	<i>A. deliciosa</i>	<i>A. eriantha</i>	Άλλο	
Μπουμπούκι		15.689	34.519			50.208
Κύτταρο (καλλιέργεια κυττάρων)		4.851				4.851
Καρπός	5.421	8.453	13.282	11.259		38.415
Φύλλο		17.325				17.325
Πέταλο	1.836	1.061	9.950	1.388	1.422	15.657
Ρίζα					5.101	5.101
Μίσχος					1.020	1.020
<b>Σύνολο</b>	<b>7.257</b>	<b>47.379</b>	<b>57.751</b>	<b>12.647</b>	<b>7.543</b>	

Η δομή του πειράματος όριζε αρχικά την εξαγωγή DNA από τα είδη ακτινιδίων. Το επόμενο βήμα ήταν η αναγνώριση της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων στα εκφραζόμενα κομμάτια EST, ώστε να δημιουργηθεί μια βάση δεδομένων. Στην συνέχεια, έγινε απευθείας σύγκριση των EST και των πρωτεϊνικών ομάδων που ανακαλύφθηκαν στα ακτινίδια με την βάση δεδομένων για τα εκφραζόμενα κομμάτια ακολουθίας του *Arabidopsis thaliana*, που είναι γνωστή ως TAIR.

Πίνακας 3.10.2: Περίληψη των κωδικών της βάσεως δεδομένων για τα EST του *A. deliciosa* στα οποία έγινε αλληλούχηση

Κωδικός βάσης δεδομένων	Είδος / μέρος του φυτού στο οποίο υπάρχει έκφραση	Μέσο μήκος	Αριθμός EST ακολουθιών
KAAA	<i>Actinidia deliciosa</i> / Αναπτυσσόμενοι οφθαλμοί	450	9472
KABA	<i>A. deliciosa</i> / Πέταλα (όλα τα στάδια)	458	9950
KACA	<i>A. deliciosa</i> / Εξωτερικός φλοιός στα ωριμα φρούτα, τρεις μήνες μετά την αποθήκευση, με σκληρότητα σάρκας μεταξύ 2,8-9.1N	356	74
KADA	<i>A. deliciosa</i> / Εξωτερικός φλοιός στα ωριμα φρούτα, τρεις μήνες μετά την αποθήκευση, με σκληρότητα σάρκας μεταξύ 2,8-9.1N	374	9798
KAEA	<i>A. deliciosa</i> / Λανθάνοντες οφθαλμοί πριν από την εφαρμογή υδροκυαναμιδίου	461	82
KAEB	<i>A. deliciosa</i> / Λανθάνοντες οφθαλμοί πριν από την εφαρμογή υδροκυαναμιδίου	536	1013
KAFB	<i>A. deliciosa</i> / Λανθάνοντες οφθαλμοί 3 ημέρες μετά από την εφαρμογή υδροκυαναμιδίου	543	4585
KAKA	<i>A. deliciosa</i> / Λανθάνοντες οφθαλμοί 1 ημέρα πριν από την εφαρμογή υδροκυαναμιδίου	524	4689
KALA	<i>A. deliciosa</i> / Λανθάνοντες οφθαλμοί 3 ημέρες μετά από την εφαρμογή υδροκυαναμιδίου	520	9196
KALB	<i>A. deliciosa</i> / Μεταγραφικός παράγοντας προερχόμενος από τον κωδικό KALA	564	82
KSFA	<i>A. deliciosa</i> / Μικρός καρπός, 13 ημέρες μετά την άνθηση	456	3410
KUBA	<i>A. deliciosa</i> / Οφθαλμοί, κατά την διάρκεια διαφοροποίησής τους	320	5241

Αυτό πραγματοποιήθηκε με μοντέλα βιοπληροφορικής, την γλώσσα προγραμματισμού PERL και με την χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής BLASTx ώστε να αναγνωριστούν οι ομοιότητες μεταξύ των βάσεων δεδομένων των δύο φυτών. Στον πίνακα 3.10.2 παρουσιάζονται οι κωδικοί της βάσης δεδομένων που αφορούν το *Actinidia deliciosa* και το μέρος

έκφρασης των EST που ανακαλύφθηκαν. Η εργασία παρουσίασε πολύ σημαντικά αποτελέσματα για την περαιτέρω μελέτη του γένους των *Actinidia*. Αρχικά, μόνο 32% των εκφραζόμενων κομματιών ακολουθίας δεν είχε ομόλογο από την βάση δεδομένων του *Arabidopsis*, και σε γενικές γραμμές η λειτουργική κατανομή των πρωτεϊνών ήταν παρόμοια ανάμεσα στο γένος των ακτινιδίων και στο φυτό-μοντέλο (Πίνακας 3.10.3). Ανάμεσα στα αποτελέσματα του πειράματος ανήκουν και τα πολλά γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα σε διάφορα σημαντικά βιοσυνθετικά μονοπάτια, όπως αυτά της σύνθεσης καροτενοειδών, τερπενίων, φλαβονοειδών και ασκορβικού οξέος.

Επίσης, το μεγάλο απόθεμα από EST που δημιουργήθηκε θα επιτρέψει στους ερευνητές να ασχοληθούν με την κατανόηση της μοριακής βάσης της γενετικής ποικιλότητας εντός του γένους. Επιπλέον, η παρούσα βάση δεδομένων από εκφραζόμενα κομμάτια ακολουθίας αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο για περαιτέρω συγκρίσεις ανάμεσα στα γονιδιώματα των φρούτων. Οι διάφορες αναλύσεις βιοπληροφορικής βοηθούν στην προσπάθεια κατανόησης των διαφορών που υπάρχουν ανάμεσα στα γονιδιακά προϊόντα και στον ρόλο του καθενός στα διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια των φυτικών ειδών και γενών.

Πίνακας 3.10.3: Λειτουργική κατανομή των EST του γένους *Actinidia*

Κωδ.	Λειτουργική κατανομή	Ποσοστό % στα EST ακτινιδίων	Ποσοστό % στις αλληλουχίες του <i>Arabidopsis</i>
1	PS	2,18	0,73
2	Βασικός CHO μεταβολισμός	0,86	0,37
3	Ελάσων CHO μεταβολισμός	1,02	0,45
4	Γλυκόλυση	1,03	0,23
5	Ζύμωση	0,38	0,05
6	Γλυοξυλικός κύκλος	0,14	0,04
7	OPP	0,25	0,11
8	TCA / μεταμόρφωση οργάνων	0,64	0,27
9	Μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων / Σύνθεση ATP	0,82	0,49
10	Κυτταρικό τοίχωμα	3,20	1,90
11	Μεταβολισμός λιπιδίων	1,78	1,49
12	Μεταβολισμός N	0,08	0,09
13	Μεταβολισμός αμινοξέων	2,64	1,07
14	Αφομοίωση S	0,10	0,05
15	Χειρισμός των μετάλλων	2,53	0,34
16	Δευτερεύων μεταβολισμός	3,02	1,64
17	Μεταβολισμός ορμονών	2,16	2,27
18	Μεταβολισμός βιταμινών και συμπαραγόντων	0,10	0,16
19	Σύνθεση τετραπυρρολών	0,28	0,17
20	Stress	4,08	3,48
21	Ρύθμιση αναγωγής	1,02	0,70
22	Μεταβολισμός πολυαμινών	0,29	0,05
23	Μεταβολισμός νουκλεοτιδίων	0,59	0,57
24	Βιοδιάσπαση ξενοβιοτικών	0,04	0,09
25	C1- μεταβολισμός	0,19	0,14
26	Διάφορα	4,72	5,38
27	RNA	7,86	10,88
28	DNA	1,60	1,99
29	Πρωτεΐνες	18,61	13,31
30	Σηματοδότηση	3,42	4,46
31	Κύτταρο	3,23	2,57
32	Ανάπτυξη	1,29	2,24
33	Μεταφορά	3,62	3,49
34	Χωρίς καταχώρηση	26,23	38,72

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

#### 4. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας ήταν ο καθορισμός του φύλου σε διαφορετικούς γενότυπους του ακτινιδίου *Actinidia deliciosa* μέσω της ανάλυσης του γενετικού τους υλικού με την χρήση μοριακών δεικτών RAPD. Συγκεκριμένα, μέσω της κατηγορίας των μοριακών δεικτών που ονομάζονται RAPD, έγινε η προσπάθεια κατάταξης των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα σε αρσενικά και θηλυκά δέντρα.

Ο καθορισμός του φύλου είναι μια πολύ σημαντική διεργασία σε δέντρα όπως η ακτινιδιά, διότι το φύλο που παράγει καρπούς είναι μόνο τα θηλυκά φυτά, και στα πρώτα στάδια ανάπτυξης τους δεν είναι φανερό αν ανήκουν στα αρσενικά ή τα θηλυκά. Τα αρσενικά λειτουργούν μόνο ως επικοινωνιστές στα θηλυκά δέντρα. Επομένως είναι αναγκαίο να γνωρίζουμε το φύλο των φυτών από την αρχή, ώστε να γίνεται ο ανάλογος σχεδιασμός στον αγρό και στην συνέχεια να ακολουθεί η φύτευση των δέντρων. Ο αριθμός των αρσενικών σε κάθε αγρό είναι καθορισμένος, άρα αν φυτευτούν περισσότερα αρσενικά στο χωράφι ουσιαστικά σημαίνει και μείωση της προβλεπόμενης παραγωγής.

## 5. Υλικά και μέθοδοι

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό του φύλου ήταν ακτινίδια ποικιλίας «Τσεχελίδης» (αρσενικοί και θηλυκοί φαινότυποι), «Hayward» (θηλυκοί φαινότυποι) και «Ματσα» (αρσενικοί φαινότυποι). Τα δέντρα από τα οποία συλλέχτηκαν φύλλα ήταν διαφορετικών ηλικιών και ανήκαν σε 3 διαφορετικούς αγρούς στην Επισκοπή Νάουσας του νομού Ημαθίας. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έγινε τυχαία, χωρίς να υπάρχει γνώση σχετικά με το φύλο του καθενός δείγματος. Ο αριθμός των δέντρων που ελέγχθηκαν για το φύλο ανήλθε σε 23 δείγματα συνολικά.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος για επτά χαρακτηριστικά των φύλλων με βάση τον κατάλογο του οργανισμού UPOV σε 12 από τα 23 δείγματα. Από τον καθένα κωδικό μελετήθηκαν 5 φύλλα. Στη συνέχεια έγινε εξαγωγή του γενετικού υλικού από τα δείγματα, ενίσχυση και πολλαπλασιασμός των κομματιών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και ηλεκτροφόρησή του για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων του πειράματος.



## 5.1. Εξαγωγή DNA

Η εξαγωγή του DNA πραγματοποιήθηκε σε 23 δείγματα διαφορετικών γενοτύπων. Από τον αγρό συλλέχθηκαν 2 κλαδίσκοι ανά κωδικό, ώστε να υπάρχουν νεαρά φύλλα για κάθε γενότυπο και διατηρήθηκαν μέσα σε νερό για 2 περίπου μέρες σε θερμοκρασία 3 βαθμών Κελσίου.

Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε η διαδικασία εξαγωγής γενετικού υλικού με βάση την μικρομέθοδο CTAB (Doyle and Doyle, 1990). Κατόπιν ζυγίστηκαν 0,3 γραμμάρια φυτικού ιστού και λειοτρηβήθηκαν με υγρό άζωτο ώστε τα κυτταρικά τοιχώματα να διαρρηχθούν πλήρως και να εξαχθεί αρκετή ποσότητα γενετικού υλικού. Έπειτα προστέθηκαν σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα μαζί με 800 μl ρυθμιστικού διαλύματος CTAB και 20 μL β-μερκαπτοαιθανόλης (1% v/v) όπου και πολτοποιήθηκαν. Οι σωλήνες αφέθηκαν σε υδατόλουτρο 60 °C για 15 λεπτά. Μετά ακολούθησε φυγοκέντριση στα 14.000 g για 20 λεπτά, ώστε στην συνέχεια το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει και το γενετικό υλικό να αφαιρεθεί με την βοήθεια πιπέτας. Ακολούθως η επόμενη διαδικασία ήταν η απομάκρυνση των πρωτεϊνών με διάλυμα χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24/1 και καθίζηση του DNA με χρήση 2/3 του όγκου ισοπροπανόλης και άλατος (Na-acetate) ώστε το τελικό διάλυμα να έχει συγκέντρωση 0,1 M. Έπειτα τα διαλύματα αφέθηκαν στην κατάψυξη για περισσότερο από 30 λεπτά στους -20 °C. Ακολούθησε φυγοκέντριση 10 λεπτών στα 14.000 g και απομάκρυνση των πολυσακχαριτών με διάλυμα NaCl 1,0 M, γιατί τα φύλλα του ακτινιδίου περιέχουν μεγάλη ποσότητα πολυσακχαριτών οι οποίοι στην συνέχεια δημιουργούν σοβαρό πρόβλημα στα δείγματα. Το επόμενο βήμα ήταν καθαρισμός του DNA με διάλυμα αιθανόλης 70% και άλατος (K-acetate) 0,1 M για δύο φορές και μια ακόμα φορά με καθαρή αιθανόλη. Στη συνέχεια το

καθαρό πλέον DNA διαλύθηκε σε 200 µL διαλύματος TE και παρέμεινε στην κατάψυξη. Κατόπιν τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση για να φανεί εάν υπάρχει γενετικό υλικό ή όχι.

## 5.2. Εκκινητές RAPD

Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν μόνο δύο εκκινητές, οι οποίοι παρουσιάστηκαν από τους Gill, Harvey et al. το 1998. Οι δείκτες χρησιμοποιήθηκαν από τους συγγραφείς ώστε να καθοριστεί το φύλο σε φυτά του γένους *Actinidia*, μεταξύ των οποίων και τα είδη *Actinidia chinensis*, *Actinidia deliciosa* (ποικιλία «Hayward»). Οι εκκινητές στοχεύουν σε ενισχυμένες περιοχές του γενετικού υλικού όπου υπάρχουν οι χαρακτηριστικές ακολουθίες για τις οποίες κατασκευάζονται. Στον πίνακα 4.2.1 παρουσιάζονται οι κωδικοί των εκκινητών, οι χαρακτηριστικές ακολουθίες που έχει ο καθένας και το φύλο το οποίο αναγνωρίζουν.

Πίνακας 5.2.1: Κωδικοί και αλληλουχίες εκκινητών

Κωδικός	Αλληλουχία	Φύλο
OPAL-20	5'AGGAGTCGG	Θηλυκό
OPAI-12	5'GACGCGAACC	Αρσενικό

### 5.3. Αντιδράσεις PCR και ανάλυση προϊόντων

Ο τελικός όγκος ανά δείγμα για τις αντιδράσεις ήταν 25  $\mu\text{L}$ . Σε αυτά περιέχονταν 2,5  $\mu\text{L}$  10x PCR buffer, 2,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  συγκέντρωσης 25 mM, 2,5  $\mu\text{L}$  dNTP's συγκέντρωσης 2,5 mM, 5  $\mu\text{L}$  εκκινητή συγκέντρωσης 1 U, 7  $\mu\text{L}$  γενετικού υλικού, 0,3  $\mu\text{L}$  ένζυμο πολυμερισμού (Taq polymerase) συγκέντρωσης 1 U.

Για τον καθένα εκκινητή χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά προγράμματα της PCR, γιατί λειτουργούν υπό διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι θερμοκρασίες και τα χρονικά διαστήματα για τον δείκτη OPAL-20 έχουν ως εξής: 94 °C για 5 λεπτά για την προδιάταξη του DNA, 94 °C για 1 λεπτό ώστε να γίνει αποδιάταξη του DNA, 68 °C για 1 λεπτό για τον υβριδισμό του δείκτη, 72 °C για 2 λεπτά για την αντιγραφή του επιλεγμένου DNA τμήματος από τους εκκινητές. Οι συγκεκριμένες θερμοκρασίες επαναλήφθηκαν για 38 κύκλους και ακολούθησε ένας κύκλος με θερμοκρασία 72 °C για 5 λεπτά για την πλήρωση των αντιγραφών τους.

Οι θερμοκρασίες και τα χρονικά διαστήματα για τον δείκτη OPAL-12 είναι οι παρακάτω: 94 °C για 5 λεπτά, 94 °C για 1 λεπτό, 55 °C για 1 λεπτό για τον υβριδισμό του δείκτη, 72 °C για 2 λεπτά. Οι συγκεκριμένες θερμοκρασίες επαναλήφθηκαν για 38 κύκλους και ακολούθησε ένας κύκλος με θερμοκρασία 72 °C για 5 λεπτά.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν ακόμα 2 αντιδράσεις PCR, μία με τον καθένα εκκινητή, με μόνη διαφορά την αλλαγή θερμοκρασίας που αφορά τον υβριδισμό του δείκτη, που ρυθμίστηκε στους 37 °C. Οι τελευταίες αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν ως «μάρτυρες» ή «control» αντιδράσεις ώστε να φανεί σε ποιες θερμοκρασίες ανταποκρίνονται οι εκκινητές με τους οποίους πραγματοποιήθηκε το πείραμα.

Τα προϊόντα της των αντιδράσεων της PCR στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1,2% με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε συσκευή ηλεκτροφόρησης ώστε να εμφανιστούν οι αλληλουχίες. Το gel ήταν πάχους περίπου 0,5 mm και εφαρμόστηκε σε αυτό τάση 90 V για περισσότερο από 60 λεπτά. Τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν σε συσκευή με λάμπες UV και η σύγκριση για την εμφάνιση ζωνών έγινε απευθείας μεταξύ των δειγμάτων.

## 6. Αποτελέσματα - Συζήτηση

### 6.1. Αποτελέσματα UPOV

Τα χαρακτηριστικά στα οποία ελέγχθηκαν 5 φύλλα από 12 δείγματα είναι τα παρακάτω:

- Σχήμα ελάσματος φύλλου (κωδικός UPOV αρ. 26) : (1) λογχοειδές, (2) ωοειδές, (3) πλατύ ωοειδές, (4) πολύ πλατύ ωοειδές, (5) πλατύ αντρωοειδές, (6) πολύ πλατύ αντρωοειδές
- Σχήμα κορυφής του ελάσματος (κωδικός UPOV αρ. 27): (1) οξύληκτη, (2) ακιδόληκτη, (3) οξεία, (4) στρογγυλεμένη, (5) ακρότομη, (6) ακρόκοιλη
- Απόσταση των λοβών βάσης του ελάσματος (κωδικός UPOV αρ. 28): (1) πολύ απομακρυσμένοι, (2) λίγο απομακρυσμένοι, (3) εφαπτόμενοι, (4) ελαφρώς επικαλυπτόμενοι, (6) πολύ επικαλυπτόμενοι
- Τριχίδια στην πάνω επιφάνεια του ελάσματος (κωδικός UPOV αρ.29): (1) απουσία ή πολύ σποραδικά, (3) σποραδικά, (5) μεσαίας πυκνότητας, (7) πυκνά
- Τριχίδια στην κάτω επιφάνεια του ελάσματος (κωδικός UPOV αρ. 30): (1) απουσία ή πολύ σποραδικά, (3) σποραδικά, (5) μεσαίας πυκνότητας, (7) πυκνά
- Απόχρωση του πράσινου χρώματος στην πάνω επιφάνεια του ελάσματος (κωδικός UPOV αρ. 32): (3) ελαφριά, (5) κανονική, (7) σκούρη
- Χρώμα της κάτω επιφάνειας του φύλλου (κωδικός UPOV αρ. 33): (1) υπόλευκο, (2) ελαφρύ πράσινο, (3) μεσαίο πράσινο, (4) κιτρινοπράσινο, (5) κίτρινο-καφέ

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1.1. :

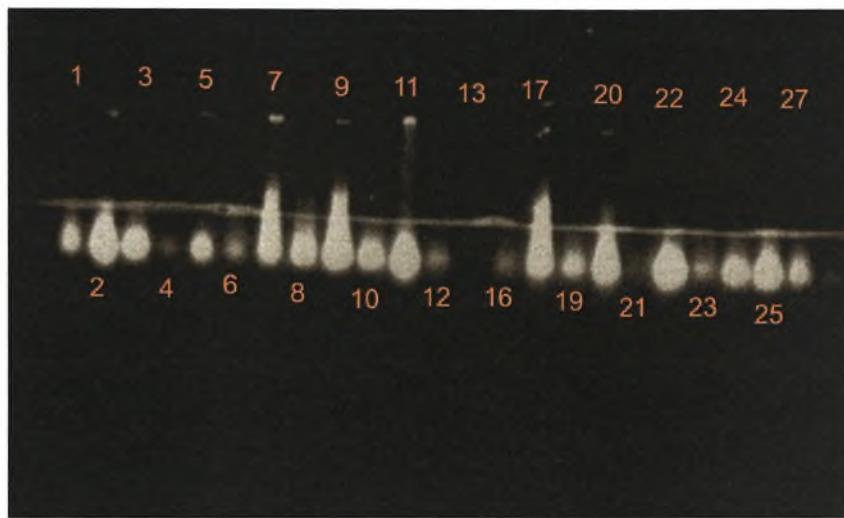
Πίνακας 6.1.1.: Αποτελέσματα των μετρήσεων για τα κριτήρια UPOV

Κωδικός δειγματος	UPOV αρ. 26	UPOV αρ. 27	UPOV αρ. 28	UPOV αρ. 29	UPOV αρ. 30	UPOV αρ. 32	UPOV αρ. 33
1	4	4	4	1	5	7	4
2	3	2	2	1	5	5	4
3	3	3	4	1	5	5	4
4	4	2	4	1	5	7	4
5	3	3	4	1	5	5	4
6	4	3	2	1	5	7	4
7	4	3	2	1	5	7	3
8	3	4	2	3	5	5	3
9	6	6	1	1	5	7	2
10	4	2	4	1	5	5	4
11	4	3	1	3	5	7	4
20	4	2	2	1	5	7	3

Βάσει των χαρακτηριστικών που βλέπουμε στον πίνακα μπορούμε να ξεχωρίσουμε 3 κωδικούς που εμφανώς ανήκουν σε συγκεκριμένες ποικιλίες. Σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά που ελέγχτηκαν, βλέπουμε πως τα φύλλα από τα δείγματα 3 και 5 ενδέχεται να ανήκουν στην ποικιλία «Hayward», καθώς και τα χαρακτηριστικά των φύλλων από τον κωδικό 10 δηλώνουν που μάλλον το δέντρο ανήκει στην αρσενική ποικιλία «Ματια». Στα υπόλοιπα δείγματα είναι φανερό πως υπάρχουν αποκλίσεις των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών, αλλά αυτές είναι μικρές. Οι αποκλίσεις είναι δυνατό να οφείλονται και στις διαφορετικές ηλικίες των φύλλων που μελετήθηκαν.

## 6.2. Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης

Αρχικά μετά την εξαγωγή του γενετικού υλικού από τα φύλλα έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων προκειμένου να φανεί εάν όντως υπάρχει γενετικό υλικό εντός των διαλυμάτων που περιέχονταν στους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες. Τα αποτελέσματα που φαίνονται στην εικόνα 6.2.1. δείχνουν ότι η επεξεργασία δειγμάτων και η εξαγωγή DNA στέφθηκε με επιτυχία. Η ποσότητα του γενετικού υλικού που εξήχθη δεν ήταν σταθερή, όπως μαρτυρά η σύγκριση για παράδειγμα μεταξύ των δειγμάτων 4 και 7.



Εικόνα 6.2.1.: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων

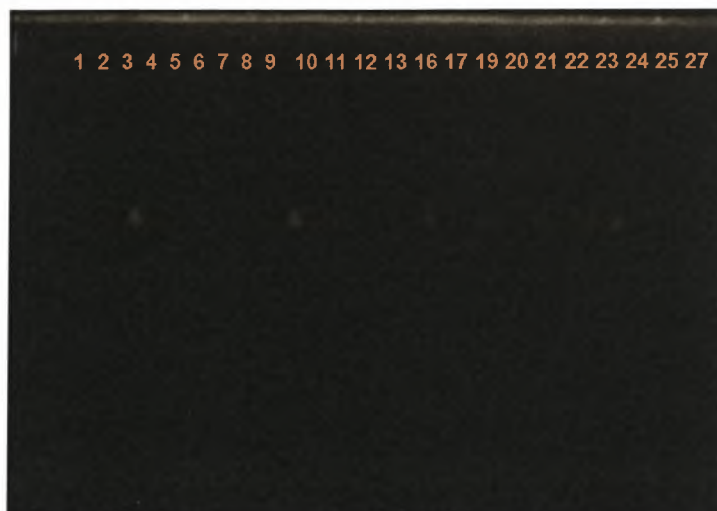
Οι δείκτες RAPD οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό του φύλου στα ακτινίδια δεν εμφάνισαν ουσιαστικούς πολυμορφισμούς, δηλαδή στα gel αγαρόζης δεν εμφανίστηκαν ζώνες οι οποίες διαχώριζαν τους αρσενικούς από τους θηλυκούς γενότυπους. Έγιναν δοκιμές όσον αφορά την τιμή της ποσότητας του DNA που προστέθηκε στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης και για αυτό πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με 5  $\mu\text{L}$  και 7  $\mu\text{L}$  γενετικού υλικού. Ακόμη, έγιναν δοκιμές με τις τιμές των υπόλοιπων αντιδρώντων στην διαδικασία της PCR, κάτι το οποίο δεν έδωσε ουσιαστικά αποτελέσματα, με εξαίρεση ίσως την αντίδραση με τον δείκτη OPAT-12 με ποσότητα γενετικού υλικού 5  $\mu\text{L}$  και θερμοκρασία υβριδισμού δείκτη 37 °C,

κατά την οποία τα δείγματα με κωδικό 10 και 13 εμφάνισαν μια ζώνη στο ίδιο σημείο (Εικόνα 6.2.2.). Αυτό βέβαια δεν συνιστά αξιόπιστο αποτέλεσμα, γιατί τα διπλανά δείγματα με τους κωδικούς 11, 12 είναι επίσης αρσενικά και ο εκκινητής δεν εμφάνισε πολυμερισμό για αυτά.



Εικόνα 6.2.2.: Αποτέλεσμα αντίδρασης PCR του δείκτη OPAL-12 στους 37°C

Στην εικόνα 6.2.3. βλέπουμε ότι εφαρμόζοντας παρόμοιες συνθήκες, ο εκκινητής OPAL-20 δεν έδωσε πολυμορφισμό για κανένα δείγμα.



Εικόνα 6.2.3.: Αποτελέσματα αντίδρασης PCR του δείκτη OPAL-20 στους 37°C

Εν τέλει, αποφασίστηκε η εφαρμογή διαφορετικών θερμοκρασιών για τους 2 εκκινητές, οι οποίες θερμοκρασίες σύμφωνα με τους Gill, Harvey et Βόλος, 2010



αΙ. (1998) ήταν πιθανότερο να δείξουν διαφοροποιήσεις ανάμεσα στους αρσενικούς και στους θηλυκούς γενότυπους. Επίσης, αποφασίστηκε και η μείωση των δειγμάτων από 23 σε 6, προκειμένου να υπάρξει ταυτόχρονη επί τόπου σύγκριση στο gel ηλεκτροφόρησης μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο αντιδράσεων. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν για τις δύο αντιδράσεις PCR, ήταν οι κωδικοί 2, 4, 8 (θηλυκοί γενότυποι) και 10, 11, 12 (αρσενικοί γενότυποι).

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 6.2.4., δεν εμφανίστηκαν πολυμορφισμοί που αφορούν το φύλο σε κανένα από τα δείγματα. Στα πρώτα 6 δείγματα (με την σειρά οι κωδικοί 2, 4, 8, 10, 11, 12) χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής OPAL-12 ο οποίος εμφανίζει κυρίαρχο πολυμορφισμό σε αρσενικούς γενότυπους. Τα υπόλοιπα 3 δείγματα αποτελούν επανάληψη των αρσενικών κωδικών (10, 11, 12). Παρομοίως, στα επόμενα 6 δείγματα χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης OPAL-20 και εφαρμόστηκε ακόμη μία επανάληψη των θηλυκών γενότυπων. Το μοναδικό αποτέλεσμα των δύο αντιδράσεων το οποίο θα μπορούσε να παρουσιαστεί είναι μόνο μία πολύ αχνή ζώνη στον κωδικό 12 της 2<sup>ης</sup> επανάληψης με τον εκκινητή OPAL-12, η οποία φαινόταν μόνο δια γυμνού οφθαλμού.



Εικόνα 6.2.4.: Ηλεκτροφόρηση με τους δείκτες OPAL-12 (αριστερά, πρώτα 8 δείγματα) και OPAL-20 (δεξιά, τα υπόλοιπα 8)

## 7. Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από το παρών πείραμα δεν είναι ξεκάθαρα, γιατί δεν εμφανίστηκαν σαφείς ζώνες πολυμορφισμού από την πλειοψηφία των δειγμάτων. Μέσω μιας ολιστικής προσέγγισης καταβλήθηκε προσπάθεια ώστε να αποκλειστούν ορισμένοι πειραματικοί παράγοντες που ενδέχεται να ευθύνονταν για την ασάφεια των αποτελεσμάτων του πειράματος.

Οι παράγοντες που δυνητικά έπαιξαν ρόλο στην λειτουργία του πολυμορφισμού των δεικτών είναι οι εξής:

- Μικρή ποσότητα αντιδρώντων στην PCR
- Κακή ποιότητα / Αποτυχία εξαγωγής γενετικού υλικού από τα δείγματα
- Επιλεγόμενες θερμοκρασίες στις αντιδράσεις PCR
- Αποτυχία λειτουργίας εκκινητών

Μετά από επανειλημμένες δοκιμές και αρκετές αλλαγές στην διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που αφορούσαν στην ποσότητα των αντιδρώντων, συμπεριλαμβανομένου και του DNA, καθώς και την εφαρμογή 3 διαφορετικών προγραμμάτων θερμοκρασιών για την ενίσχυση και τον πολλαπλασιασμό του γενετικού υλικού με τα υπόλοιπα αντιδρώντα στις αντιδράσεις PCR, το αποτέλεσμα δεν ήταν σαφές, διότι μόνο σε τρεις περιπτώσεις εμφανίστηκε ζώνη πολυμορφισμού στα δείγματα.

Το επόμενο λογικό συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι οι δείκτες δεν ήταν ικανοί ώστε να καθορίσουν το φύλο στα δείγματα. Βέβαια, θα πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι στις περιπτώσεις όπου οι δείκτες εμφάνισαν ζώνες πολυμορφισμού, το αποτέλεσμα ήταν σωστό. Έτσι, ο δείκτης OPAl-12 στους 37°C έδωσε σαφείς ζώνες στα δείγματα 10 και 13, που ήταν όντως αρσενικά.

Επίσης, ο ίδιος δείκτης εμφάνισε μια δυσδιάκριτη ζώνη στον κωδικό 12 στους 68°C, και ο φαινότυπος του είναι όντως αρσενικός. Ενδεχομένως λοιπόν, η λάθος διαχείριση και οι ελλειπείς συγκεντρώσεις του γενετικού υλικού που υπήρχε, σε συνδυασμό με την διαφορά μεθοδολογίας ανάμεσα στο πείραμα των Gill et al. το 1998 και σε αυτή που ακολουθήθηκε από τον γράφοντα να οδήγησε στο συμπέρασμα πως οι δείκτες OPAL-20 και OPAL-12 δεν κατάφεραν να καθορίσουν το φύλο 23 δειγμάτων διαφορετικών ποικιλιών *Actinidia deliciosa*, όπου ανάμεσά τους βρισκόταν και η ελληνική ποικιλία «Τσεχελίδης».

Το πρόβλημα εντοπίστηκε και από τους Gill & Harvey, έτσι προσπάθησαν ξανά μετατρέποντας τους RAPD δείκτες σε SCAR και το αποτέλεσμα ανταποκρίθηκε στην πραγματικότητα. Αυτό σημαίνει πως μελλοντικά ένα παρόμοιο πείραμα με διαφοροποιήσεις όσον αφορά την μεθοδολογία και τα υλικά θα είναι σε θέση να καθορίσει το φύλο στο ακτινίδιο.

## 8. Βιβλιογραφία

1. Jaeger S.R., Rossiter K.L., Wismer W.V., Harker F.R., (2003b), Consumer-driven product development in the kiwifruit industry, *Food Qual. Pref.* 14: 187-198
2. Jaeger S.R., (2003a), Innovation in the fruit industry: need for convenience, *Food Aus.* 55: 129-132
3. Doyle, J. J. and Doyle, L. J. , (1990), Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
4. Morton, J. (1987), Kiwifruit. p. 293-300. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL.
5. Ferguson A.R., Seal A.G., McNeilage M.A., Fraser L.G., Harvey C.F. and R.A. Beatson. (1996), p. 371-417. In: Janick J. and Moore J.N. (eds.), Fruit breeding. Vol. 2. Vine and small fruits, *Wiley, New York*.
6. Li J-Q, Li X-W, Soejarto D.D., (2007), A revision of the genus *Actinidia* from China, *Acta Horti* 753:69-71
7. McNeilage M.A., Considine J.A., (1989), Chromosome studies in some *Actinidia* taxa and implications for breeding, *NZ J Bot* 27:71-81
8. Li X., Li J., Soejarto D.D., (2009), Advances in the study of the systematics of *Actinidia* Lindley, *Front. Biol. China* 2009, 4(1): 55-61
9. Qian Y.Q., Yu D.P., (1992), Advances in *Actinidia* research in China, *Acta Horti* 297:51-55
10. Zhang, J., Beuzenberg E.J., (1983), Chromosome numbers in two varieties of *Actinidia chinensis* Planch., *N. Z. J. Bot.* 21: 353-355.
11. Cronquist A., (1998), The Evolution and Classification of Flowering Plants. *Bronx, NY: New York Botanical Gardens*
12. Renner S.S., Ricklefs R.E., (1995), Dioecy and its correlates in the flowering plants, *American Journal of Botany* 82: 596-606.
13. Paran I., Michelmore R.W., (1993), Development of reliable PCR based marker linked to downey mildew resistant genes in lettuce, *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993.
14. Cao W., Hughes G. R., Ma H., Dong Z., (2001), Identification of molecular markers for resistance to *Septoria nodorum* blotch in durum wheat, *Theor. Appl. Genet.*, vol. 102: 551-554.
15. Guttman D.S., Charlesworth D. (1998), An X-linked gene with a degenerate Y-linked homologue in a dioecious plant, *Nature* 393: 263.

16. Zhang Y.H., Di Stilio V.S., Rehman F., Avery A., Mulcahy D., Kesseli R., (1998), Y chromosome specific markers and the evolution of dioecy in the genus *Silene*, *Genome* 41: 141-147
17. Shibata F., Hizume M., Kuroki Y., (1999), Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*, *Chromosoma* 108:266-270
18. Wismer W.V., Harker F.R., Gunson F.A., Rossiter K.L., Lau K., Seal A.G., Lowe R.G., Beatson R., (2005), Identifying flavour targets for fruit breeding: A kiwifruit example, *Euphytica* 141: 93-104
19. Dellaporta S., Calderon-Urrea A., (1993), Sex determination in flowering plants, *The Plant Cell* 5: 1241-1251
20. Testolin R., Cipriani G., (1997), Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in the genus *Actinidia*, *Theor. Appl. Genet.* 94: 897-903
21. Atkinson R.G., Cipriani G., Whittaker D.J., Gardner R.C., (1997), The allopolyploid origin of kiwifruit, *Actinidia deliciosa* (*Actinidiaceae*), *Pl. Syst. Evol.* 205: 111-124
22. Chat J., Jauregui B., Petit R.J., Nadot S., (2004), Reticulate evolution in kiwifruit (*Actinidia*, *Actinidiaceae*) identified by comparing their maternal and paternal phylogenies, *Journal of Botany* 91: 736-747
23. Yan G., Atkinson R.G., Ferguson A.R., McNeilage M.A., Murray B.G., (1997), In situ hybridization in *Actinidia* using repeat DNA and genomic probes, *Theor. Appl. Genet.* 94: 507-513
24. McNeilage M.A., Duffy A.M., Fraser L.G., Marsh H.D., Hofstee B.J. (2007), All together now: the development and use of hermaphrodite breeding lines in *Actinidia deliciosa*, *Acta Hort* 753:191-197
25. McPherson H.G., Richardson A.C., Snelgar W.P., Patterson K.J., Currie M.B., (2001), Flower quality and fruit size in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*), *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 29: 93-101
26. Ferguson A.R., (1999), New Temperate Fruits: *Actinidia chinensis* and *Actinidia deliciosa*, *Perspectives on new crops and new uses*, Janick J. (ed.), *ASHS Press, Alexandria, VA*: 342-347

27. Atkinson R.G., Cipriani G., Whittaker D.J., Gardner R.C., (1997), The allopolyploid origin of kiwifruit, *Actinidia deliciosa* (Actinidiaceae), *Pl. Syst. Evol.* 205: 111-124
28. Ferguson A.R., Huang H.W., (2007), Genetic resources of kiwifruit: domestication and breeding, *Hort Rev*, 33:1-121.
29. Ferguson A.R., Seal A.G., (2008), Chapter 8: Kiwifruit, Temperate Fruit Crop Breeding J.F. Hancock (ed.), *Springer Science+Business Media B.V.*
30. Ferguson A.R., (1990), Kiwifruit (*Actinidia*), *Acta Hort* 290:603-653
31. Nakamura Y., Sawada H., Kobayashi S., Nakajima I., Yoshikawa M., (1999), Expression of soybean  $\beta$ -1,3-endoglucanase cDNA and effect on disease tolerance in kiwifruit plants, *Plant Cell Reports* 18:527-532
32. Kobayashi S., Ding C.K., Nakamura Y., Nakajima I., Matsumoto R., (2000), Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside), *Plant Cell Reports* 19: 904-910
33. Negrutiu I., Vyskot B., Barbacar N., Georgiev S., Moneger F., (2001), Dioecious Plants. A Key to the Early Events of Sex Chromosome Evolution, *Pl. Physiology* 127: 1418-1424
34. Testolin R., Cipriani G., Costa G., (1995), Sex segregation ratio and gender expression in the genus *Actinidia*, *Sex Plant Reprod.* 8: 129-132
35. Harvey C.F., Gill G.P., Fraser L.G., McNeilage M.A., (1997), Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*, *Sex Plant Reprod.* 10: 149-154
36. Huang G.W., Cipriani G., Morgante M., Testolin R., (1998), Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterisation, and homology in related species, *Theor. Appl. Genet.* 97: 1269-1278
37. McNeilage M.A., Steinhagen S., (1998), Flower and fruit characters in a kiwifruit hermaphrodite, *Euphytica* 101: 69-72
38. Gill G.P., Harvey C.F., Gardner R.C., Fraser L.G., (1998), Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*, *Theor. Appl. Genet.* 97: 439-445
39. McNeilage M.A., (1991), Gender variation in *Actinidia deliciosa*, the kiwifruit, *Sex Plant Reprod* 4:267-273

40. Hormaza I.J., Dollo L., Polito S.V., (1994), Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulk segregant analysis, *Theor. Appl. Genet.* 89: 9-13
41. Shirkot P., Sharma R.D., Mohapatra T., (2002), Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* by RAPD markers, *Sci. Hort.* 94: 33-39
42. Ainsworth C., (2000), Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants, *Annals of Botany* 86: 211-221
43. Xu W.-J., Wang B.-W., Cui K.-M., (2004), RAPD and SCAR markers linked to sex determination in *Eucommia ulmoides* Oliv., *Euphytica* 136: 233-238
44. Atkinson R.G., MacRae E.A., (2007), Kiwifruit, Pua E.C., Davey M.R. ., (eds), Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 60, Transgenic Crops V, *Springer-Verlag, Berlin*
45. Crowhurst R.N., Gleave A.P., MacRae E.A., Ampomah-Dwamena C., Atkinson R.G., Beuning L.L., Bulley S.M., Chagne D., Marsh K.B. et al., (2008), Analysis of expressed sequence tags from *Actinidia*: applications of a cross species EST database for gene discovery in the areas of flavour, health, color and ripening, *BMC Genomics* 9:351

#### Ελληνική Βιβλιογραφία

46. Βασιλακάκης Μ., (2004), Στοιχεία Γενικής και Ειδικής Δενδροκομίας
47. Παλούκης Σ., Ντινόπουλος Ο., (1989), Ακτινιδιά: Φυτό, Καλλιέργεια, Προστασία, Εμπορία

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Τηλ.: 24210 ~~746051~~ 93141



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000105347