

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ & ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Αθανάσιος Ε. Κορκόβελος

**Μοριακή αξιολόγηση και διαλογή γενοτύπων ακτινιδιάς με χρήση δεικτών
μικροδορυφορικού DNA**

-2000-



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 1649/1

Ημερ. Εισ.: 01-07-2003

Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

631.523 3

ΚΟΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ & ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



Αθανάσιος Ε. Κορκόβελος

Μοριακή αξιολόγηση και διαλογή γενοτύπων ακτινιδιάς με χρήση δεικτών
μικροδορυφορικού DNA

-2000-

Μοριακή αξιολόγηση και διαλογή γενοτύπων ακτινιδιάς με χρήση δεικτών
μικροδορυφορικού DNA

Τα μέλη της επιτροπής

Χρήστος Γούλας

Πέτρος Λόλας

Δημήτριος Κουρέτας

Καθηγητής Π.Θ.
Γενετικής Βελτίωσης
Φυτών
Επιβλέπων

Καθηγητής Π.Θ.
Φυσιολογίας-
Ζιζανιολογίας
Μέλος

Επίκουρος Καθηγητής Π.Θ.
Φυσιολογίας Ζωικών
Οργανισμών
Μέλος

Ευχαριστίες

Ειλικρινείς ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν με τον τρόπο τους ώστε να πραγματοποιηθεί αυτή η εργασία.

Ειδικότερα οφείλω θερμές ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή κύριο Χρήστο Γούλα για την αμέριστη συμπαράσταση, καθοδήγηση και βοήθεια τόσο υλική όσο και ηθική ώστε να πραγματοποιηθεί αυτή η εργασία.

Ευχαριστίες οφείλω στα μέλη της επιτροπής Καθηγητές Π. Λόλα και Δ. Κουρέτα για τις χρήσιμες υποδείξεις τους βοήθεια που έχουν προσφέρει ώστε να ξεπεραστούν τα διάφορα προβλήματα.

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου για την υποστήριξη που μου παρείχαν ώστε να καταστεί δυνατή η πραγματοποίηση αυτής της διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | | |
|--|-----|----|
| Περίληψη | σελ | 4 |
| Εισαγωγή | σελ | 7 |
| 1.1 Βοτανική κατάταξη | σελ | 8 |
| 1.2 Μορφολογία της ακτινιδιάς | σελ | 10 |
| 1.2.1 Γενετική του φύλου | σελ | 12 |
| 1.2.2 Γενετική της διοικίας | σελ | 14 |
| 1.3 Έπικονίαση | σελ | 15 |
| 1.4 Αναπαραγωγή της ακτινιδιάς | σελ | 16 |
| 1.5 Τεχνικές μοριακής γενετικής ανάλυσης | σελ | 18 |
| 1.5.1 Προσεγγίσεις χωρίς την χρήση θερμοκυκλοποιητή (PCR) | σελ | 19 |
| 1.5.2 Τεχνικές με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε τυχαίες θέσεις στο γένωμα | σελ | 21 |
| 1.5.3 Εστιασμένη PCR ανάλυση και αλληλούχηση | σελ | 24 |
| Υλικά και μέθοδοι | σελ | 30 |
| Αποτελέσματα - Συζήτηση | σελ | 36 |
| 1. Ανάλυση σε μη μετουσιωμένη πολυακρυλαμίδα | σελ | 36 |
| 1.1 Περιγραφή μικροδορυφορικών περιοχών | σελ | 36 |
| 1.2 Αξιολόγηση εκκινήτων | σελ | 44 |
| 2. Ανάλυση σε μετουσιωμένη πηκτή πολυακρυλαμίδης | σελ | 46 |
| 2.1 Περιγραφή μικροδορυφορικών περιοχών | σελ | 46 |
| 2.1 Αποτύπωση γενοτύπων. | σελ | 49 |
| Συμπεράσματα | σελ | 60 |
| Βιβλιογραφία | σελ | 63 |
| Παράρτημα | σελ | 69 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα νέο είδος, που έχει πρόσφατα καταστεί καλλιεργήσιμο, είναι η ακτινιδιά και αποτελεί ίσως την μοναδική περίπτωση οπωροφόρου με οικονομική σημασία που έχει ανακαλυφθεί τον τελευταίο αιώνα. Η εξάπλωση του ξεκίνησε από την Ν. Ζηλανδία με την ποικιλία Hayward (*A. deliciosa* - $2n = 6x$) και αποτελεί την κύρια ποικιλία (πάνω από 90%) στην οποία στηρίζεται η παγκόσμια παραγωγή. Έτσι το ενδεχόμενο γενετικής ευπάθειας, ανάλογη μ' αυτήν του καλαμποκιού στις Η.Π.Α. στην δεκαετία του 60 δεν μπορεί να αποκλεισθεί και επομένως είναι αναγκαία η δημιουργίας νέων ποικιλιών είτε του ιδίου είδους (*A. deliciosa*) ή και άλλου είδους (*A. chinensis* $2n = 4x$ ή $2n = 2x$). Για την αξιοποίηση όμως των νέων γενοτύπων ακτινιδιάς θα πρέπει πρώτα να διερευνηθεί η γεντική τους βάση και η ύπαρξη γενετικής παραλλακτικότητας. Πέρα από τις μεθόδους της κλασικής γενετικής υπάρχουν και νέες μέθοδοι μοριακής γενετικής ανάλυσης μέσω μοριακών δεικτών. Στην παρούσα εργασία οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επαναλαμβανόμενες μικροδορυφορικές ακολουθίες (SSRs) γιατί α) αντιστοιχούν σε μία και μόνη γενωμική περιοχή β), είναι συγκυρίαρχοι δείκτες που εμφανίζουν πολλά αλληλόμορφα και γ) χαρακτηρίζονται από επαναληψιμότητα τόσο στο χρόνο όσο και από διαφορετικά εργαστήρια.

.Στα πλαίσια της διατριβής αξιολογήθηκαν γενότυποι, που ανήκουν στα είδη *A. chinensis* και *A. deliciosa* οι οποίοι υποβλήθηκαν σε μοριακή γενετική αξιολόγηση. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μοριακής αξιολόγησης με σκοπό την διερεύνηση της δυνατότητας ιχνηλάτησης του γενώματος με PCR ανάλυση πολυμορφισμών, αποτύπωσης και ταυτοποίησης με δείκτες SSRs. Χρησιμοποιήθηκαν 24 γενότυποι από τους οποίους οι 13 του είδους *A. deliciosa* (επτά θηλυκοί και έξη άρρενες), 11 γενότυποι του είδους *A. chinensis* 10 τετραπλοειδείς (9 θηλυκοί και ένας άρρεν). Χρησιμοποιήθηκαν 38 εκκινητές μήκους 20 bp που δημιουργήθηκαν στο Εργαστήριο του Πανεπιστημίου του Udine κατάλληλοι για την ιχνηλάτηση του γενώματος με PCR ανάλυση πολυμορφισμών μικροδορυφορικού DNA. Έγινε εξαγωγή του DNA, PCR και ανάλυση προϊόντων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8%, ενώ εκτιμήθηκαν ο αριθμός αλληλομόρφων, ο δείκτης

πολυμορφισμού PIC (*polymorphism information content*), DI (Diversity indices) και I (Probability of identity).

Σκοπός της παρούσης ερευνητικής εργασίας ήταν η αξιολόγηση μοριακών δεικτών μικροδορυφορικών περιοχών (SSRs) ως προς την αποτελεσματικότητά τους να διαφοροποιούν γενότυπους ακτινιδιάς και η αποτύπωση γενότυπων ακτινιδιάς.

Οι χρωμοσωμικές περιοχές που μελετήθηκαν έδειξαν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού που φάνηκε να αντιστοιχεί σε μέσο αριθμό 10.7 ± 3 αλληλομόρφων με εύρος 5 - 17 ανάλογα με τον εκκινητή. Οι γενότυποι διαφοροποιήθηκαν ως προς το επίπεδο πλοειδίας σε εξαπλοειδείς και τετραπλοειδείς. Γενικά οι εκκινητές φάνηκε να διαφοροποιούν αποτελεσματικά τους γενότυπους με τιμή $PIC=0.805 \pm 0.128$ και εύρος 0.905-0.686, $DI=844 \pm 0.048$ και εύρος 0.912-0.711 και $I=0.044 \pm 0.025$ και εύρος 0.015-0.108.

Τα δεδομένα έδειξαν ότι υπάρχουν εκκινητές που παρουσίασαν υψηλό πολυμορφισμό για τα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*. Ειδικότερα για τα άτομα του είδους *A. chinensis* οι υποσχόμενοι εκκινητές ήταν οι UDK 96-040, UDK 96-001, UDK 96-022, UDK 96-033, UDK 97-407, UDK 97-406, UDK 97-413, UDK 97-402, UDK 96-092, UDK 99-141 και UDK 99-168. Για τα άτομα του είδους *A. deliciosa* ήταν οι UDK 96-001, UDK 96-018, UDK 96-040, UDK 96-020, UDK 96-092, UDK 96-065 b, UDK 97-414, UDK 97-704, UDK 97-413, UDK 97-422 και UDK 99-141.

Υπήρξαν μοριακοί δείκτες έδωσαν την δυνατότητα ταυτοποίησης όλων των γενότυπων του είδους *A. chinensis* με έναν και μόνο εκκινητή UDK 96-092, UDK 99-141, κάτι που δεν ήταν εφικτό για τα άτομα του είδους *A. deliciosa*. Κάτι που είναι εφικτό με την συνδυασμένη αξιολόγηση δύο ή περισσότερων εκκινητών..

Η ανάλυση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων ως προς όλα τα άτομα των ειδών έδειξε ότι υπήρξαν μοριακοί δείκτες ικανοί να προσδιορίσουν το είδος του κάθε γενότυπου, όσον αφορά βέβαια τους γενότυπους που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία. Ειδικότερα οι εκκινητές UDK 96-035a, UDK 99-156 και UDK 96-158 διαχώρισαν τους γενότυπους των δύο ειδών

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ακτινιδία κατάγεται από την Κίνα, και είναι διαδεδομένη σε ολόκληρη τη στην Ασία από την Σιβηρία, στο βόρειο Ταϊβάν, Μαλαισία και Ινδία από Βορά έως Νότο φυόμενη σε πολλές περιοχές κυρίως στις παρυφές των δασών στην κοιλάδα του Γαλάζιου ποταμού. Χρησιμοποιήθηκε για παλαιότερα για παραγωγή χαρτιού, για στολισμό σε ανθόκηπους, στην ιατρική και τέλος για την διατροφή του ανθρώπου ως φρούτο. Αν και το κέντρο παραγωγής της ακτινιδιάς είναι η Κίνα έγινε γνωστή και διαδόθηκε στον κόσμο από την Ν. Ζηλανδία όταν το (1904) ο J. Mc Gregor ο οποίος εισήγαγε τους πρώτους σπόρους. Η Ακτινιδιά πρωτοκαλλιεργήθηκε από τον A. Allison, και από τα πρώτα αυτά φυτά δημιουργήθηκαν οι σύγχρονες ποικιλίες Hayward (Ferguson and Bollard 1990) οι οποίες καλλιεργούνται σ' όλο τον κόσμο μέχρι σήμερα (ποικιλία Hayward). Από την Ν. Ζηλανδία η ακτινιδιά διαδόθηκε σε διάφορες χώρες της Ευρώπης και τις Η.Π.Α. Στην Αγγλία εισήχθη το 1900, στην Γαλλία το 1903, στην Καλιφόρνια το 1904 και αργότερα το (1934) στην Ιταλία. Η ακτινιδιά καλλιεργείται σήμερα στη Ν. Ζηλανδία, στη Χιλή, στην Ελλάδα και σε άλλες υποτροπικές περιοχές. Στην Ελλάδα εισήχθη για πρώτη φορά το 1984 σε έκταση 400 εκτάρια και μέχρι το 1990 έφτασε τα 2300, είναι ανερχόμενη και πολλά υποσχόμενη καλλιέργεια που πρόσφατα εισήλθε σε προγράμματα ολοκληρωμένης καλλιέργειας για παραγωγή φρούτων καλύτερης ποιότητας πράγμα εφικτό για τις Ελληνικές συνθήκες. Η παραγωγή έτος για τις καλλιεργούμενες εκτάσεις ανήλθε σε από τους 1500 τόνους ανά έτος το 1984 σε 20000 τόνους το 1990. (Βασιλακάκης 1991). Το φρούτο της καταρχήν πήρε την ονομασία "Chinese gooseberry" Κινέζικο φραγκοστάφυλο κι αργότερα μετονομάσθηκε σε Kiwi.

1.1 Βοτανική κατάταξη

Η ακτινιδιά (*Actinidia*), είναι δικοτυλήδονο φυτό πολυετές, φυλλοβόλο και αναρριχώμενο. Ανήκει στην τάξη Theales και την οικογένεια Actiniciaceae που είναι συγγενείς με την οικογένεια Theaceae των οποίων η γενεαλογία αμφισβητείται (Case et al., 1993; Cosner et al., 1994). Η καλλιεργούμενη ακτινιδιά κατατάχθηκε κατ' αρχήν ως ποικιλία του είδους *A. chinensis* var *Hispida* αλλά μορφολογικές διαφορές καθώς και ο αριθμός των χρωμοσώμων οδήγησαν τους Liang και Ferguson να δεχθούν την ύπαρξη δύο διακριτών ειδών *A. chinensis* ($2n=2x=58$) και *A. deliciosa* ($2n=6x=174$) ο βασικός αριθμός χρωμοσώμων είναι $n=29$. Το γένος *Actinidia* περιλαμβάνει περισσότερα από 60 είδη και μεγάλο αριθμό ενδοειδικών υβριδίων που ξεπερνούν τα 100 ενώ υπάρχουν και κάποια είδη που ακόμα ερευνάται η βοτανική τους κατάταξη. Κατατάσσονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες που διαφοροποιούνται ως προς τον βαθμό του πυκνού τριχώματος, και την παρουσία - απουσία φακιδίων στην επιφάνεια των καρπών. Η σημερινή κατάταξη των ειδών έχει γίνει κατά βάση με μορφογενετικά φαινοτυπικά στοιχεία. Επίσης πολλά είδη που έχουν ταξινομηθεί κατά τον περασμένο αιώνα, βασίστηκαν σε άτομα των ειδών που βρίσκονται σε βοτανικούς κήπους και δεν έχουν βρεθεί ως άγρια είδη στην φύση. Έτσι η περιγραφή αυτών των ειδών έγινε με βάση μικρό αριθμό γενοτύπων και σε μερικές περιπτώσεις με βάση τα χαρακτηριστικά μόνο του ενός φύλου γεγονός που δημιουργεί ερωτηματικά για την εγκυρότητα της συστηματικής κατάταξής τους (Cirigliani et al., 1998). Σ' αυτό το σημείο η ανάλυση και ταυτοποίηση των γενοτύπων με μοριακούς δείκτες έχει επιβεβαιώσει την ύπαρξη κάποιων ειδών ιδιαίτερα από την στιγμή που αναπτύχθηκαν μοριακές προσεγγίσεις κατάλληλες για χρήση στην συστηματική κατάταξη των ειδών. Αναλύσεις με βοήθεια μοριακών δεικτών έδειξαν ότι είδη όπως τα *A. rufa* και *A. kolomikta* βρίσκονται σε λάθος θέση στην συστηματική τους κατάταξη καθώς και ότι τα

είδη *A. deliciosa* και *A. chinensis* είναι στενά συγγενή (Cipriani et al., 1998; Testolin et al., 1997; Webby et al., 1994; Cipriani et al., 1995).

Βασική διαφορά για τον διαχωρισμό και αναγνώριση των ειδών είναι ο βαθμός πλοειδίας. Ανάλογα με το επίπεδο πλοειδίας τα είδη είναι:

A. callosa (Lind) 2x και 4x

A. polyama 2n=58 , 4n=116 (Nakajima 1942)

A. Kolomikta 4n= 112 (Nakajima 1942)

A. arguta 4n=116 (Bowden 1945) περιλαμβάνει κυρίως τετραπλοειδής γενοτύπους, αλλά έχουν αναφερθεί και διπλοειδής καθώς και εξαπλοειδής (Yan et al., 1994 και εν αυτώ αναφορές).

A. arguta var purpurea 4x και 8x

A. chinensis 4n=116 (Bowden 1945), 2n=58 ήταν το πρώτο είδος που μελετήθηκε και ταξινομήθηκε ως διπλοειδές 2n = 58 χρωμοσώματα (Zhang and Beuzenberg 1983 Mc Neilage and Considine 1989), έχουν αναφερθεί και τετραπλοειδή άτομα (Xiong et al., 1992).

A. valnata 4x και 6x

A. melanandra (Franch) 2x και 4x

A. deliciosa όλα τα άτομα είναι εξαπλοειδή 2n=6x και υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι αλλοπολυπλοειδή. (Mc Neilage and Considine 1989; et al., 1990; Crowhurst and Gardner 1991).

Στο είδος *A. deliciosa* ανήκουν οι πολύ γνωστές ποικιλίες Hayward, που καλλιεργείται σχεδόν αποκλειστικά στον κόσμο και στην Ελλάδα και οι νεότερες Bruno και Morty. Τα είδη *A. deliciosa* και *A. chinensis* σύμφωνα με ισοενζυμικές αναλύσεις έχουν πολλές ομοιότητες στο βιοχημικό επίπεδο (Testolin et al, 1997) καθώς και μορφολογικές αλλά και στην σύσταση των φλαβονοειδών (Webby et al., 1994). Το είδος *A. deliciosa* πιθανότατα έχει προέλθει από το είδος *A. chinensis* το οποίο είναι ένας από τους γονείς του

αφού πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι τα δύο είδη έχουν γενετικά όμοιους χλωροπλάστες (μητρική κληρονομία) (Cirriani et al., 1995). Το είδος *A. deliciosa* σχηματίζει διδύναμα χρωμοσώματα κατά την μείωση (Mc Neilage and Considine 1989) και όταν διασταυρώνεται με διπλοειδή άτομα του είδους *A. chinensis* στα προκύπτοντα τετραπλοειδή ακολουθεί δισωμική κληρονομία σύμφωνα με δεδομένα ισοενζυματικής ανάλυσης (Huang et al., 1997) πράγμα που ενισχύει την προηγούμενη άποψη ότι είδος *A. deliciosa* είναι αλλοπολυπλοειδές. Αυτό περαιτέρω ενισχύθηκε από δεδομένα με βάση μοριακούς γενετικούς δείκτες από DNA του πυρήνα που έδειξαν ότι ένας από τους γονείς του είδους *A. deliciosa* μπορεί να είναι το είδος *A. chinensis* (Crowhurst et al., 1990).

Γενικότερα στο γένος *Actinidia* υπάρχει μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς το επίπεδο πλοειδίας που μπορεί να είναι: διπλοειδές, τετραπλοειδές, εξαπλοειδές, ακόμη και οκταπλοειδές που φαίνεται να απαντά σε πολύ μικρές συχνότητες όπως στο είδος *A. arguta var. purpurea* (Ferguson et al., 1997). Στην φύση όμως απαντούνται τριπλοειδή άτομα με 87 χρωμόσωμα (προερχόμενα από διασταύρωση διπλοειδών και τετραπλοειδών ατόμων του είδους *A. chinensis* (Plunch), ή τριαπλοειδή προερχόμενα από μη γονιμοποιημένα άνθη του είδους *A. deliciosa*) καθώς και πενταπλοειδή που προέρχονται από διασταύρωση (*A. deliciosa* 6x x *A. chinensis* 4x) με 145 χρωμοσώματα (Ferguson et al., 1997). Τέτοια πολυπλοειδή άτομα περιέχουν 3, 4, 5, 6 ή 8 φορές των βασικό αριθμό χρωμοσώμων $n=29$ (Yan et al., 1994).

1.2 Μορφολογία της Ακτινιδιάς

Η ακτινιδιά είναι φυτό πολυετές και αναρριχόμενο και ως προς την συμπεριφορά και την βλάστηση μοιάζει πολύ μ' εκείνη του αμπελιού. Παρουσιάζει μεγάλη ταχύτητα αύξησης του βλαστού η οποία μπορεί να φτάσει

τα 10 εκ. ημερησίως σε ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίες. Οι βλαστοί έχουν την τάση να περιελίσσονται κατά την αύξησή τους γύρω από υποστηρίγματα.

Το ριζικό σύστημα της ακτινιδιάς αποτελείται από σαρκώδεις, σχετικά χοντρές και έντονα διακλαδιζόμενες ρίζες. Λόγω των μεγάλων απαιτήσεων σε οξυγόνο ο κύριος όγκος του ριζικού συστήματος αναπτύσσεται στο επιφανειακό στρώμα εδάφους βάθος 3 - 4 εκ. και φτάνει στα 70 έως 150 εκ. με ακτίνα 1 μ από τον κορμό. Οι ρίζες αναπτύσσονται κατ' αρχήν οριζόντια στην προηγούμενη περιοχή και στην συνέχεια εισχωρούν σε βάθος. Το ριζικό σύστημα που προέρχεται από μοσχεύματα είναι πιο πυκνό ενώ των σποροφύτων είναι περισσότερο ανεπτυγμένο και με καλύτερη κατανομή.

Ο κορμός των φυτών κατά το νεανικό στάδιο είναι εύκαμπτη κληματίδα που χρειάζεται υποστύλωση ενώ σε ενήλικα φυτά 35 ετών μπορεί να φτάσει διάμετρο μέχρι 20 - 30 εκ.

Οι βλαστοί επιμηκύνονται ταχύτατα κι έχουν τάση να περιελίσσονται μεταξύ τους και στα υποστυλώματα. Ανάλογα με τον τύπο των οφθαλμών που φέρουν διακρίνονται σε φυλλοφόρους και ανθοφόρους. Οι φυλλοφόροι βλαστοί προέρχονται από ξυλοφόρους οφθαλμούς και φέρουν μόνο φύλλα ενώ οι ανθοφόροι από ανθοφόρους οφθαλμούς και φέρουν φύλλα, άνθη και καρπούς. Οι βλαστοί ηλικίας ενός έτους ονομάζονται κληματίδες.

Οι τύποι των οφθαλμών που απαιτούνται στην ακτινιδιά διακρίνονται σε ξυλοφόρους και μικτούς. Οι ξυλοφόροι βρίσκονται σε ξύλο ηλικίας άνω των 2 ετών και στην βάση των ετήσιων βλαστών. Οι μικτοί ανθοφόροι βρίσκονται στο μεσαίο και ανώτερο τμήμα των κληματίδων.

Τα φύλλα είναι καρδιόσχημα με οδοντωτή περιφέρεια και μπορούν να φτάσουν την διάμετρο 18 - 20 εκ. Δεν έχουν παρατηρηθεί μορφολογικά χαρακτηριστικά φύλλων που να διαφοροποιούν τα αρσενικά από τα θηλυκά φυτά.

Τα άνθη της ακτινιδιάς αρσενικά ή θηλυκά αποτελούνται από 3 - 5 σέπαλα και 5 ή περισσότερα πέταλα αλλά δεν εμφανίζονται και τα δύο φύλα στο ίδιο φυτό αλλά σε διαφορετικά τα οποία ανάλογα με τον τύπο των ανθέων που φέρουν ονομάζονται αρσενικά ή θηλυκά (δίοικο φυτό). Τα αρσενικά φυτά έχουν άνθος που εύκολα αναγνωρίζεται ως αρσενικό λόγω της μορφολογίας του. Έτσι τα αρσενικά άνθη έχουν πυκνούς και πολλούς στήμονες οι οποίοι περιβάλλουν έναν ατροφικό ύπερο του οποίου η ανάπτυξη παρεμποδίζεται πολύ νωρίς κατά την μορφοποίησή του, είτε πριν από την επιμήκυνση του στύλου είτε πριν από την δημιουργία ωαρίων. Τα θηλυκά άνθη είναι υπόγυνα κι έχουν υπερφυσική ερμαφρόδιτη εμφάνιση με πολλούς στύλους και καλά ανεπτυγμένη ωοθήκη με πολλά ωάρια σε κάθε συγκάρπιο. Η ωοθήκη περιλαμβάνει 36 καρπόφυλλα φύλλα και υπάρχουν τόσοι στύλοι όσοι και στα καρποφόρα. Κάθε καρπόφυλλο φέρει δύο σειρές με 10 - 20 ανάποδες σπερματοβλάστες. Τα θηλυκά άνθη σε αντίθεση με τα αρσενικά παράγουν μόνο άδειους γυρεόκοκκους αφού όλα τα μικροσπόρια εκφυλίζονται μετά το πρώτο στάδιο της μείωσης κατά την δημιουργία γαμετών και πριν από την μικροσποριογένεση.

Ο καρπός είναι η ράγα σχήματος ωοειδούς ή ελλειψοειδούς ή επιμήκους και ζυγίζει κατά μέσο όρο 65 γρ.. Η σάρκα είναι μαλακή χυμώδης, σακχαρώδης με γεύση ελαφρά υπόξινη, ευχάριστη και πολύ χαρακτηριστική. Ο καρπός έχει πολυάριθμους μικρούς σπόρους. (Βάρος 1000 σπόρων 1.0 - 1.5 γρ.) και για τον κανονικό σχηματισμό του είναι απαραίτητοι τουλάχιστον 50 - 100 σπόροι. Χαρακτηριστικό του καρπού είναι η αυξημένη περιεκτικότητά του σε βιταμίνη C (80 - 300 mg / kg σάρκας).

1.2.1 Γενετική του φύλου

Η καθυστέρηση ανάπτυξης των θηλυκών στοιχείων (ύπερος, ωοθήκη) στα πλούσια σε στήμονες αρσενικά άνθη και η αντίστοιχη γρήγορη ανάπτυξη

τους στα πλούσια σε στίγματα θηλυκά άνθη οδηγεί πρακτικά σε διοικία που είναι αποτέλεσμα εκφυλισμού των αντίστοιχων χαρακτηριστικών φύλου. Το συγκεκριμένο φαινόμενο είναι χαρακτηριστικό του γένους *Actinidia* (Harvey et al., 1997 και εν αυτώ αναφορές) αλλά δεν είναι και μοναδικό. Έρευνες σε είδη ακτινιδιάς και μεταξύ τους υβρίδιά τους έδειξε ότι ορισμένα οργανίδια του κυττάρου ακολουθούν μονοπατρική κληρονομία πράγμα που είναι κοινό στα γυμνόσπερμα (Rebound and Zeyl 1994) και σπάνιο στα αγγειόσπερμα και έχει αναφερθεί μόνο στην ακτινιδιά (Cirriani et al., 1995; Testolin and Cirriani 1997; Chat et al., 1999) όπου οι χλωροπλάστες κληρονομούνται αυστηρά μόνο από τον πατέρα και τα μιτοχόνδρια αυστηρά μόνο από την μητέρα. Ειδικότερα φάνηκε ότι υπάρχουν δύο χωριστοί μηχανισμοί διαχωρισμού κι επιλογής των οργανιδίων. Ο ένας, υπεύθυνος για την εξαφάνιση των πατρικών μιτοχονδρίων κι ο άλλος, υπεύθυνος για την μεταφορά των πατρικών χλωροπλάστων. Οι δύο αυτοί μηχανισμοί πιθανόν δρουν κατά την διάρκεια του τελικού σταδίου βλάστησης της γύρης κατά την γονιμοποίηση ή κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του ζυγωτού (Chat et al., 1999).

Μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί μορφολογικοί ή κυττολογικοί δείκτες που να μας δίνουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουμε το φύλλο του φυτού πριν από την άνθηση (Harvey et al., 1997; Gill et al., 1998). Έρευνες με μοριακούς δείκτες καθώς και ο τρόπος κληρονομής του φύλλου έδειξαν ότι το σύστημα κληρονομής του είναι ανάλογο με αυτό των θηλαστικών XX/XY (Harvey et al., 1997) όπου το ετεροζύγωτο άτομο είναι το αρσενικό και ομοζύγωτο το θηλυκό. Έτσι το αρσενικό άτομο, παράγει γαμέτες X (θηλυκούς) και Y (αρσενικούς) και κατά την διασταύρωσή του με θηλυκά άτομα δίνει απογόνους αρσενικά και θηλυκά άτομα σε αναλογία 1:1 χωρίς σημαντικές αποκλίσεις (Testolin et al., 1995; Harvey et al., 1997). Στα εξαπλοειδή άτομα η χρωμοσωμική σύσταση των αρσενικών είναι XXXXXY ή

XXXXYY ενώ στο Y χρωμόσωμα υπάρχει κάποια περιοχή καθοριστική του αρσενικού χαρακτηριστικού και άσχετη με την σχέση αριθμού X και Y χρωμοσώμων.

1.2.2 Γενετική της διοικίας

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το χαρακτηριστικό της διοικίας είναι αποτέλεσμα της μη σύγχρονης ανάπτυξης των θηλυκών και αρσενικών στοιχείων του άνθους για τα αντίστοιχα άτομα. Έτσι αυτή η χρονική διαφορά που παρατηρείται κατά την δημιουργία στύλων σε σχέση με τους στήμονες στα αρσενικά και την αποτυχία δημιουργίας κανονικών μικροσπορίων σε σχέση με τα μακροσπόρια στα θηλυκά δείχνει ότι ο μηχανισμός του φύλου ελέγχεται από δύο τουλάχιστον στενά συνδεδεμένα γονίδια. Ένα πιθανό πρότυπο βασίζεται στη ύπαρξη δύο κυρίαρχων αλληλομόρφων στο αρσενικό φυτό το ένα υπεύθυνο για τον εκφυλισμό του υπέρου και στενά συνδεδεμένο με το υπεύθυνο για την δημιουργία κανονικής γύρης και πιθανόν ένα ακόμα υπεύθυνο για την αποκατάσταση της βιωσιμότητας της γύρης. Τα κυρίαρχα αυτά αλληλόμορφα βρίσκονται στο Y χρωμόσωμα ενώ στο X χρωμόσωμα υπάρχουν δύο υποτελή γονίδια, το ένα επιτρέπει την κανονική ανάπτυξη του υπέρου και το άλλο προάγει τον μη σχηματισμό της γύρης (Harvey et al., 1997). Το άνθος της ακτινιδιάς ενώ είναι μορφολογικά ερμαφρόδιτο δεν είναι τέλειο λειτουργικά, έτσι έχουν παρατηρηθεί και περιπτώσεις όπου αρσενικά φυτά έδωσαν μικρούς καρπούς αφού τα άνθη αυτά είχαν μερικώς αυτογονιμοποιηθεί. Κάτι τέτοιο δείχνει ότι υπάρχουν δυνατότητες να δημιουργηθεί στο μέλλον ερμαφρόδιτη ποικιλία η οποία θα παράγει περισσότερο από τις σημερινές αφού δεν θα απαιτούνται οι επικονιαστές.

1.3 Επικονίαση

Η ακτινιδιά ως δίοικο φυτό απαιτεί την ύπαρξη εντός του οπωρώνα αρσενικών δένδρων ως επικονιαστές. Ανάλογα με τις επικρατούσες κάθε φορά μικροκλιματικές συνθήκες το ποσοστό των επικονιαστών κυμαίνεται από 3:1 (Θηλυκά:αρσενικά) μέχρι 8:1. Η αναλογία 8:1 εφόσον είναι εφικτή έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή λόγω μεγαλύτερου αριθμού Θηλυκών παραγωγικών ατόμων.

Επιβάλλεται τα αρσενικά φυτά κατ' αρχάς να συνανθούν ή να ανθούν κλιμακωτά καλύπτοντας την περίοδο άνθησης της καλλιεργούμενης ποικιλίας και παράλληλα να παράγουν άφθονη βιώσιμη γύρη ώστε να έχουμε αποτελεσματική γονιμοποίηση.

Ο τρόπος μεταφοράς της γύρης και ο τύπος επικονίασης (ανεμόφιλη ή εντομόφιλη) αποτέλεσε για μεγάλο χρονικό διάστημα αντικείμενο διαμάχης. Η ύπαρξη και των δύο μηχανισμών γονιμοποίησης φαίνεται να ισχύει (Costa et al 1993), αλλά αποτελεσματικότερος είναι αυτός με την βοήθεια των εντόμων αφού τα ανεμογονιμοποιούμενα άνθη φαίνεται να παράγουν μικρότερους καρπούς σε βάρος και όγκο και με λιγότερα σπέρματα. Αν και τα έντομα είναι αυτά που εγγυώνται ικανοποιητική γονιμοποίηση παρατηρούνται προβλήματα λόγω της μειωμένης ελκυστικότητας των ανθέων σε σχέση με τα άνθη της αυτοφυούς βλάστησης και αυτό λόγω της μη έκκρισης νέκταρος από την ακτινιδιά και ειδικά από την ποικιλία Hayward ενώ σε άλλες ποικιλίες όπως η Abbot παρατηρείται έκκριση ουσίας παρόμοιας με νέκταρ.

Τα έντομα που συμβάλλουν στην επικονίαση της ακτινιδιάς είναι:

1) Οι αυτόχθονες φυσικοί πληθυσμοί μελισσών που παρατηρήθηκαν σε οπωρώνες της Ν. Ζηλανδίας 2) Υμενόπτερα όπως οι (*Bombus* sp) και δίπτερα τα οποία διαδραματίζουν δευτερεύοντα ρόλο στην γονιμοποίηση. 3) Οι κοινές μέλισσες (*Apis mellifera*) οι οποίες είναι το βασικό έντομο που βοηθά στην γονιμοποίηση των ανθέων.

Έτσι η επικονίαση γίνεται με τρεις τρόπους.

1) Εισαγωγή κυψελών στους σπυρώνες ακτινιδιάς σε πυκνότητα 1 κυψέλη / 2 στρέμματα όταν το 15% των θηλυκών φυτών έχει ανθήσει.

2) Επικονίαση με το χέρι: Για τον σκοπό αυτό γίνεται τριβή των στημόνων πάνω στους στύλους των θηλυκών κατά την περίοδο της πλήρης άνθησης των θηλυκών. Ένα αρσενικό άνθος μπορεί να γονιμοποιήσει πέντε έως έξι θηλυκά άνθη. Η επικονίαση με το χέρι είναι εργασία ιδιαίτερα απαιτητική και με μεγάλο κόστος.

3) Τεχνητή γονιμοποίηση με μέσα επίπασης γύρεως: Η γύρη συλλέγεται και αναμειγνύεται με αδρανή υλικά όπως η γύρη των πεύκων ή αναμειγνύονται με ισοτονικά διαλύματα (CBCA Νιτρικού Ασβεστίου $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, Βορικό οξύ (H_3BO_4), καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης σε απεσταγμένο νερό). Η γύρη αυτή μπορεί να επιβιώσει για ικανοποιητικό χρονικό διάστημα μέχρι την εφαρμογή της στα άνθη με ψεκαστικό σύστημα ή με τον ψεκασμό τους σε μέλισσες που βρίσκονται μέσα στις κυψέλες πριν από τις πρωινές τους πτήσεις. Οι μέλισσες σ' αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούνται ως μεταφορείς γύρεως.

1.4 Αναπαραγωγή της ακτινιδιάς

Το πολλαπλασιαστικό υλικό της ακτινιδιάς παράγεται:

α.) **Εγγενώς**: Στην περίπτωση αυτή η παραγωγή γίνεται με σπόρο κι έχει ως αποτέλεσμα τα φυτά λόγω ετεροζυγωτίας και διασπάσεων να παρουσιάζουν γενετική παραλλακτικότητα και να αποκλίνουν από τον μητρικό τύπο.

β.) **Αγενώς**:

ι. Με **ξυλοποιημένα μοσχεύματα** βλαστών τα οποία λαμβάνονται κατά των χειμώνα και τοποθετούνται για ριζοβολία σε κιβώτια ή πλάκες με θερμό υπόστρωμα και παράλληλη χρήση ορμονών ριζοβολίας.

ii. **Ημιξυλοποιημένα μοσχεύματα ή Χλωρά** τα οποία λαμβάνονται κατά την περίοδο Ιουλίου Αυγούστου και ριζοβολούν σε συνθήκες θερμοκηπίου 24 - 25° C ύστερα από εφαρμογή υδρονέφωσης.

iii. **Μοσχεύματα Ρίζας:** Λαμβάνονται τεμάχια ριζών μήκους 25 - 30 cm και διαμέτρου 5 - 20 χιλ. τοποθετούνται σε κιβώτια με θερμαινόμενο υπόστρωμα όπου αφού οι λανθάνοντες οφθαλμοί βλαστήσουν τοποθετούνται κατόπιν για ριζοβολία.

iv. **Μικροπολλαπλασιασμός:** Χρησιμοποιούνται κυρίως τα επάκρια ή άλλα μεριστώματα τα οποία τοποθετούνται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για να περάσουν από τα τρία στάδια ανάπτυξης α) πολλαπλασιασμού β) επιμήκυνση βλαστού και γ) ριζοβολίας. Στη συνέχεια υπόκεινται στη διαδικασία σκληραγώγησης σε συνθήκες θερμοκηπίου και αφού ελεγχθούν για την γενετική τους ταυτότητα και σταθερότητα χρησιμοποιούνται ως πολλαπλασιαστικό υλικό.

v. **Άλλες μέθοδοι πολλαπλασιασμού και προοπτικές:** Εκτενείς εργασίες έδειξαν ότι μπορούμε να επιτευχθεί αναγέννηση φυταρίων με οργανογένεση ή καλλογένεση με χρήση τεμαχίων φύλλου, βλαστού, ρίζας ή μίσχου για τις καλλιεργούμενες ποικιλίες Hayward, Tomuri, Katiuscia καθώς και για υβρίδια *A. deliciosa* x *A. arguta* (Famiani et al., 1997). Η εφαρμογή της κυτταροκαλλιέργειας μπορεί να αξιοποιηθεί και ως μέθοδος δημιουργίας σωμακλωνικής παραλλακτικότητας διευρύνοντας έτσι την υπάρχουσα γενετική παραλλακτικότητα (Harada et al., 1975; Standardi et al., 1983). Η δημιουργία υβριδίων μέσω εγγενούς πολλαπλασιασμού για την επίτευξη εκλεκτών (elite) γενοτύπων τόσο για χαρακτηριστικά ποιότητας όσο και για ανθεκτικότητες σε διάφορες καταπονήσεις όπως οι χαμηλές θερμοκρασίες είναι πρακτικώς αδύνατη κυρίως λόγω του διαφορετικού βαθμού πλοειδίας αλλά και λόγω αδυναμίας επιβίωσης του ζυγωτού (Hayward 2n=6x ευαίσθητη στο ψύχος και των *A. arguta*, 2n= 4x, *A. kolomikta* 2n= 2x, *A. polygama*

2n=2x που είναι ανθεκτικά). Έρευνες για την δημιουργία υβριδίων με διειδικές διασταυρώσεις (*A. arguta* 2n=4x με *A. deliciosa* 2n=6x) έδωσαν και διπλοειδείς απογόνους 2n=2x αντί του αναμενόμενου (2n=5x) τέτοιοι απόγονοι πιθανόν να προήλθαν από μη γονιμοποιημένα άνθη ενδεχομένως παρθενοκαρπικά (Chat j. and P. Y. Dumoulin 1997). Αξιοποίηση τεχνικών, όπως σωματικός ο υβριδισμός, καθιστά δυνατή την δημιουργία τέτοιων διειδικών υβριδίων (Χίαιο et al., 1997). Έτσι αυξάνεται η γενετική παραλλακτικότητα της ακτινιδιάς ιδιαίτερα χρήσιμη σε προγράμματα βελτίωσης για την δημιουργία νέων ποικιλιών με επιθυμητά χαρακτηριστικά.

1.5 Τεχνικές μοριακής γενετικής ανάλυσης.

Η παραλλακτικότητα των φυσικών πληθυσμών, είναι ιδιαίτερα επιθυμητή για την δημιουργία νέων ποικιλιών καλλιεργούμενων φυτών. Αυτή η παραλλακτικότητα είναι που οδήγησε στην ταξινόμηση των πληθυσμών σε ομάδες συγγένειας (Τάξη, οικογένεια, γένος, είδος κ.λ.π.). Η διαπίστωση και μελέτη της παραλλακτικότητας γίνεται με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά (μονο ή ολιγογονιδιακά) η παρατηρούμενη παραλλακτικότητα οφείλεται στην ύπαρξη των αλληλομόρφων γονιδίων και στους συνδυασμούς τους. Η μελέτη της ακολουθεί την συμβατική μενδελική γενετική ανάλυση αλλά και την σύγχρονη μοριακή. Στα ποιοτικά χαρακτηριστικά (πολυγονιδιακά) η αναγνώριση των διαφορών και η μελέτη τους με προσεγγίσεις της ποσοτικής γενετικής και βιοχημικές αναλύσεις με όλα τα προβλήματα που αυτή συνεπάγεται και ειδικότερα την αλληλεπίδραση του γενοτύπου με το περιβάλλον.

Η αδυναμία διαπίστωσης φαινοτυπικών διαφορών δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι δεν υπάρχουν και γενετικές διαφορές. Έτσι η δυνατότητα μελέτης της βασικής του δομής δηλαδή το γένωμα, με την βοήθεια μοριακών δεικτών μπορεί να αναγνωρίσει γενετική παραλλακτικότητα ακόμη κι εκεί που δεν

είναι εφικτή η φαινοτυπική διαφοροποίηση. Οι μοριακοί δείκτες που επιτρέπουν την αποτύπωση του γενώματος είναι ιδιαίτερα πολύτιμοι επειδή:

- 1) τα μοριακά δεδομένα είναι κατά βάση γενετικά
- 2) επιτρέπουν την λεπτομερή εξέταση του γενώματος
- 3) δίνουν την δυνατότητα ευχερής ανάλυσης και μελέτης των γενωμικών τραπεζών δεδομένων
- 4) μπορούν να διακρίνουν σχέσεις συγγένεια των χρομοσώμων ομόλογα ή ετερόλογα
- 5) μπορούν να δώσουν μια εκτίμηση της γενετικής συγγένεια ή απόκλισης μεταξύ ατόμων και πληθυσμών
- 6) διευκολύνουν την κατανόηση των μηχανισμών εξέλιξης των ειδών στο χρόνο. (Kresovich et al., 1995)

Οι τελευταίες εξελίξεις στον τομέα της μοριακής βιολογίας και κυρίως στην ανάπτυξη της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για την αναπαραγωγή ή αλληλούχιση τμημάτων DNA καθώς και ανάλυση των δεδομένων καθιστά τις τεχνικές μοριακής γενετικής ανάλυσης πολύτιμο μέσο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διαλογή, χαρακτηρισμό και αξιολόγηση της γενετικής παραλλακτικότητας. Η βιβλιογραφία σχετικά με τις τεχνικές και την αξιοποίησή τους στα υπ' όψιν θέματα που έχουν προηγουμένως αναφερθεί είναι ιδιαίτερα γνωστή και δεν μπορεί ούτε καν συνοπτικά να αναφερθεί στα πλαίσια αυτής της εργασίας. Από την ποικιλία των προσεγγίσεων της μοριακής γενετικής ανάλυσης που αναφέρονται για αναγνώριση πολυμορφισμών στο επίπεδο του DNA αναφέρονται οι τρεις βασικές 1) προσεγγίσεις χωρίς την χρήση PCR 2) Τεχνικές PCR με τυχαίους εκκινήτες 3) τεχνικές PCR σε εστιασμένες περιοχές του γενώματος καθώς και αλληλούχισης τμημάτων DNA.

1.5.1. Προσεγγίσεις χωρίς χρήση θερμοκυκλοποιητή (PCR)

Πολυμορφισμοί τμημάτων γενώματος που προέκυψαν από την δράση περιοριστικών ενζύμων (Restriction Fragments Length Polymorphisms). Είναι η πρώτη τεχνική που αναπτύχθηκε κι επιτρέπει την διάγνωση



RFLP

πολυμορφισμών στο επίπεδο της αλληλουχίας τμημάτων DNA. Αυτή η τεχνική βασίζεται στη χρήση περιοριστικών ενζύμων για κατάτμηση του DNA σε κομμάτια. Τα τμήματα διαχωρίζονται σε πηκτή μέσο ηλεκτροφόρισης, κατόπιν μεταφέρονται σε μια επιφάνεια ζελατίνης όπου στερεώνονται με ηλεκτροχημικούς δεσμούς και στη συνέχεια υβριδίζονται με ειδικούς μοριακούς ιχνηλάτες (probes). Οι δείκτες αυτοί είναι μικρές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που είναι ομόλογες με ειδικές θέσεις του κατατμημένου DNA. Έτσι μπορούν να υβριδιστούν λόγω συμπληρωματικής αλληλουχίας και δίνουν ορατά σήματα της ύπαρξής τους χαρακτηρίζοντας το τμήμα εκείνο του DNA με το οποίο υβριδίστηκαν. Εξειδικευμένοι δείκτες (ενζυμικοί συνδυασμοί) δίνουν σταθερά αναπαραγόμενους μορφότυπους για κάθε άτομο. Η παραλλακτικότητα του μήκους των τεμαχίων του DNA προκύπτει από μεταλλάξεις στο γένωμα και κατά συνέπεια αλλάζει η θέση στο γένωμα όπου δρουν τα περιοριστικά ένζυμα. Η RFLP ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την δημιουργία γενετικών χαρτών και για την εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας στα καλλιεργούμενα φυτά. Η τεχνική RFLP έχει τα ακόλουθα σημαντικά πλεονεκτήματα: 1) Τα αποτελέσματα είναι επαναλήψιμα και οι μορφότυποι μπορούν να αναπαραχθούν αξιόπιστα τόσο στο χρόνο όσο και σε διαφορετικά εργαστήρια 2) είναι συγκυρίαρχος μοριακός δείκτης και κατά συνέπεια μπορεί να διαφοροποιεί τους ομοζύγωτους από τους ετεροζύγωτους γενότυπους ενώ μπορεί να αποτυπώσει και τα αλληλόμορφα τμήματα DNA. 3) δεν απαιτείται εξειδικευμένη γνώση της εξεταζόμενης αλληλουχίας αφού οι δείκτες αφενός μπορούν να έχουν τυχαία αλληλουχία αφετέρου μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για διαλογή και αξιολόγηση γενοτύπων. Σημαντικό μειονέκτημα της ανάλυσης μέσω πολυμορφισμών με RFLPs είναι η σπάνια εμφάνιση τους σε άτομα που έχουν συγγένεια σε επίπεδο είδους. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί με την εξειδικευμένη ανάλυση συγκεκριμένων τμημάτων του γενώματος στις οποίες

το κύριο χαρακτηριστικό είναι η επανάληψη συγκεκριμένης αλληλουχίας στο γένωμα, και ο πολυμορφισμός μεταξύ των ατόμων οφείλεται στον αριθμό των επαναλήψεων της βασικής επαναλαμβανόμενης δομής στο ομόλογο τμήμα του γενώματος μεταξύ των ατόμων. Αυτές οι περιοχές είναι γνωστές ως μικροδορυφορικές περιοχές (microsatellites) ή επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (SSRs) όπου ο αριθμός των βάσεων της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας ποικίλει από δύο έως οκτώ βάσεις, επίσης υπάρχουν και οι μίνιδορυφορικές περιοχές (minisatellites) όπου απαντούνται μεγαλύτερου μήκους επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, από 16 έως 100 βάσεις. Τέτοιες περιοχές βρίσκονται σε περιοχές του κεντρομερούς, τελομερικές περιοχές ή σε βρόχους χρωματίνης και συντελούν στο ζευγάρισμα και την σύναψη των χρωμοσώμων κατά την διαδικασία της μείωσης.

RFLPS



Τέτοιου είδους περιοχές είναι ιδιαίτερα πολυμορφικές οπότε η RFLP ανάλυση με χρήση μοριακών ιχνηλατών (probes) για μικρο και μίνι δορυφορικές περιοχές δίνει μορφότυπους πολλών αλληλομόρφων οπότε υπάρχει ικανότητα διάκρισης ακόμη και σε άτομα ενός πληθυσμού με στενή γενετική βάση. Η παραλλακτικότητα προκύπτει από τις διαφορές των επαναλήψεων της βασικής επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας και αναφέρονται ως (Variable Numbers of Tandem Repeats). Επειδή οι VNTRs είναι ιδιαίτερα πολυμορφικοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαλογή, αναγνώριση και αποτύπωση καλλιεργούμενων και μη ποικιλιών, για μελέτες εκτίμησης της παραλλακτικότητας εντός και μεταξύ πληθυσμών καθώς και για εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων μεταξύ τους.

1.5.2. Τεχνικές με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε τυχαίες θέσεις στο γένωμα

Με την ανακάλυψη του θερμοκυκλοποιητή (PCR) προστέθηκαν και νέες τεχνικές στις ήδη υπάρχουσες για εκτίμηση και αποτύπωση της γενετικής

παραλλακτικότητας. Αυτές οι τεχνικές δεν απαιτούν εξειδικευμένη γνώση της αλληλουχίας των τμημάτων του γενώματος που πρόκειται να αναλυθεί οπότε μπορούν να εφαρμοσθούν απευθείας στους οργανισμούς. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην χρήση ενός τυχαίου εκκινητή (ομόλογο σε τυχαία θέση του γενώματος) στην αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Αποτέλεσμα αυτού είναι η ενίσχυση τυχαίων διακριτών τμημάτων του γενώματος. Κάθε προϊόν της PCR προέρχεται από μία περιοχή του γενώματος η οποία έχει δύο τμήματα ομόλογα ή μερικώς ομόλογα με την ακολουθία του εκκινητή. Τα τμήματα αυτά βρίσκονται το ένα στην μια αλλοσίδα του DNA και το άλλο στην συμπληρωματική της. Και οι δύο αυτές θέσεις βρίσκονται αρκετά κοντά ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η ενίσχυση μέσω της τεχνικής PCR. Η πιο γνωστή τεχνική είναι η RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ανάλυση στην οποία οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι δεκαμερή ή εικοσαμερή όπου τα προϊόντα ενίσχυσης διαχωρίζονται σε πηκτή αγαρόζης παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και οι ζώνες γίνονται ορατές κάτω από ακτινοβολία υπεριώδους φωτός (Sambrook et al., 1989).

Οι πολυμορφισμοί καταγράφονται ως παρουσία ή απουσία ενισχυμένων ζωνών οι οποίες προκύπτουν από διαφορές στην αλληλουχία της μιας ή και της συμπληρωματικής αλλοσίδας στο γένωμα του οργανισμού. Η τεχνική RAPD είναι απλή και γρήγορη και απαιτεί δύο μόνο συσκευές, τον θερμοκυκλοποιητή και μια ηλεκτροφόρηση αγαρόζης. Απαιτεί μικρότερες ποσότητες DNA (10 ng/αντίδραση) σε σχέση με την RFLP ανάλυση. Η όλη διαδικασία είναι αυτοματοποιημένη και έχει δείξει ότι δίνει υψηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού σε σχέση με την RFLP ανάλυση όταν οι δύο τεχνικές εφαρμόζονται στο ίδιο βιολογικό υλικό. Η ανάλυση RAPD έχει δείξει ότι δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα για τον διαχωρισμό και αξιολόγηση ατόμων κυρίως σε επίπεδο μεταξύ των ειδών. (Karp and Edwards 1995 και εν αυτώ αναφορές)

RAPDs

Η RAPD ανάλυση δεν είναι ανεξάρτητη περιορισμών: 1) Οι RAPD μοριακοί δείκτες είναι κυριαρχικοί δείκτες όπου μόνο η ομοζύγωτη κατάσταση είναι ορατή και βασίζεται στην παρουσία ή απουσία ζωνών ιδίου μοριακού βάρους στο ηλεκτροφόρημα αγαρόζης. 2) Η παρουσία ζώνης ιδίου μοριακού βάρους μεταξύ δύο ατόμων δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι και στα δύο άτομα έχει ενισχυθεί η ίδια περιοχή στο γένωμα, δηλαδή δεν γνωρίζουμε πραγματικά εάν η ζώνες είναι πραγματικά ανάλογες αν και αυτή η υπόθεση γίνεται πάντα δεκτή κατά την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων. 3) Παράλληλα με τις προς εξέταση ζώνες παράγονται κι ένας μεγάλος αριθμός πέρα από τις επιθυμητές αναλυόμενες οι οποίες δημιουργούν πρόβλημα ιδιαίτερα κατά την ταυτοποίηση ατόμων αφού δεν μπορούμε πλέον να αναφερόμαστε σε μία και μόνη περιοχή του γενώματος. Οι επιπλέον ζώνες δεν δημιουργούν σοβαρό πρόβλημα όταν εκτιμούνται συχνότητες αλληλομόρφων για γενετική ανάλυση πληθυσμών αλλά παράγουν μειωμένης εγκυρότητας αποτελέσματα σε σχέση με συγκυρίαρχους μοριακούς δείκτες (RFLPs, VNTRs, SSRs). Για να μπορέσει να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα και να μην προκύπτουν μη έγκυρες (biased) εκτιμήσεις παραμέτρων θα πρέπει το μέγεθος του δείγματος των ατόμων να αυξηθεί (δύο έως δέκα φορές) σε σχέση με τους συγκυρίαρχους μοριακούς δείκτες.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα της RAPD ανάλυσης είναι τα σφάλματα που μπορεί να προέρχονται από τον εκάστοτε χρήστη της μεθοδολογίας αφού τα αποτελέσματα μπορεί να παραλλάσσουν μεταξύ δύο διαφορετικών χρονικά εφαρμογών της μεθοδολογίας ακόμη κι όταν τα υλικά και οι συνθήκες παραμένουν σταθερές. Τα αποτελέσματα αυτού του είδους της ανάλυσης δεν είναι κατά βάση επαναλήψιμα μεταξύ των εργαστηρίων ιδιαίτερα όταν αυτά χρησιμοποιούν διαφορετικές συσκευές θερμοκυκλοποιητή (PCR) και διαφορετικής προέλευσης ένζυμα πολυμεράσης και διαλύματα.

Μια τεχνική με καλύτερα αποτελέσματα και ποιο έγκυρα των RAPDs είναι αυτή των AFLPs (Amplified Fragments Length Polymorphisms) κατά την


AFLP's

οποία πρώτα γίνεται τεμαχισμός του DNA με ένζυμα περιορισμού και κατόπιν ακολουθεί η διαδικασία της PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται έχουν βασικά την ακολουθία της περιοχής περιορισμού και προστίθενται στην αλληλουχία τους δύο ή τρία νουκλεοτίδια οπότε η ενίσχυση είναι πιο εξειδικευμένη και ο αριθμός των ενισχυόμενων περιοχών που θα αναλυθούν σε μία πηκτή περιορίζονται σε 150 έως 200 πράγμα που κάνει εφικτή την εκτενή ανάλυσή τους. Η ανάλυση γίνεται σε ζώνες που προηγουμένως έχουν επισημανθεί μέσω του εκκινητή με ραδιενεργό φώσφορο και οι ζώνες γίνονται ορατές μέσω έκθεσης της πηκτής σε φιλμ ευαίσθητο στις ακτίνες X.

Παρατηρούνται δύο διαφορετικοί τύποι πολυμορφισμών:

1) Λόγω μετάλλαξης στο σημείο περιορισμού ή λόγω των επιπρόσθετων νουκλεοτιδίων εξειδίκευσης οπότε μπορεί να παρουσιάζονται ζώνες σε ένα άτομο και όχι σε κάποιο άλλο. 2) Λόγω παρεμβολών μικρών τμημάτων DNA ή και παραλήψεων εντός των τμημάτων του τεμαχισμένου DNA οπότε οι ενισχυόμενες ζώνες θα διαφέρουν στο μήκος τους. Το πλεονέκτημα της AFLP ανάλυσης είναι ότι μπορούν να παρατηρηθούν πολυμορφισμοί και κάτω από το επίπεδο του είδους πράγμα που την καθιστά χρήσιμο εργαλείο ποιο έγκυρο από την ανάλυση με RAPDs σε άτομα συγγενή στο επίπεδο του είδους. Γενικότερα οι AFLPs δείκτες είναι κυριαρχικοί μοριακοί δείκτες όπου τα ενισχυόμενα τμήματα του γενώματος και διαχωριζόμενα σε πηκτή είναι άγνωστα. Όπως και στην RAPD ανάλυση έτσι και στην AFLP για δύο ενισχυόμενα τμήματα του γενώματος, δύο διαφορετικών ατόμων, με το ίδιο μήκος δεν μπορούμε να συμπεράνουμε θετικά ότι προέρχονται από τη ίδια περιοχή του γενώματος.

1.5.3. Εστιασμένη PCR ανάλυση και αλληλούχηση.

Το χαρακτηριστικό αυτών των τεχνικών είναι ότι οι εκκινητές σε αντίθεση με άλλες τεχνικές (RAPDs) είναι σχεδιασμένοι να στοχεύουν σε εξειδικευμένες περιοχές του γενώματος. Τα προϊόντα ενίσχυσης μπορούν να

αναλυθούν σε πηκτή αγαρόζης αλλά η ανάλυσή τους είναι εφικτή μόνο όταν οι διαφορές μήκους των ενισχυόμενων τμημάτων του γενώματος αντιστοιχούν σε πολλές βάσεις. Σε αντίθετη περίπτωση θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν πιο ευαίσθητα συστήματα διαχωρισμού και ανάλυσης των ζωνών όπως σε πηκτή ακρυλαμίδης ή ηλεκτροφόριση σε συσκευή αλληλούχισης γενώματος π.χ. (TGGE Thermal Gradient Gel Electrophoresis, DGGE Denaturing Gradient gel Electrophoresis, SSCP Single Strad Conformation Polymorphism). Μια άλλη δυνατότητα μέσω τεχνικής η οποία συγκρίνει αλληλουχίες χωρίς όμως να αλληλουχεί τα παραγόμενα τμήματα μπορεί να επιτευχθεί με συνδυασμό PCR και RFLP ανάλυση. Σύμφωνα με αυτήν την προσέγγιση τα ενισχυόμενα τμήματα του γενώματος καταρχήν τεμαχίζονται με χρήση ενός εξειδικευμένου ενζύμου περιορισμού και κατόπιν τα προϊόντα διαχωρίζονται σε πηκτή αγαρόζης παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου. Τα φυτά έχουν τρία διαφορετικά γενώματα που βρίσκονται σε τρία διαφορετικά οργανίδια του κυττάρου, άρα υπάρχουν και τρεις πηγές αλληλουχιών κατάλληλες για εστιασμένη PCR ανάλυση: χλωροπλαστικό γένωμα (cp DNA), μιτοχονδριακό γένωμα (mt DNA) και το πυρηνικό γένωμα.

Το χλωροπλαστικό γένωμα ακλουθεί μητρική κληρονομία στα περισσότερα φυτά, είναι άφθονο στα φύλλα και γι' αυτό είναι εύκολη η απομόνωσή του. Η πλήρης αποκωδικοποίηση και αλληλούχιση του χλωροπλαστικού γενώματος έχει γίνει για μερικά φυτά (π.χ. καπνός, ρύζι) και φάνηκε ότι διατηρεί σταθερά την δομή του, το μήκος του, τα γονίδιά του και την σειρά κατάταξής τους. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν το συγκεκριμένο γένωμα κατάλληλο για φυλογενετικές μελέτες.

Το μιτοχονδριακό γένωμα σύμφωνα με μελέτες είναι μια πηγή αλληλουχιών με περιορισμένη χρήση για την μελέτη της παραλλακτικότητας των ειδών. Είναι λιγότερο άφθονο στα φύλλα απ' ό τι το χλωροπλαστικό γένωμα, είναι δυσκολότερη η απομόνωσή του, υπάρχουν περιορισμένοι

μοριακοί δείκτες διαθέσιμοι για την διερεύνησή του και είναι λιγότερο μελετημένο. Οι υψηλοί ρυθμοί δομικών διευθετήσεων στο μιτοχονδριακό γένωμα σε συνδυασμό με τους μικρούς ρυθμούς σημειακών μεταλλάξεων το καθιστούν περιορισμένης χρησιμότητας για γενετική ανάλυση των οικογενειών και των ειδών. Οι μεγάλες συχνότητες ανακατανομής του γενώματος η οποία μπορεί εύκολα να αναγνωρισθεί μέσω RFLP ανάλυση σημαίνει ότι το μιτοχονδριακό γένωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση παραλλακτικότητας σε επίπεδο εντός των ειδών και πληθυσμών.

Στο πυρηνικό γένωμα υπάρχει μια περιοχή η οποία έχει χρησιμοποιηθεί κατ'εξοχή για μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας και είναι η περιοχή που κωδικοποιεί τις ριβοσωμικές υπομονάδες. Τα ριβοσωμικά γονίδια βρίσκονται σε μια ειδική χρωμοσωμική περιοχή (*Nor*) συνήθως σε ένα ή δύο χρωμοσώματα και χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό σταθερότητας αλληλουχίας μεταξύ ατόμων της ίδιας γενιάς μιας οικογένειας. Ειδικότερα υπάρχουν περιοχές που είναι μεταξύ των ριβοσωμικών γονιδίων οι οποίες παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα παραλλακτικότητας ως προς το μήκος τους και χρησιμοποιούνται για έλεγχο και ανάλυση πολυμορφισμών κάτω από το επίπεδο του είδους.

Οι τεχνικές εστιασμένης PCR ανάλυσης δίνουν υψηλής ποιότητας και πιστότητας δεδομένα και οι πληροφορίες οι οποίες προκύπτουν είναι συγκεκριμένες και αφορούν μόνο τα τμήματα που αναλύονται τα οποία είναι εκ των προτέρων γνωστά κι έτσι αποφεύγονται ασάφειες στις αναλύσεις όπως με χρήση RAPDs, AFLPs ή τυχαίους RFLPs δείκτες. Για την μελέτη πληθυσμών η χρήση γενώματος οργανιδίων σε συνδυασμό με το πυρηνικό γένωμα μπορεί να δώσει ιδιαίτερα διαφωτιστικά στοιχεία σε σχέση με τους μηχανισμούς διαφοροποίησης των ατόμων, τη ροή γονιδίων και την κατανομή τους μεταξύ ατόμων εντός ή και μεταξύ των ειδών. Αντίθετα τα προϊόντα για ανάλυση των τεχνικών RAPD και RFLP δεν είναι γνωστό σε ποιο από τα τρία

γενώματα αντιστοιχούν και, παρόλο που δεν υπάρχουν αποδείξεις, κάποια από τα προϊόντα που παράγονται με τις ανωτέρω τεχνικές αντιστοιχούν πέρα από το πυρηνικό DNA στο χλωροπλαστικό και στο μιτοχονδριακό γένωμα. Σημαντικό προτέρημα των τεχνικών εστιασμένης PCR ανάλυσης είναι ότι οι μοριακές μέθοδοι ανάλυσης μπορούν να συνδυαστούν με συμβατικές γενετικές αναλύσεις. Έτσι αναλύσεις γενεαλογίας με συνδυασμένη ανάλυση για μελέτη της παραλλακτικότητας εντός και μεταξύ πληθυσμών μπορούν να μας δώσουν σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο εξέλιξης των ειδών.

Πέρα όμως από τις θετικές προεκτάσεις της μοριακής γενετικής ανάλυσης με χρήση τεχνικών εστιασμένου PCR υπάρχουν και περιορισμοί οι οποίοι συνοψίζονται ως ακολούθως: 1) Θα πρέπει οι συχνότητες των πολυμορφισμών να είναι αρκετά υψηλές για να μπορέσουν να διαγνωστούν και να αξιοποιηθούν 2) παρόλο που τα δεδομένα είναι υψηλής πιστότητας και ποιότητας αντιπροσωπεύουν ένα μικρό μέρος του γενώματος ειδικότερα μια αλληλουχία με την βοήθεια της οποίας γίνονται συγκρίσεις μεταξύ των ατόμων. 3) Οι γενωμικές περιοχές οι οποίες εξετάζονται θα πρέπει να πληρούν δύο κριτήρια i) Θα πρέπει η εκάστοτε γενωμική περιοχή να είναι διατηρήσιμη μεταξύ των ατόμων εντός των ειδών αφού οι εκκινητές που σχεδιάζονται θα πρέπει να ενισχύουν τη ίδια περιοχή σε ένα εύρος ειδών. ii) Οι πολυμορφισμοί στις εξεταζόμενες περιοχές θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλοί ώστε να είναι χρήσιμοι για γενετική ανάλυση στο επίπεδο συγγένειας πληθυσμού.

Οι μικροδορυφόροι ή απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Simple Sequence Repeats) είναι περιοχές που υφίστανται συχνά μεταλλάξεις. Όταν αυτές χρησιμοποιούνται ως RFLP ή VNTR δείκτες είναι τυχαίες στο γένωμα των ατόμων των πληθυσμών. Το πρόβλημα της χρησιμοποίησής τους χρήσης τους για γενετική ανάλυση είναι ότι οι επαναλαμβανόμενες αυτές αλληλουχίες βρίσκονται σε πολλές περιοχές του γενώματος και είναι δύσκολη η ερμηνεία

των αποτελεσμάτων. Ο σχεδιασμός όμως εκκινητών που ενισχύουν μία και μόνη μικροδορυφική περιοχή δίδει αποτελέσματα πιο σαφή, κατανοητά, που ακολουθούν μενδελική κληρονομηση και επιτρέπει την σαφή διάκριση των ατόμων μεταξύ τους. Η υπεροχή της μοριακής γενετικής ανάλυσης με τη βοήθεια μικροδορυφόρων στο γένωμα βασίζεται στα εξής τέσσερα γεγονότα: 1) αντιστοιχούν σε μία και μόνη γενωμική περιοχή, 2) υπόκεινται συχνά σε μεταλλάξεις και παρατηρούνται πολλά αλληλόμορφα, 3) Είναι συγκυρίαρχοι μοριακοί δείκτες και μπορούν να αποκαλυφθούν και να αναλυθούν εύκολα μέσω της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR. 4) Είναι ενδιαφέροντα μέσα και τεχνικές γενετικής ανάλυσης αφού χαρακτηρίζονται από επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων τόσο στο χρόνο όσο και μεταξύ των εργαστηρίων και επιπλέον εμφανίζουν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού. Όπως και με τους δείκτες VNTRs έτσι και με τους SSRs η παραλλακτικότητα που παρατηρείται μέσω των πολυμορφισμών οφείλεται σε αλλαγές στον αριθμό της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας. Τα αποτελέσματα ενίσχυσης διαχωρίζονται κατά περίπτωση ανάλογα με τις διαφορές μήκους των ενισχυόμενων τμημάτων (μεγάλες ή μικρές) σε πηκτή αгарόζης ή σε πηκτή ακρυλαμίδης αντίστοιχα.

SSR's

Η ανάλυση μέσω μικροδορυφορικών περιοχών υπόκειται και σε περιορισμούς όπως: 1) Αν και είναι συγκυρίαρχοι μοριακοί δείκτες ο τρόπος κληρονομησης και η παραλλακτικότητα που δημιουργείται στον χρόνο κατά την εξέλιξη των ειδών είναι διαφορετική απ' αυτές των κανονικά κωδικοποιημένων περιοχών. 2) Δημιουργούνται εύκολα νέα αλληλόμορφα μέσω άνισης σύζευξης και συχνών μεταλλάξεων πράγμα που περιορίζει την χρήση τους για εκτίμηση της συγγένειας ατόμων μεταξύ τους σε ένα μικρό αριθμό γενεών. 3) Ο μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων δυσκολεύει την εκτίμηση των συχνοτήτων τους 4) Η συχνότητα εμφάνισης τέτοιων μικροδορυφορικών περιοχών στους φυτικούς οργανισμούς είναι πολύ

μικρότερη απ' αυτή των ζωικών οργανισμών οπότε απαιτούνται εκτενείς αναλύσεις του γενώματος για την εύρεσή τους. Για να είναι χρήσιμοι τέτοιοι μοριακοί δείκτες πρέπει η περιοχή η οποία ενισχύουν να υπάρχει και να είναι πολυμορφικοί σε επίπεδο γένους και όχι μόνο είδους. Γενικότερα η μοριακή γενετική ανάλυση μέσω μικροδορυφορικών περιοχών είναι κατάλληλη για διάκριση μεταξύ ατόμων πολύ στενά συγγενών στο επίπεδο του πληθυσμού.

Σκοπός της παρούσης ερευνητικής εργασίας ήταν: 1) η αξιολόγηση μοριακών δεικτών μικροδορυφορικών περιοχών (SSRs) ως προς την αποτελεσματικότητά τους να διαφοροποιούν και να επιλέγουν γενοτύπους ακτινιδιάς και 2) Η αναγνώριση και αποτύπωση γενοτύπων ακτινιδιάς καλλιεργούμενων και μη.

SSR's



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γενετικό υλικό: Το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των SSRs και στην συνέχεια την μοριακή αποτύπωση ήταν 24 γενότυποι των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*. Οι 11 γενότυποι ήταν εξαπλοειδείς και ανήκαν στο είδος *A. deliciosa*, και ήταν εμπορικές ποικιλίες που καλύπτουν το μεγαλύτερο ποσοστό των καλλιεργούμενων ποικιλιών παγκοσμίως (πίνακας 1).

Πίνακας 1: Γενότυποι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση πολυμορφισμών μικροδορυφορικών περιοχών γενωμικού DNA σε άτομα του γένους *Actinidia*.

| <i>A. deliciosa</i> 2n=6x | | | | <i>A. chinensis</i> 2n=4x | | | |
|---------------------------|----------|-------------|-------|---------------------------|-------|-----------|-------|
| | Όνομα | Προέλευση | φύλλο | | Όνομα | Προέλευση | Φύλλο |
| 1 | Hayward | New Zealand | Θ | 1 | K1-89 | Kiwi uno | Θ |
| 2 | Top Star | Italy | Θ | 2 | K1-90 | Kiwi uno | Θ |
| 3 | Kouryoku | Japan | Θ | 3 | K1-91 | Kiwi uno | Θ |
| 4 | Bruno | New Zealand | Θ | 4 | M 3 | Kiwi uno | A |
| 5 | 2.084 | Italy | Θ | 5 | C 1 | China | Θ |
| 6 | Autari | Italy | A | 6 | C 2 | China | Θ |
| 7 | Matua | New Zealand | A | 7 | C 3 | China | Θ |
| 8 | Tomuri | New Zealand | A | 8 | C 4 | China | Θ |
| 9 | M 51 | New Zealand | A | 9 | C 5 | China | Θ |
| 10 | M 52 | New Zealand | A | 10 | C 6 | China | Θ |
| 11 | M 54 | New Zealand | A | 11 | C 7 | China | Θ |
| | | | | 12 | C 9 | China | Θ |
| | | | | 13 | C 10 | China | A |

Δεκατρείς γενότυποι ήταν τετραπλοειδείς και ανήκαν στο είδος *A. chinensis* όπου τέσσερις απ' αυτούς ήταν εμπορικές καλλιεργούμενες ποικιλίες και οι υπόλοιποι εννέα ήταν επιλογές νέων γενοτύπων ακτινιδιάς από βοτανικό κήπο της Κίνας του Πανεπιστημίου του Wuhan.

Εκκινητές μικροδορυφορικών περιοχών

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 38 ζεύγη εκκινητών, (29 απ αυτούς χρησιμοποιήθηκαν έτος 1999 ενώ 9 το έτος 2000) που δημιουργήθηκαν στο Πανεπιστήμιο του Udine της Ιταλίας στα πλαίσια Κοινοτικού προγράμματος αξιολόγησης νέων γενοτύπων ακτινιδιάς του είδους *A. chinensis*. Από τους 29 εκκινητές οι 14 απ' αυτούς στόχευαν σε επαναλαμβανόμενες μικροδορυφορικές ακολουθίες του τύπου AG/CT και οι υπόλοιποι 15 στόχευαν σε επαναλαμβανόμενες μικροδορυφορικές ακολουθίες του τύπου AC/GT (πίνακας 2).

Πίνακας 2 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση πολυμορφικών περιοχών σε άτομα του είδους *A. deliciosa* και *A. chinensis*.

| Έτος 1999 | | | |
|-----------|----------------|-----|----------------|
| a/a | Περιοχές AC/GT | a/a | Περιοχές AG/CT |
| 1 | UDK 96-001 | 1 | UDK 97-401 |
| 2 | UDK 96-009 | 2 | UDK 97-402 |
| 3 | UDK 96-015 | 3 | UDK 97-404 |
| 4 | UDK 96-016 | 4 | UDK 97-405 |
| 5 | UDK 96-018 | 5 | UDK 97-406 |
| 6 | UDK 96-020 | 6 | UDK 97-407 |
| 7 | UDK 96-022 | 7 | UDK 97-408 |
| 8 | UDK 97-026 | 8 | UDK 97-409 |
| 9 | UDK 96-028 | 9 | UDK 97-411 |
| 10 | UDK 96-030 | 10 | UDK 97-413 |
| 11 | UDK 96-033 | 11 | UDK 97-414 |
| 12 | UDK 96-034 | 12 | UDK 97-415 |
| 13 | UDK 96-037 | 13 | UDK 97-420 |
| 14 | UDK 96-039 | 14 | UDK 97-422 |
| 15 | UDK 96-040 | 15 | |
| Έτος 2000 | | | |
| 1 | UDK96-035 | 6 | UDK 99-168 |
| 2 | UDK 96-101 | 7 | UDK 96-158 |
| 3 | UDK 96-092 | 8 | UDK 99-141 |
| 4 | UDK 96-088 | 9 | UDK 96-159 |
| 5 | UDK 99-156 | | |

Κατά το έτος 2000 χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον εννέα εκκινητές οι οποίοι στόχευαν σε διβασικές μικροδορυφορικές περιοχές τύπου AC/GT.

Οι δύο τύποι μικροδορυφορικών ακολουθιών (AC/GT και AG/CT) διέφεραν ως προς τον αριθμό επαναλήψεων της επαναλαμβανόμενης ακολουθίας ειδικότερα στις περιοχές AC/GT ο αριθμός των επαναλήψεων ήταν $n = 14$ με εύρος (8-21) ενώ για τις περιοχές AG/CT ήταν $n = 20$ με εύρος (15-26), τα προϊόντα ενίσχυσης είχαν μήκους από 85-258 βάσεις.

Εξαγωγή DNA

Το Δεκέμβριο του 1998 και 1999 ελήφθησαν βλαστοί που είχαν εισέλθει στο στάδιο του ληθάργου από τον κάθε ένα από τους 24 γενότυπους. Τα μοσχεύματα τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (4°C) για 15 ημέρες, στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε φιάλες με νερό σε μέρος φωτεινό σε θερμοκρασία δωματίου για να βλαστήσουν οι οφθαλμοί και εμφανιστούν τα πρώτα φύλλα.

Για την εξαγωγή DNA χρησιμοποιήθηκε 1 γρ. φρέσκου νεαρού ιστού φύλλων ο οποίος προήλθε από βλάστηση των οφθαλμών των προηγούμενων μοσχευμάτων (Doyle and Doyle 1990). Ο ιστός κονιορτοποιήθηκε σε γουδί παρουσία υγρού αζώτου θερμοκρασίας -196 °C ώστε να απενεργοποιηθούν όλα τα ένζυμα και ιδιαίτερα οι DNAάσες ώστε αφενός να μην αποδομηθεί το DNA και αφετέρου να έχουμε την μεγαλύτερη δυνατή απόδοση σε εξαγόμενο DNA.

Ο ιστός μεταφέρθηκε σε διάλυμα CTAB και τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο για 15 λεπτά στους 60 °C. Ακολούθησε απομάκρυνση των πρωτεϊνών με διάλυμα χλωροφορμίου : ισοαμλικής αλκοόλης 24:1 και καθίζηση του DNA με χρήση 2/3 του όγκου ισοπροπανόλης και άλατος 0.1 M με φυγοκέντρωση στα 3000 g για 10 λεπτά.

Ακολούθησε επαναδιάλυση του DNA σε υδατικό διάλυμα Tris-EDTA και βουτόξυ αιθανόλης και απομάκρυνση των πολυσακχαριτών (Manning 1991) με ψύξη στους 0 °C και φυγοκέντρωση στα 20000g για 10 λεπτά. Ακολούθησε

επαναδιάλυση σε 1 ml διαλύματος TE και καθαρισμός του DNA από RNA με χρήση RNAάσης (10 mg/ml) στους 37 °C για 2 ώρες και στην συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντριση καθίζηση και επαναδιάλυση του καθαρού πλέον DNA σε 100 µl νερού απιονισμένου απεσταγμένου (dd H₂O).

Αντιδράσεις PCR.

Οι αντιδράσεις στον θερμοκυκλοποιητή ήταν τελικού όγκου 30 µl και περιείχαν 10mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM, 0,25 mM από κάθε dNTP, 1 U ένζυμο πολυμερισμού (*Taq polymerase*). Το πρόγραμμα ενίσχυσης των μικροδορυφορικών ακολουθιών στο θερμοκυκλοποιητή ήταν ως ακολούθως: 95 °C για 5 λεπτά, 94 °C για 50 δευτερόλεπτα για την αποδιάταξη του DNA, 55 °C για 50 δευτερόλεπτα για τον υβριδισμό των εκκινητών, 72 °C για 50 δευτερόλεπτα για την αντιγραφή του ορισμένου από τους εκκινητές τμήματος DNA, τελείωνε με 72 °C για 8 λεπτά.

Ανάλυση προϊόντων.

Τα προϊόντα ενίσχυσης της αντίδρασης πολυμεράσης για τους 29 εκκινητές του έτους 1999 διαχωρίστηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης μη μετουσιωμένης 8% και πάχους 1.5 mm στην οποία εφαρμόστηκε τάση 160 Volts για χρονικό διάστημα 2 ωρών. Τα διαχωρισμένα προϊόντα έγιναν εμφανίστηκαν μετά από βαφή με νιτρικό άργυρο, μέθοδος γνωστή ως silver staining. Τα προϊόντα ενίσχυσης των εννέα εκκινητών του έτους 2000 (UDK 96-092, UDK 99-141, UDK 99-168, UDK 99-156, UDK 96-159, UDK 96-088, UDK 96-035, UDK 96-158, UDK 96-101) το πίνακα 2 διαχωρίστηκαν σε πηκτή μετουσιωμένης πολυακρυλαμίδης 6% σε συσκευή ηλεκτροφόρησης αλληλούχησης (*sequencing gel*). Η εμφάνιση των προϊόντων έγινε με χρήση μιας τροποποιημένης μεθόδου με χρήση νιτρικού αργύρου της Promega (*Promega Technical Manual for DNA Sequencing System*). Με την

συγκεκριμένη μέθοδο διαχωρισμού των προϊόντων και χρήση τριών μοριακών δεικτών (100 bp, 50 bp, 20 bp pBR 322) έγινε δυνατή η μέτρηση του αριθμού των βάσεων των αλληλομόρφων πράγμα χρήσιμο στην ταυτοποίηση των γενοτύπων.

Με βάση τα δεδομένα των προηγούμενων αναλύσεων έγινε αξιολόγηση των αλληλομόρφων, κοινών και μη, τόσο μεταξύ των ατόμων εντός των δύο ειδών, *A. deliciosa* και *A. chinensis*, όσο και μεταξύ όλων των ατόμων των δύο ειδών. Επιπλέον υπολογίστηκαν ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων ανά εκκινητή, οι συχνότητες των αλληλομόρφων ως προς το σύνολο των αλληλομόρφων για κάθε είδος χωριστά αλλά και για τα δύο είδη συνολικά, οι συχνότητες παρουσίας των αλληλομόρφων ως προς τον αριθμό των ατόμων για κάθε είδος. Εκτιμήθηκαν οι παράμετροι: Diversity Indices (DI) (Weir 1990), Probability of Identity (I) (Paetkau et al., 1995) και Polymorphism Information Content (PIC) (Weber 1990).

$$DI = 1 - \sum_{i=1}^n p_i$$

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

$$I = \sum_{i=1}^n p_i^4 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2$$

Όπου p_i και p_j ήταν οι συχνότητες του i και j αλληλομόρφου και n ο αριθμός των αλληλομόρφων τόσο στα 11 άτομα του είδους *A. deliciosa* και 13 άτομα του *A. chinensis* όσο και στα 24 συνολικά άτομα των δύο ειδών. Οι προηγούμενοι δείκτες δίνουν μια εκτίμηση της διακριτικής ικανότητας του κάθε εκκινητή προσμετρώντας όχι μόνο τον αριθμό των εμφανιζόμενων αλληλομόρφων αλλά και τις σχετικές συχνότητες τους. Έτσι άτομα με ίδιο

αριθμό αλληλομόρφων μπορούν να έχουν διαφορετικές τιμές DI , I , και PIC οι οποίες οφείλονται στη διαφορετική κατανομή των αλληλομόρφων (Pasqualone et al., 1999). Έτσι για να έχει ένας εκκινητής την μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα πρέπει να έχει τις μεγαλύτερες δυνατές τιμές για τις παραμέτρους DI και PIC (να τείνουν στην μονάδα) και την μικρότερη τιμή για την παράμετρο I (να τείνει στο μηδέν)

Τα προηγούμενα δεδομένα επιτρέπουν την κατάταξη των εκκινητών ($SSRs$) ως προς την ικανότητα και αποτελεσματικότητα διαφοροποίησης των γενοτύπων μεταξύ τους. Επιπλέον με βάση τα ίδια δεδομένα ήταν δυνατή η καταγραφή του αποτυπώματος κάθε γενοτύπου που επιτρέπει την συγκριτική μεταξύ τους μελέτη τόσο για σκοπούς προσδιορισμού γενετικής συγγένειας όσο και την ταυτοποίηση τους. Επιπλέον επιτρέπει μια ενδεχόμενη αξιοποίηση τους με τυχόν συσχέτιση των προηγούμενων δεικτών με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά για σκοπούς αποτελεσματικής επιλογής.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γενικά όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν προϊόντα που συμφωνούν με τα αναμενόμενα (Huang et al., 1998). Έτσι παρόλο που για τις συγκεκριμένες συνθήκες ενίσχυσης το 45% των εκκινητών έδωσε και προϊόντα που δεν ανταποκρίνονται στον "γονιδιακό" τόπο για τον οποίο σχεδιάστηκαν, η διάκριση όμως της κύριας πολυμορφικής περιοχής ήταν εφικτή. Επίσης οκτώ εκκινητές (UDK 96-040, UDK 96-016, UDK 96-009, UDK 97-413, UDK 97-404, UDK 97-401, UDK97-420, UDK 97-415, UDK 97-402) έδειξαν αποτελέσματα που δεν συμφωνούσαν με το επίπεδο πλοειδίας, γεγονός που σημαίνει ότι πιθανότατα να υπήρχε και δεύτερη λιγότερο πολυμορφική περιοχή στόχος που έδωσε προϊόντα ενίσχυσης ανάλογου μήκους με αυτά της υπό εξέταση μικροδορυφορικής περιοχής

1. Ανάλυση σε μη μετουσιωμένη πηκτή πολυακρουαϊδης

1.1 Περιγραφή μικροδορυφορικών περιοχών

Η μελέτη και ανάλυση των μικροδορυφορικών περιοχών AC/GT και AG/CT που έγινε με βάση τον αριθμό αλληλομόρφων και τις παραμέτρους PIC, DI και I έδειξε τα ακόλουθα: Με βάση τα άτομα του είδους *A. chinensis* (4x) παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων ανα μικροδορυφορική περιοχή και για τις δύο περιοχές. Ειδικότερα για τις επαναλαμβανόμενες ακολουθίες του τύπου AC/GT ο αριθμό αλληλομόρφων ήταν 9.3 ± 2.3 και εύρος από 5 έως 14 ενώ για τις ακολουθίες του τύπου AG/CT ήταν 9.0 ± 2.3 και εύρος από 6 έως 15 (Πιν. 3). Ο αριθμός των αλληλομόρφων ήταν ο ίδιος και για τις δυο πολυμορφικές περιοχές όπως ίδια ήταν και η παραλλακτικότητα.

Οι τιμές Polimorphic Information Content (PIC) και Diversity Indices (DI) ήταν ιδιαίτερα υψηλές 0.812 ± 0.074 και εύρος από 0.901 έως 0.680 και 0.832 ± 0.063 και εύρος από 0.909 έως 0.672 αντίστοιχα για τις περιοχές

AC/GT. Ανάλογες ήταν και οι τιμές για τις περιοχές AG/CT με τιμή $PIC=0.806\pm 0.065$ και εύρος από 0.903 έως 0.680 και $DI=0.828\pm 0.053$ και εύρος (0.910-0.725). Συγκεκριμένα οι δείκτες PIC, και DI παίρνουν τιμές από 0 έως 1, δείχνουν την πολυμορφικότητα του κάθε εκκινητή και δίνουν μια εκτίμηση της ικανότητας διαχωρισμού του. Η διακριτική ικανότητα και κατ' επέκταση η ικανότητα ταυτοποίησης του κάθε εκκινητή είναι υψηλότερη όσο υψηλότερες είναι οι τιμές των παραμέτρων PIC, DI (να τείνουν στην μονάδα) (Weber 1990; Weir 1990; Pasqualone et al., 1999) Οι τιμές της παραμέτρου Probability of Identity (I) ήταν αντιστρόφως ανάλογες με τις τιμές PIC και DI όπως αυτό ήταν αναμενόμενο αφού ο δείκτης I παίρνει τιμές από 0 έως 1 και η διακριτική ικανότητα του κάθε εκκινητή είναι υψηλότερη όσο μικρότερη είναι η τιμή της παραμέτρου I (να τείνει στο μηδέν) (Petkau et al., 1995; Pasqualone et al., 1999). Έτσι παρατηρήθηκαν γενικά χαμηλές τιμές και για τις μικροδορυφορικές περιοχές του τύπου AC/GT η τιμή ήταν $I=0.052\pm 0.036$ με εύρος 0.156-0.016 και για τις περιοχές τύπου AG/CT τιμή ήταν $I=0.054\pm 0.031$ με εύρος 0.121-0.015 (Πιν. 3).

Όσον αφορά τα άτομα του είδους *A. deliciosa* η γενική εικόνα ήταν πρακτικά η ίδια με την προηγούμενη. Έτσι ο αριθμός των αλληλομόρφων ήταν επίσης υψηλός για τις πολυμορφικές περιοχές τύπου AC/GT η τιμή ήταν 8.8 ± 2.1 και εύρος από 12 έως 5 ενώ για τις αντίστοιχες πολυμορφικές περιοχές τύπου AG/CT η τιμή ήταν 8.8 ± 2.5 και εύρος 13-5 (Πιν. 4). Οι παρατηρηθείσες τιμές PIC ήταν υψηλές, όπως και για τα άτομα του είδους *A. chinensis*, για τις περιοχές AC/GT με τιμή $PIC=0.794\pm 0.086$ και εύρος 0.874-0.522 ενώ για τις αντίστοιχες AG/CT η τιμή ήταν $PIC=0.796\pm 0.049$ και εύρος 0.887-0.713. Οι τιμές της παραμέτρου DI ήταν επίσης υψηλές για τις περιοχές τύπου AC/GT ήταν $DI=0.815\pm 0.075$ κι εύρος 0.885-0.568 και για τις αντίστοιχες περιοχές AG/CT η τιμή ήταν $DI=0.824\pm 0.037$ και εύρος 0.896-0.756.

Πίνακας 3: Εκτιμήσεις αριθμού αλληλομόρφων, Diversity indices DI, Probability of identity I, Polymorphic information content PIC μικροδορυφορικών περιοχών επαναλαμβανόμενων ακολουθιών AC/GT και AG/CT σε 13 γενοτύπους του είδους *A. chinensis*

| Μικροδορυφορική Περιοχή (AC/GT) | Αλληλόμορφα | DI | I | PIC |
|---------------------------------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| UDK 96-040 | 14 | 0.909 | 0.016 | 0.901 |
| UDK 96-001 | 11 | 0.890 | 0.019 | 0.880 |
| UDK 96-022 | 11 | 0.883 | 0.025 | 0.871 |
| UDK 96-033 | 10 | 0.881 | 0.026 | 0.869 |
| UDK 96-015 | 12 | 0.880 | 0.026 | 0.868 |
| UDK 96-030 | 9 | 0.880 | 0.026 | 0.868 |
| UDK 96-016 | 10 | 0.867 | 0.032 | 0.852 |
| UDK 96-020 | 10 | 0.856 | 0.037 | 0.840 |
| UDK 96-018 | 10 | 0.828 | 0.051 | 0.807 |
| UDK 96-039 | 9 | 0.822 | 0.055 | 0.799 |
| UDK 96-009 | 7 | 0.796 | 0.072 | 0.765 |
| UDK 97-026 | 7 | 0.792 | 0.074 | 0.761 |
| UDK 96-037 | 7 | 0.781 | 0.073 | 0.756 |
| UDK 96-028 | 7 | 0.745 | 0.097 | 0.713 |
| UDK 96-034 | 5 | 0.672 | 0.156 | 0.623 |
| ΜΟ | 9.3±2.3 | 0.832±0.063 | 0.052±0.036 | 0.812±0.074 |
| AG/CT | | | | |
| UDK97-407 | 15 | 0.910 | 0.015 | 0.903 |
| UDK97-406 | 10 | 0.875 | 0.028 | 0.862 |
| UDK 97-413 | 11 | 0.875 | 0.028 | 0.862 |
| UDK 97-402 | 10 | 0.872 | 0.029 | 0.859 |
| UDK97-411 | 9 | 0.856 | 0.036 | 0.840 |
| UDK97-420 | 9 | 0.854 | 0.038 | 0.837 |
| UDK 97-409 | 11 | 0.852 | 0.036 | 0.842 |
| UDK97-422 | 8 | 0.837 | 0.048 | 0.816 |
| UDK 97-408 | 9 | 0.834 | 0.048 | 0.813 |
| UDK97-404 | 7 | 0.813 | 0.061 | 0.787 |
| UDK 97-414 | 8 | 0.794 | 0.068 | 0.769 |
| UDK 97-415 | 6 | 0.757 | 0.098 | 0.717 |
| UDK97-405 | 7 | 0.741 | 0.106 | 0.702 |
| UDK97-401 | 6 | 0.725 | 0.121 | 0.680 |
| ΜΟ | 9.0±2.3 | 0.828±0.053 | 0.054±0.031 | 0.806±0.065 |

Όπως και για το είδος *A. chinensis* οι τιμές της παραμέτρου I ήταν χαμηλές και κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα και για τους δύο τύπους μικροδορυφορικών περιοχών. Συγκεκριμένα για τις AC/GT περιοχές η τιμή ήταν $I=0.062\pm 0.050$ και εύρος 0.232-0.024 και για τις περιοχές AG/CT η τιμή ήταν $I=0.058\pm 0.024$ και εύρος 0.103-0.020 (Πίν. 4).

Παρόλο που οι τιμές όλων των παραμέτρων που μελετήθηκαν για τα άτομα του είδους *A. deliciosa* κυμάνθηκαν γενικά στα ίδια επίπεδα με τα αντίστοιχα των ατόμων του είδους *A. chinensis* φάνηκε να ήταν σχετικά χαμηλότερες γεγονός που θα μπορούσε κατ' αρχήν να σημαίνει μικρότερο επίπεδο πολυμορφισμών. Ειδικότερα ως προς τον αριθμό των αλληλομόρφων οι περιοχές AG/CT και AC/GT του είδους *A. deliciosa* παρουσίασαν κατά μέσο όρο 8.4 και 8.8 αλληλόμορφα αντίστοιχα ενώ οι αντίστοιχες περιοχές του είδους *A. chinensis* έδειξαν 9.0 και 9.3 αλληλόμορφα (Πίν. 3). Η διαφορά που παρατηρήθηκε ως προς το εύρος με εκείνο για τις περιοχές του *A. chinensis* να είναι μεγαλύτερο από εκείνο του είδους *A. deliciosa* (5-14 vs 5-12) για την περιοχή AG/CT και 6-15 vs 5-13 για την AC/GT βλέπε πίνακες 3 και 4 που φαίνεται να είναι μια επιπλέον ένδειξη μεγαλύτερης παραλλακτικότητας.

Ανάλογες ήταν οι παρατηρήσεις και για τις παραμέτρους PIC και DI έτσι στο είδος *A. chinensis* παρουσιάστηκαν γενικά τιμές υψηλότερες απ' αυτές του είδους *A. deliciosa*. Ειδικότερα ως προς την παράμετρο PIC οι περιοχές AC/GT και AG/CT του είδους *A. chinensis* έδειξαν τιμές 0.812 και 0.806 αντίστοιχα ενώ οι αντίστοιχες περιοχές του είδους *A. deliciosa* 0.794 και 0.796 (Πίν 3,4). Από την διαφορά των τιμών μεταξύ των δύο φάνηκε ότι το είδος *A. chinensis* είναι περισσότερο πολυμορφικό πράγμα που δίνει ενδείξεις ύπαρξης υψηλότερης παραλλακτικότητας.

Πίνακας 4: Εκτιμήσεις αριθμού αλληλομόρφων, Diversity indices DI, Probability of identity I, Polymorphic information content PIC μικροδορυφορικών περιοχών επαναλαμβανόμενων ακολουθιών AC/GT και AG/CT σε 11 γενοτύπους του είδους *A. deliciosa*.

| Μικροδορυφορική | | | | |
|--------------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Περιοχή (AC/GT) | Αλληλόμορφα | DI | I | PIC |
| UDK 96-001 | 11 | 0.885 | 0.024 | 0.899 |
| UDK 96-018 | 11 | 0.876 | 0.028 | 0.864 |
| UDK 96-040 | 12 | 0.865 | 0.032 | 0.851 |
| UDK 96-020 | 11 | 0.860 | 0.032 | 0.847 |
| UDK 96-022 | 11 | 0.858 | 0.036 | 0.842 |
| UDK 96-033 | 10 | 0.850 | 0.040 | 0.833 |
| UDK 96-030 | 7 | 0.845 | 0.044 | 0.825 |
| UDK 96-015 | 9 | 0.837 | 0.046 | 0.818 |
| UDK 96-037 | 8 | 0.830 | 0.051 | 0.808 |
| UDK 96-016 | 9 | 0.821 | 0.045 | 0.803 |
| UDK 96-039 | 6 | 0.809 | 0.064 | 0.782 |
| UDK 97-026 | 8 | 0.793 | 0.071 | 0.765 |
| UDK 96-009 | 8 | 0.771 | 0.088 | 0.736 |
| UDK 96-034 | 6 | 0.756 | 0.101 | 0.714 |
| UDK 96-028 | 5 | 0.568 | 0.232 | 0.522 |
| MO | 8.8±2.1 | 0.815±0.075 | 0.062±0.05 | 0.794±0.086 |
| AG/CT | | | | |
| UDK 97-414 | 12 | 0.896 | 0.020 | 0.887 |
| UDK97-407 | 11 | 0.880 | 0.026 | 0.862 |
| UDK 97-413 | 13 | 0.859 | 0.035 | 0.844 |
| UDK97-422 | 7 | 0.843 | 0.045 | 0.823 |
| UDK97-420 | 8 | 0.834 | 0.048 | 0.813 |
| UDK97-411 | 9 | 0.831 | 0.049 | 0.811 |
| UDK 97-402 | 11 | 0.830 | 0.049 | 0.810 |
| UDK 97-409 | 9 | 0.828 | 0.051 | 0.807 |
| UDK 97-408 | 7 | 0.808 | 0.065 | 0.780 |
| UDK 97-415 | 5 | 0.795 | 0.101 | 0.716 |
| UDK97-405 | 6 | 0.793 | 0.070 | 0.766 |
| UDK97-406 | 8 | 0.793 | 0.072 | 0.764 |
| UDK97-404 | 6 | 0.786 | 0.079 | 0.753 |
| UDK97-401 | 5 | 0.756 | 0.103 | 0.713 |
| MO | 8.4±2.5 | 0.824±0.037 | 0.058±0.024 | 0.796±0.049 |

Ανάλογες ήταν και οι εκτιμήσεις της παραμέτρου DI αφού για τις περιοχές AC/GT και AG/CT του είδους *A. chinensis* έδειξαν τιμές 0.832 και 0.828 αντίστοιχα ενώ οι αντίστοιχες περιοχές του είδους *A. deliciosa* 0.815 και 0.824 (Πίν 3,4) όπου λόγο διαφοράς τιμών φαίνεται μια σχετική υπεροχή του είδους *A. chinensis*. Για την παράμετρο I οι τιμές για τις περιοχές AC/GT και AG/CT του είδους *A. chinensis* έδειξαν τιμές 0.052 και 0.054 αντίστοιχα ενώ οι αντίστοιχες περιοχές του είδους *A. deliciosa* 0.062 και 0.058 (Πίν 3,4). Οι τιμές της παραμέτρου I είναι χαμηλότερες για το είδος *A. chinensis* πράγμα που είναι ένδειξη μεγαλύτερης παραλλακτικότητας.

Ο σχετικά μεγαλύτερος αριθμός των αλληλομόρφων σε συνδυασμό με τις υψηλότερες τιμές PIC και DI και τις χαμηλότερες της παραμέτρου I βλέπε πίνακες 3 και 4 για τις συγκεκριμένες περιοχές του είδους *A. chinensis* συγκρινόμενες με εκείνες των αντίστοιχων περιοχών του είδους *A. deliciosa* δίνουν ενδείξεις ότι το είδος *A. chinensis* είναι περισσότερο πολυμορφικό από το είδος *A. deliciosa* που κατ' επέκταση σημαίνει ότι παρουσιάζει υψηλότερη παραλλακτικότητα. Αυτή η διαφορά ως προς το επίπεδο πολυμορφισμών ενδεχομένως να οφείλεται στην καταγωγή των γενότυπων του είδους *A. chinensis* οι οποίοι στην πλειοψηφία τους ήταν γενότυποι τυχαία επιλεγμένοι από το φυσικό περιβάλλον του τόπου καταγωγής τους στην Κίνα. Αντιθέτως οι γενότυποι του είδους *A. deliciosa* ήταν καλλιεργούμενες ποικιλίες δημιουργίες μετά από επιλογή για συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως ομοιομορφία καρπού, χρόνος άνθησης, χρώμα σάρκας, χρόνος αποθήκευσης παραγόμενου προϊόντος είναι επομένως αναμενόμενο η διαδικασία να μείωσε την γενετική παραλλακτικότητα που εκφράστηκε με τον μειωμένο πολυμορφισμό. Η μελέτη των περιοχών με βάση τις προηγούμενες παραμέτρους οι μέσες εκτιμήσεις για τα δύο είδη *A. deliciosa* και *A. chinensis* έδωσε τιμές που εμφανίζονται στον πίνακα 5. Η γενική εικόνα έδειξε

Πίνακας 5: Εκτιμήσεις αριθμού αλληλομόρφων, Diversity indices DI, Probability of identity I, Polymorphic information content PIC μικροδορυφορικών περιοχών επαναλαμβανόμενων ακολουθιών AC/GT και AG/CT σε 24 γενοτύπους των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*

| Μικροδορυφορική Περιοχή (AC/GT) | Αλληλόμορφα | DI | I | PIC |
|---------------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| UDK96-040 | 17 | 0.912 | 0.015 | 0.905 |
| UDK96-001 | 14 | 0.904 | 0.015 | 0.090 |
| UDK 96-018 | 17 | 0.899 | 0.018 | 0.892 |
| UDK 96-033 | 11 | 0.887 | 0.023 | 0.876 |
| UDK96-022 | 13 | 0.882 | 0.025 | 0.871 |
| UDK 96-016 | 13 | 0.880 | 0.026 | 0.860 |
| UDK96-020 | 13 | 0.876 | 0.027 | 0.864 |
| UDK96-015 | 13 | 0.874 | 0.028 | 0.862 |
| UDK96-030 | 9 | 0.871 | 0.031 | 0.857 |
| UDK 96-009 | 11 | 0.842 | 0.043 | 0.824 |
| UDK96-037 | 10 | 0.837 | 0.044 | 0.820 |
| UDK 96-039 | 9 | 0.827 | 0.052 | 0.804 |
| UDK 97-026 | 8 | 0.798 | 0.070 | 0.769 |
| UDK 96-034 | 7 | 0.742 | 0.105 | 0.703 |
| UDK 96-028 | 8 | 0.711 | 0.108 | 0.686 |
| MO | 11.5±3.0 | 0.849±0.057 | 0.042±0.029 | 0.779±0.194 |
| AG/CT | | | | |
| UDK97-407 | 15 | 0.907 | 0.016 | 0.899 |
| UDK 97-414 | 13 | 0.888 | 0.023 | 0.878 |
| UDK 97-413 | 13 | 0.874 | 0.029 | 0.861 |
| UDK 97-402 | 13 | 0.862 | 0.033 | 0.848 |
| UDK97-420 | 12 | 0.862 | 0.034 | 0.847 |
| UDK97-422 | 9 | 0.862 | 0.035 | 0.846 |
| UDK 97-409 | 12 | 0.857 | 0.036 | 0.841 |
| UDK97-411 | 11 | 0.852 | 0.038 | 0.836 |
| UDK97-406 | 11 | 0.851 | 0.039 | 0.835 |
| UDK 97-408 | 9 | 0.840 | 0.045 | 0.821 |
| UDK97-404 | 7 | 0.810 | 0.063 | 0.783 |
| UDK 97-415 | 7 | 0.784 | 0.080 | 0.751 |
| UDK97-405 | 7 | 0.781 | 0.059 | 0.752 |
| UDK97-401 | 7 | 0.768 | 0.089 | 0.733 |
| MO | 10.4±2.6 | 0.843±0.040 | 0.044±0.020 | 0.824±0.048 |

αυξημένο αριθμό αλληλομόρφων και μια σχετική διαφοροποίηση ως προς τις άλλες παραμέτρους (DI, I και PIC). Παρ' όλα αυτά οι διαφορές μεταξύ των δύο περιοχών AC/GT και AG/CT ήταν οι ίδιες που είχαν παρατηρηθεί και επι των ειδών. Αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί ως επιβεβαίωση της διαφοράς ως προς τον βαθμό πολυμορφισμού μεταξύ των δύο περιοχών.

Οι τιμές όσο αφορά τον αριθμό αλληλομόρφων και PIC που παρατηρήθηκαν ήταν σαφώς υψηλότερες απ' αυτές που παρατηρήθηκαν σε εξαπλοειδές σιτάρι (3.8 και 0.57) αντίστοιχα για δινουκλεοτιδικές και τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες (Bryan et al., 1997) και (7 και 0.72) για δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες τύπου GT και CA (Prasad et al., 2000), καθώς και εκείνες σε τετραπλοειδές σιτάρι με αριθμό αλληλομόρφων 3.4, DI=0.528, I=0.318 και PIC=0.458 (Pasqualone et al., 1999). Οι προηγούμενες τιμές στο σιτάρι σημαίνουν γενετική ομοιομορφία και οφείλεται στην στενή γενετική βάση των καλλιεργούμενων ποικιλιών σιταριού (Bryan 1999 και εν αυτώ αναφορές) όπως και το γεγονός ότι το σιτάρι ως αυτογονιμοποιούμενο που σημαίνει ότι όλοι οι καλλιεργούμενοι γενότυποι είναι πλήρως ομζύγωτοι. Αντίθετα η ακτινιδιά ως σταυρογονιμοποιούμενο φυτό έχει την δυνατότητα να παρατηρούνται σε έναν πληθυσμό όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί αλληλομόρφων που σημαίνει ότι οι γενότυποι είναι κατά βάση ετεροζύγωτοι.

Οι τιμές του αριθμού των αλληλομόρφων που εκτιμήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι σχετικά μικρότερος 9 vs 15 απ' ότι σε πληθυσμό 39 ατόμων που ανήκαν σε 13 είδη (*A. chinensis*, *A. deliciosa*, *A. arguta*, *A. polygama*, *A. chrysantha*, *A. gullinensis*, *A. hemsieyana*, *A. macrosperma*, *A. melanandra*, *A. setosa*) Weising et al., 1996 και 9 vs 12 σε 66 άτομα του είδους *Malus x domestica* (Borch) με τιμή . Ανάλογα πειράματα με 66 άτομα του είδους *Malus x domestica* (Borch) με τιμή PIC=0.712 αισθητά μικρότερη απ' την αυτή των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*. Γενικά η μελέτη των συγκεκριμένων μικροδομορφικών περιοχών έδειξε ότι πρόκειται για

περιοχές με υψηλό πολυμορφισμό. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει γενετική παραλλακτικότητα που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί σε προγράμματα βελτίωσης για δημιουργία ποικιλιών. Επιπλέον δε, είναι ενδεικτική των δυνατοτήτων για αξιοποίηση, αναγνώριση και ταυτοποίηση των γενοτύπων. Φυσικά τα δεδομένα είναι ενδεικτικά εφόσον προέρχονται από δύο μόνο τύπους πολυμορφικών περιοχών. Παρ' όλα αυτά ο σχετικά ικανοποιητικός αριθμός γενοτύπων και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν συνηγορεί για την εγκυρότητα των δεδομένων.

1.2 Αξιολόγηση εκκινητών

Η ικανότητα των εκκινητών να περιγράφουν ένα γενότυπο και να μπορούν να διαφοροποιήσουν τους γενοτύπους μεταξύ τους (διακριτική ικανότητα) είναι ανάλογη με το επίπεδο πολυμορφισμού που παρατηρείται στη γονιδιακή περιοχή που στοχεύει ο κάθε εκκινητής. Η πολυμορφικότητα του κάθε εκκινητή περιγράφεται με την συναξιολόγηση των τριών παραμέτρων DI , I και PIC . Για να είναι ένας εκκινητής πολυμορφικός πρέπει οι τιμές DI και PIC να τείνουν στην μονάδα και η τιμή I να τείνει στο μηδέν. Έτσι οι εκκινητές με τιμές που τους κατέτασσαν στην κορυφή των πινάκων 3,4 και 5 αξιολογούνται ως οι καταλληλότεροι για την αποτύπωση και ταυτοποίηση γενοτύπων.

Γενικά οι τιμές των παραμέτρων PIC και DI ήταν ανάλογες με τον αριθμό των αλληλομόρφων και οι τιμές της παραμέτρου I αντιστρόφως ανάλογες. Παρατηρήθηκαν όμως και εξαιρέσεις όπως ήταν οι εκκινητές UDK 96-030, UDK 97-409 UDK 96-033 και UDK 97-422 (Πιν. 3, 4, 5) που κατατάχθηκαν σε διαφορετικές θέσεις απ' αυτές που όριζε ο αριθμός των αλληλομόρφων πράγμα που οφείλεται στις σχετικές συχνότητες των αλληλομόρφων στο γένωμα.

Ειδικότερα για τους γενότυπους του είδους *A. chinensis* και για τις περιοχές AC/GT οι ποιο πολυμορφικοί εκκινητές ήταν οι UDK 96-040, UDK

96-001, UDK 96-022 και UDK 96-033 ενώ για τις περιοχές AG/CT ήταν οι UDK 97-407, UDK 97-406, UDK 97-413 και UDK 97-402 (Πιν 3).

Για τους γενοτύπους του είδους *A. deliciosa* οι πλέον πολυμορφικοί εκκινητές για τις μικροδορυφορικές περιοχές του τύπου AC/GT ήταν οι UDK 96-001, UDK 96-018, UDK 96-040 και UDK 96-020 ενώ για τις περιοχές AG/CT ήταν οι UDK 97-414, UDK 97-704, UDK 97-413 και UDK 97-422. Παρατηρήθηκε ότι υπήρξαν εκκινητές που ενώ κατατάχθηκαν στις πρώτες θέσεις με βάση την αξιολόγησή τους για τα άτομα του ενός είδους να μην κατατάσσονται το ίδιο υψηλά και κατά την αξιολόγησή τους με τα άτομα του άλλου είδους. Ειδικότερα στις μικροδορυφορικές περιοχές τύπου AC/GT οι εκκινητές UDK 96-018 και UDK 96-020 κατατάχθηκαν υψηλά στην αξιολόγησή τους με τα άτομα του είδους *A. deliciosa* (Πιν 4) και χαμηλά με τα άτομα του είδους *A. chinensis* (Πιν. 3). Αντίστοιχα στις μικροδορυφορικές περιοχές του τύπου AG/CT οι εκκινητές UDK 97-406 και UDK 97-402 παρουσιάζονται ιδιαίτερα πολυμορφικοί (λόγω κατάταξης) για τα άτομα του είδους *A. chinensis* (Πιν 3) δεν ήταν το ίδιο πολυμορφικοί και με τα άτομα του είδους *A. deliciosa* αφού ο UDK 97-402 κατατάσσεται στην μέση του πίνακα 4 και ο UDK 97-406 στο τέλος. Τέτοιες καταστάσεις που εμφανίζουν διαφορετική αξιολογική κατάταξη είναι αναμενόμενες στα βιολογικά φαινόμενα και εκφράζουν τις πρακτικές αδυναμίες πειραματικής ακρίβειας. Αυτοί οι εκκινητές θα μπορούσαν να θεωρηθούν είτε ως εξειδικευμένοι προς συγκεκριμένο είδος είτε το πιθανότερο έχοντας μικρότερη διακριτική ικανότητα και επομένως λιγότερο αποτελεσματικοί.

Εκκινητές οι οποίοι παρουσίασαν υψηλό πολυμορφισμό και στα δύο είδη και ήταν υψηλά στην αξιολογική κατάταξη θεωρούνται ότι έχουν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και υψηλή διακριτική ικανότητα. Τέτοιοι εκκινητές θα μπορούσαν να είναι οι UDK 96-040, UDK 96-001, UDK 96-018, και UDK 96-

033 για τις μικροδορυφορικές περιοχές τύπου AC/GT και οι UDK 97-407, UDK 97-414, UDK 97-413 και UDK 97-402 για τις περιοχές AG/CT (Πίν. 5)

2 Ανάλυση σε μετουσιωμένη πηκτή πολυακρυλαμίδης

2.1 Περιγραφή μικροδορυφορικών περιοχών

Ανάλογα με τα δεδομένα που έχουν ήδη συζητηθεί ήταν και τα αποτελέσματα ως προς την εκτίμηση παραμέτρων πολυμορφισμού PIC, DI και I καθώς και του αριθμού αλληλομόρφων με την μέθοδο διαχωρισμού των προϊόντων ενίσχυσης της πολυμεράσης σε μη μετουσιωμένη πηκτή πολυακρυλαμίδης. Έτσι οι τιμές της παραμέτρου PIC ήταν 0.776 ± 0.104 και εύρος από 0.900 έως -0.498) και $PIC=0.745 \pm 0.066$ και εύρος από 0.829 έως 0.591 οι αντίστοιχες της παραμέτρου $DI=0.805 \pm 0.083$ και εύρος από 0.907 έως 0.587 και $DI=0.781 \pm 0.051$ και εύρος από 0.846 έως 0.666 για τα άτομα των ειδών *A. chinensis* και *A. deliciosa* αντίστοιχα. Οι εκτιμήσεις την παραμέτρου I ήταν 0.075 ± 0.064 και εύρος από 0.260 έως 0.016 και $I=0.085 \pm 0.040$ και εύρος από 0.186 έως 0.041 για τα είδη *A. chinensis* και *A. deliciosa* αντίστοιχα. Γενικά οι τιμές PIC και DI παρουσιάστηκαν σχετικά χαμηλότερες απ' ό τι στην ανάλυση σε μη μετουσιωμένη πολυακρυλαμίδα (Πίν. 3,4,5 και 6). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία της μικροδορυφορικής περιοχής UDK 96-035a η οποία είχε πολύ μικρό αριθμό αλληλομόρφων (3) και εντός των ειδών παρουσίασε σχεδόν μονομορφική εικόνα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα χαμηλές τιμές PIC και DI και υψηλές της παραμέτρου I, και αυτές οι τιμές κατ' επέκταση επηρέασαν και τις μέσες τιμές των παραμέτρων. Ως προς την πολυμορφικότητα των ειδών τα δεδομένα επιβεβαίωσαν την μεγαλύτερη πολυμορφικότητα των γενοτύπων του είδους *A. chinensis* απ' αυτή των γενοτύπων του είδους *A. deliciosa* αφού οι τιμές PIC ήταν 0.976 για τα άτομα του είδους *A. chinensis* και 0.745 για τα άτομα του είδους

Πίνακας 6: Εκτιμήσεις αριθμού αλληλομόρφων, Diversity indices DI, Probability of identity I, Polymorphic information content PIC μικροδορυφορικών περιοχών για τους γενότυπους τών ειδών *A. chinensis*, *A. deliciosa* καθώς και για όλα τα άτομα των δύο ειδών.

| Εκκινητές | Αλληλόμορφα | DI | I | PIC |
|--|-------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>A. chinensis</i> | | | | |
| UDK 96-092 | 15 | 0.907 | 0.016 | 0.900 |
| UDK 99-141 | 13 | 0.904 | 0.017 | 0.896 |
| UDK 99-168 | 10 | 0.853 | 0.037 | 0.838 |
| UDK 99-156 | 9 | 0.834 | 0.048 | 0.814 |
| UDK 96-159 | 8 | 0.826 | 0.053 | 0.804 |
| UDK 96-088 | 7 | 0.814 | 0.057 | 0.791 |
| UDK 96-035 b | 8 | 0.793 | 0.069 | 0.767 |
| UDK 96-158 | 6 | 0.787 | 0.078 | 0.755 |
| UDK 96-101 | 5 | 0.744 | 0.110 | 0.699 |
| UDK 96-035 a | 3 | 0.587 | 0.260 | 0.498 |
| M.O. | 8 ± 3 | 0.805 ± 0.083 | 0.075 ± 0.064 | 0.776 ± 0.104 |
| <i>A. deliciosa</i> | | | | |
| UDK 99-141 | 10 | 0.846 | 0.041 | 0.829 |
| UDK 96-092 | 8 | 0.840 | 0.046 | 0.820 |
| UDK 96-035 b | 6 | 0.807 | 0.066 | 0.778 |
| UDK 99-156 | 6 | 0.802 | 0.069 | 0.772 |
| UDK 96-088 | 8 | 0.788 | 0.074 | 0.759 |
| UDK 96-101 | 5 | 0.799 | 0.064 | 0.757 |
| UDK 96-159 | 6 | 0.776 | 0.085 | 0.741 |
| UDK 96-158 | 5 | 0.758 | 0.100 | 0.717 |
| UDK 99-168 | 6 | 0.729 | 0.119 | 0.683 |
| UDK 96-035 a | 3 | 0.666 | 0.186 | 0.591 |
| M.O. | 6 ± 2 | 0.781 ± 0.051 | 0.085 ± 0.040 | 0.745 ± 0.066 |
| <i>A. chinensis</i> και <i>A. deliciosa</i> | | | | |
| UDK 96-092 | 16 | 0.9 | 0.018 | 0.892 |
| UDK 99-141 | 13 | 0.884 | 0.024 | 0.873 |
| UDK 96-088 | 10 | 0.854 | 0.037 | 0.838 |
| UDK 99-168 | 11 | 0.854 | 0.038 | 0.838 |
| UDK 99-156 | 10 | 0.851 | 0.039 | 0.834 |
| UDK 96-159 | 12 | 0.836 | 0.046 | 0.817 |
| UDK 96-158 | 7 | 0.831 | 0.051 | 0.809 |
| UDK 96-101 | 7 | 0.812 | 0.053 | 0.785 |
| UDK 96-035 b | 9 | 0.811 | 0.062 | 0.784 |
| UDK 96-035 a | 5 | 0.745 | 0.106 | 0.704 |
| M.O. | 10 ± 3 | 0.838 ± 0.041 | 0.047 ± 0.023 | 0.817 ± 0.050 |

A. deliciosa. Οι τιμές για τις παραμέτρους DI ήταν 0.805 και 0.781 και για την παράμετρο I ήταν 0.075 και 0.745 για τους γενοτύπους των ειδών *A. chinensis* και *A. deliciosa* αντίστοιχα

Ως προς την πολυμορφικότητα και κατ' επέκταση την ικανότητα διαφοροποίησης και ταυτοποίησης των γενοτύπων σύμφωνα με την κατάταξή τους στον πίνακα 6 παρατηρήθηκε ότι για τα άτομα του είδους *A. chinensis* οι πλέον υποσχόμενοι εκκινητές ήταν οι UDK 96-092, UDK 99-141 και UDK 99-168 ενώ για τα άτομα του είδους *A. deliciosa* υποσχόμενοι εκκινητές ήταν οι UDK 99-141, UDK 96-092 και UDK 96-065 b. Όπως και προηγουμένως παρατηρήθηκε εξειδίκευση εκκινητών ως προς το είδος όπου ο εκκινητής UDK 99-168 ήταν υποσχόμενος μόνο για το είδος *A. chinensis* και ο UDK 96-035 b για το είδος *A. deliciosa*. Κατ' επέκταση οι εκκινητές που επιλέχθηκαν από κοινού και για τα δύο είδη (UDK 96-092 και UDK 99-141) φάνηκε να είναι οι πλέον κατάλληλοι για μελέτη πολυμορφισμών και σε άλλα είδη του γένους *Actinidia*.

Και οι δύο μέθοδοι ανάλυσης προϊόντων ενίσχυσης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (μετουσιωμένης και μη πολυακρυλαμίδης) έδωσαν αξιόπιστα αποτελέσματα ως προς τον αριθμό των αλληλομόρφων. Η μέθοδος της μετουσιωμένης πολυακρυλαμίδης και ο διαχωρισμός των προϊόντων σε συσκευή ηλεκτροφόρησης αλληλούχισης, είχε ως αποτέλεσμα μια πληρέστερη εικόνα αφού εκτός του αριθμού των αλληλομόρφων επέτρεψε και μια εκτίμηση του αριθμού των βάσεων για κάθε αλληλόμορφο (Εικόνα 3,4). Αντιθέτως με την μέθοδο της μη μετουσιωμένης ήταν δυνατή μόνο η επισήμανση των κοινών αλληλομόρφων (Εικόνα 1, 2). Ειδικότερα για τα άτομα του είδους *A. chinensis* ο αριθμός των αλληλομόρφων κυμάνθηκε από 3 έως 15 και ο αριθμός των βάσεων για κάθε αλληλόμορφο από 85 έως 302 (Πίν 7). Αντιθέτως για τους γενοτύπους του είδους *A. deliciosa* ο αριθμός των

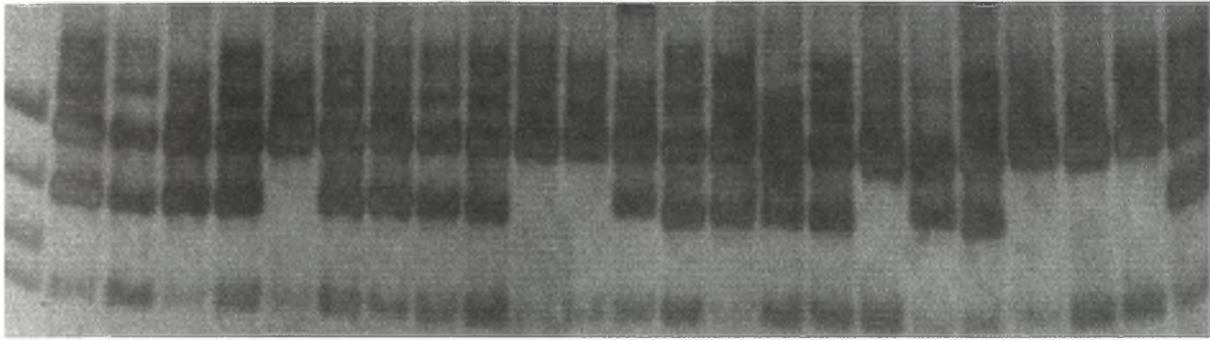
αλληλομόρφων κυμάνθηκε από 3 έως 10 και ο αριθμός των βάσεων για κάθε αλληλόμορφο από 80 έως 306 βάσεις (Πίν. 8)

2.2 Αποτύπωση γενοτύπων.

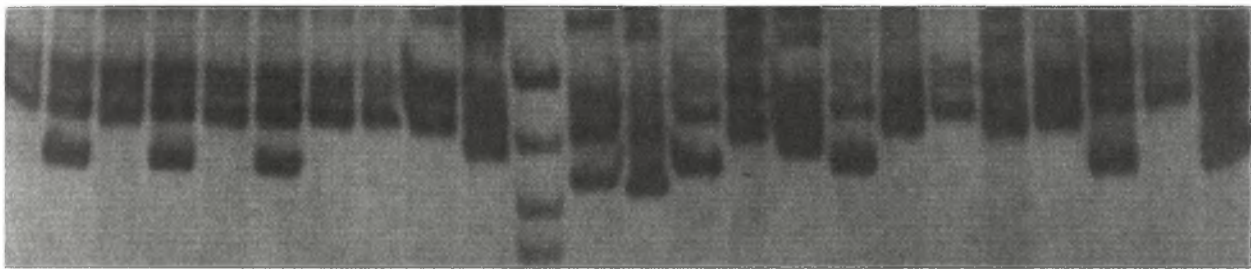
Με βάση τον αριθμό των αλληλομόρφων και τον αριθμό των βάσεων ανά αλληλόμορφο για κάθε γενότυπο σχηματίστηκαν τα αποτυπώματα των γενοτύπων (Πίν. 9, 10, 11 και 12). Στα αποτυπώματα αυτά παρουσιάζεται η ταυτότητα του κάθε γενοτύπου αφού δίνεται το μοριακό αποτύπωμά του για κάθε εκκινήτη. Έτσι η ταυτοποίηση των γενοτύπων μπορεί να γίνει αφενός μέσω σύγκρισης του αποτυπώματος του αγνώστου γενοτύπου με το αποτύπωμα γνωστού γενοτύπου, αφετέρου ένα εργαστήριο που δεν έχει το βιολογικό υλικό γνωστών γενοτύπων και δεν μπορεί να κάνει σύγκριση αποτυπομάτων μπορεί να χρησιμοποιήσει τα αποτυπώματα των πινάκων 9,10,11,12 και να τα συγκρίνει με αυτά των υπό εξέταση άγνωστων γενοτύπων.

Από την ανάλυση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων για όλους τους γενότυπους κάθε είδους (Πίν. 13, 15, 15) τα στοιχεία έδειξαν ότι υπήρξαν εκκινήτες οι οποίοι είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες για προσδιορισμό του είδους. Έτσι σε ότι αφορά τους *εξαπλοειδείς* (*A. deliciosa*) γενότυπους και *τετραπλοειδείς* (*A. chinensis*) παρατηρήθηκαν αλληλόμορφα με υψηλές και αντίστοιχες χαμηλές συχνότητες κατά είδος. Ειδικότερα οι εκκινήτες UDK 96-035 α για τα αλληλόμορφα Β και C (Εικόνα 3), ο UDK 96-158 για το αλληλόμορφο G και ο UDK 99-156 για το αλληλόμορφο Α έδωσαν την δυνατότητα διαχωρισμού του είδους των εξεταζόμενων αλληλομόρφων (Πίν. 15).

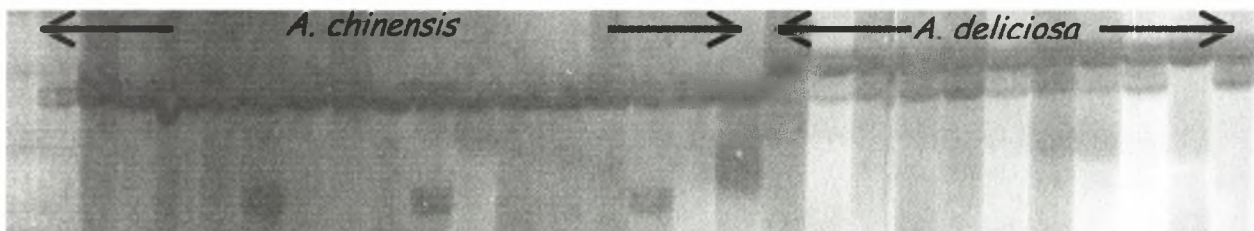
Εικόνα 1: Αποτύπωμα σε πηκτή πολυακρυλαμίδης μη μετουσιωμένης των προϊόντων ενίσχυσης αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για τον εκκινητή UDK 97-401.



Εικόνα 2: Αποτύπωμα σε πηκτή πολυακρυλαμίδης μη μετουσιωμένης των προϊόντων ενίσχυσης αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για τον εκκινητή UDK 97-406.



Εικόνα 3: Αποτύπωμα σε πηκτή πολυακρυλαμίδης μετουσιωμένης των προϊόντων ενίσχυσης αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για τον εκκινητή UDK 96-035 b.



Εικόνα 4: Αποτύπωμα σε πηκτή πολυακρυλαμίδης μετουσιωμένης των προϊόντων ενίσχυσης αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για τον εκκινητή UDK 96-092.



Πίνακας 7: Αριθμός αλληλομόρφων (N) ανά μικροδορυφορική περιοχή και αριθμός βάσεων ανά αλληλόμορφο για τους γενότυπους του είδους *A. chinensis*

| Αλληλόμορφα | N | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O |
|-------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Εκκρινιτές | | | | | | | | | | | | | | | | |
| UDK96-035b | 8 | 138 | 134 | 132 | 130 | 128 | 122 | 120 | 118 | | | | | | | |
| UDK96-035a | 3 | 302 | 300 | 272 | | | | | | | | | | | | |
| UDK 96-101 | 5 | 114 | 110 | 108 | 106 | 104 | | | | | | | | | | |
| UDK 96-092 | 15 | 192 | 190 | 188 | 184 | 182 | 180 | 178 | 176 | 174 | 172 | 170 | 168 | 166 | 162 | 158 |
| UDK 96-088 | 7 | 130 | 126 | 124 | 122 | 120 | 112 | 108 | | | | | | | | |
| UDK 99-156 | 9 | 258 | 256 | 254 | 250 | 248 | 242 | 240 | 238 | 234 | | | | | | |
| UDK 99-168 | 10 | 186 | 184 | 182 | 172 | 170 | 168 | 166 | 164 | 162 | 160 | | | | | |
| UDK 96-158 | 6 | 104 | 102 | 100 | 98 | 96 | 94 | | | | | | | | | |
| UDK 99-141 | 13 | 108 | 106 | 104 | 102 | 100 | 98 | 96 | 94 | 92 | 90 | 88 | 84 | 82 | | |
| UDK 96-159 | 8 | 112 | 110 | 108 | 106 | 98 | 96 | 94 | 86 | | | | | | | |

Πίνακας 8: Αριθμός αλληλομόρφων (N) ανά μικροδορυφορική περιοχή και αριθμός βάσεων ανά αλληλόμορφο για τους νεώτετους του είδους *A. deliciosa*

| Αλληλόμορφα | N | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O |
|------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|---|---|---|---|---|
| Εκκινητές | | | | | | | | | | | | | | | | |
| UDK96-035b | 6 | 146 | 144 | 138 | 134 | 128 | 122 | | | | | | | | | |
| UDK96-035a | 3 | 300 | 304 | 306 | | | | | | | | | | | | |
| UDK 96-101 | 5 | 118 | 114 | 110 | 106 | 102 | | | | | | | | | | |
| UDK 96-092 | 8 | 184 | 180 | 176 | 174 | 172 | 170 | 168 | 156 | | | | | | | |
| UDK 96-088 | 8 | 136 | 130 | 122 | 120 | 114 | 112 | 110 | 108 | | | | | | | |
| UDK 99-156 | 6 | 300 | 256 | 250 | 242 | 240 | 238 | | | | | | | | | |
| UDK 99-168 | 6 | 186 | 184 | 172 | 170 | 160 | 158 | | | | | | | | | |
| UDK 96-158 | 5 | 104 | 102 | 98 | 96 | 90 | | | | | | | | | | |
| UDK 99-141 | 10 | 104 | 102 | 100 | 98 | 96 | 94 | 92 | 90 | 88 | 86 | | | | | |
| UDK 96-159 | 6 | 94 | 92 | 90 | 86 | 84 | 80 | | | | | | | | | |

Τίτλας 9: Αποτύπωση γενοτύπων του είδους *A. chinensis*. Σε κάθε στήλη εμφανίζονται ο εκκινητής και τα αλληλόμορφα με την μορφή του αριθμού βάσεων, το σημείο / χωρίζει τα αλληλόμορφα μεταξύ τους.

| Εκκινητές | UDK 96-088 | UDK96-159 | UDK 99-141 | UDK 96-092 | UDK 96-101 |
|-----------|-------------|-----------|--------------|-----------------|-----------------|
| Γενότυποι | | | | | |
| C1 | 122/108 | 110/98 | 100/96 | 182/178 | 114/110/106 |
| C2 | 122 | 96/86 | 108/94/90 | 182/176/168 | 106/104 |
| C3 | 126/112 | 108/94 | 96/84 | 190/182/178/166 | 110/106/104 |
| C4 | 112 | 108/96/86 | 106/92 | 188/182/172 | 110/106 |
| C5 | 130/108 | 112/94/86 | 92/84 | 192/184/174/162 | 114/106/104 |
| C6 | 130/108 | 110/94/86 | 102/82 | 180/178/170/168 | 110/108/106/104 |
| C7 | 126/108 | 110/94 | 104/90/88/84 | 182/176/172/168 | 114/110/106/104 |
| C9 | 108 | 98/86 | 104/98 | 174/166 | 114/110/106 |
| C10 | 130/124 | 110/94/86 | 104/88 | 182/178/172/168 | 110/106/104 |
| K1-90 | 122 | 96/86 | 102/98 | 176/172/168/158 | 114/110/106 |
| K1-91 | 126/108 | 96/94/86 | 102/98/96 | 176/170/166 | ----- * |
| K1-89 | 124/120/108 | 106/94 | 88/84 | 184/178 | 110/106 |
| M3 | 124 | 96 | 102 | 184/178/168 | 110/104 |

* Δεν είχαμε προϊόντα ενδοχυσής

Πίνακας 10: Αποτύπωση γενοτύπων του είδους *A. chinensis*. Σε κάθε στήλη εμφανίζονται ο εκκινητής και τα αλληλόμορφα με την μορφή του αριθμού βάσεων, το σημείο / χωρίζει τα αλληλόμορφα μεταξύ τους.

| Εκκινητές | UDK 96-158 | UDK 99-156 | UDK 96-035 α | UDK 99-168 | UDK 96-035b |
|------------------|------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|
| Γενότυποι | | | | | |
| C1 | 102/94 | 254/240/238 | 302/306 | -----* | 138/128/118 |
| C2 | 98/96/94 | 256/250/248/238 | 302/306 | -----* | 138/128/118 |
| C3 | 102/98/96 | -----* | 302/306 | 186/184/170 | 138/128 |
| C4 | 98/96/94 | -----* | 302/306 | -----* | 138/132/120 |
| C5 | 98/96/94 | 254/248/238 | 302/306 | 182/170/164 | 138/130 |
| C6 | 104 | 258/254/238/234 | 302/306 | 182/170/168 | 138/128/118 |
| C7 | 100/98 | 256/250/248/238 | 302/306/272 | 182/170/162 | 138/128/118 |
| C9 | 102/94 | 256/250/248 | 302/306 | 182/172/160 | 138/118 |
| C10 | 102 | -----* | 302/306/272 | 182/170/166 | 138/118 |
| K1-90 | 98/94 | 256/242 | 302/306 | 182/172/168 | 138/128/122 |
| K1-91 | 100 | -----* | 302/306/272 | 182/168/162 | 138/134/122 |
| K1-89 | 102/94 | 256/238 | 302/306 | 186/184/172/160 | 138/134/128/120 |
| M3 | 94 | 256/250/238 | 302/306 | 182/172 | 134/122 |

* Δεν είχαμε προϊόντα ενίσχυσης

Τίτλακας 11 : Αποτύπωση γενοτύπων του είδους *A. deliciosa*. Σε κάθε στήλη εμφανίζονται ο εκκινητής και τα αλληλόμορφα με την μορφή του αριθμού βάσεων, το σημείο / χωρίζει τα αλληλόμορφα μεταξύ τους.

| Εκκινητές | UDK 96-035a | UDK96-158 | UDK 99-156 | UDK 96-159 | UDK 96-035 b |
|------------------|--------------------|------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|
| Γενοτύποι | | | | | |
| M 51 | 306/304/300 | 104/102/96/90 | 300/256/250/242 | 94/86/80 | 144/128/122 |
| Tomuri | 306/304/300 | 104/102/90 | 300/256/250/242/240 | 94/86/80 | 144/128/122 |
| Matua | 306/304/300 | 104/102/90 | 300/256/250 | 94/86/80 | 138/134/128/122 |
| Top Star | 306/304/300 | 104/102/90 | 300/256/250/242 | 94/86/80 | 134/128/122 |
| Bruno | 306/304/300 | 104/102/90 | 300/256/250/242 | 94/90/86/80 | 138/134/128/122 |
| Hayward | 306/304/300 | 104/102/90 | 300/256/250 | 94/86/80 | 134/128/122 |
| Kouryoku | 306/304/300 | 102/98/96/90 | 300/256/250/242 | 94/86/80 | 138/134/128/122 |
| M 54 | 306/304/300 | 104/98/90 | 300/256/250/242/240/238 | 94/90/86 | 134/128/122 |
| M 52 | 306/304/300 | 102/98/90 | 300/256/250/242/240 | 94/86/80 | 138/128/122 |
| 2.084 | 306/304 | 104/102/98/90 | 300/256/250/240 | 92/84/80 | 138/134/122 |
| Autari | 306/304/300 | 102/98/90 | 300/256/250/242/240/238 | 92/84/80 | 138/128/122 |

Πίνακας 12: Αποτύπωση γενεοτύπων του είδους *A. deliciosa*. Σε κάθε στήλη εμφανίζονται ο εκκινητής και τα αλληλόμορφα με την μορφή του αριθμού βάσεων, το σημείο / χωρίζει τα αλληλόμορφα μεταξύ τους.

| Εκκινητής | UDK 96-101 | UDK96-092 | UDK 96-088 | UDK 99-168 | UDK 99-141 |
|------------------|---------------------|---------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Γενότυποι | | | | | |
| M 51 | 118/114/110/106/102 | 184/180/176/168/156 | 130/114 | 186/184/172 | 104/102/94/88 |
| Tomuri | 118/114/110/106/102 | 180/176/170/ | 114 | 186/184/172 | 104/102/94/88 |
| Matua | 118/114/110/106/102 | 184/180/168/156 | 130/112 | 186/184 | 104/102/92/88 |
| Top Star | 118/114/110/106/102 | 184/180/170/168/156 | 130/114 | 186/184/160 | 104/102/92/90 |
| Bruno | 118/114/110/106 | 180/176/170 | 130/122/110/108 | 186/184 | 98/92/90 |
| Hayward | 118/114/110/106/102 | 184/180/172/168/156 | 130/122/114 | 186/184/172/160 | 104/102/92 |
| Kouryoku | 118/114/106/102 | 174/180/176/168/156 | 130/128/114 | 186/184/172/170 | 104/102/94/90 |
| M 54 | 118/114/110/106/102 | 184/180/176/168/156 | 130/128/114 | 186/184 | 104/102/100/86 |
| M 52 | 118/114/110/106 | 180/176/172/168/156 | 114 | 186/184/172/158 | 104/102/100/88 |
| 2.084 | 118/114/110/106/102 | 184/180/176/168/156 | 130/112 | 186/184/160 | 104/102/100/86 |
| Autari | 118/114/110/106/102 | 184/180/174/170 | 130/122/120 | 186/184 | 104/102/96 |

Πίνακας 13: Συχνότητες των αλληλομόρφων εκφρασμένες % του αριθμού των ατόμων του κάθε είδους χωριστά για τις μικροδορυμφορικές περιχές AC/GT.

| ΠΕΡΙΟΧΕΣ AC/GT | ΓΕΝΟΤΥΠΟΙ | ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| | | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q |
| UDK 96-001 | <i>A. deliciosa</i> | 0.0 | 18.2 | 9.1 | 54.5 | 9.1 | 63.6 | 18.2 | 27.3 | 54.5 | 27.3 | 9.1 | 45.5 | 27.3 | 0.0 | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 38.5 | 0.0 | 23.1 | 76.9 | 15.4 | 30.8 | 23.1 | 23.1 | 23.1 | 38.5 | 0.0 | 7.7 | 23.1 | 53.8 | | | |
| UDK 96-009 | <i>A. deliciosa</i> | 9.1 | 0.0 | 18.2 | 90.9 | 9.1 | 0.0 | 0.0 | 100 | 9.1 | 81.8 | 18.2 | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 30.8 | 23.1 | 76.9 | 7.7 | 0.0 | 69.2 | 15.4 | 76.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | | | | | |
| UDK 96-015 | <i>A. deliciosa</i> | 36.4 | 54.5 | 9.1 | 18.2 | 0.0 | 54.5 | 18.2 | 27.3 | 0.0 | 0.0 | 81.8 | 0.0 | 9.1 | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 7.7 | 61.5 | 7.7 | 30.8 | 23.1 | 30.8 | 7.7 | 0.0 | 7.7 | 23.1 | 53.8 | 53.8 | 30.8 | | | | |
| UDK 96-016 | <i>A. deliciosa</i> | 18.2 | 72.7 | 9.1 | 27.3 | 0.0 | 18.2 | 36.4 | 9.1 | 27.3 | 0.0 | 23.1 | 100 | 0.0 | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 0.0 | 7.7 | 7.7 | 53.8 | 23.1 | 0.0 | 46.2 | 7.7 | 0.0 | 46.2 | 23.1 | 38.5 | 38.5 | | | | |
| UDK 96-018 | <i>A. deliciosa</i> | 9.1 | 45.5 | 27.3 | 27.3 | 36.4 | 81.8 | 0.0 | 0.0 | 27.3 | 63.6 | 9.1 | 72.7 | 27.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | <i>A. chinensis</i> | 7.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 23.1 | 76.9 | 15.4 | 23.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 7.7 | 0.0 | 84.6 | 53.8 | 23.1 | 7.7 |
| UDK 96-020 | <i>A. deliciosa</i> | 0.0 | 18.2 | 18.2 | 9.1 | 9.1 | 18.2 | 27.3 | 27.3 | 9.1 | 18.2 | 72.7 | 27.3 | 0.0 | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 16.7 | 0.0 | 0.0 | 8.3 | 16.7 | 0.0 | 33.3 | 8.3 | 8.3 | 58.3 | 58.3 | 33.3 | 41.7 | | | | |
| UDK 96-022 | <i>A. deliciosa</i> | 90.9 | 9.1 | 36.4 | 27.3 | 90.9 | 9.1 | 27.3 | 72.7 | 9.1 | 0.0 | 18.2 | 0.0 | 54.5 | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 38.5 | 7.7 | 30.8 | 7.7 | 38.5 | 0.0 | 46.2 | 53.8 | 7.7 | 30.8 | 23.1 | 23.1 | 0.0 | | | | |
| UDK 96-026 | <i>A. deliciosa</i> | 18.2 | 9.1 | 81.8 | 27.3 | 72.7 | 45.5 | 9.1 | 9.1 | | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 15.4 | 7.7 | 76.9 | 53.8 | 46.2 | 46.2 | 7.7 | 0.0 | | | | | | | | | |
| UDK 96-028 | <i>A. deliciosa</i> | 0.0 | 0.0 | 27.3 | 0.0 | 27.3 | 9.1 | 0.0 | 100 | | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 7.7 | 7.7 | 0.0 | 46.2 | 23.1 | 15.4 | 38.5 | 100 | | | | | | | | | |
| UDK 96-030 | <i>A. deliciosa</i> | 0.0 | 45.5 | 0.0 | 36.4 | 36.4 | 54.5 | 36.4 | 18.2 | 54.5 | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 15.4 | 38.5 | 23.1 | 30.8 | 30.8 | 15.4 | 38.5 | 15.4 | 23.1 | | | | | | | | |
| UDK 96-033 | <i>A. deliciosa</i> | 72.7 | 0.0 | 9.1 | 90.9 | 9.1 | 45.5 | 54.5 | 63.6 | 27.3 | 18.2 | 9.1 | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 25.0 | 16.7 | 50.0 | 25.0 | 33.3 | 41.7 | 16.7 | 58.3 | 0.0 | 58.3 | 25.0 | | | | | | |
| UDK 96-034 | <i>A. deliciosa</i> | 9.1 | 72.7 | 81.8 | 0.0 | 27.3 | 9.1 | 72.7 | | | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 7.7 | 53.8 | 100 | 30.8 | 0.0 | 0.0 | 15.4 | | | | | | | | | | |
| UDK 96-037 | <i>A. deliciosa</i> | 54.5 | 9.1 | 36.4 | 0.0 | 9.1 | 63.6 | 18.2 | 45.5 | 72.7 | 0.0 | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 0.0 | 0.0 | 15.4 | 30.8 | 15.4 | 30.8 | 15.4 | 0.0 | 76.9 | 15.4 | | | | | | | |
| UDK 96-039 | <i>A. deliciosa</i> | 63.6 | 36.4 | 100 | 0.0 | 45.5 | 0.0 | 72.7 | 36.4 | | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 38.5 | 7.7 | 76.9 | 15.4 | 69.2 | 7.7 | 23.1 | 7.7 | 53.8 | | | | | | | | |
| UDK 96-040 | <i>A. deliciosa</i> | 0.0 | 9.1 | 0.0 | 9.1 | 63.6 | 9.1 | 9.1 | 63.6 | 18.2 | 9.1 | 0.0 | 18.2 | 63.6 | 0.0 | 36.4 | 27.3 | 0.0 |
| | <i>A. chinensis</i> | 30.8 | 7.7 | 7.7 | 15.4 | 30.8 | 30.8 | 15.4 | 0.0 | 46.2 | 0.0 | 15.4 | 0.0 | 30.8 | 15.4 | 38.5 | 38.5 | 7.7 |

Τίνακας 14: Συχνότητες των αλληλομόρφων εκφρασμένες % του αριθμού των ατόμων του κάθε είδους χωριστά για τις μικροδορυφορικές περιοχές A6/CT.

| ΠΕΡΙΟΧΕΣ A6/CT | ΓΕΝΟΤΥΠΟΙ | ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|---|--|--|
| | | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | | |
| UDK 97-401 | <i>A. deliciosa</i> | 100 | 0.0 | 72.7 | 0.0 | 9.1 | 72.7 | 100 | | | | | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 92.3 | 30.8 | 23.1 | 23.1 | 0.0 | 23.1 | 100 | | | | | | | | | | | | |
| UDK 97-402 | <i>A. deliciosa</i> | 9.1 | 9.1 | 90.9 | 0.0 | 18.2 | 0.0 | 36.4 | 9.1 | 45.5 | 90.9 | 9.1 | 27.3 | 9.1 | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 0.0 | 23.1 | 30.8 | 7.7 | 38.5 | 23.1 | 30.8 | 23.1 | 30.8 | 61.5 | 0.0 | 7.7 | 0.0 | | | | | | |
| UDK 97-404 | <i>A. deliciosa</i> | 72.7 | 18.2 | 18.2 | 72.7 | 100 | 54.5 | 0.0 | | | | | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 15.4 | 30.8 | 30.8 | 61.5 | 61.5 | 61.5 | 7.7 | | | | | | | | | | | | |
| UDK 97-405 | <i>A. deliciosa</i> | 100 | 36.4 | 27.3 | 36.4 | 45.5 | 45.5 | 0.0 | | | | | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 100 | 25.0 | 8.3 | 8.3 | 25.0 | 100 | 25.0 | | | | | | | | | | | | |
| UDK 97-406 | <i>A. deliciosa</i> | 100 | 0.0 | 100 | 0.0 | 9.1 | 27.3 | 54.5 | 9.1 | 9.1 | 45.5 | 0.0 | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 46.2 | 23.1 | 61.5 | 7.7 | 23.1 | 0.0 | 46.2 | 15.4 | 46.2 | 30.8 | 23.1 | | | | | | | | |
| UDK 97-407 | <i>A. deliciosa</i> | 9.1 | 54.5 | 45.5 | 0.0 | 36.4 | 9.1 | 27.3 | 9.1 | 63.6 | 27.3 | 0.0 | 54.5 | 27.3 | 0.0 | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 7.7 | 53.8 | 15.4 | 7.7 | 23.1 | 7.7 | 15.4 | 7.7 | 23.1 | 38.5 | 30.8 | 23.1 | 38.5 | 15.4 | 23.1 | | | | |
| UDK 97-408 | <i>A. deliciosa</i> | 63.6 | 90.9 | 9.1 | 0.0 | 54.5 | 90.9 | 0.0 | 54.5 | 9.1 | | | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 61.5 | 53.8 | 7.7 | 30.8 | 7.7 | 61.5 | 15.4 | 23.1 | | | | | | | | | | | |
| UDK 97-409 | <i>A. deliciosa</i> | 9.1 | 72.7 | 18.2 | 0.0 | 36.4 | 0.0 | 54.5 | 27.3 | 90.9 | 18.2 | 0.0 | 9.1 | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 7.7 | 53.8 | 7.7 | 7.7 | 7.7 | 7.7 | 53.8 | 23.1 | 23.1 | 30.8 | 0.0 | | | | | | | | |
| UDK 97 411 | <i>A. deliciosa</i> | 0.0 | 63.6 | 27.3 | 9.1 | 9.1 | 9.1 | 54.5 | 27.3 | 90.9 | 45.5 | 0.0 | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 23.1 | 38.5 | 0.0 | 23.1 | 23.1 | 0.0 | 69.2 | 38.5 | 92.3 | 53.8 | 23.1 | | | | | | | | |
| UDK 97-413 | <i>A. deliciosa</i> | 72.7 | 15.4 | 7.7 | 76.9 | 61.5 | 15.4 | 15.4 | 15.4 | 76.9 | 7.7 | 7.7 | 61.5 | 7.7 | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 61.5 | 20.0 | 0.0 | 60.0 | 20.0 | 20.0 | 50.0 | 20.0 | 60.0 | 0.0 | 10.0 | 70.0 | 0.0 | | | | | | |
| UDK 97-414 | <i>A. deliciosa</i> | 36.4 | 0.0 | 18.2 | 9.1 | 45.5 | 36.4 | 18.2 | 9.1 | 36.4 | 9.1 | 36.4 | 18.2 | 27.3 | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 30.8 | 23.1 | 7.7 | 76.9 | 7.7 | 46.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 23.1 | 0.0 | 7.7 | | | | | | | |
| UDK 97-415 | <i>A. deliciosa</i> | 0.0 | 100 | 100 | 0.0 | 100 | 81.8 | 9.1 | | | | | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 7.7 | 84.6 | 15.4 | 53.8 | 69.2 | 23.1 | 0.0 | | | | | | | | | | | | |
| UDK 97-420 | <i>A. deliciosa</i> | 18.2 | 18.2 | 63.6 | 45.5 | 36.4 | 18.2 | 0.0 | 0.0 | 90.9 | 72.7 | 0.0 | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 0.0 | 0.0 | 61.5 | 15.4 | 30.8 | 0.0 | 30.8 | 61.5 | 15.4 | 38.5 | 7.7 | | | | | | | | |
| UDK 97-422 | <i>A. deliciosa</i> | 0.0 | 100 | 0.0 | 27.3 | 100 | 63.6 | 100 | 100 | 100 | | | | | | | | | | |
| | <i>A. chinensis</i> | 80.0 | 20.0 | 10.0 | 80.0 | 0.0 | 30.0 | 100 | 100 | 90.0 | | | | | | | | | | |

Πίνακας 15: Συχνότητες των αλληλομόρφων εκφρασμένες % του αριθμού των ατόμων του κάθε είδους χωριστά για τις μικροδορυφορικές περιοχές Α6/CT.

| ΠΕΡΙΟΧΕΣ Α6/CT AC-GT | ΓΕΝΟΤΥΠΟΙ | ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|---------------------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|-----|---|--|
| | | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | |
| UDK 96-35a | <i>A. chinensis</i> | 0,0 | 0,0 | 100 | 100 | 23,1 | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>A. deliciosa</i> | 100 | 100 | 0,0 | 90,9 | 0,0 | | | | | | | | | | | | | |
| UDK 96-35b | <i>A. chinensis</i> | 0,0 | 92,3 | 23,1 | 0,0 | 7,7 | 7,7 | 53,8 | 23,1 | 15,4 | 46,2 | | | | | | | | |
| | <i>A. deliciosa</i> | 18,2 | 54,5 | 63,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 90,9 | 100 | 0,0 | 0,0 | | | | | | | | |
| UDK 96-088 | <i>A. chinensis</i> | 0,0 | 23,1 | 23,1 | 23,1 | 23,1 | 7,7 | 0,0 | 15,4 | 0,0 | 53,8 | | | | | | | | |
| | <i>A. deliciosa</i> | 18,2 | 81,8 | 0,0 | 0,0 | 45,5 | 9,1 | 63,6 | 18,2 | 9,1 | 9,1 | | | | | | | | |
| UDK 96-092 | <i>A. chinensis</i> | 7,7 | 7,7 | 7,7 | 23,1 | 38,5 | 15,4 | 46,2 | 30,8 | 15,4 | 30,8 | 15,4 | 46,2 | 23,1 | 7,7 | 7,7 | 0,0 | | |
| | <i>A. deliciosa</i> | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 72,7 | 0,0 | 100 | 0,0 | 63,6 | 9,1 | 18,2 | 36,4 | 72,7 | 0,0 | 0,0 | 72,7 | | | |
| UDK 96-101 | <i>A. chinensis</i> | 0,0 | 41,7 | 66,7 | 8,3 | 91,7 | 50,0 | 0,0 | | | | | | | | | | | |
| | <i>A. deliciosa</i> | 9,1 | 100 | 90,9 | 0,0 | 100 | 0,0 | 81,8 | | | | | | | | | | | |
| UDK 96-159 | <i>A. chinensis</i> | 7,7 | 30,8 | 23,1 | 7,7 | 15,4 | 46,2 | 46,2 | 0,0 | 0,0 | 61,5 | 0,0 | 0,0 | | | | | | |
| | <i>A. deliciosa</i> | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 81,8 | 18,2 | 18,2 | 81,8 | 18,2 | 90,9 | | | | | | | |
| UDK 99-141 | <i>A. chinensis</i> | 7,7 | 7,7 | 23,1 | 30,8 | 7,7 | 23,1 | 23,1 | 7,7 | 15,4 | 23,1 | 30,8 | 7,7 | | | | | | |
| | <i>A. deliciosa</i> | 0,0 | 0,0 | 81,8 | 90,9 | 27,3 | 9,1 | 9,1 | 27,3 | 18,2 | 27,3 | 36,4 | 18,2 | 0,0 | | | | | |
| UDK 99-156 | <i>A. chinensis</i> | 0,0 | 22,2 | 66,7 | 33,3 | 44,4 | 44,4 | 11,1 | 11,1 | 77,8 | 11,1 | | | | | | | | |
| | <i>A. deliciosa</i> | 100 | 0,0 | 100 | 0,0 | 100 | 0,0 | 72,7 | 45,5 | 18,2 | 0,0 | | | | | | | | |
| UDK 96-158 | <i>A. chinensis</i> | 7,7 | 38,5 | 15,4 | 46,2 | 38,5 | 61,5 | 0,0 | | | | | | | | | | | |
| | <i>A. deliciosa</i> | 72,7 | 90,9 | 0,0 | 45,5 | 18,2 | 0,0 | 100 | | | | | | | | | | | |
| UDK 99-168 | <i>A. chinensis</i> | 20,0 | 10,0 | 80,0 | 40,0 | 50,0 | 30,0 | 10,0 | 10,0 | 20,0 | 20,0 | 0,0 | | | | | | | |
| | <i>A. deliciosa</i> | 100 | 100 | 0,0 | 45,5 | 9,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 27,3 | 9,1 | | | | | | | |

† Με έντορους χαρακτήρες εμφανίζονται τα αλληλόμορφα που διαχωρίζουν τα είδη μεταξύ τους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Και οι δύο μέθοδοι ανάλυσης των προϊόντων ενίσχυσης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν αξιόπιστες ως προς την αναγνώριση των κοινών αλληλομόρφων απαραίτητων για την εκτίμηση των παραμέτρων πολυμορφισμού PIC, DI και I.

Η ανάλυση των προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε μετουσιωμένη πηκτή πολυακρυλαμίδης σε συσκευή ηλεκτροφόρισης αλληλούχισης έδωσε την δυνατότητα της ταυτοποίησης των γενοτύπων με σχετική ακρίβεια αφού έγινε γνωστός και ο αριθμός των βάσεων για κάθε αλληλόμορφο. Έτσι τα δεδομένα που προέκυψαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν και από άλλα εργαστήρια για ταυτοποίηση γενοτύπων ακτινιδιάς εάν ανήκουν σ' αυτούς που μελετήθηκαν.

Όπως φάνηκε από τις παραμέτρους PIC, DI και I όλοι οι γενότυποι, τόσο αυτοί που ανήκαν στο είδος *A. chinensis* όσο και αυτοί που ανήκαν στο είδος *A. deliciosa* ήταν ιδιαίτερα πολυμορφικοί. Γενικά όλοι οι γενότυποι του ακτινιδίου ήταν περισσότερο πολυμορφικοί από το εξαπλοειδές και τετραπλοειδές σιτάρι και το είδος *Malus x domestica* (Borch) (Bryan et al., 1997 ; Pasqualone et al., 1999 ; Weising et al., 1996; Prasad et al., 2000) όπως αυτό φάνηκε από τις εκτιμήσεις της παραμέτρου PIC (Polimorphic Information Content).

Τα άτομα του είδους *A. chinensis* ήταν περισσότερο πολυμορφικά από τα άτομα του είδους *A. deliciosa*, διαφορά που επιβεβαιώθηκε και από τις δύο μεθόδους ανάλυσης των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) σε μετουσιωμένη και μη μετουσιωμένη πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η διαφορά του ύψους των πολυμορφισμών πιθανόν να οφείλεται στην προέλευση των γενοτύπων, όπου οι γενότυποι του είδους *A. deliciosa* ήταν όλοι καλλιεργούμενες ποικιλίες ενώ οι γενότυποι του είδους *A.*

chinensis ήταν στην πλειοψηφία τους τυχαία επιλεγμένοι γενότυποι από το φυσικό περιβάλλον στο κέντρο καταγωγής τους, την Κίνα.

Τα δεδομένα έδειξαν ότι υπάρχουν εκκινητές που παρουσίασαν υψηλό πολυμορφισμό για τα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*. Ειδικότερα για τα άτομα του είδους *A. chinensis* οι υποσχόμενοι εκκινητές για τις περιοχές AC/GT ήταν οι UDK 96-040, UDK 96-001, UDK 96-022 και UDK 96-033 και για τις περιοχές AG/CT ήταν οι UDK 97-407, UDK 97-406, UDK 97-413, UDK 97-402, UDK 96-092, UDK 99-141 και UDK 99-168. Για τα άτομα του είδους *A. deliciosa* για τις περιοχές του τύπου AC/GT ήταν οι UDK 96-001, UDK 96-018, UDK 96-040, UDK 96-020, UDK 96-092 και UDK 96-065 b ενώ για τις περιοχές AG/CT ήταν οι UDK 97-414, UDK 97-704, UDK 97-413, UDK 97-422 και UDK 99-141.

Παρατηρήθηκαν εκκινητές οι οποίοι έδειξαν εξειδίκευση ως προς το είδος, δηλαδή παρουσίασαν υψηλό πολυμορφισμό για τα άτομα του ενός από τα δύο είδη. Ειδικότερα για το είδος *A. chinensis* ήταν οι UDK 97-406 και UDK 97-402 και για το είδος *A. deliciosa* οι UDK 96-018 και UDK 96-020.

Βρέθηκαν εκκινητές οι οποίοι παρουσίασαν υψηλό πολυμορφισμό και στα δύο παρουσιάζοντας ενδείξεις ότι τέτοιοι εκκινητές θα μπορούσαν να παρουσιάσουν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και σε άλλα είδη, τέτοιοι εκκινητές θα μπορούσαν να είναι οι UDK 96-040, UDK 96-001, UDK 96-018, και UDK 96-033 για τις μικροδορυφορικές περιοχές τύπου AC/GT και οι UDK 97-407, UDK 97-414, UDK 97-413 και UDK 97-402 για τις περιοχές AG/CT

Τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού που παρουσίασαν οι εκκινητές σε συνδυασμό ότι οι μικροδορυφορικές περιοχές είναι συγκυρίαρχοι μοριακοί δείκτες έδωσαν την δυνατότητα ταυτοποίησης όλων των γενοτύπων του είδους *A. chinensis* με έναν και μόνο εκκινητή UDK 96-092, UDK 99-141, κάτι που δεν ήταν εφικτό για τα άτομα του είδους *A. deliciosa*.

Η ανάλυση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων ως προς όλα τα άτομα των ειδών έδειξε ότι υπήρξαν μοριακοί δείκτες ικανοί να προσδιορίσουν το είδος του κάθε γενότυπου, όσον αφορά βέβαια τους γενότυπους που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία. Ειδικότερα οι εκκινητές UDK 96-035α, UDK 99-156 και UDK 96-158 διαχώρισαν τους γενότυπους των δύο ειδών.

Τα συμπεράσματα που παρουσιάζονται σ' αυτή την εργασία υπόκεινται στον περιορισμό του γενετικού υλικού και των τεχνικών ανάλυσης των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν. Περισσότερα δεδομένα απαιτούνται προκειμένου να προκύψουν ασφαλή και γενικευμένα συμπεράσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βασιλακάκης Μ. 1991 "Στοιχεία ειδικής και γενικής Δενδροκομίας"
Εκδόσεις Δεδούσης.
- Bryan G.J., A. J. Collins, P. Stephenson, A. Orry, J. B. Smith and M. D. Gale 1997 "Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat" *Theor. Appl. Genet.* 94:557-563.
- Cesner M. E., Jansen R. K., and Lammers T.G. 1994 "Phylogenetic relationships in the *Campanules* based on the *rbcL* sequences" *Plant. Syst Evol.* 190:79-95
- Chase M. W., et al., 1993 "Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*" *Ann Missouri Bot Gard.* 80:528-580
- Chat J. and P. Y. Dumoulin 1997 "Flow cytometry and RAPD markers applied to parentage analysis within *Actinidia* Genus" *Acta Hort.* 444: 109-111
- Chat J., L Chalak and R. S. petit 1999 "Strict paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in intraspecific crosses of Kiwifruit" *Theor. Appl. Genet.* 99:314-322
- Chrowhurst R. N., Lints R., Atkinson R. G., and Gardner R. C. 1990 "Restriction fragments length polymorphisms in *genus Actinidia Actinidiaceae*" *Plant Syst. Evol.* 172:193-203
- Cipriani G., R. testolin, M. Morgante 1995 "Parental inheritance of plastids in interspecific hybrids of the *genus Actinidia* revealed by PCR-amplification of chloroplast DNA fragments" *Mol. Gen. Genet.* 247: 693-697
- Cipriani G. R. Testolin and R. Gardner 1998 "Restriction site variation of PCR amplified chloroplast DNA regions and its implication for

- the evolution and taxonomy of *Actinidia*" *Theor. Appl. Genet.* 96:389-396
- Costa G., Testolin R., and Vizzoto G. 1993 "Kiwifruit pollination: an unbiased estimate of wind and bee contribution" *N. Z. Crop Hort. Sci.* 21:189-195
- Δημουλάς Ι. "Η Ακτινιδιά" Αγροτική Τράπεζα της Ελλάδος ΑΘΗΝΑ 1988 Διεύθυνση Φυτικής Παραγωγής σελ 17-132.
- Doyle J J, and Doyle J L 1990 "Isolation of plant DNA from fresh tissue" *Focus* 12:13-15.
- Famiani F., N. Feridani, and A Standardi 1997 "In vitro regeneration of different species of *Actinidia species*" *Acta Hort* 444: 133-138
- Ferguson A. R., and Bollard E.G. 1990 "Domestication of Kiwifruit" in: Warrington IJ Weston GC (eds) *Kiwifruit: science and management*. Ray Richards Publ. Auckland. N.Z. pp 165-246
- Ferguson R. A., I. E. O'Brien and G. J. Yan 1997 "Ploidy in *Actinidia*" *Acta hort.* 444: 67-71
- Gill G. P., C. F. Harvey, R.C. Gardner and L.G. Fraser 1998 "Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*" *Theor. Appl. Genet.* 97:439-445
- Harada H., 1975 "In vitro organ culture of *Actinidia chinensis* P. as a technique for vegetative multiplication" *J. Hort. Sci* 50:81-83
- Harvey C. F., G. P. Gill, L. G. Fraser and M. A. McNeilage 1997 "Sex determination in *Actinidia* . 1. Sex linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*" *Sex Plant Reprod.* 10:149-154
- Hokanson C. S., A. K. Szew-McFadden, W. F. Lamboy, and J. R. McFerson 1998 "Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a

Malus domestica borkh. Core subset collection" Theor. Appl. Genet. 97:671-683.

Huang H. W., Dane F., Wang Z. Z., Huang R. H., and Wang S. M., 1997 "Isozyme inheritance and variation in *Actinidia*" Heredity 78:328-336

Huang G. W., G. Cipriani, M Morgante, and R. Testolin 1998 "Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterization, and homology in related species". Theor. Appl. Genet. 92:1269-1278.

Karp A., and K. Eduards 1995 "Molecular techniques in the analysis of the extend and distribution of genetic diversity" IPGRI Workshop Rome Italy pp 11-22

Kresovich S., J. R. McFerson and A. L. Westman 1995 "Using molecular markers in genebanks: Identity, duplication, contamination and regeneration" IPGRI Workshop Rome Italy pp 23-38

Mc Neilage M. I., and Considine J. A., 1989 "Chromosome studies in some and implications in breeding" N. Z. J. Bot. 27: 71-81

Μπρουσοβάνας Ν. "Η ΑΤΙΝΙΔΙΑ Kiwi fruit" Ένα μοντέρνο και παραγωγικό και καλλωπιστικό φυτό. Λάρισα 1985. Εκδόσεις Γρηγόρης Μπούκας Αθήνα.

Παλούκης Σ. και Ο. Ντινοπουλος "ΑΚΤΙΝΙΔΙΑ" Θεσσαλονικη 1989 σεΛ3-63 ISBN 960-85012-0-2

Raetkau D, W. Calvert, I Stirling and C Stroberk 1995 "Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears" Mol. Ecol 4:347-354

Pasqualone A., C. Lotti and A. Blanco 1999 "Identification of durum wheat cultivars and monovarietal semolinas by analysis of DNA microasatellites" Eur. Food Res. Tech. 210:144-147

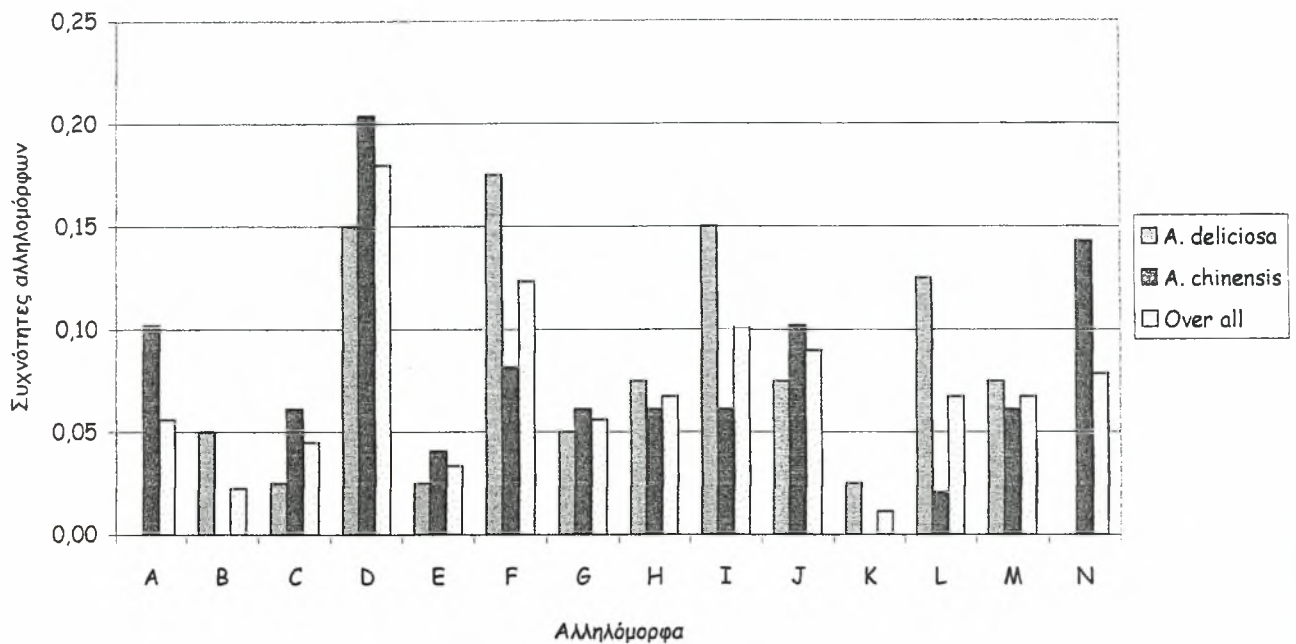
- Prasad M., R. K. Varsheny, J. K. Roy, and H. S. Balsayan 2000 "The use for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat" *Theor. Appl. Genet.* 100:584-592
- Reboud X., and Zeyl C., 1994 "Organelle inheritance in plants" *Heredity* 72: 132-140
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T 1989 "Molecular cloning a laboratory manual" 2nd edn Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Standardi A., 1988 "La micropropagazione nella moltiplicazione dell' *Actinidia*" *Frutticoltura* 2:17-22
- Testolin R., Cipriani G., Ferguson A. R., Gardner R. 1997 "Molecular approaches to systematics of *Actinidia*" *Acta Hort* 444: 97-102
- Testolin R., and G. Cipriani 1997 "Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in the genus *Actinidia*" *Theor. Appl. Genet.* 94:897-903
- Testolin R., Cipriani G., and Costa G. 1997 "Sex segregation ratio and gender expression in the genus *Actinidia*" *Acta Hort.* 444: 85-88
- Webby R. F. Wilson R. D., and Ferguson A. R. 1994 "Leaf flavonoids of *Actinidia*" *Biochem. Syst Ecol* 22:277-286
- Weber JL. 1990 "Informativeness of Human (dC-dA)_n·(dG-dT)_n polymorphisms" *Genomics* 7:524-530
- Weir BS. 1990 *Genetic data analysis*. Sinauer, Sunderland, Mass
- Weising K., Raymond W. M. Fung, D. Jeannette Keeling, Ross G. Atkinson, and Richard C. Gardner 1996 "Characterization of microsatellites from *Actinidia chinensis*" *Molec. Breeding* 2:117-131.
- Xiao G. X., and A. M. Hirst 1997 "Isolation culture and fusion of protoplasts in *Actinidia ssp*" *Acta Hort.* Vol 444 119-124

Yan G. J., Ferguson, A. R., and Mc Neilage M. A. 1994 "Ploidy races in *Actinidia chinensis*" *Euphytica* 78: 175-183

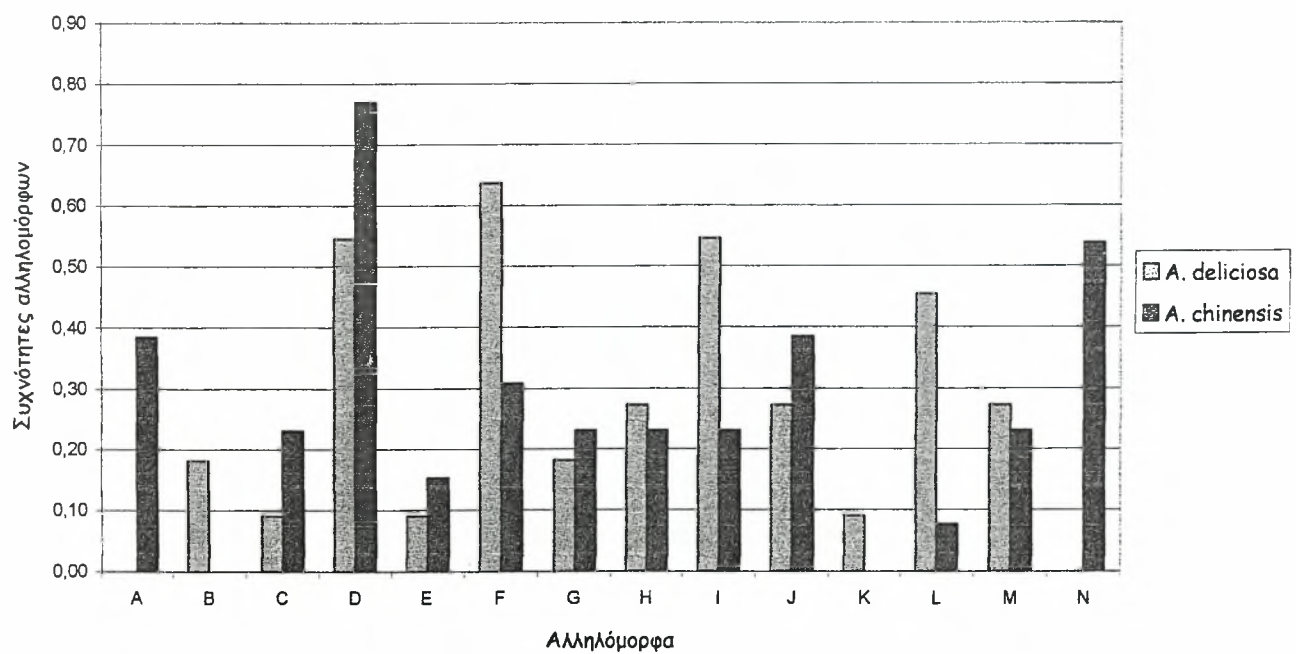
Zhang J., and Beuzentberg 1983 "Chromosome number in two varieties of *Actinidia chinensis* Planch" *N. Z. Journal Bot.* 21: 353-355

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

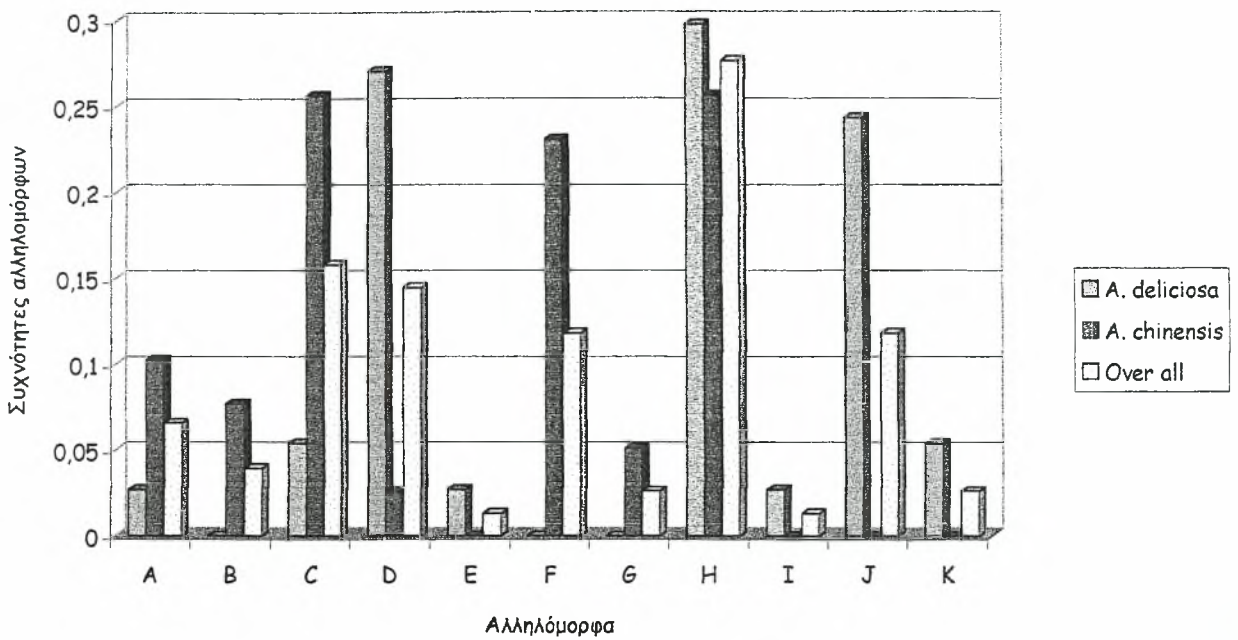
Διάγραμμα 1: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-001 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*



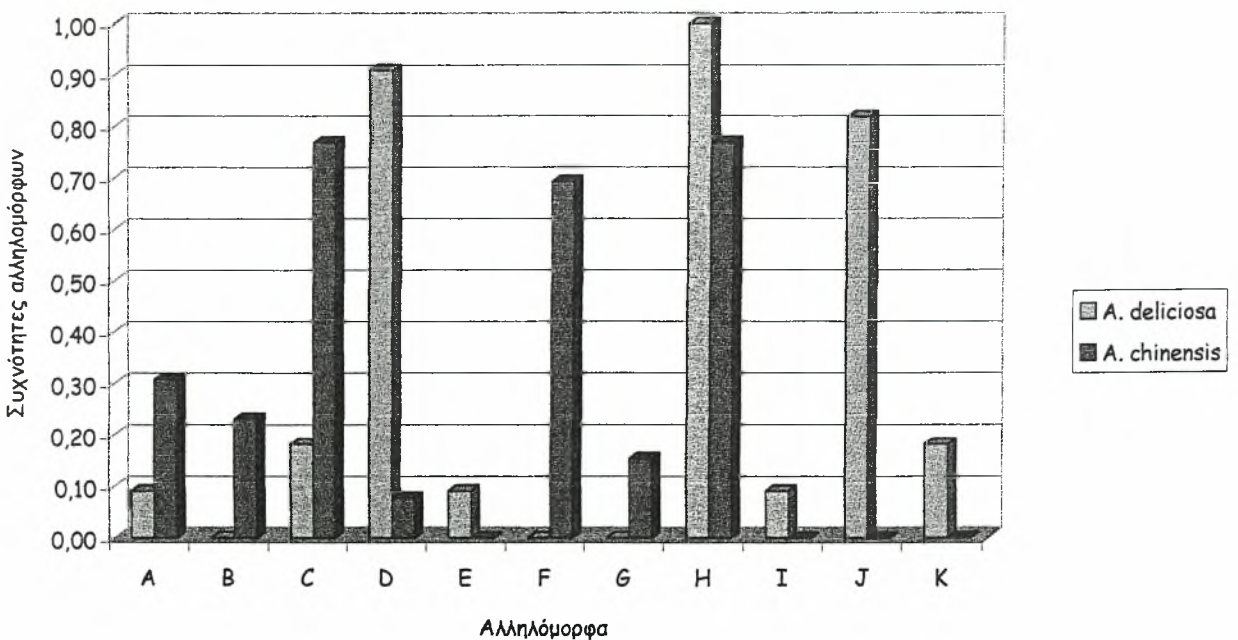
Διάγραμμα 2: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-001



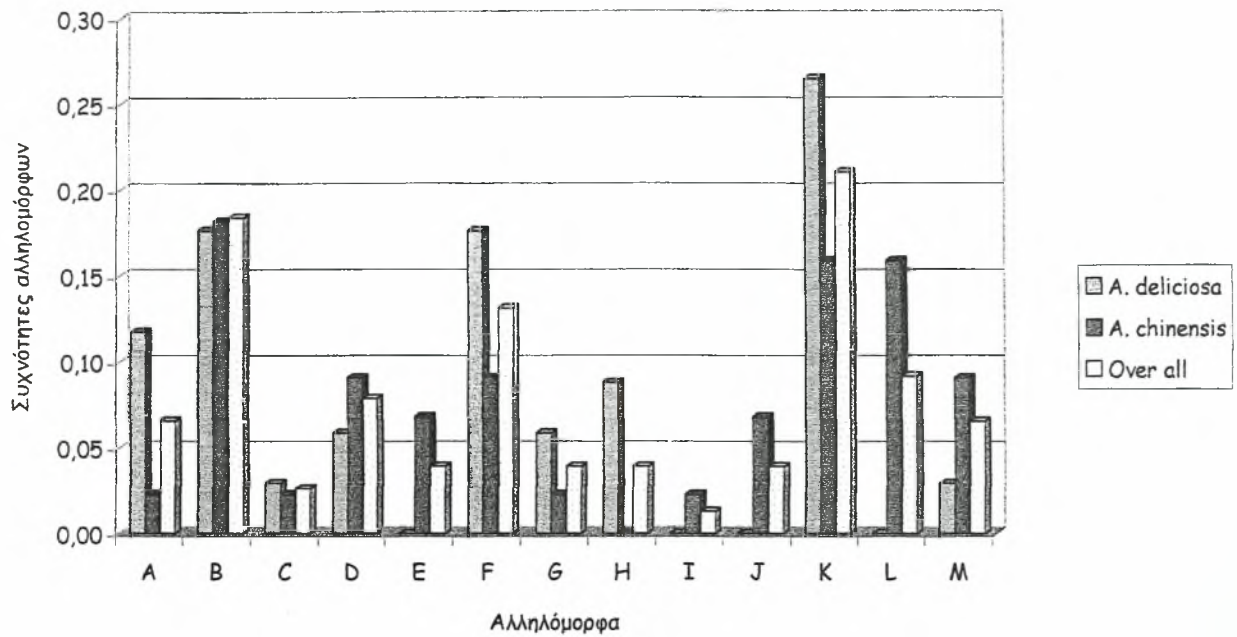
Διάγραμμα 3: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-009 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



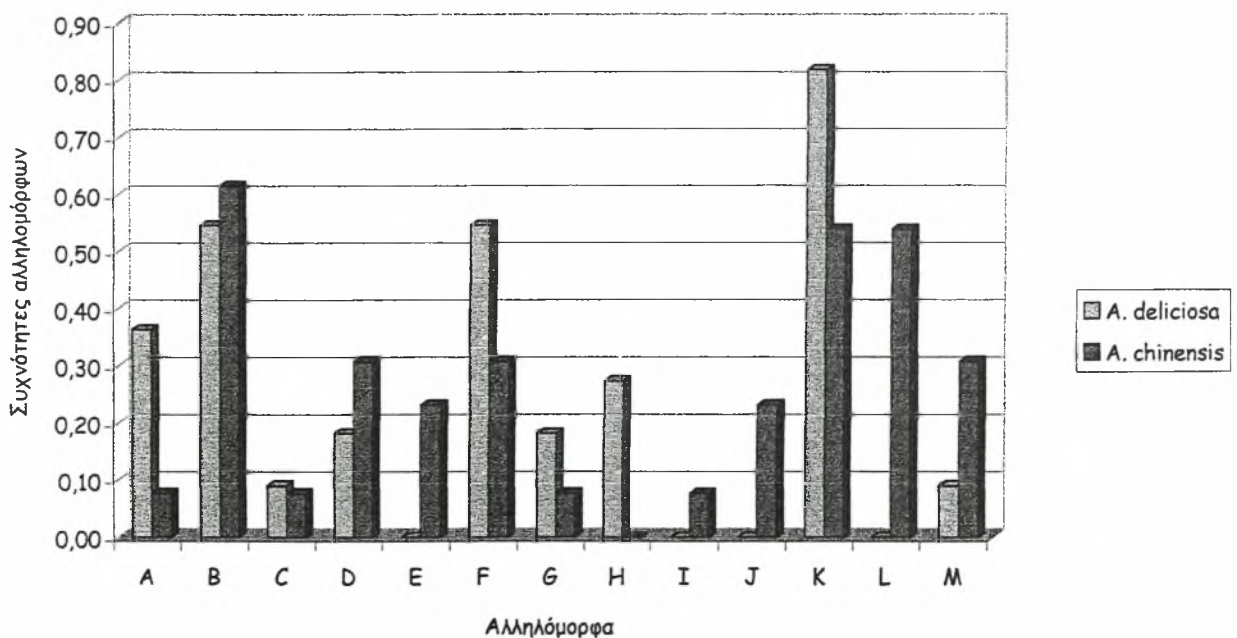
Διάγραμμα 4: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-009



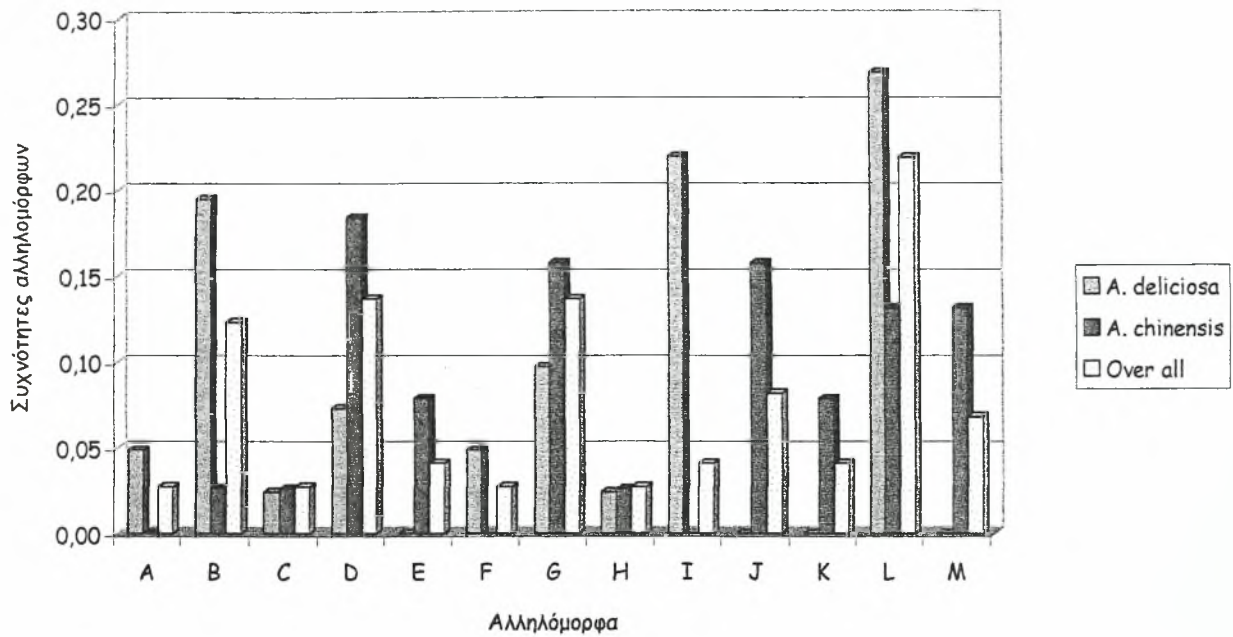
Διάγραμμα 5: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-015 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



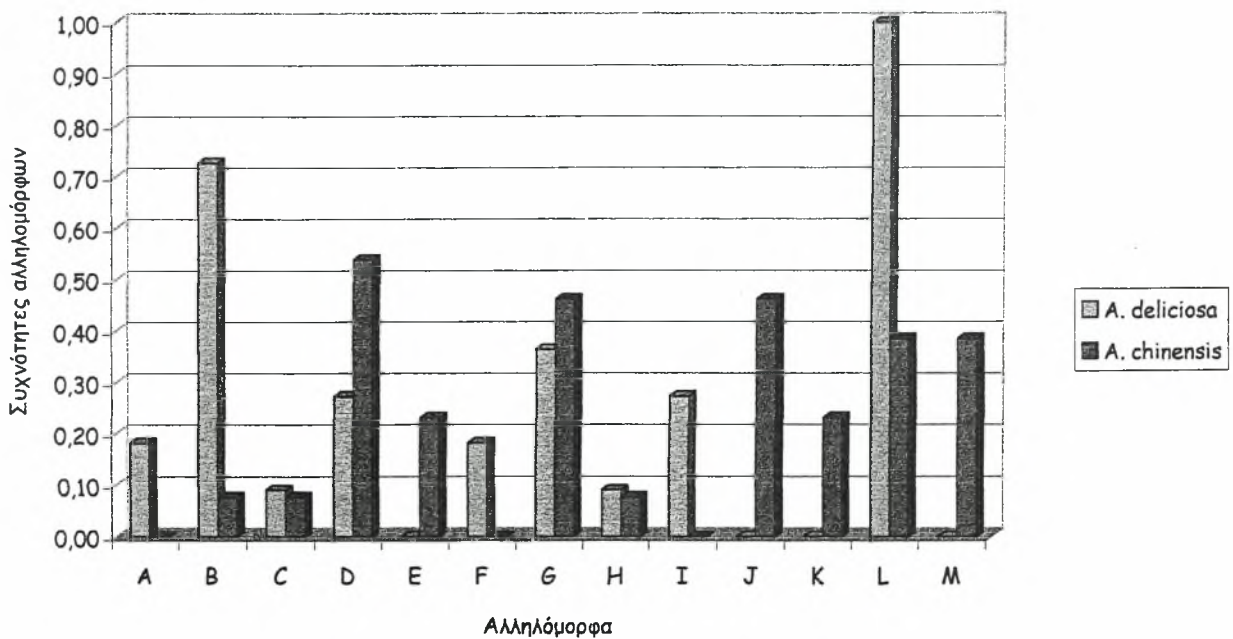
Διάγραμμα 6: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-015



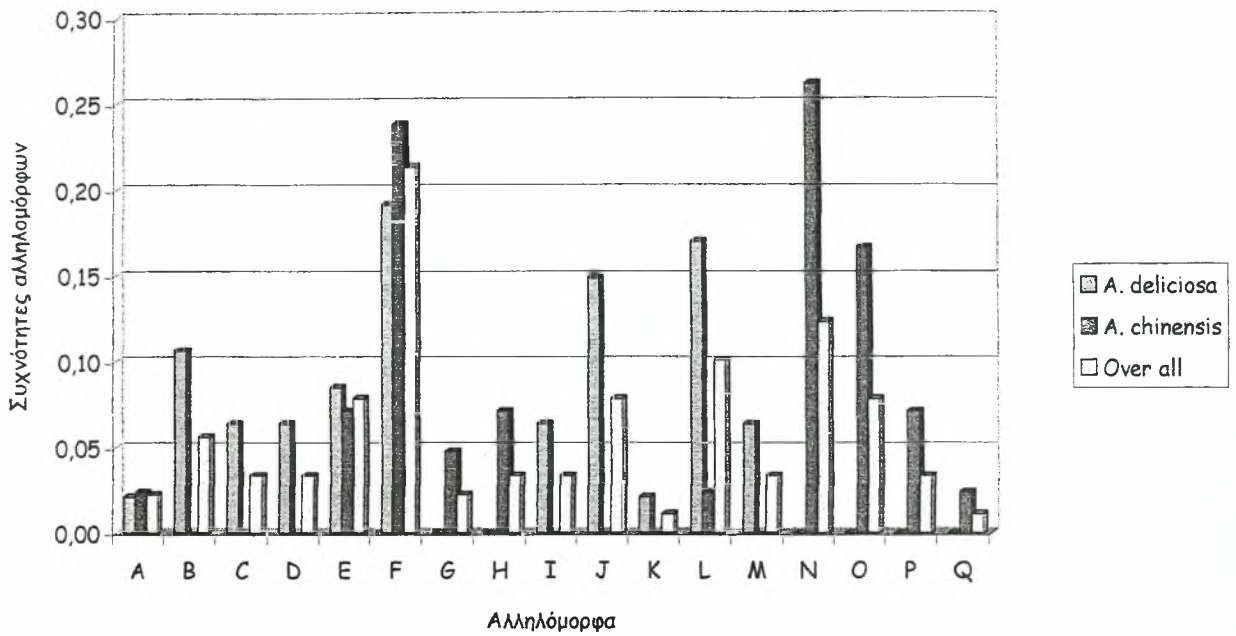
Διάγραμμα 7: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-016 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



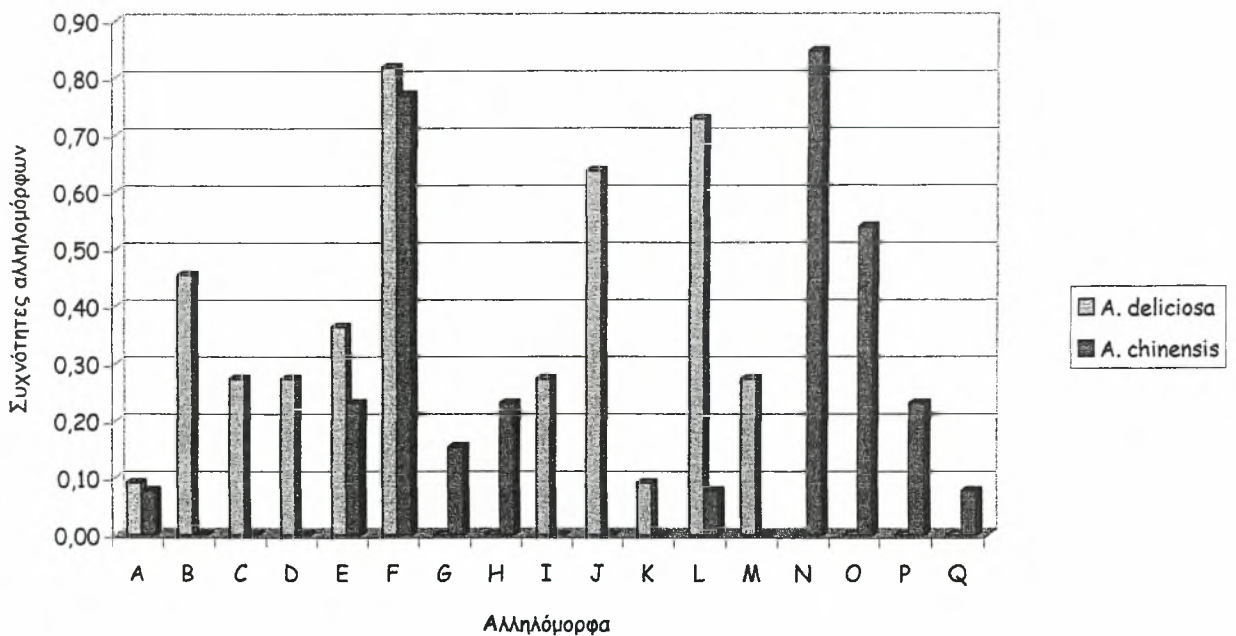
Διάγραμμα 8: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-016.



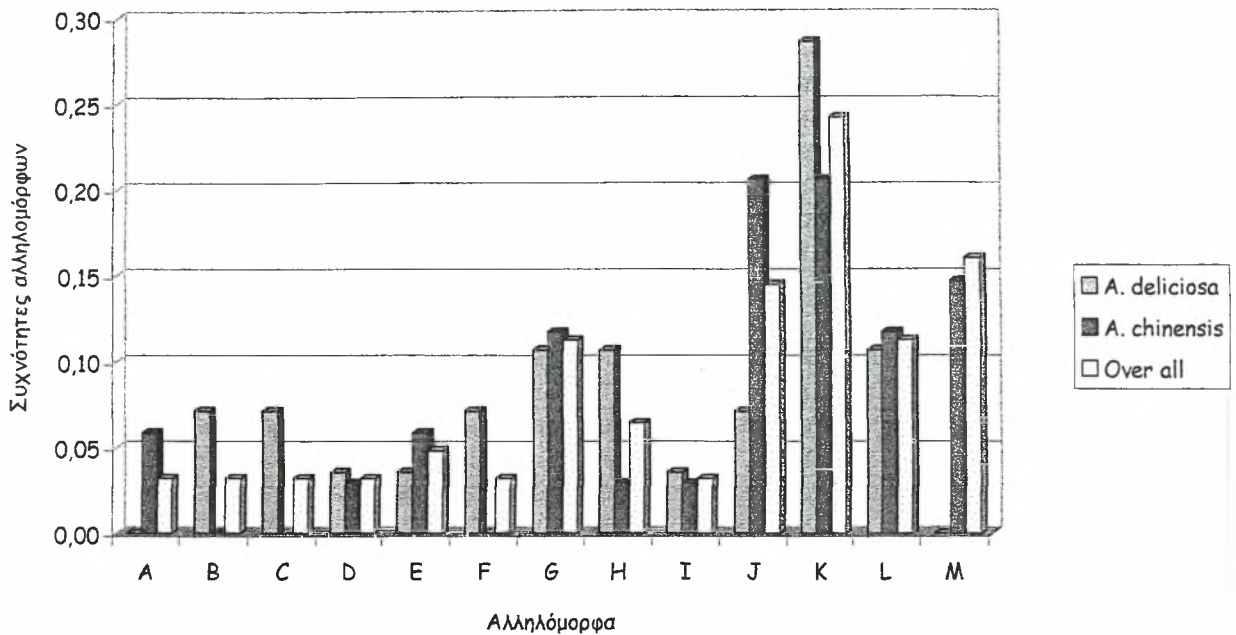
Διάγραμμα 9: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-018 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



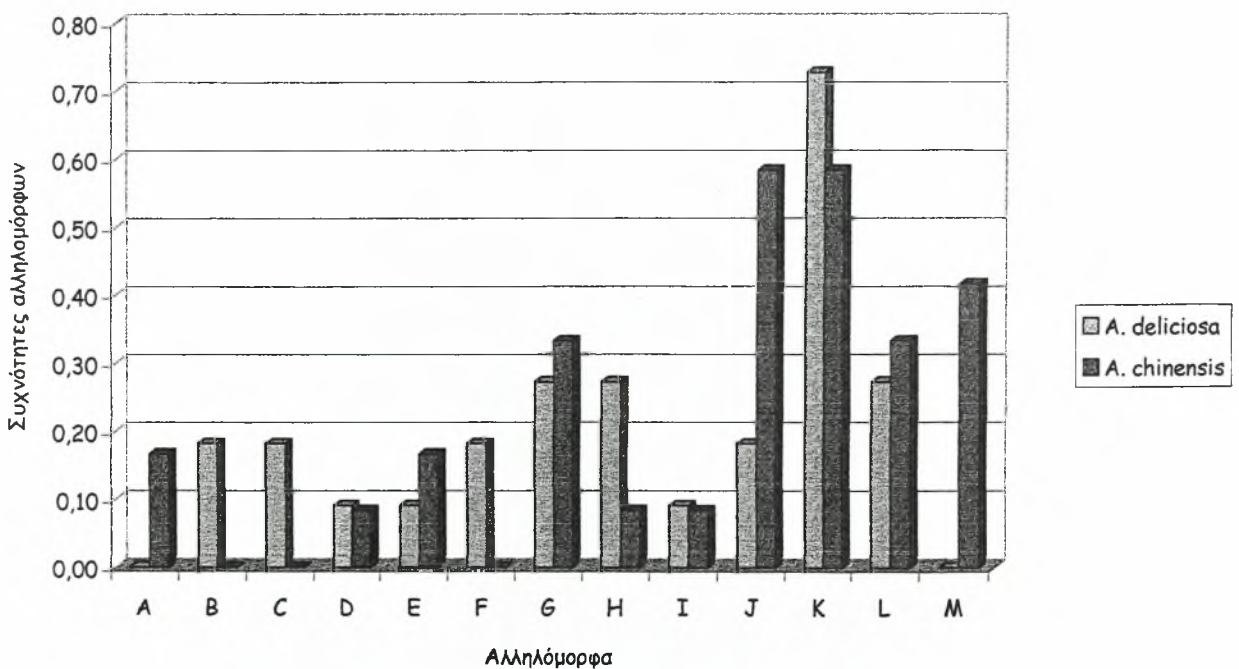
Διάγραμμα 10: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-018.



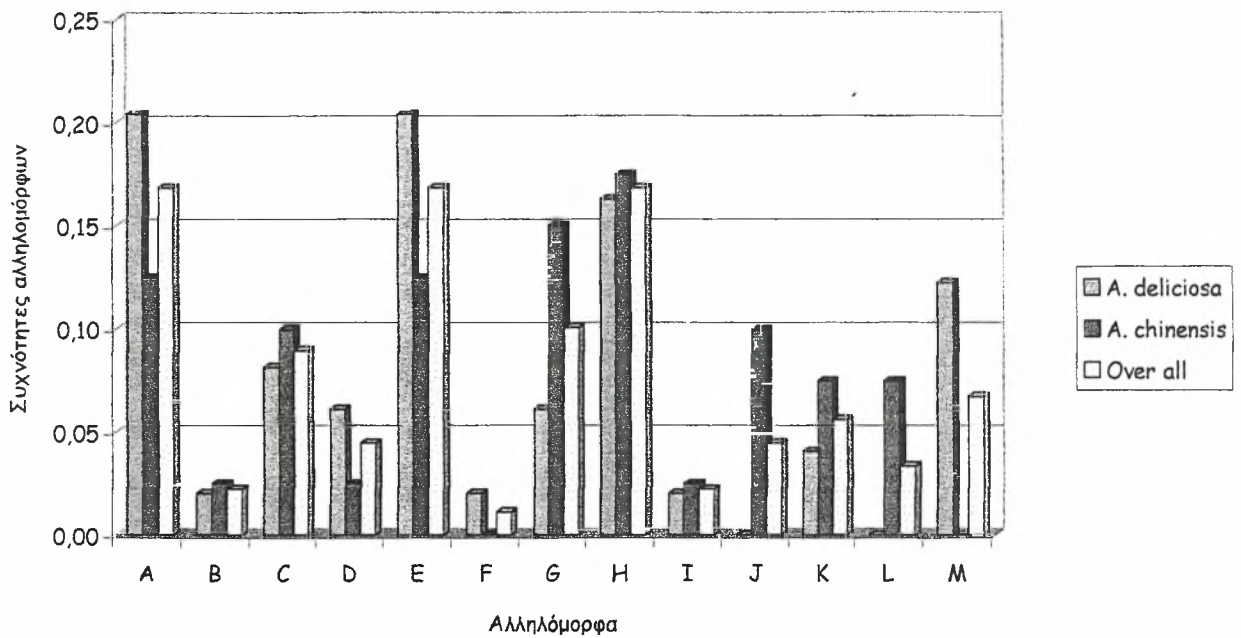
Διάγραμμα 11: Συχνότητες αλληλομόρφων γενιώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-020 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



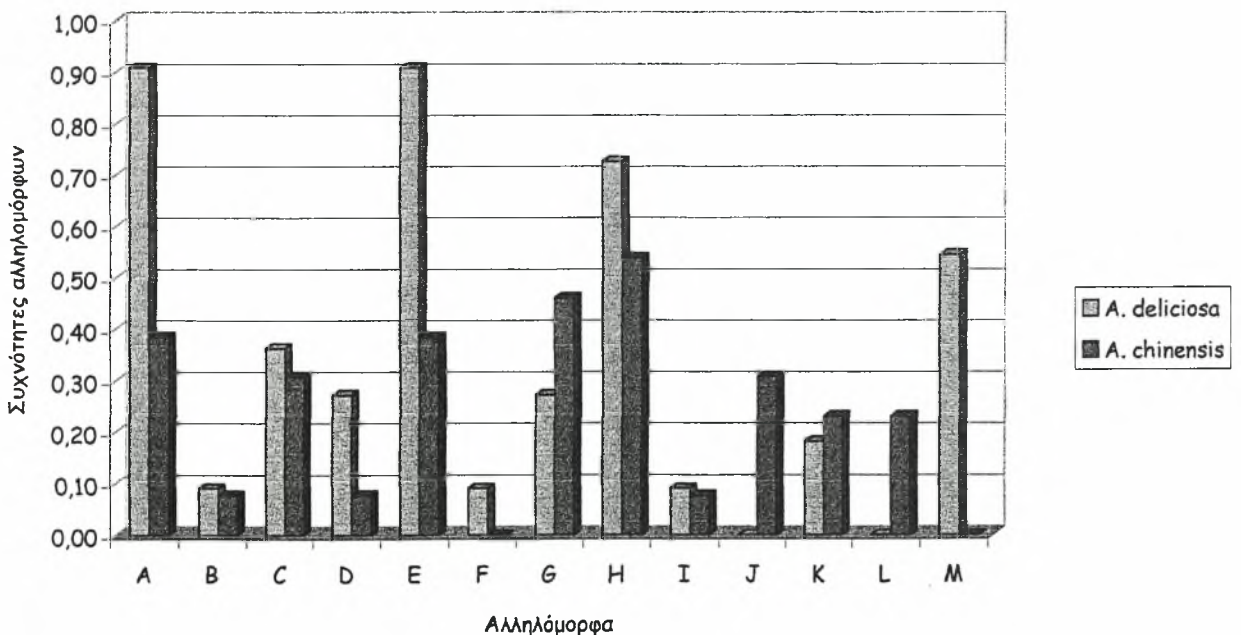
Διάγραμμα 12: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-020



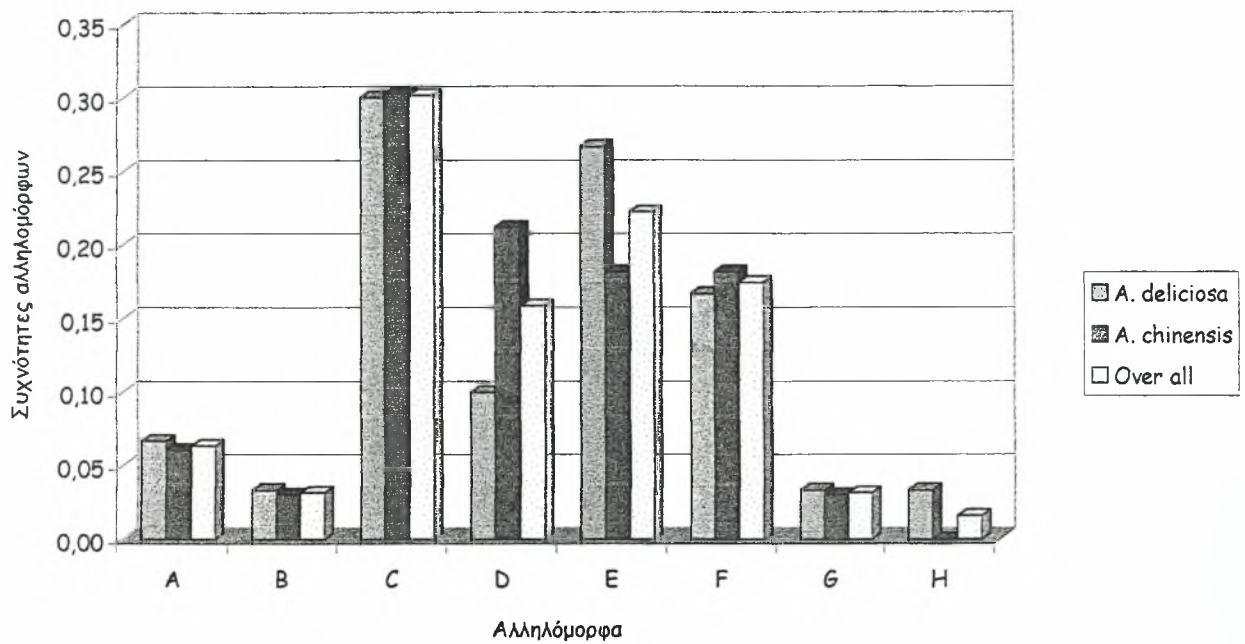
Διάγραμμα 13: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-022 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*



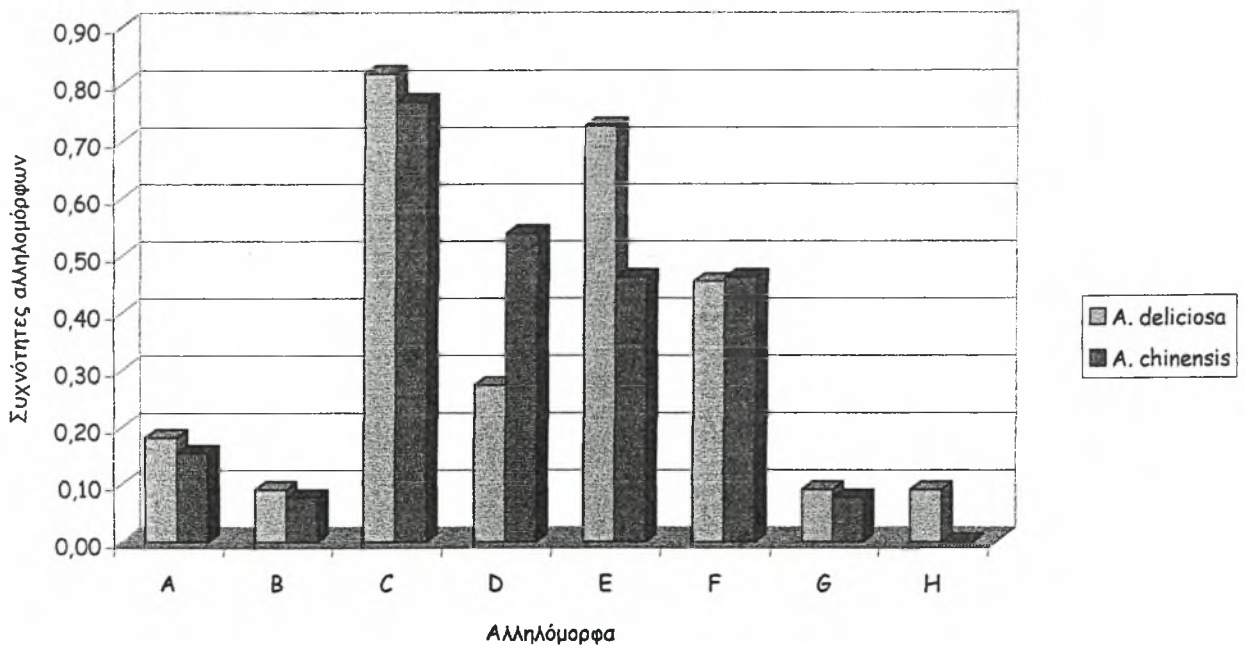
Διάγραμμα 14: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-022.



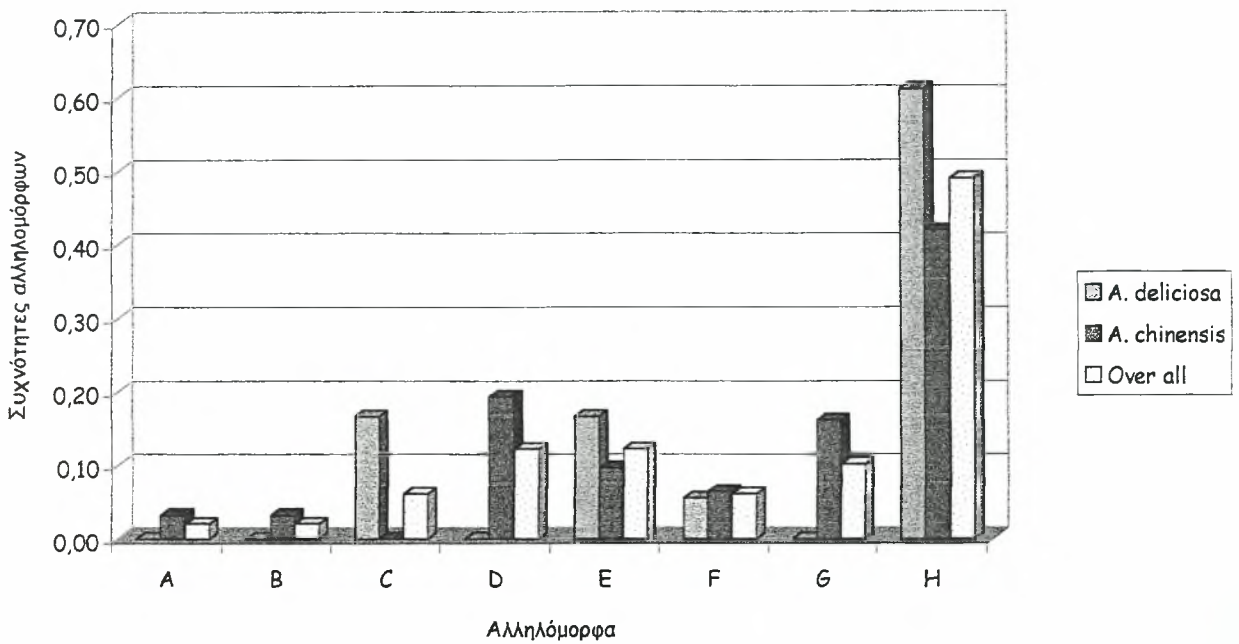
Διάγραμμα 15: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-026 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



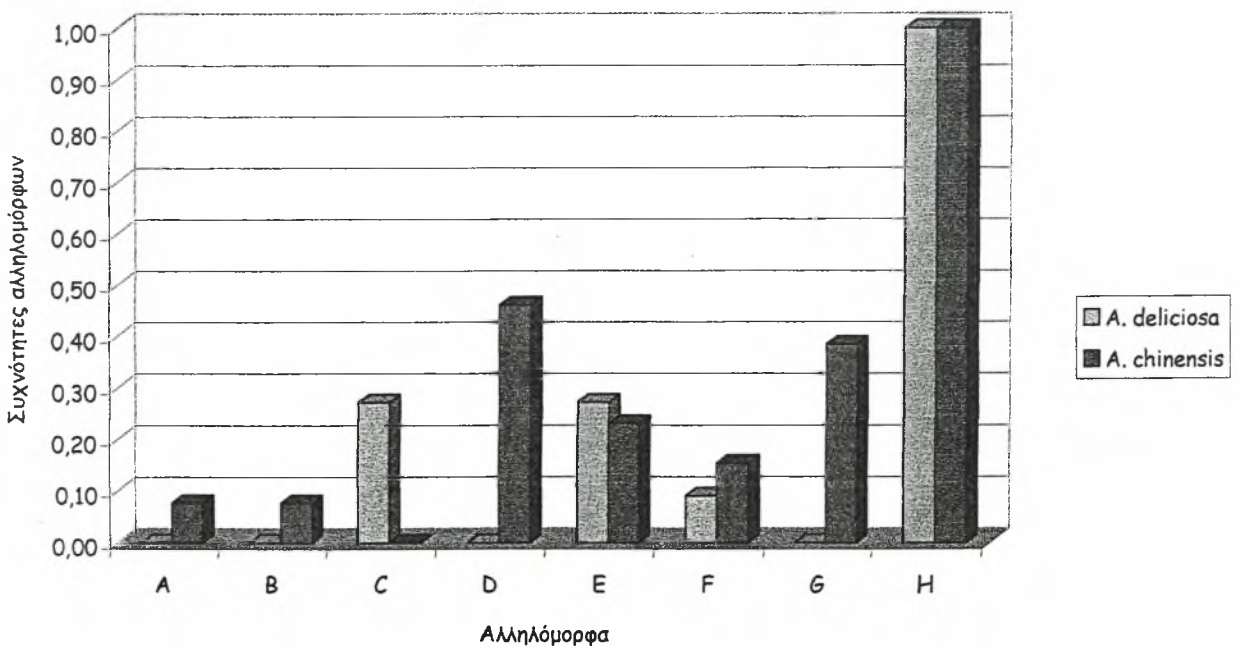
Διάγραμμα 16: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-026.



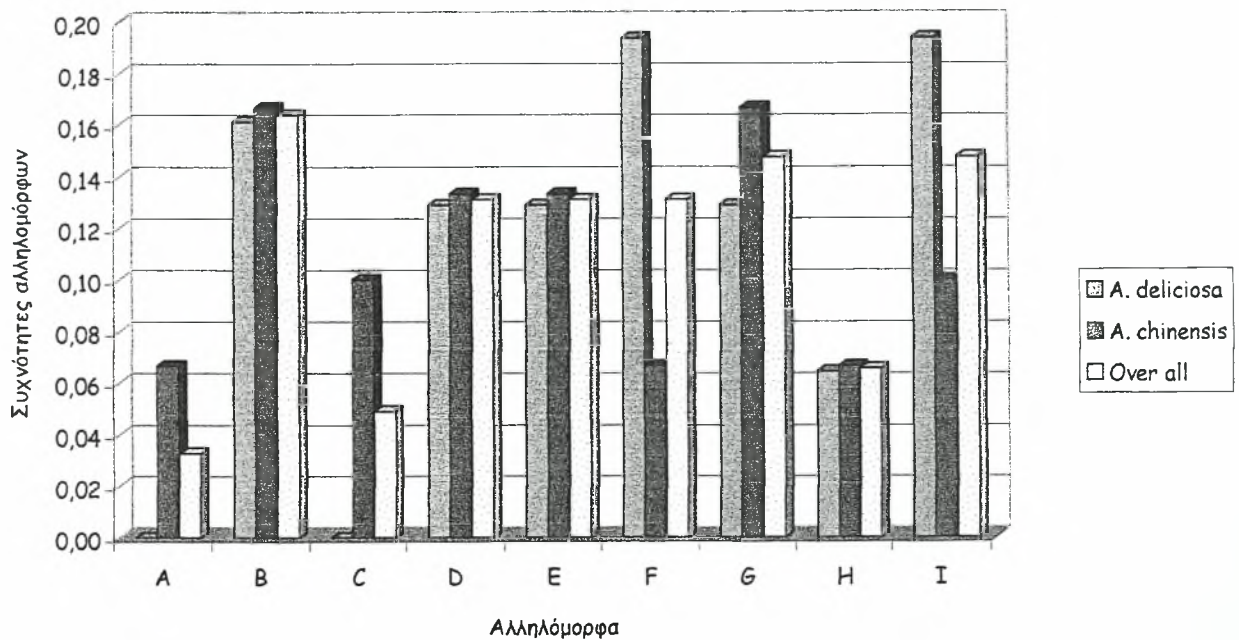
Διάγραμμα 17: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-028 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



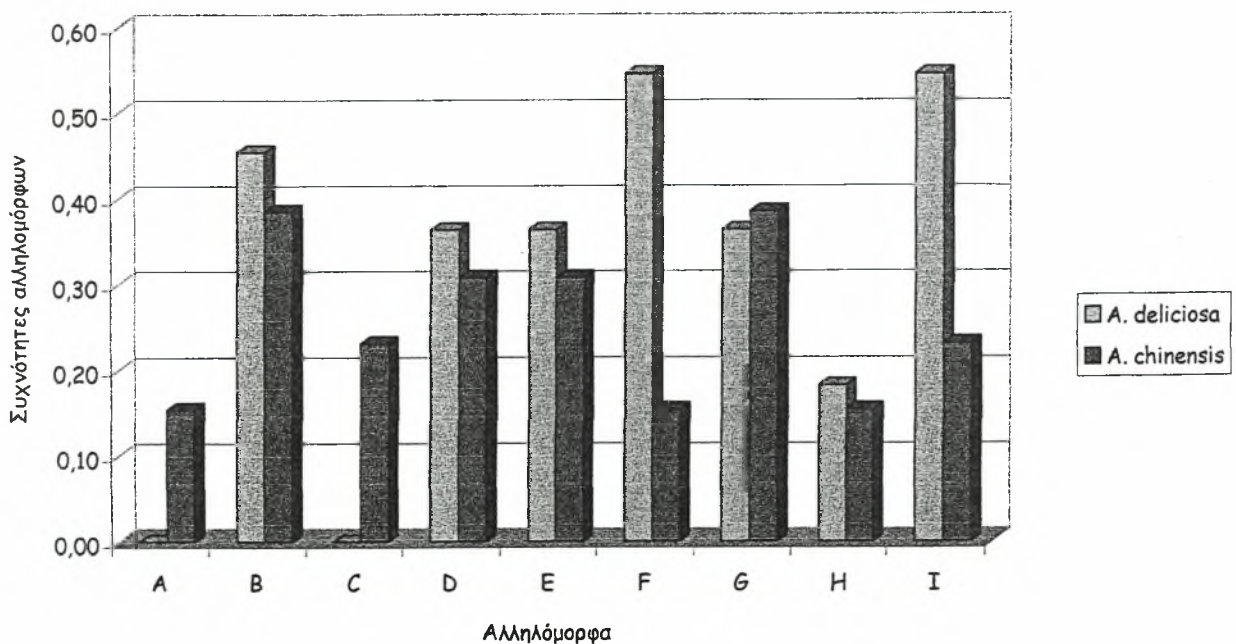
Διάγραμμα 18: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-028.



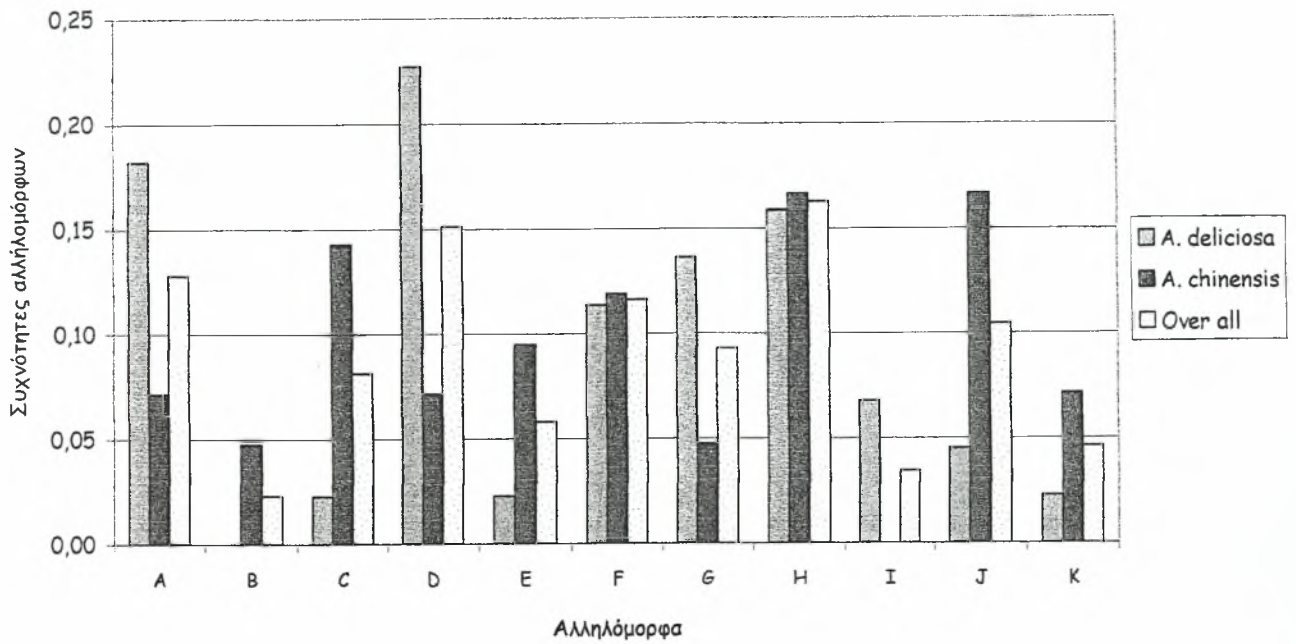
Διάγραμμα 19: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-030 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



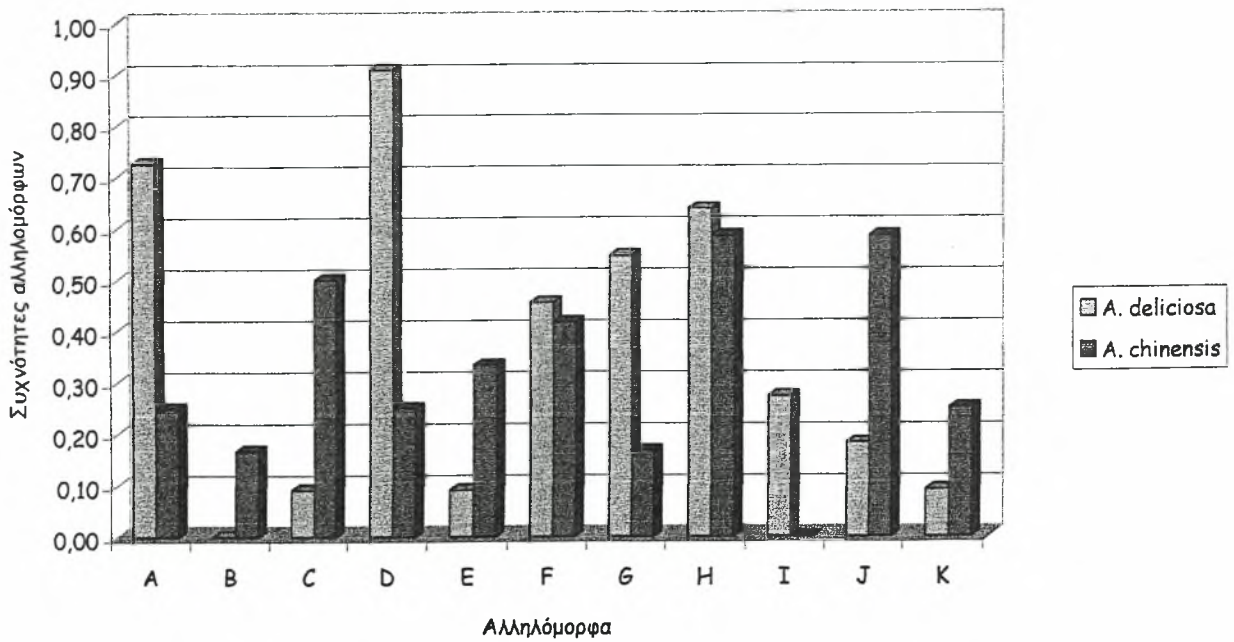
Διάγραμμα 20: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-030.



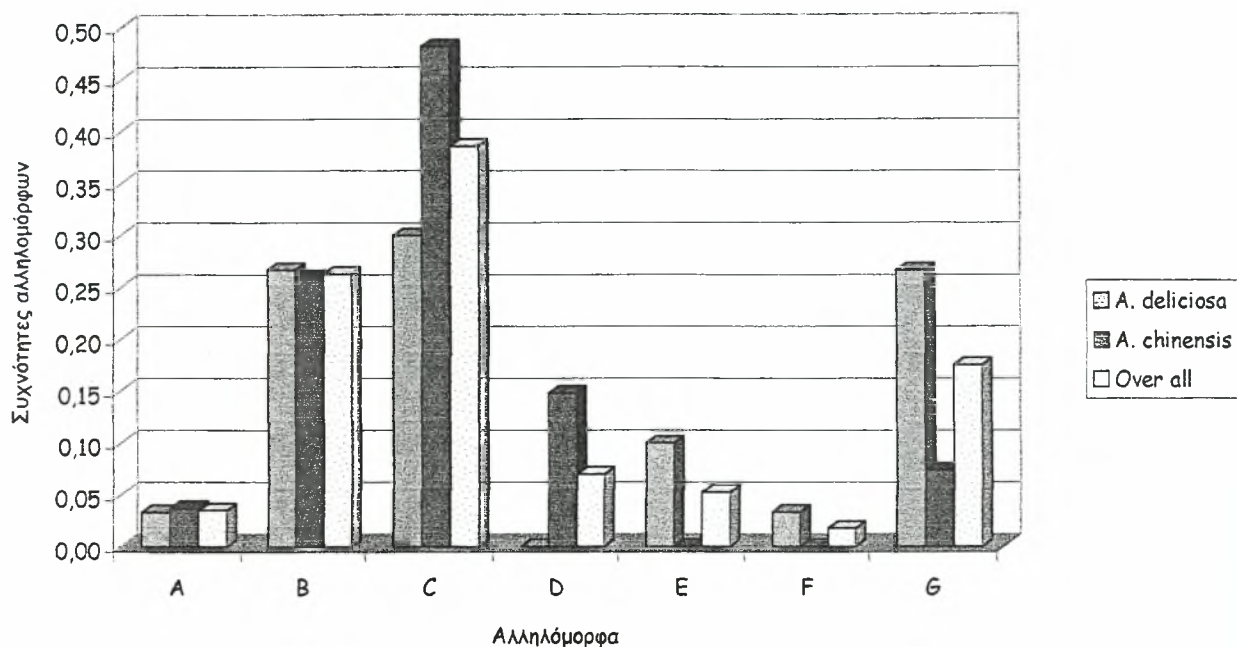
Διάγραμμα 21: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-033 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*



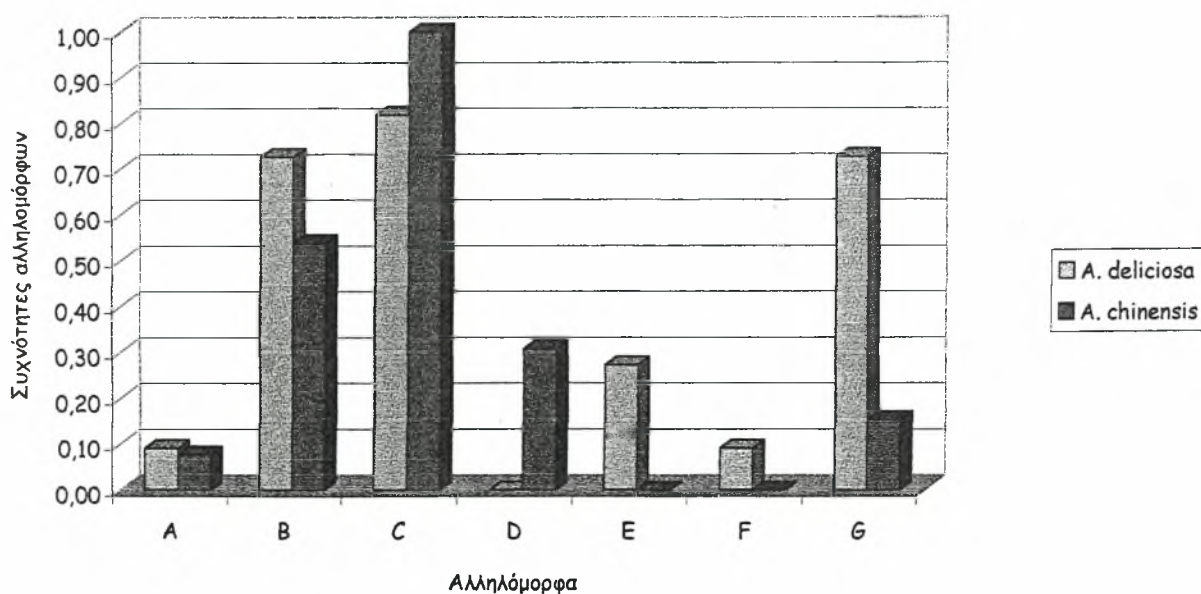
Διάγραμμα 22: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-033



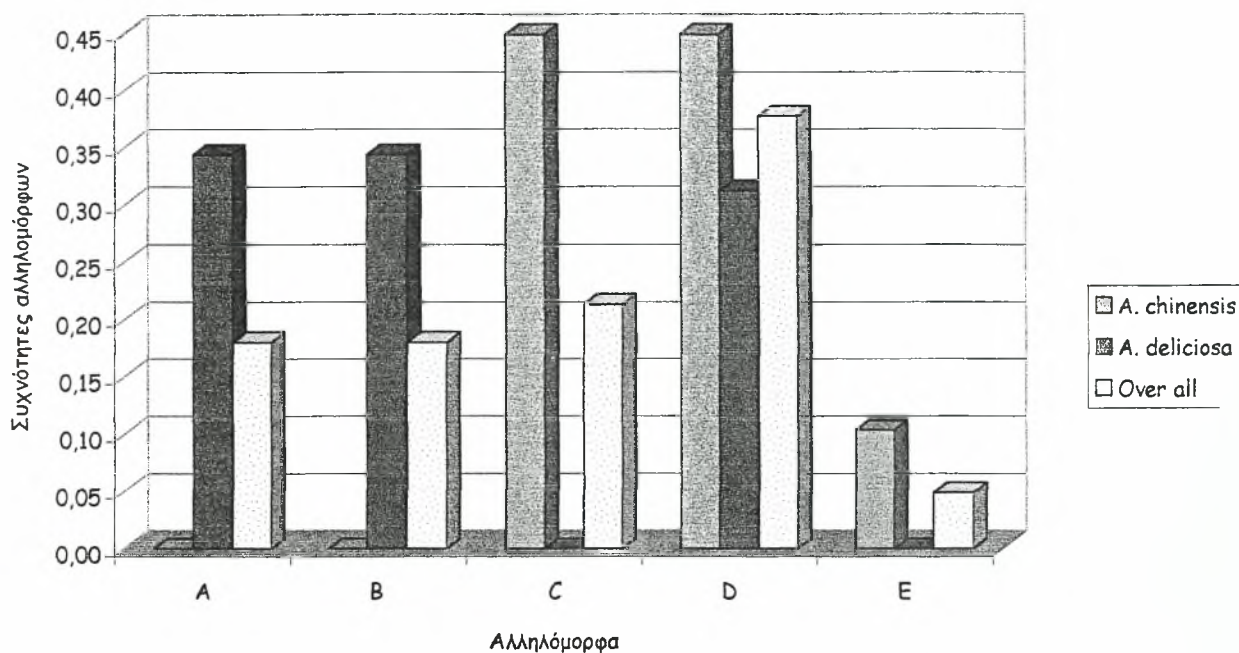
Διάγραμμα 23: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-034 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*



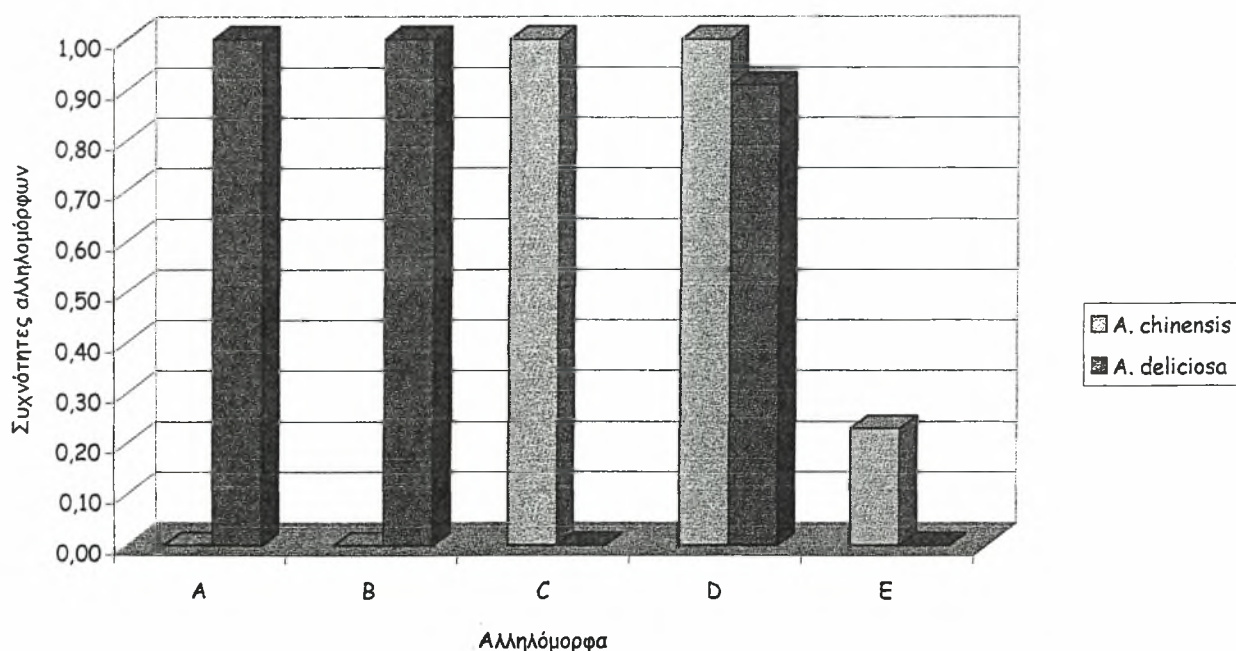
Διάγραμμα 24: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-034.



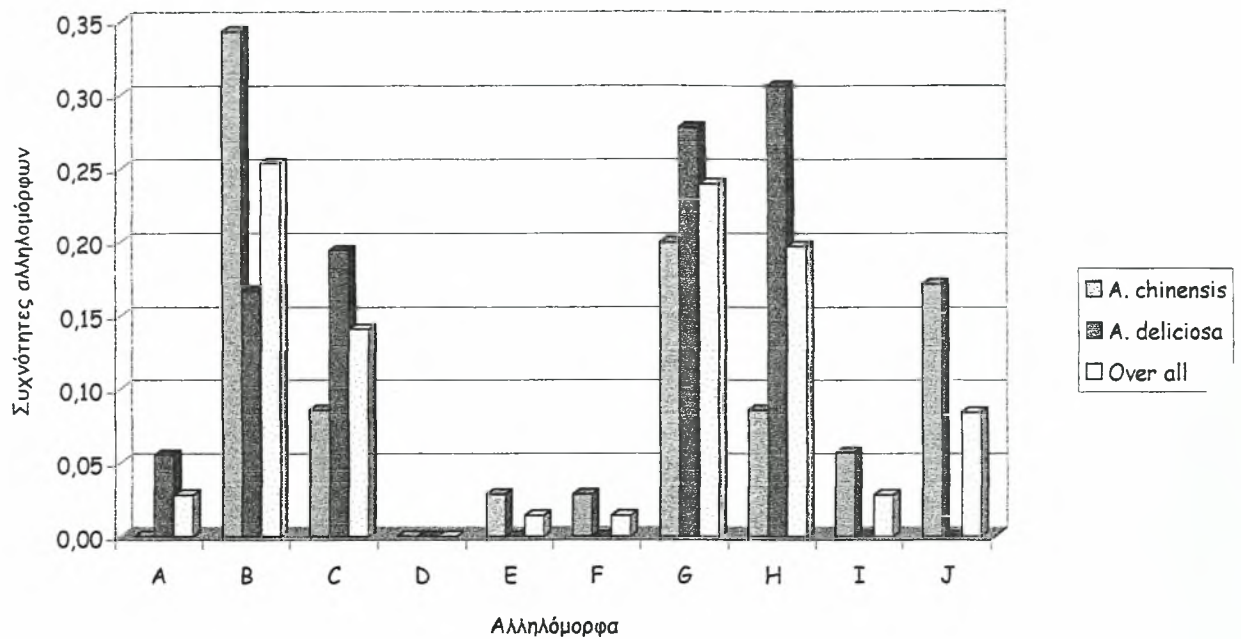
Διάγραμμα 25: Συχνότητες αλληλομόρφων γενύματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-035a των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



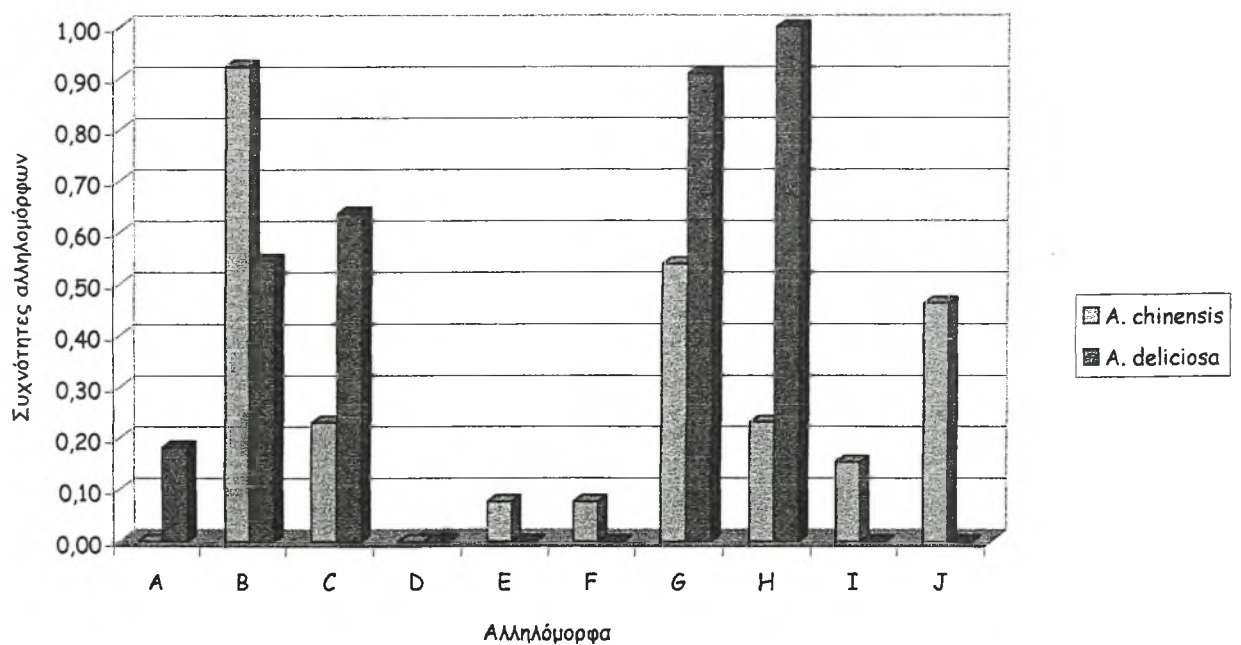
Διάγραμμα 26: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-035a.



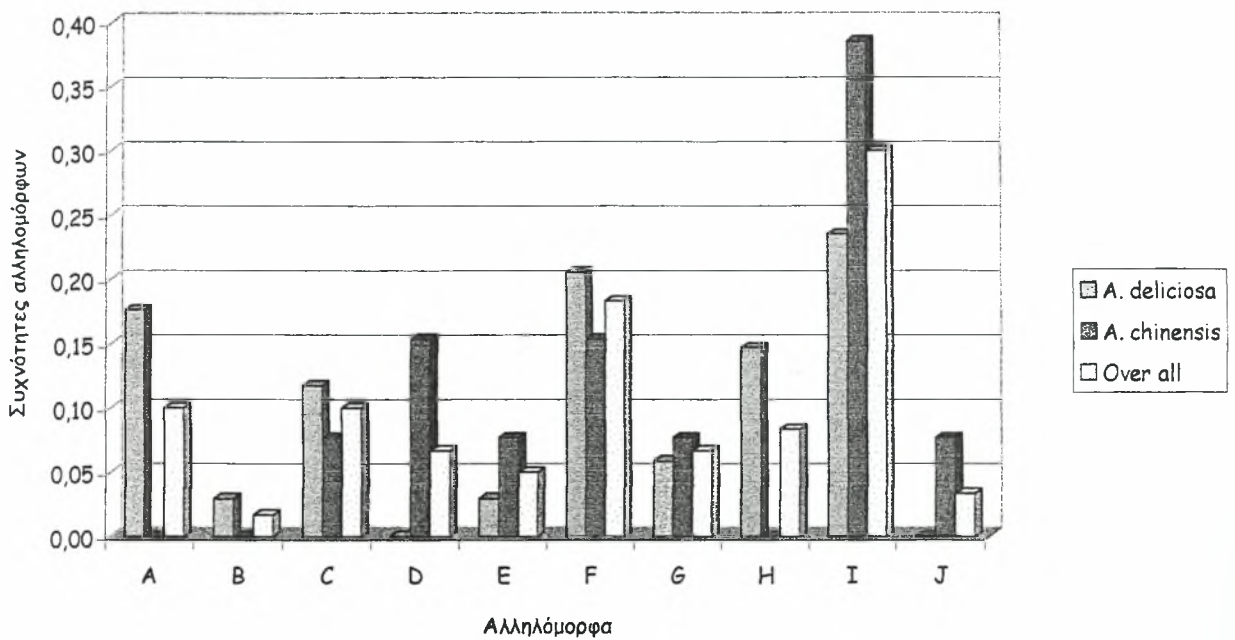
Διάγραμμα 27: Συχνότητες αλληλομόρφων γενύματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-035b των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



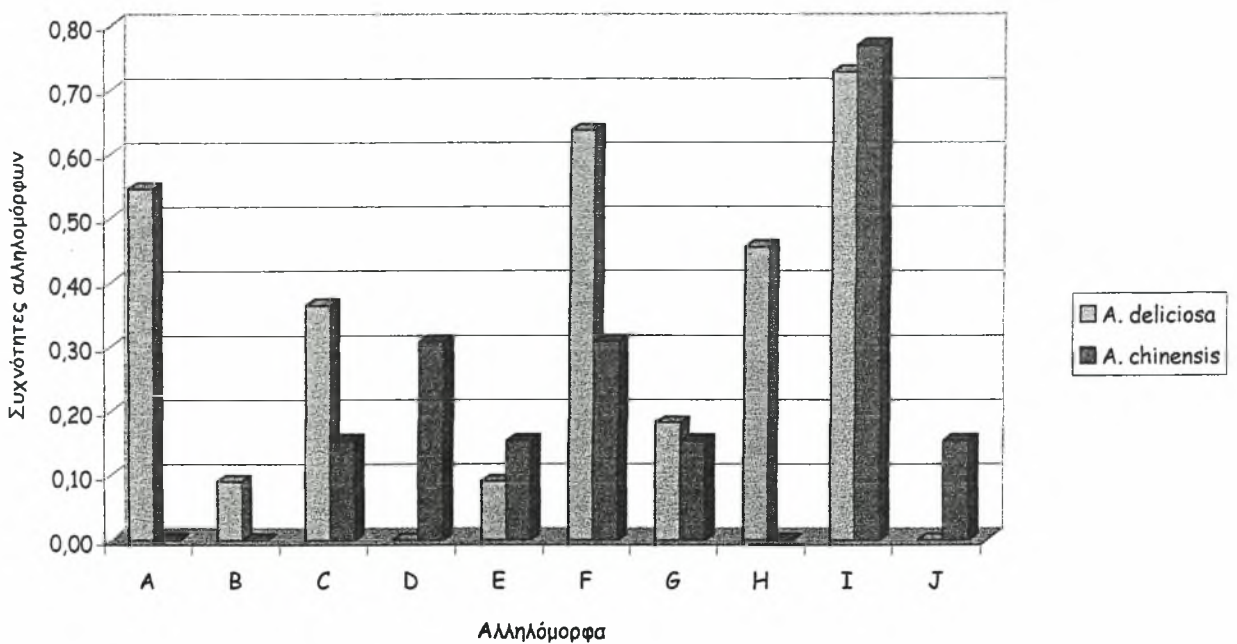
Διάγραμμα 28: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-035b.



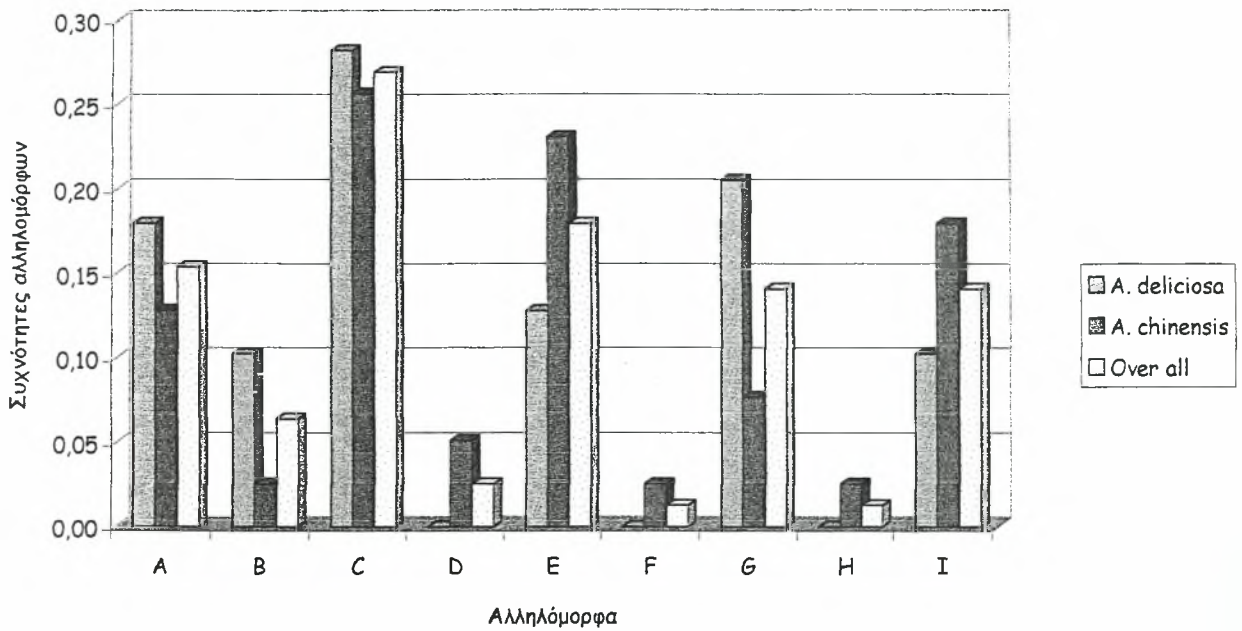
Διάγραμμα 29: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-037 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



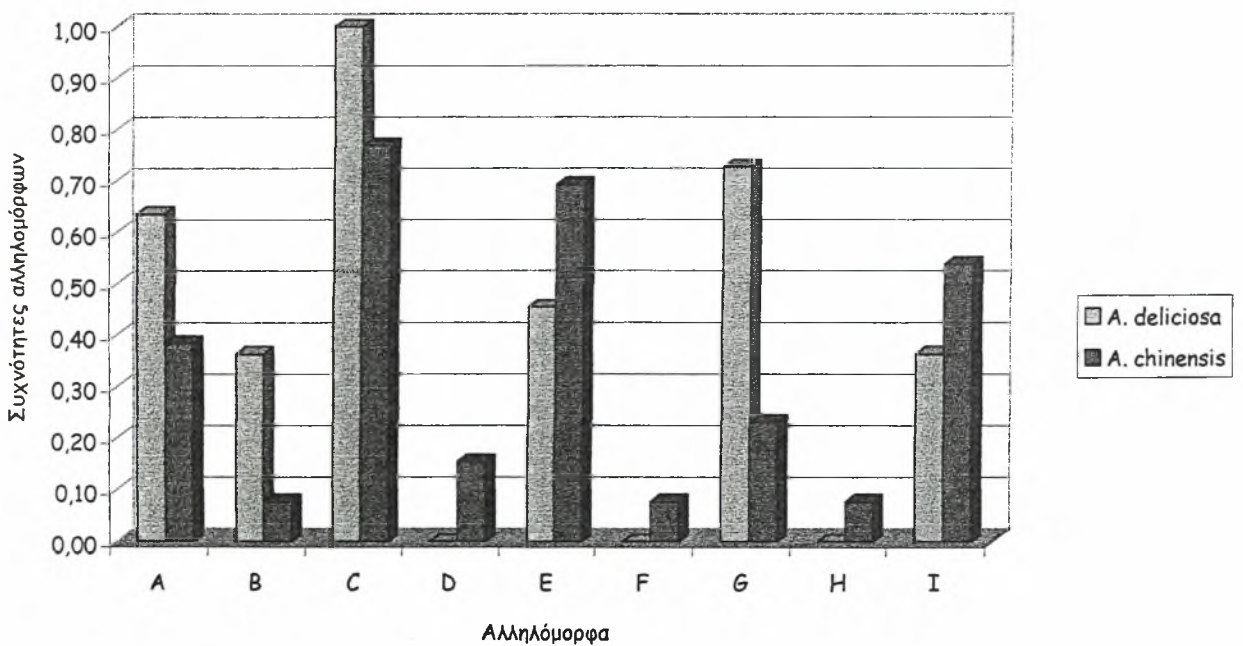
Διάγραμμα 30: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-037.



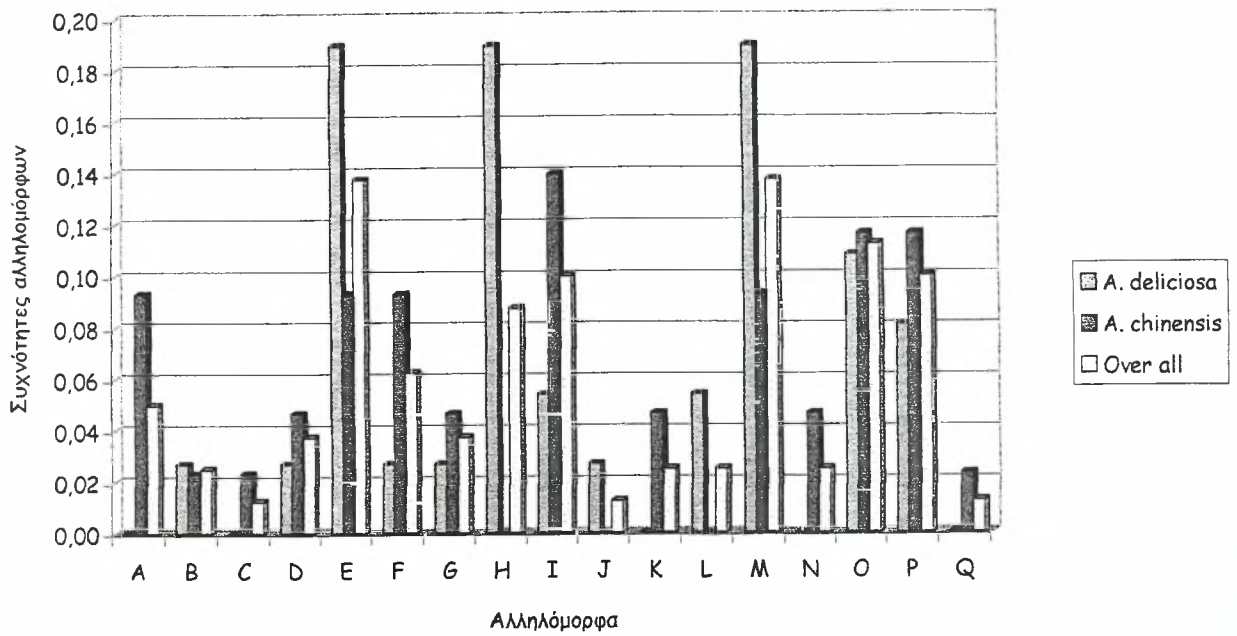
Διάγραμμα 31: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-039 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



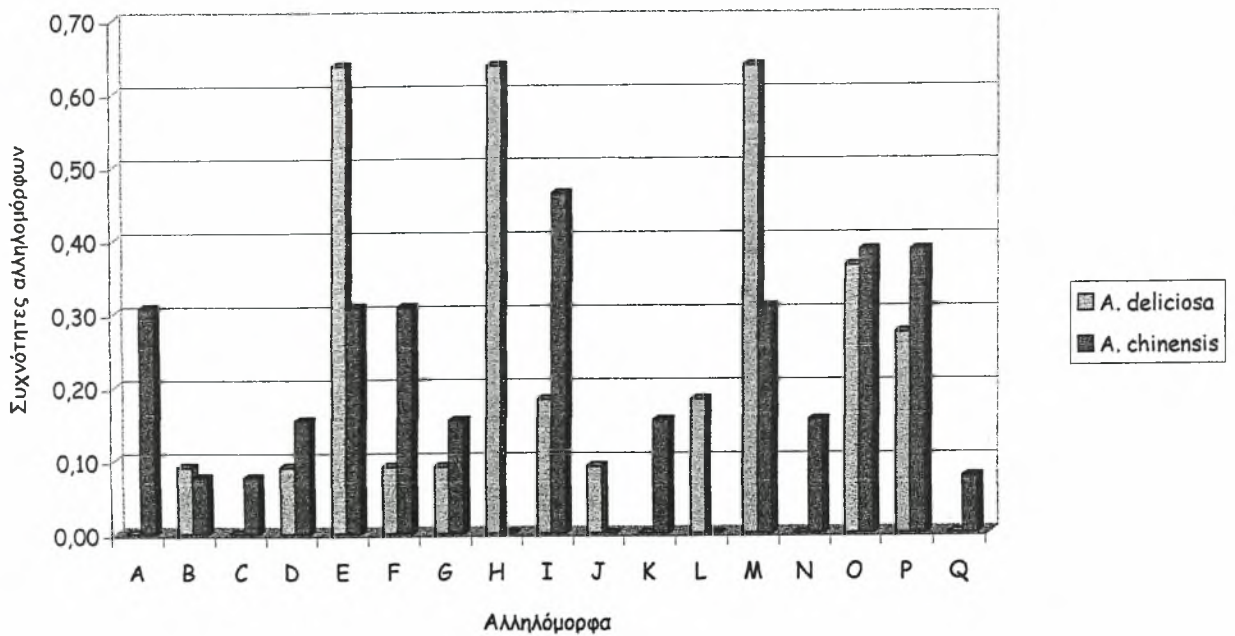
Διάγραμμα 32: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-039.



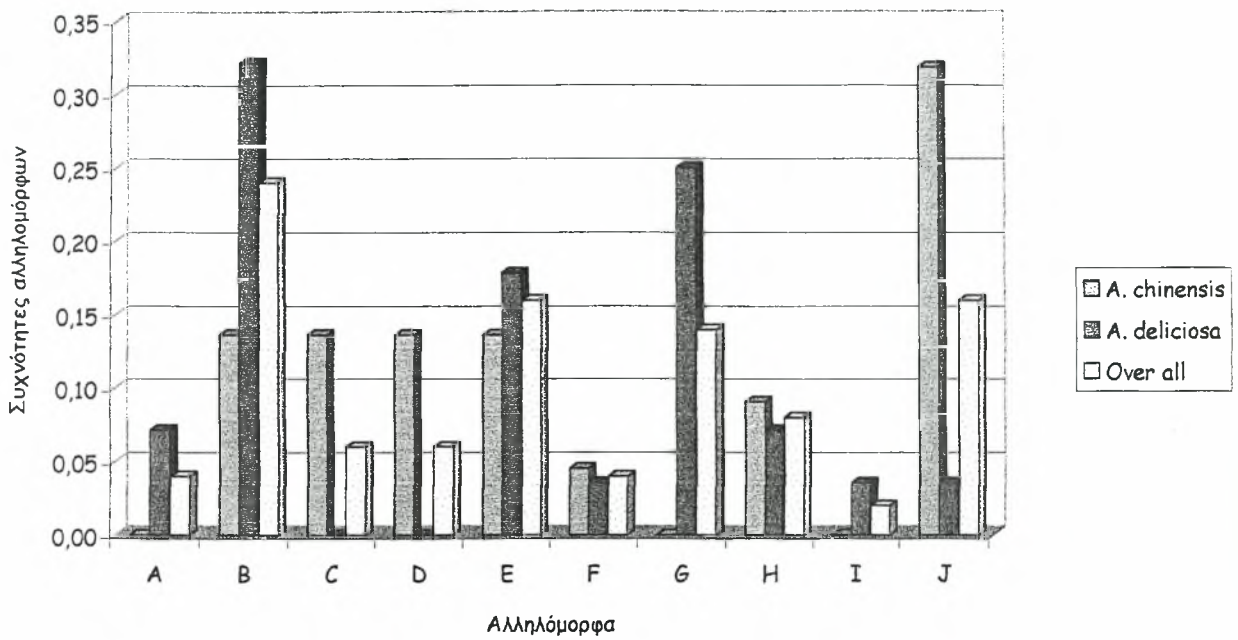
Διάγραμμα 33: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-040 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



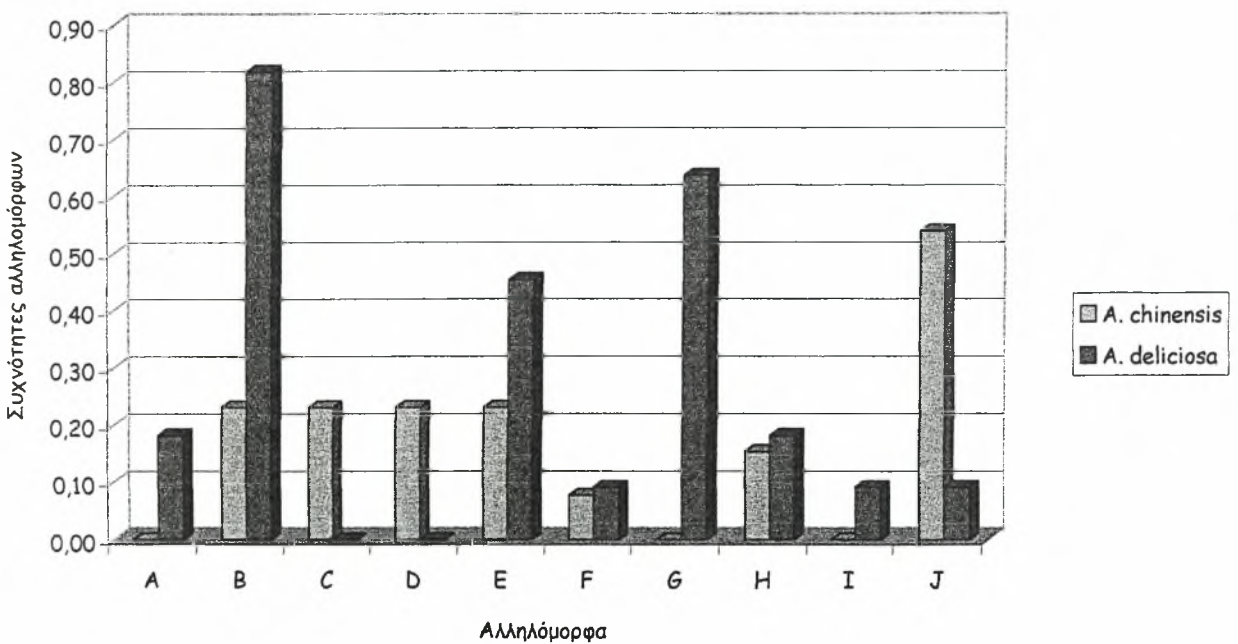
Διάγραμμα 34: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-040



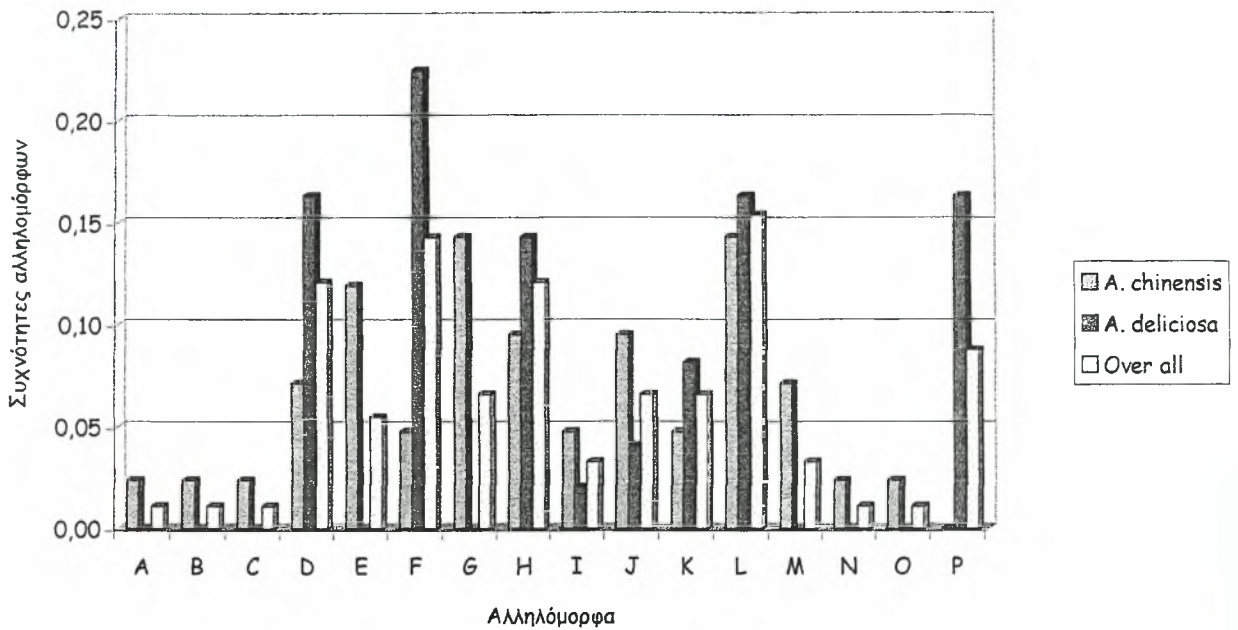
Διάγραμμα 35: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-088 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



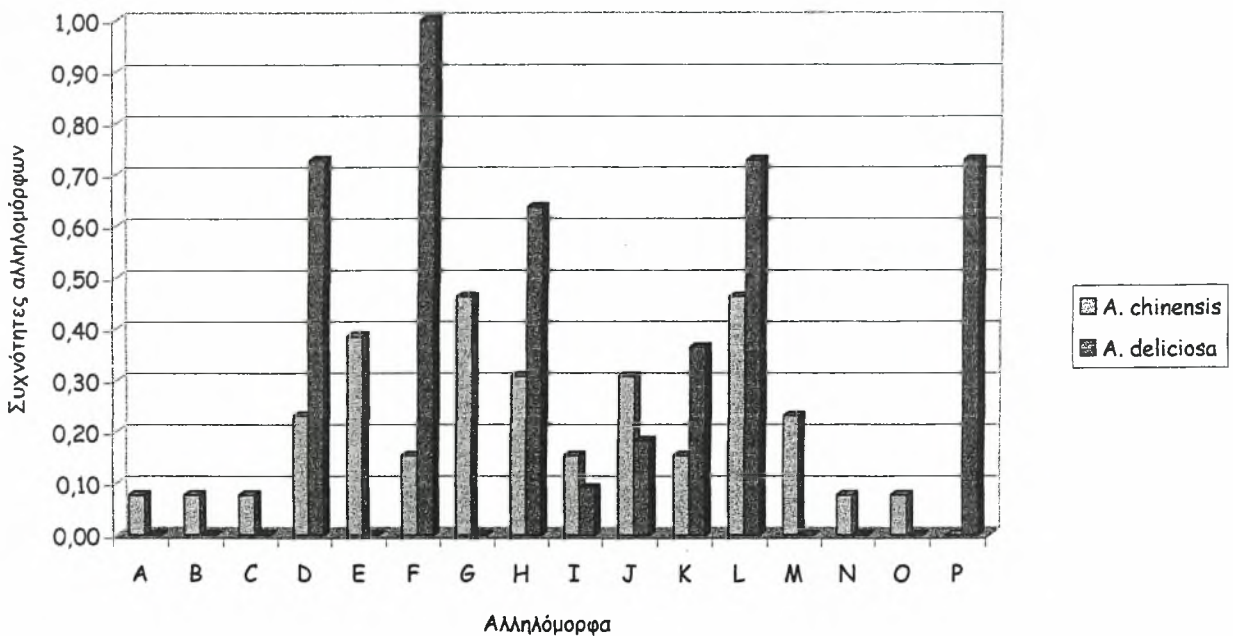
Διάγραμμα 36: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-088.



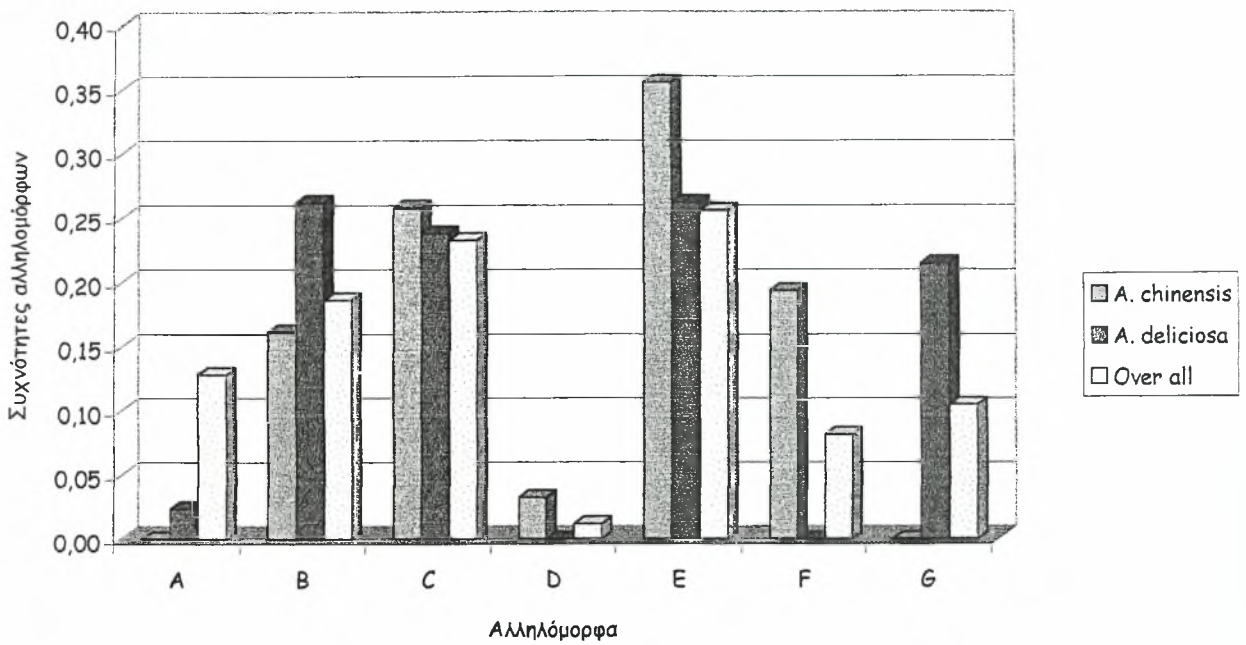
Διάγραμμα 37: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-092 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



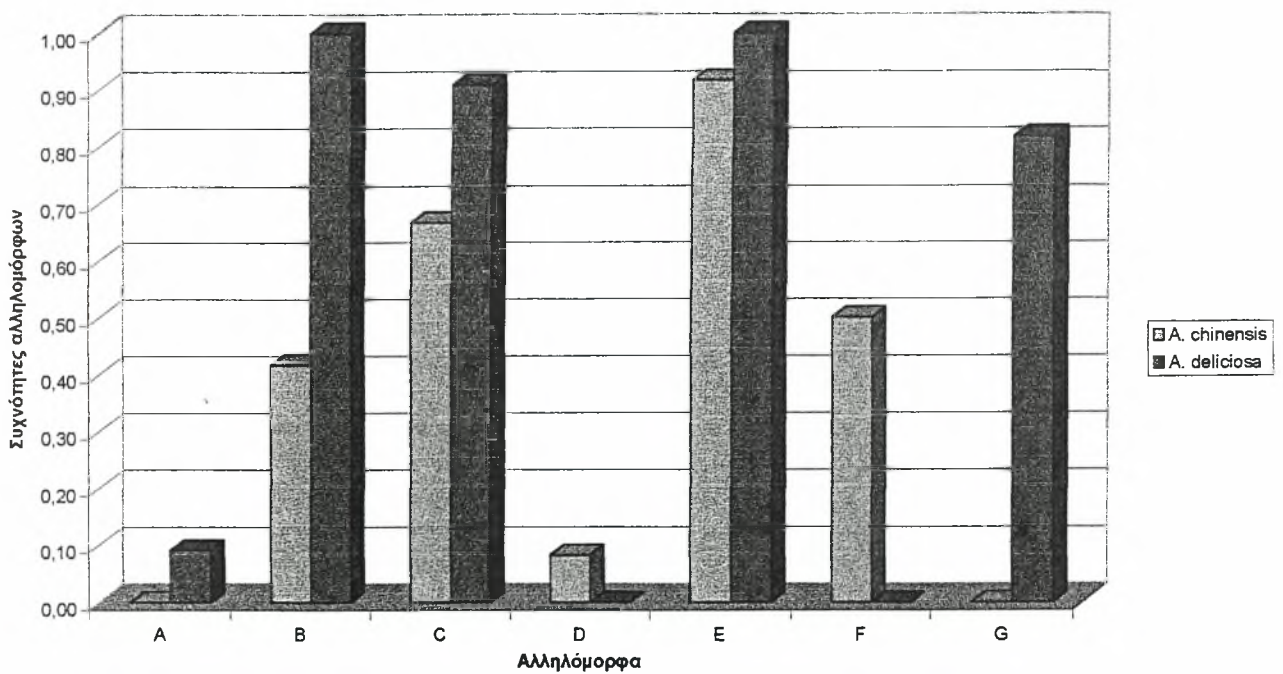
Διάγραμμα 38: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-092



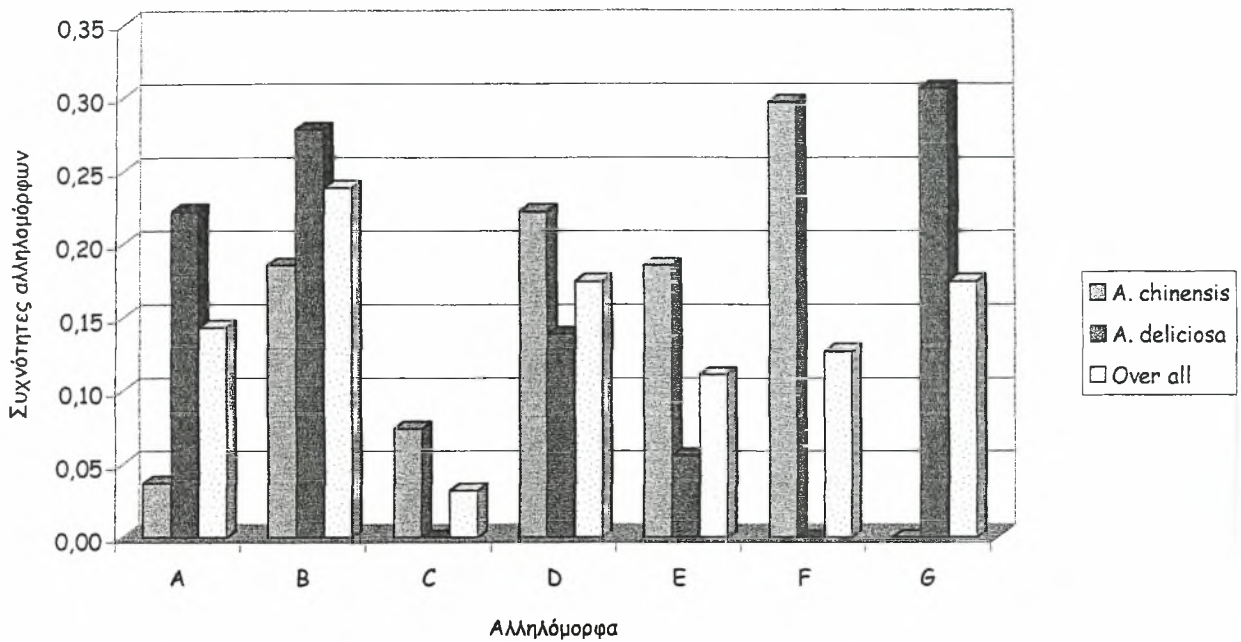
Διάγραμμα 39: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-101 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



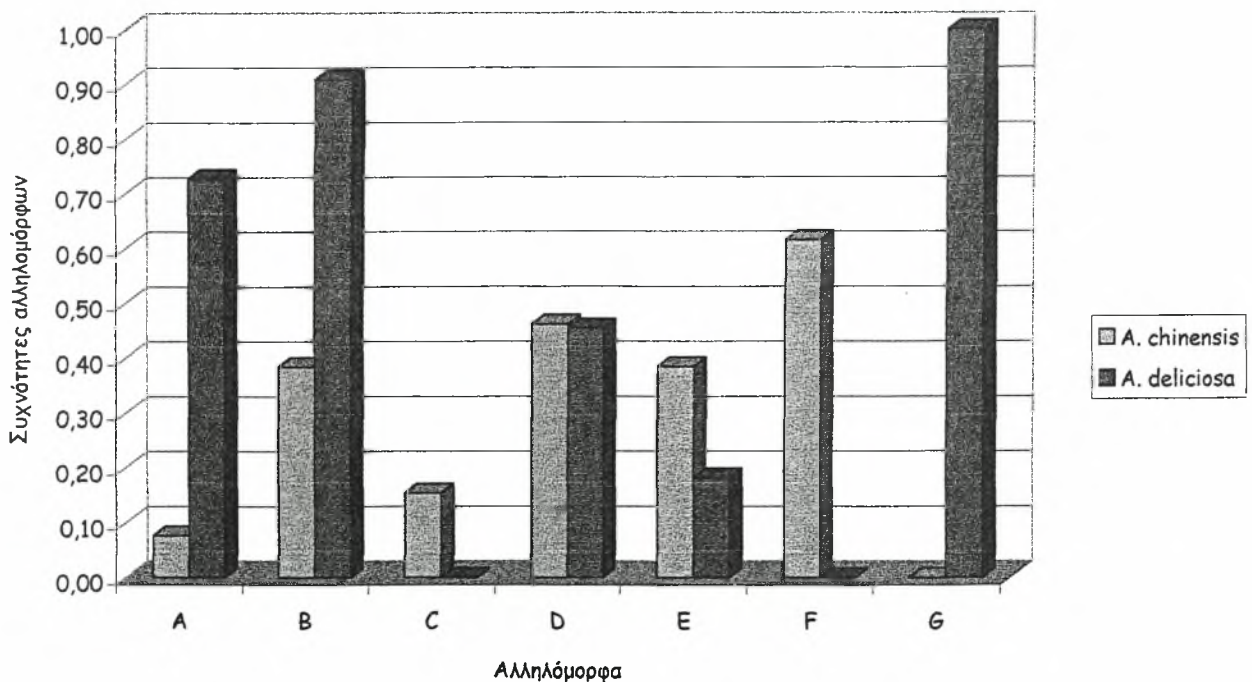
Διάγραμμα 40: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-101.



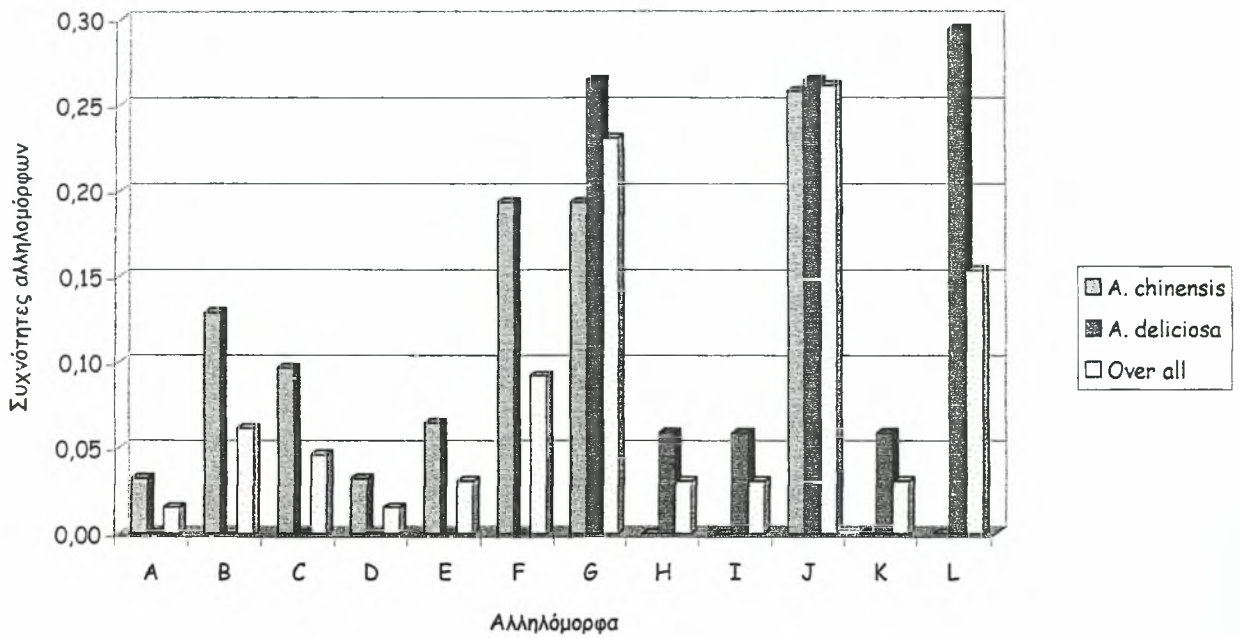
Διάγραμμα 41: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-158 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



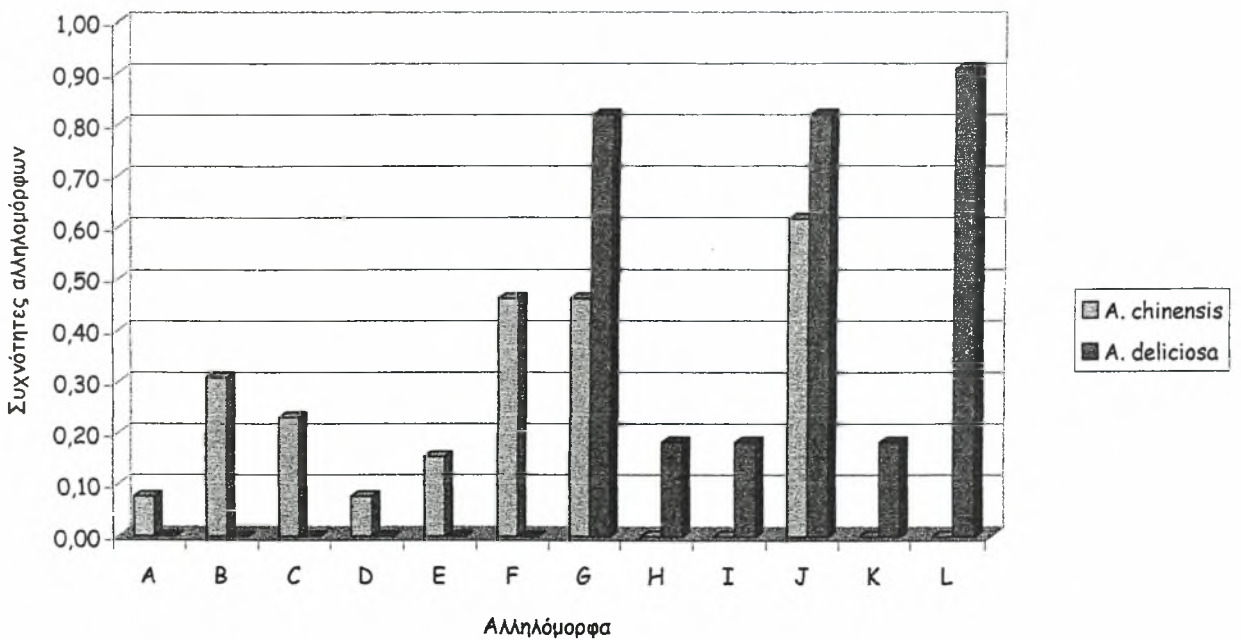
Διάγραμμα 42: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-158.



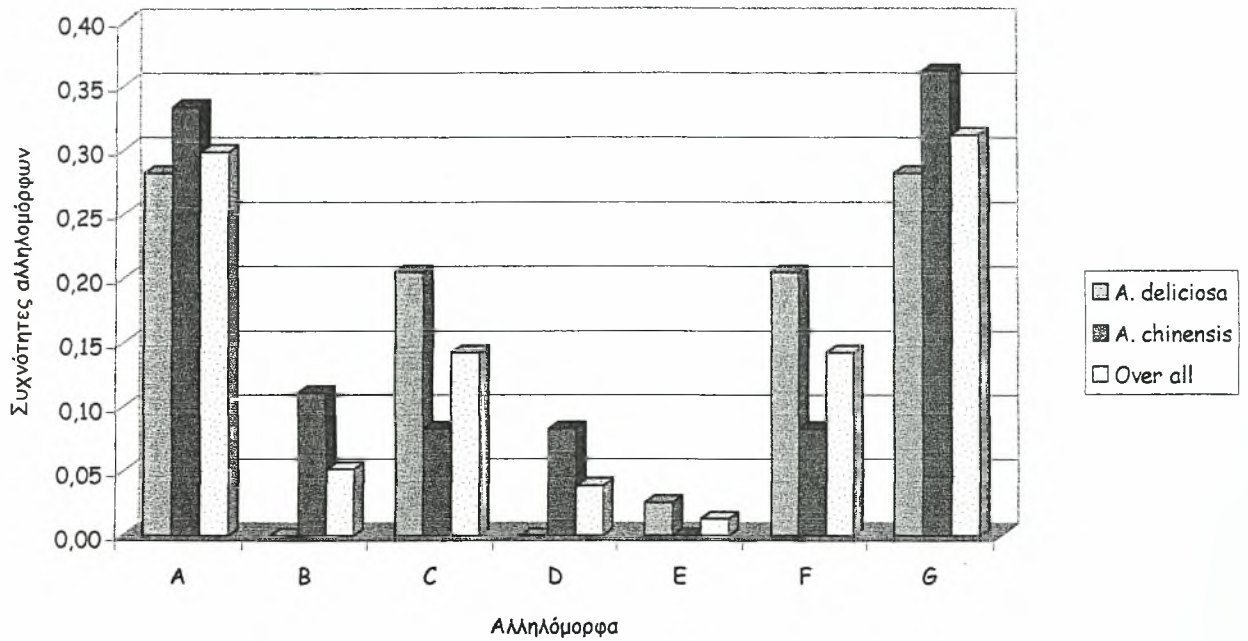
Διάγραμμα 43: Συχνότητες αλληλομόρφων γενύματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-159 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



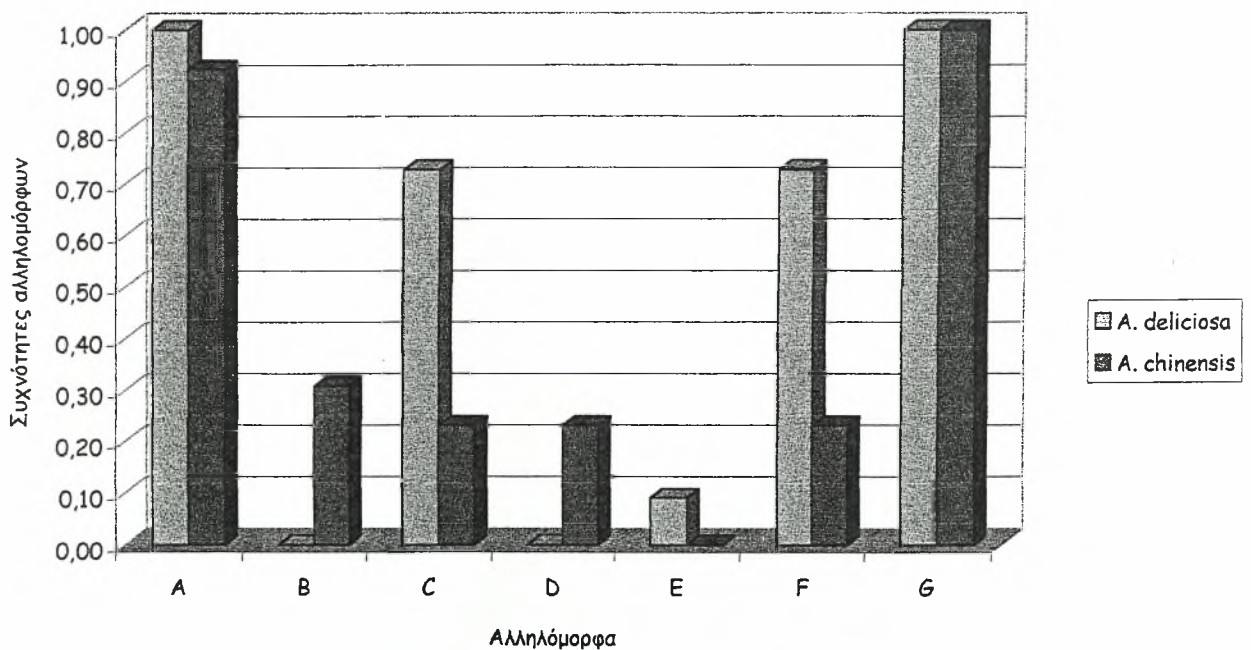
Διάγραμμα 44: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK96-159.



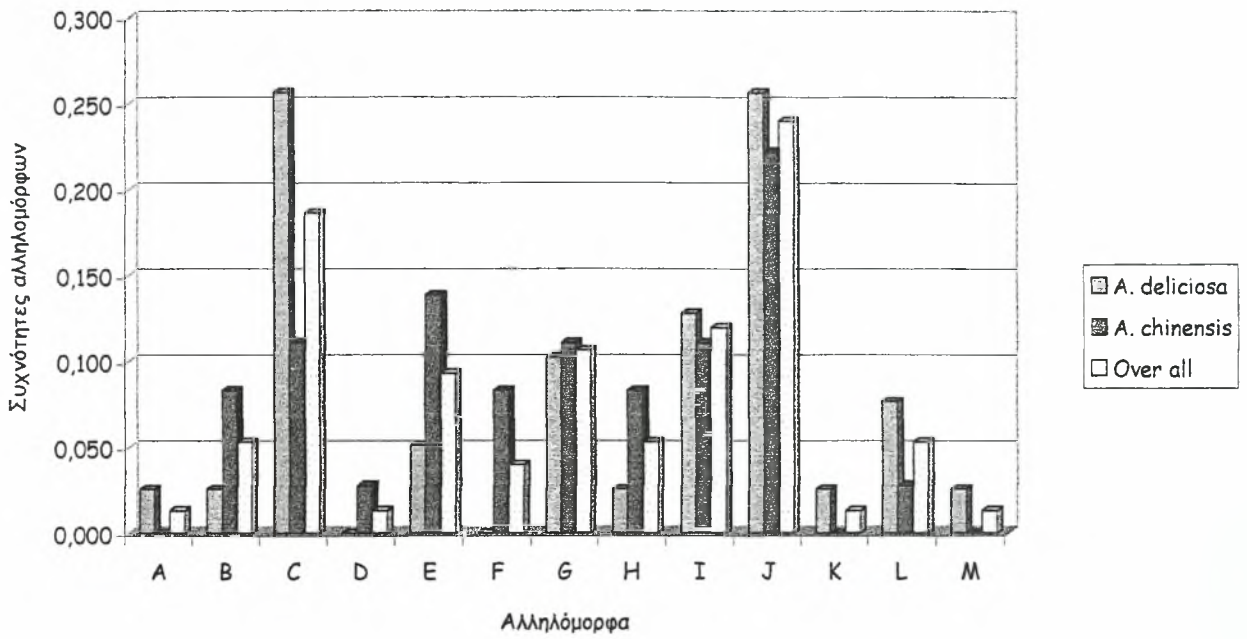
Διάγραμμα 45: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-401 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



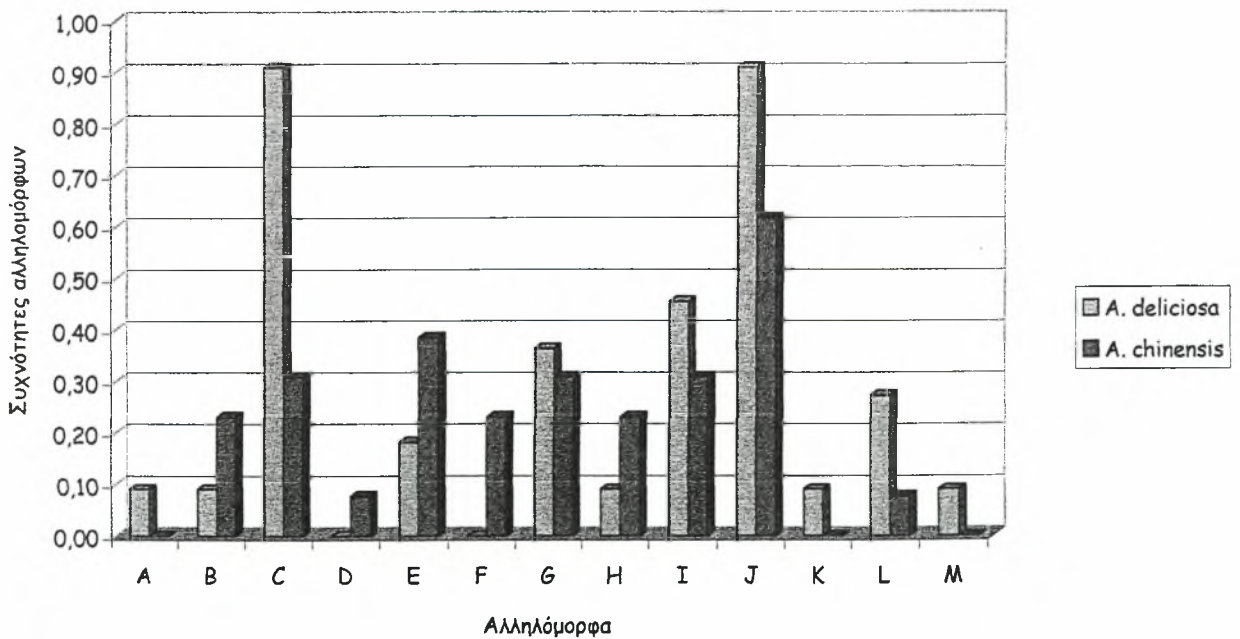
Διάγραμμα 46: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-401



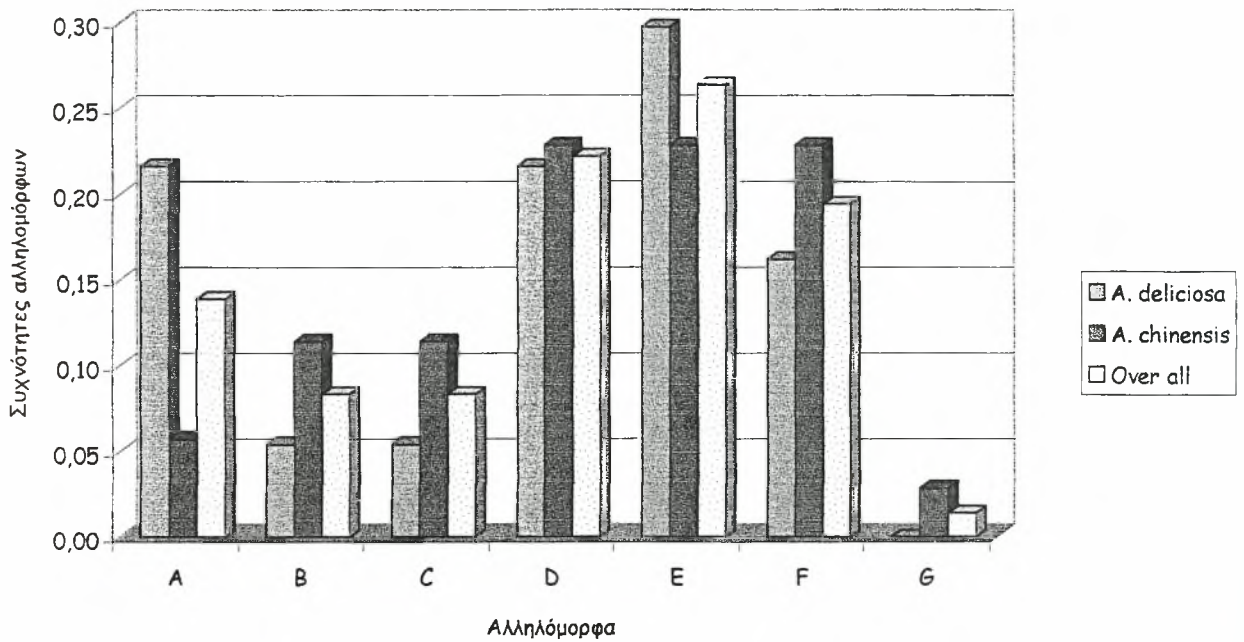
Διάγραμμα 47: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-420 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



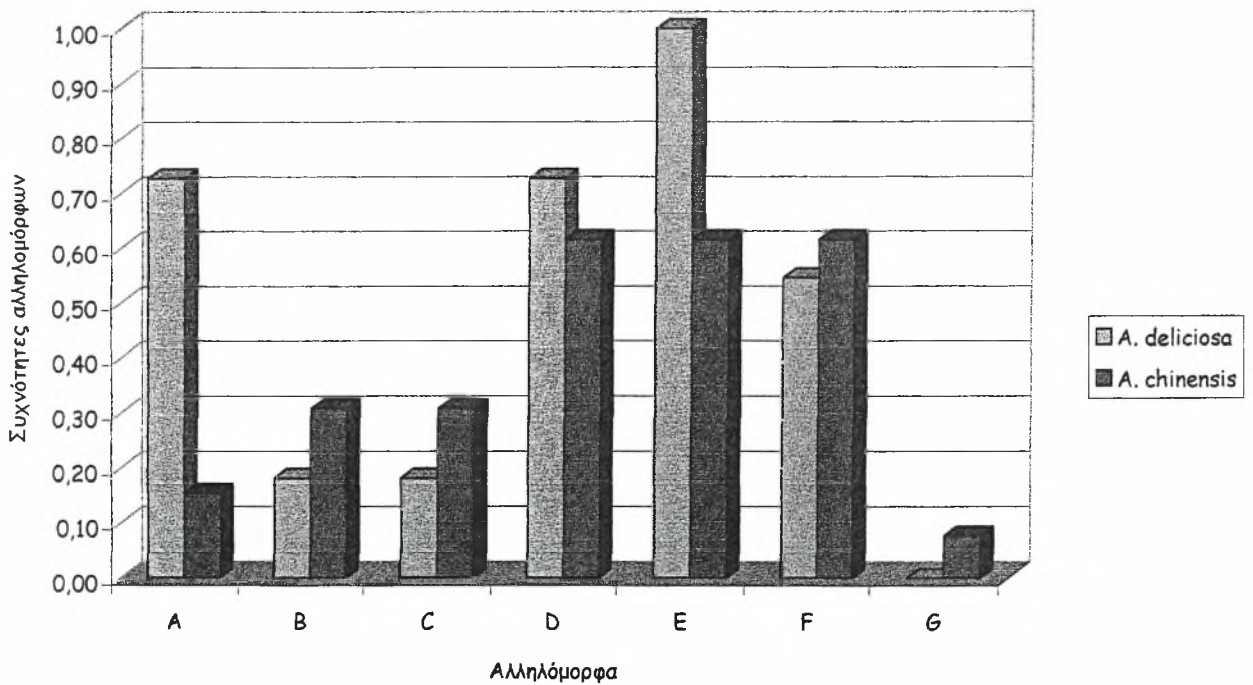
Διάγραμμα 48: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-402



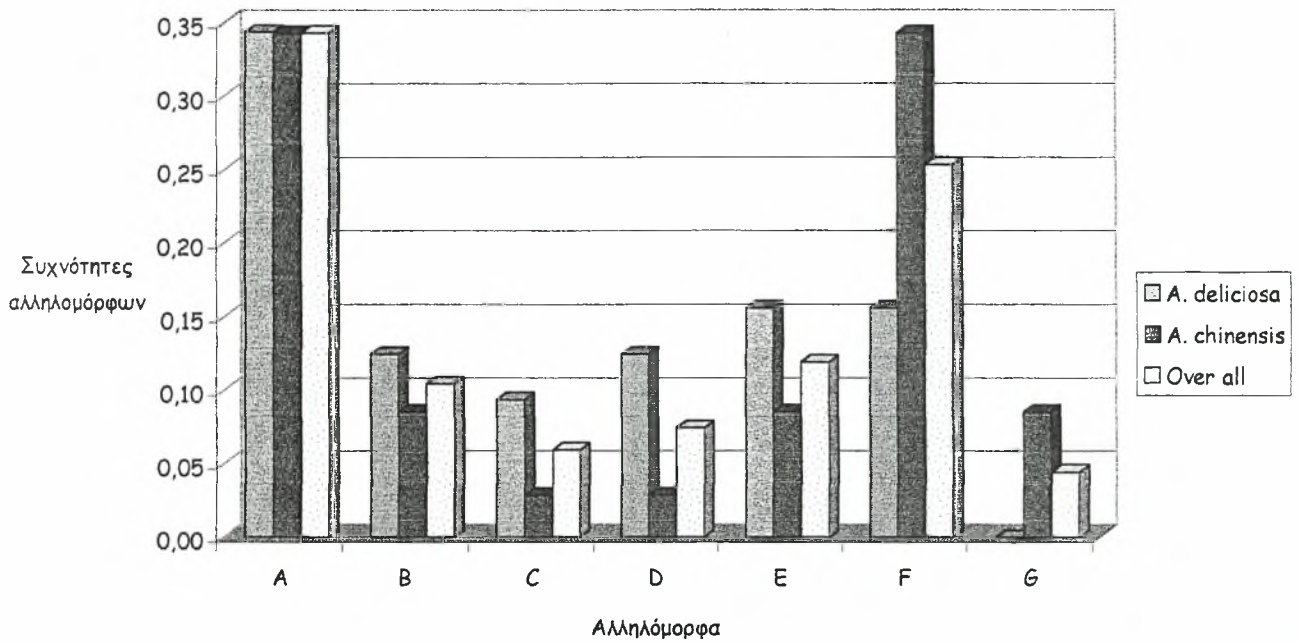
Διάγραμμα 49: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-404 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



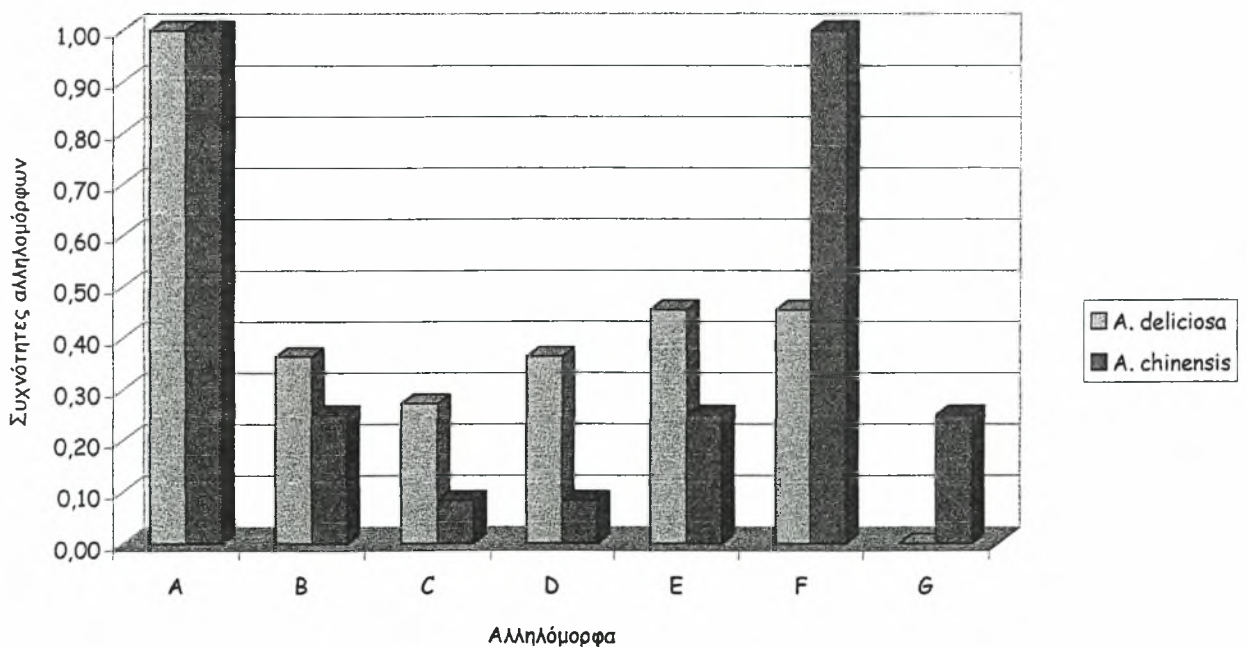
Διάγραμμα 50: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-404



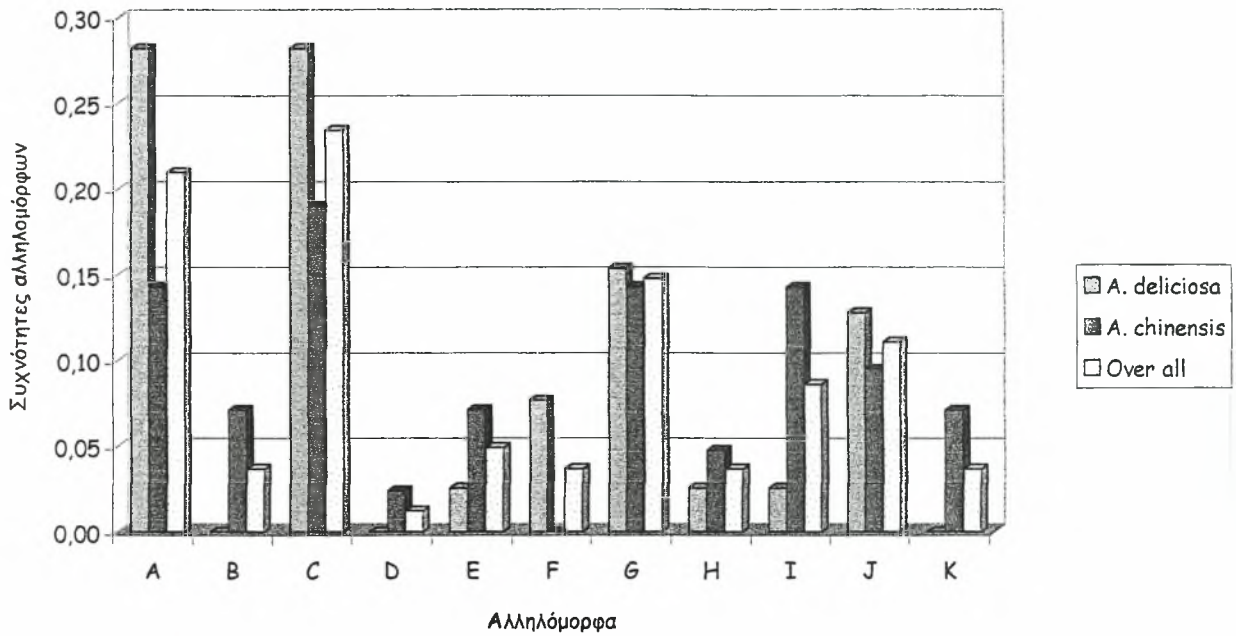
Διάγραμμα 51: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-405 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



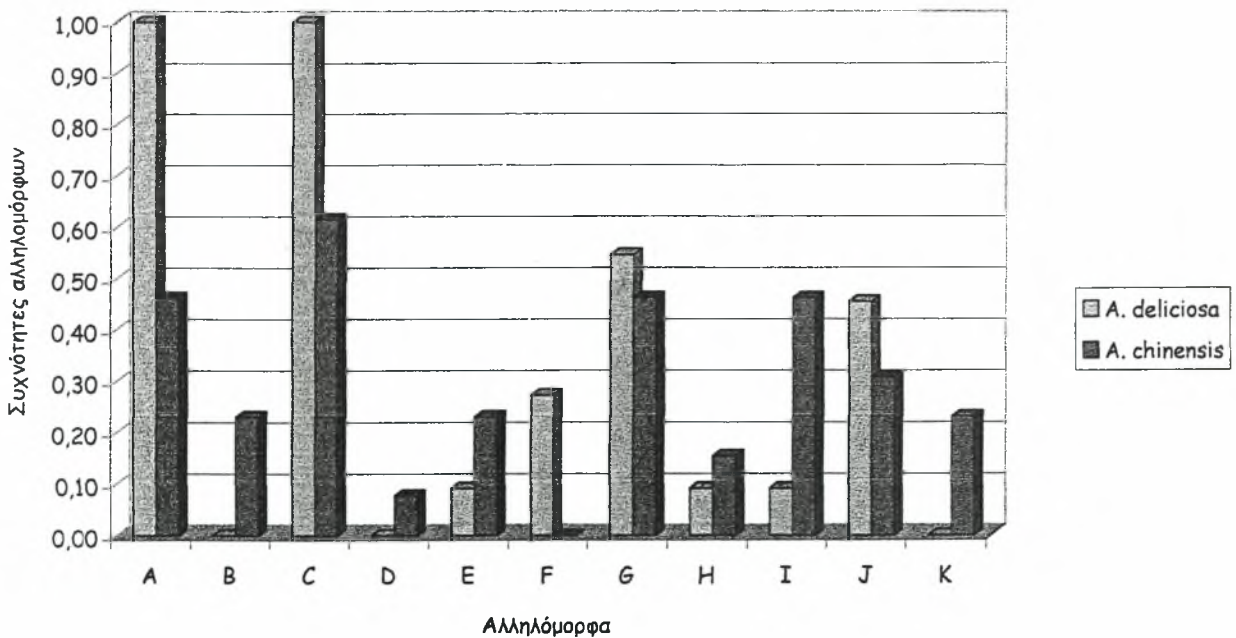
Διάγραμμα 52: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-405



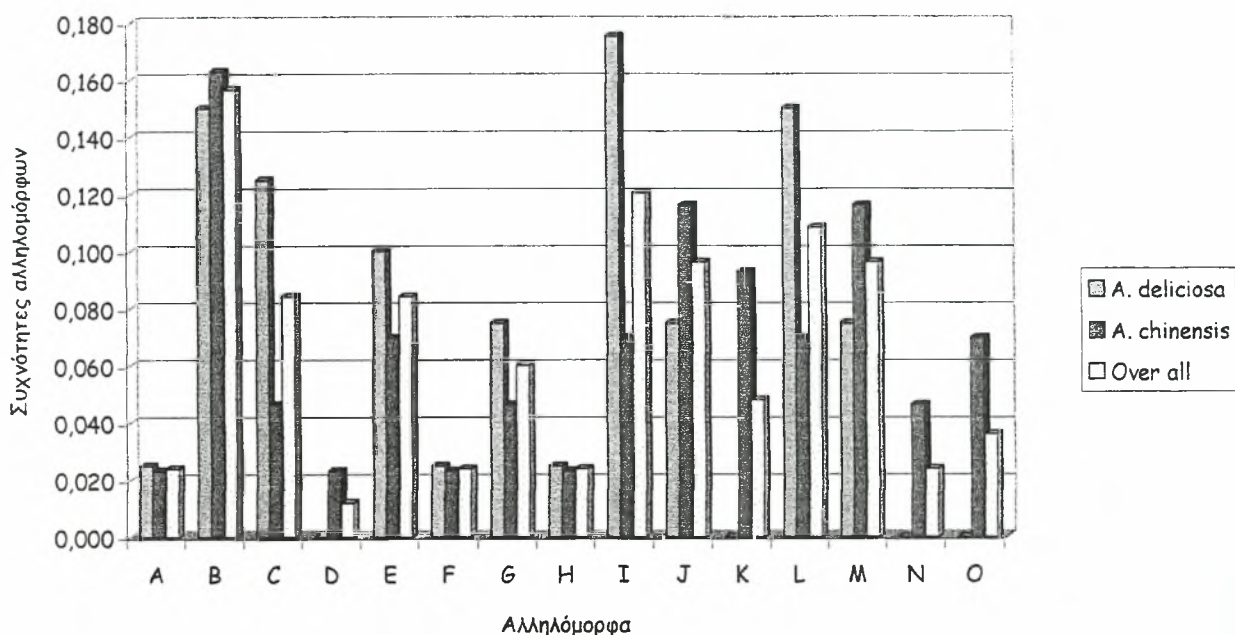
Διάγραμμα 53: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-406 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



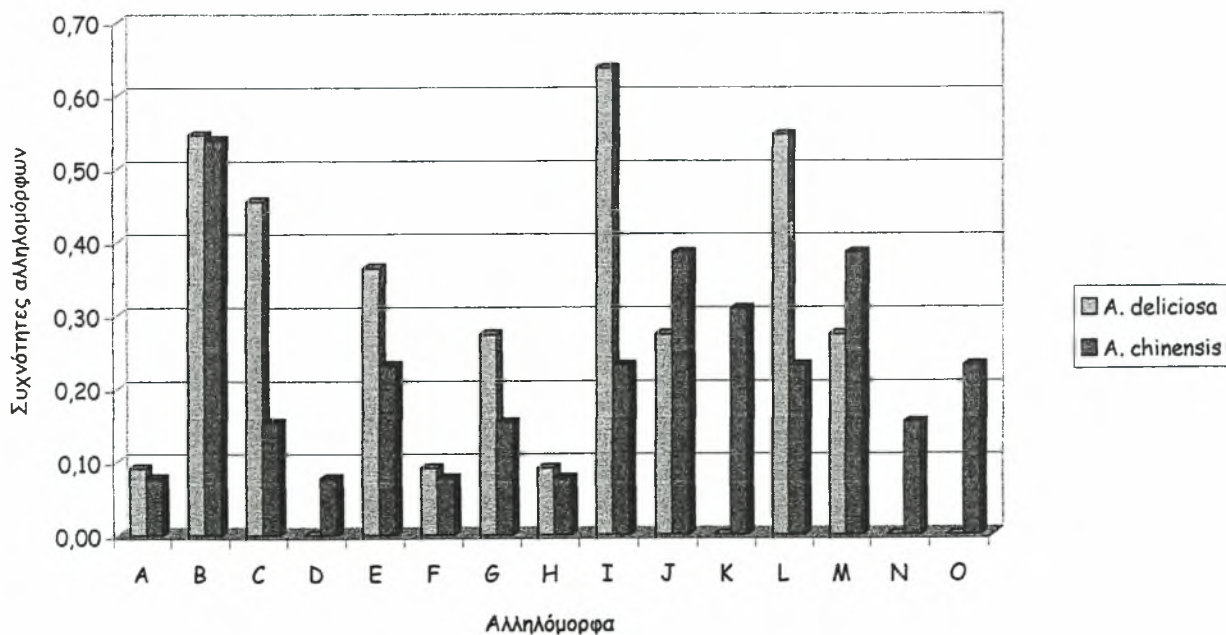
Διάγραμμα 54: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-406.



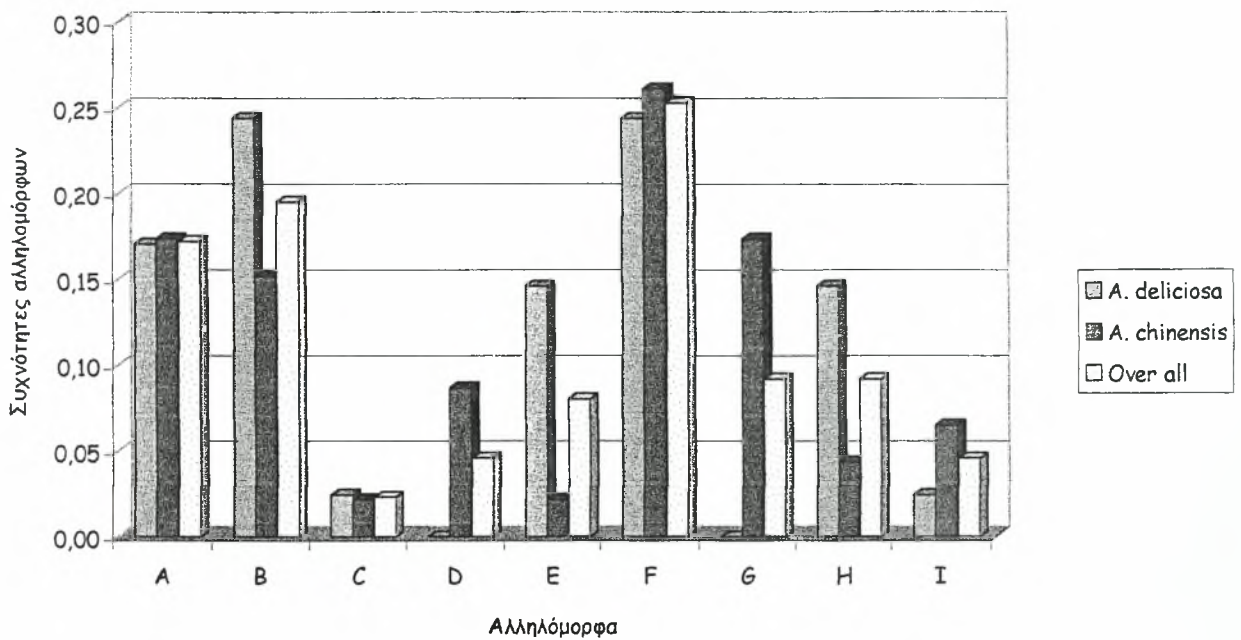
Διάγραμμα 55: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-407 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*



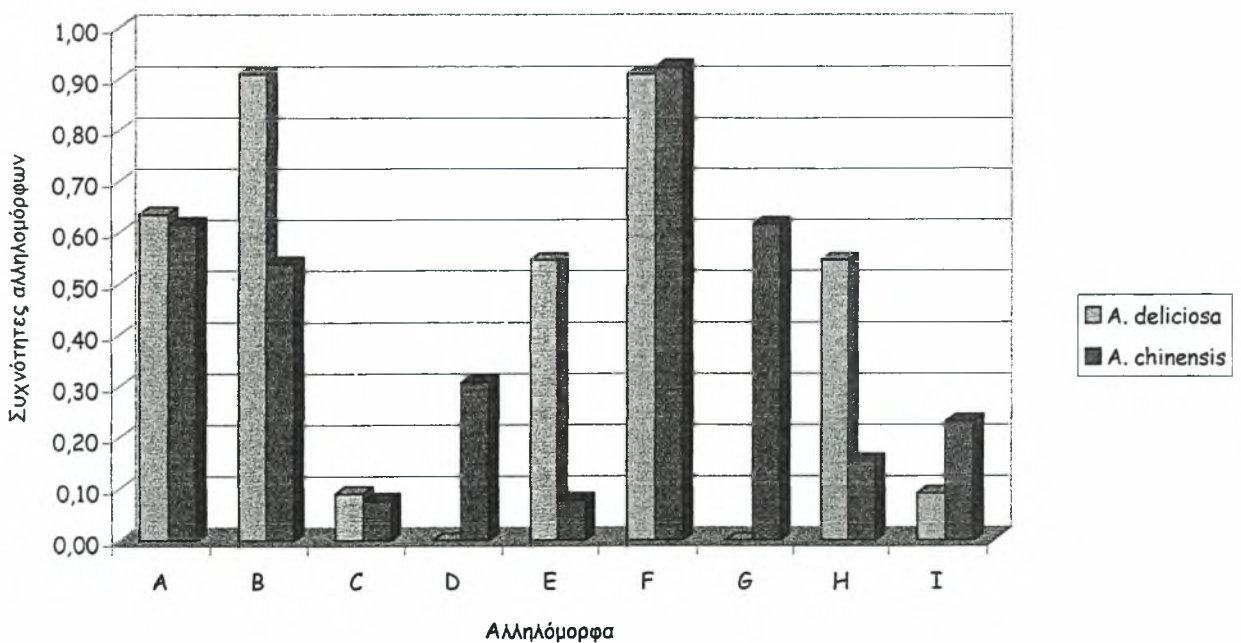
Διάγραμμα 56: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-407.



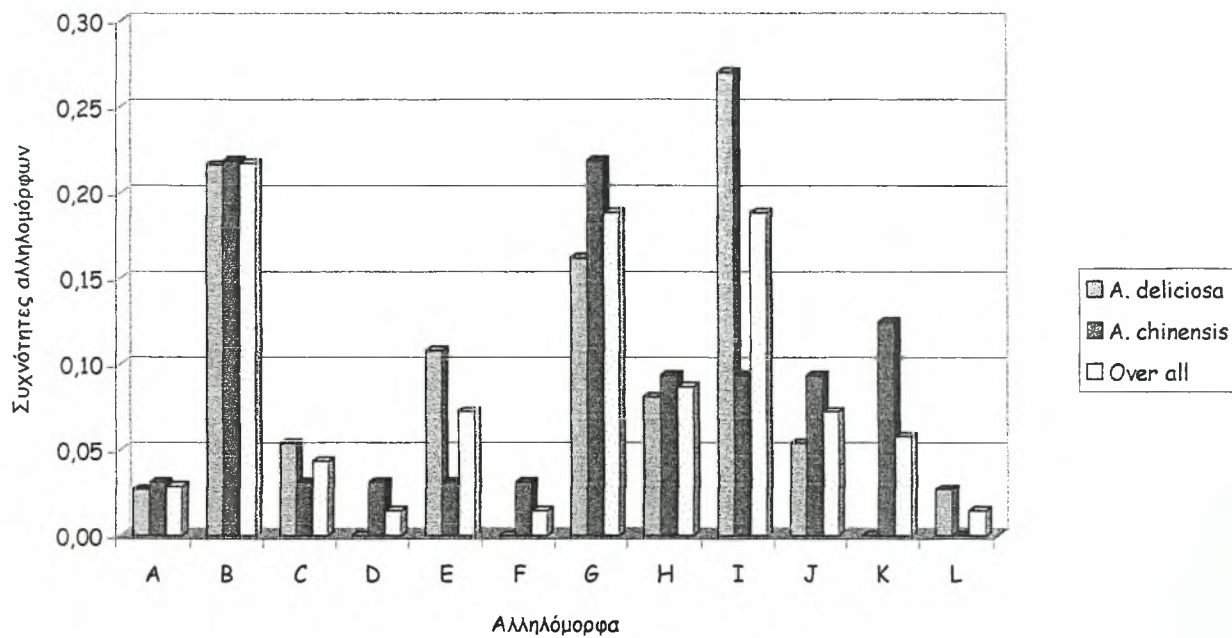
Διάγραμμα 57: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-408 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



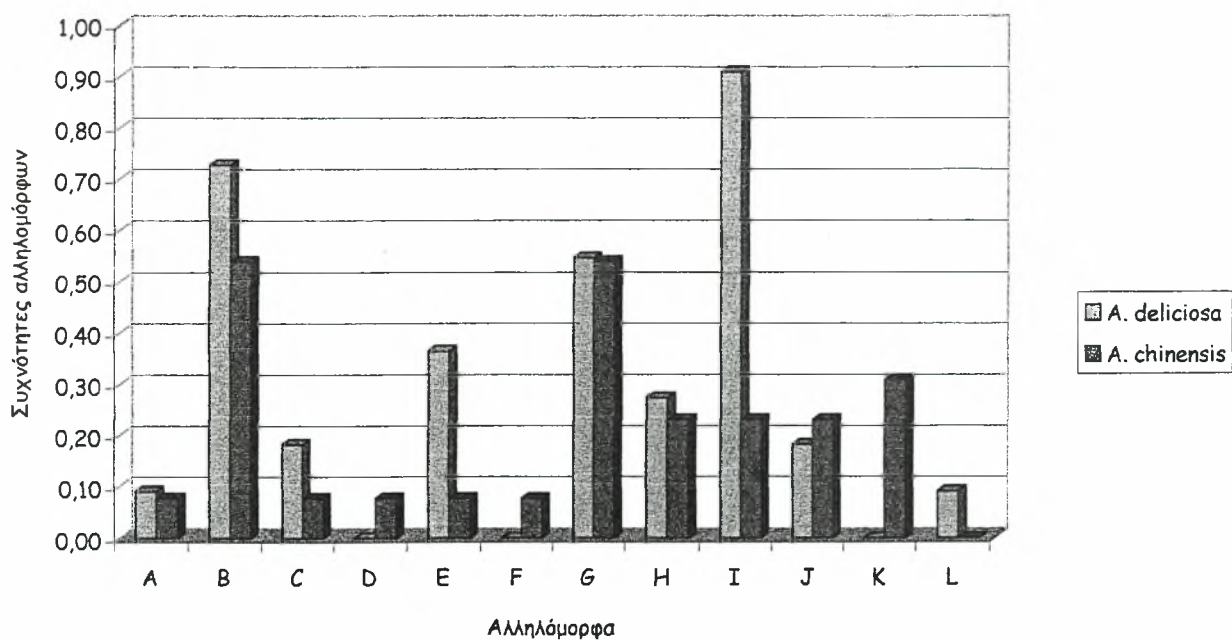
Διάγραμμα 58: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-408



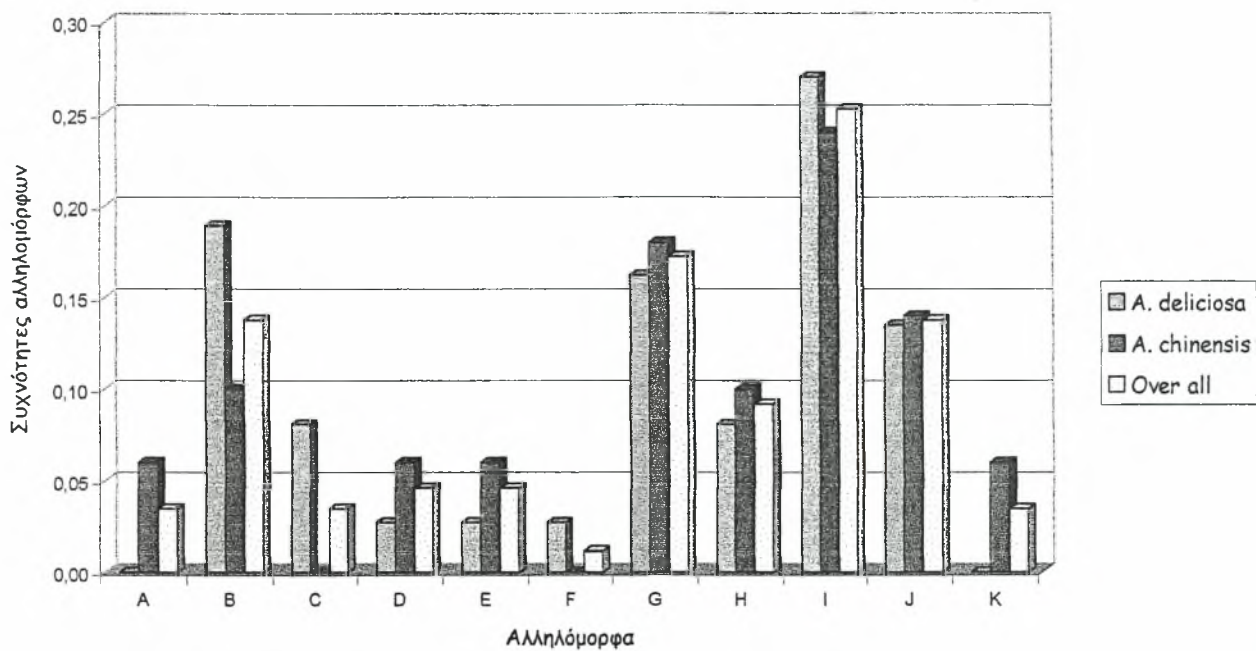
Διάγραμμα 59: Συχνότητες αλληλομόρφων γενύματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-409 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



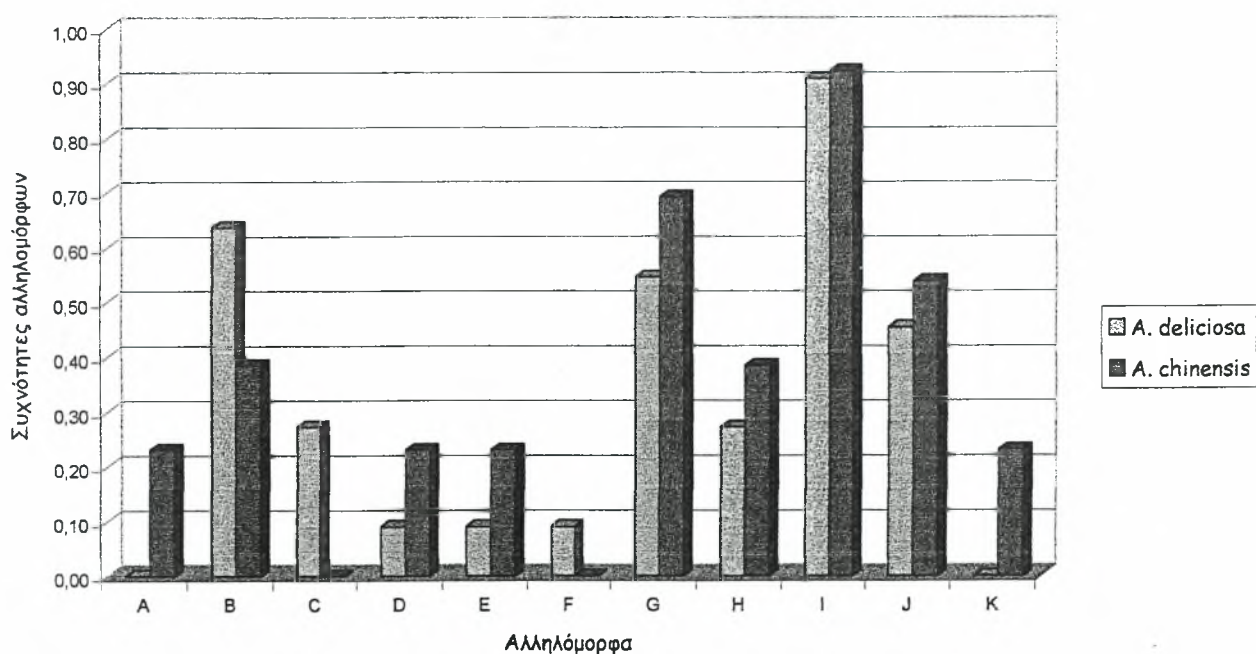
Διάγραμμα 60: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-409



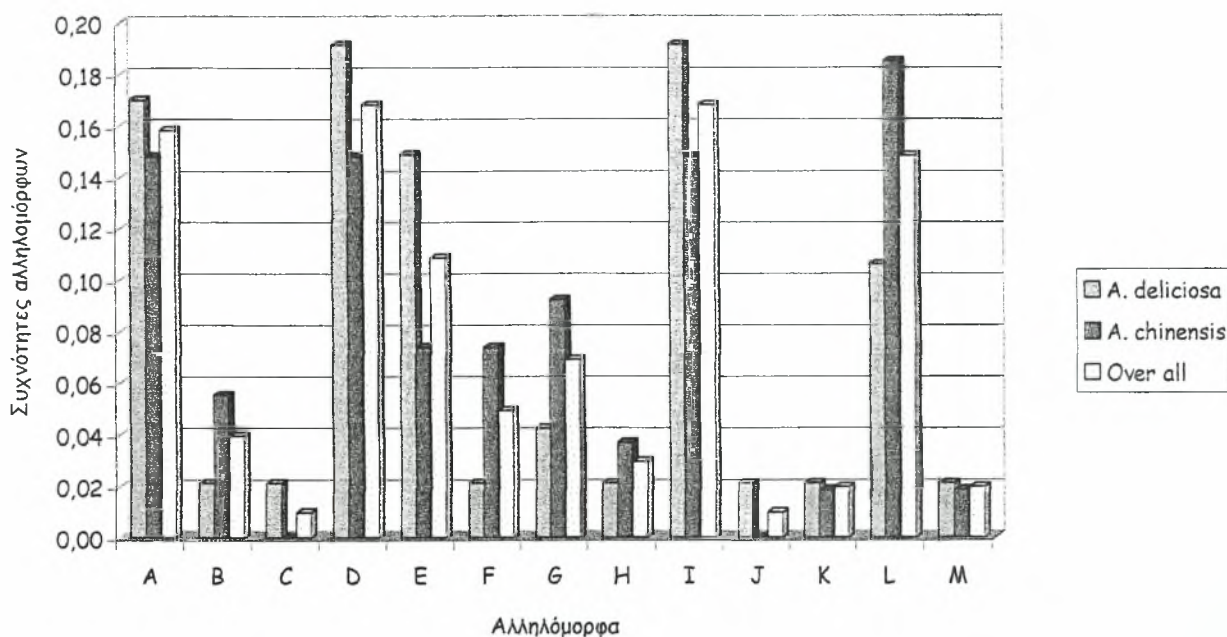
Διάγραμμα 61: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-411 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*



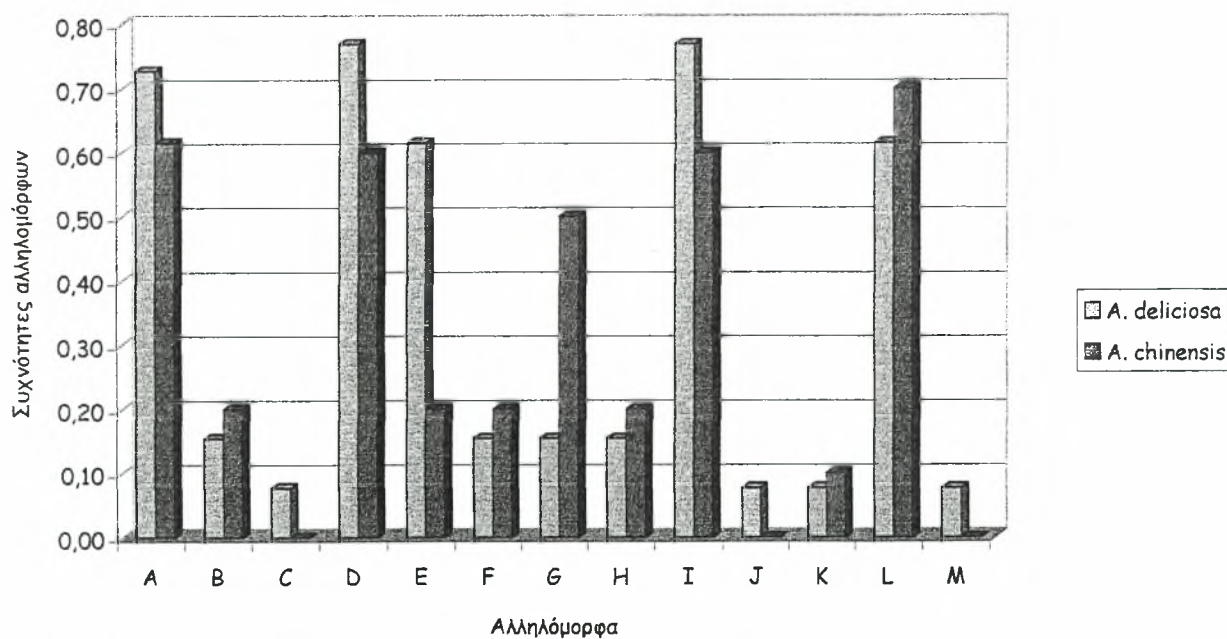
Διάγραμμα 62: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-411.



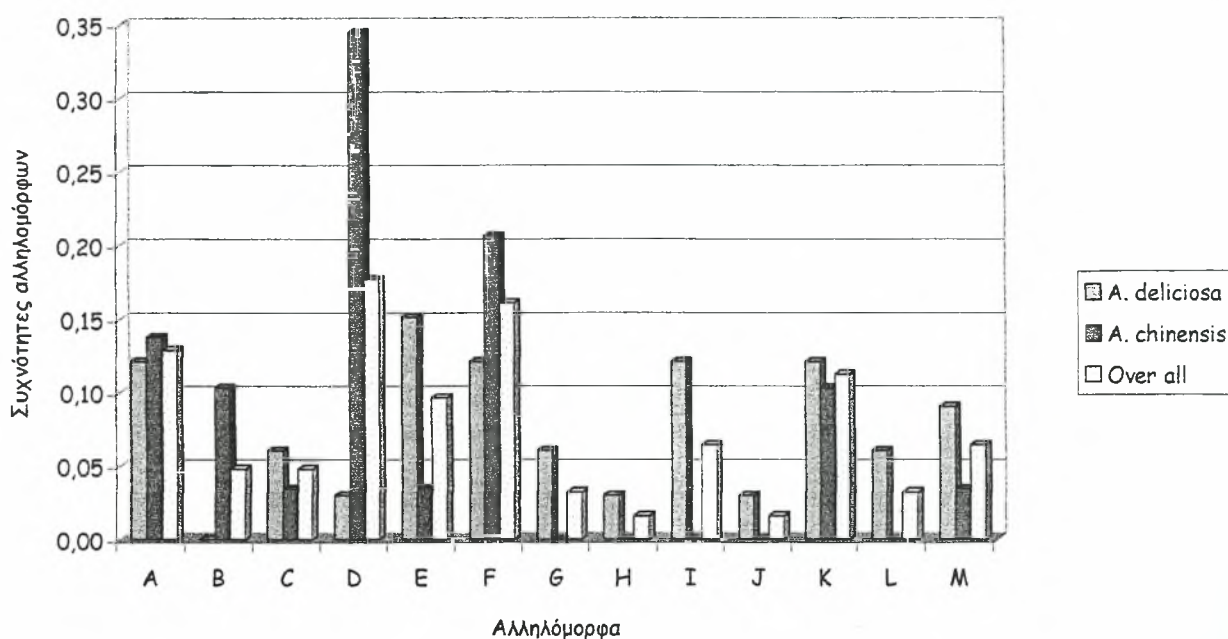
Διάγραμμα 63: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-413 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



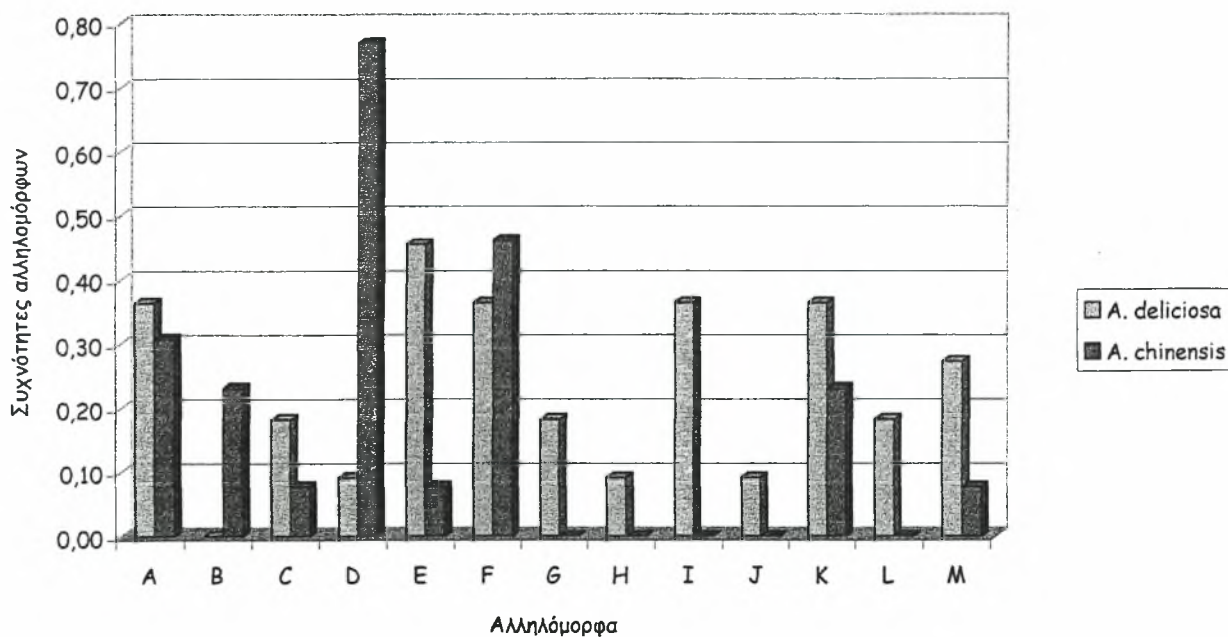
Διάγραμμα 64: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-413.



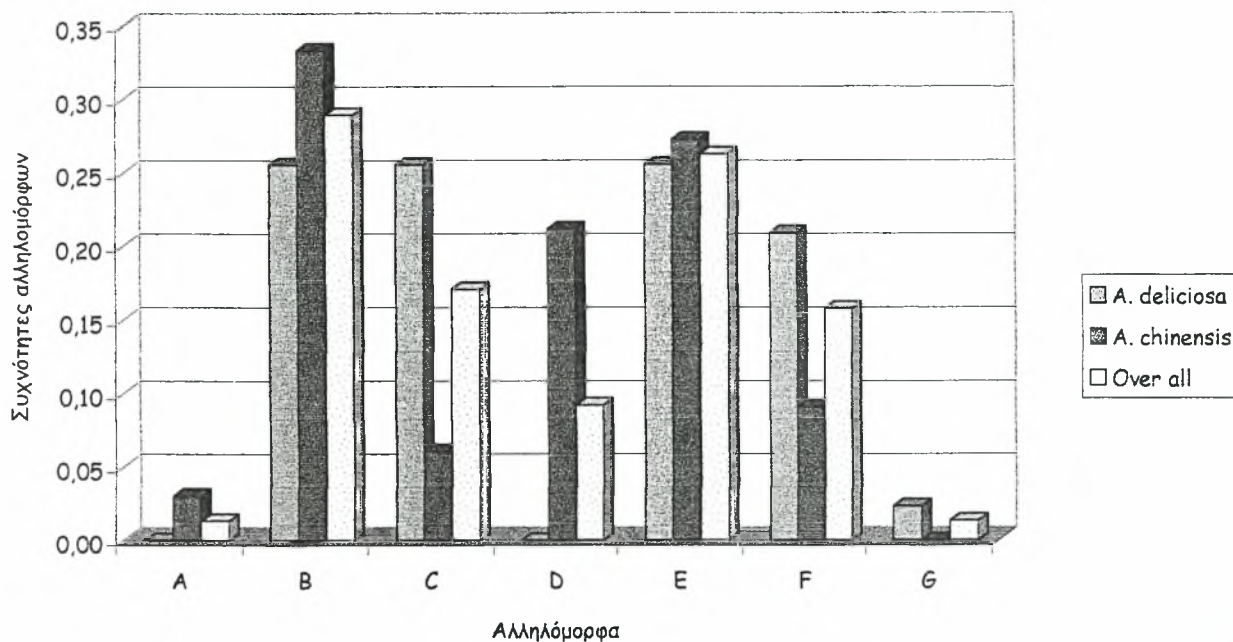
Διάγραμμα 65: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-414 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



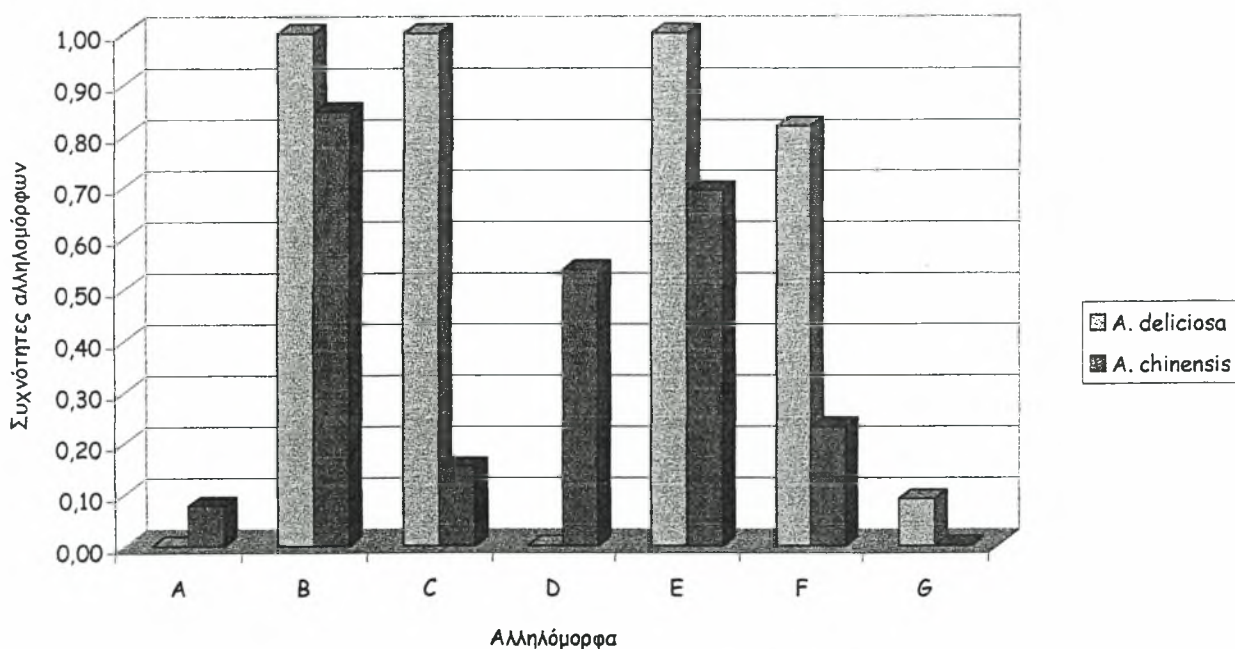
Διάγραμμα 66: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-414.



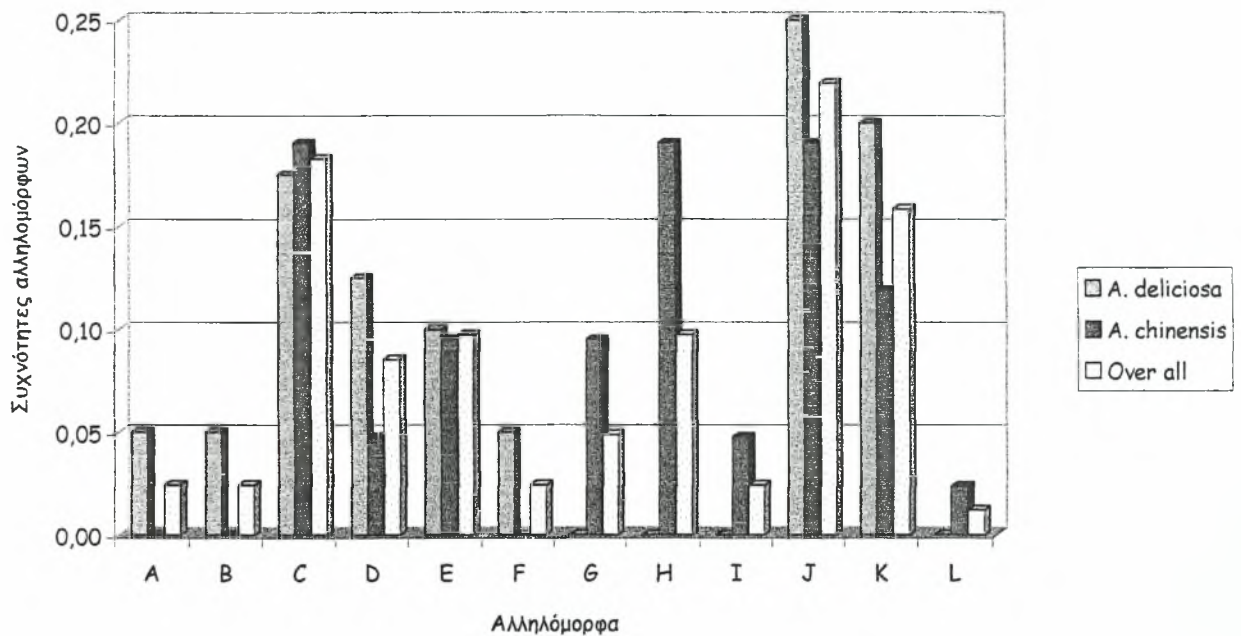
Διάγραμμα 67: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-415 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



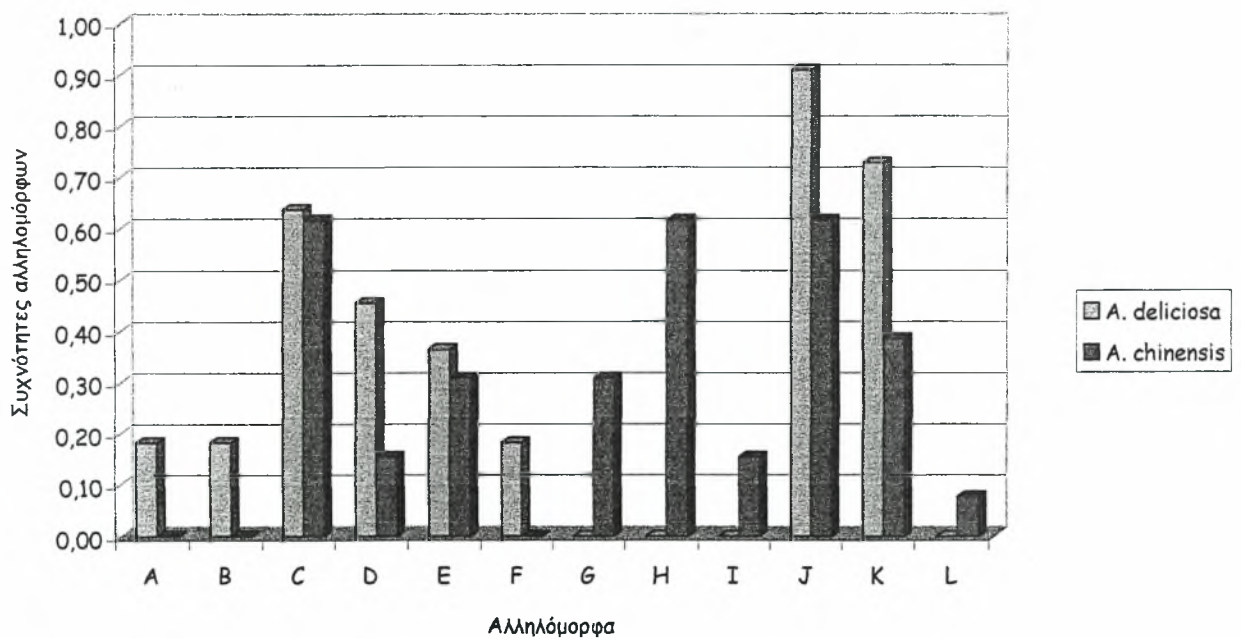
Διάγραμμα 68: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-415.



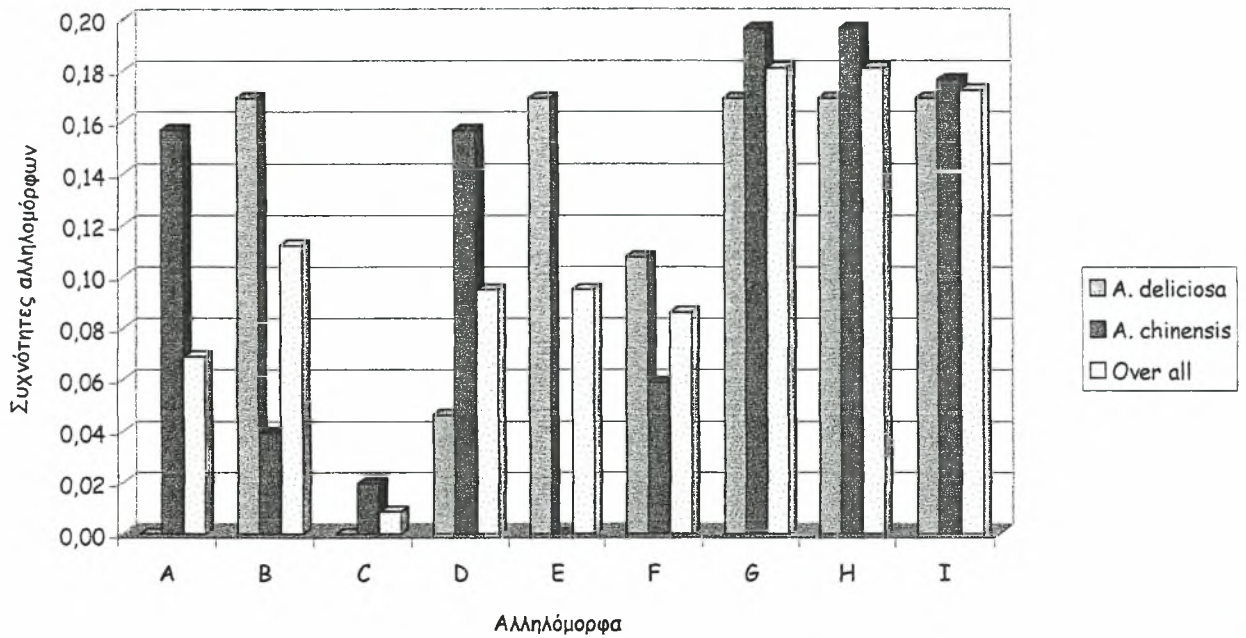
Διάγραμμα 69: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-420 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*



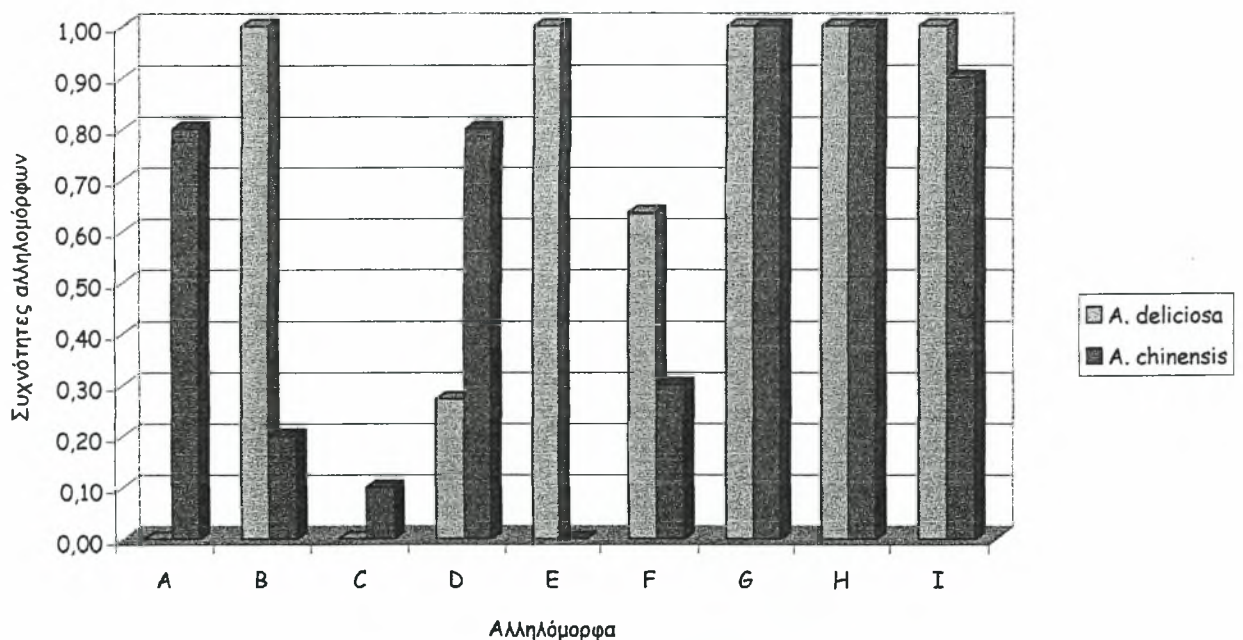
Διάγραμμα 70: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-420.



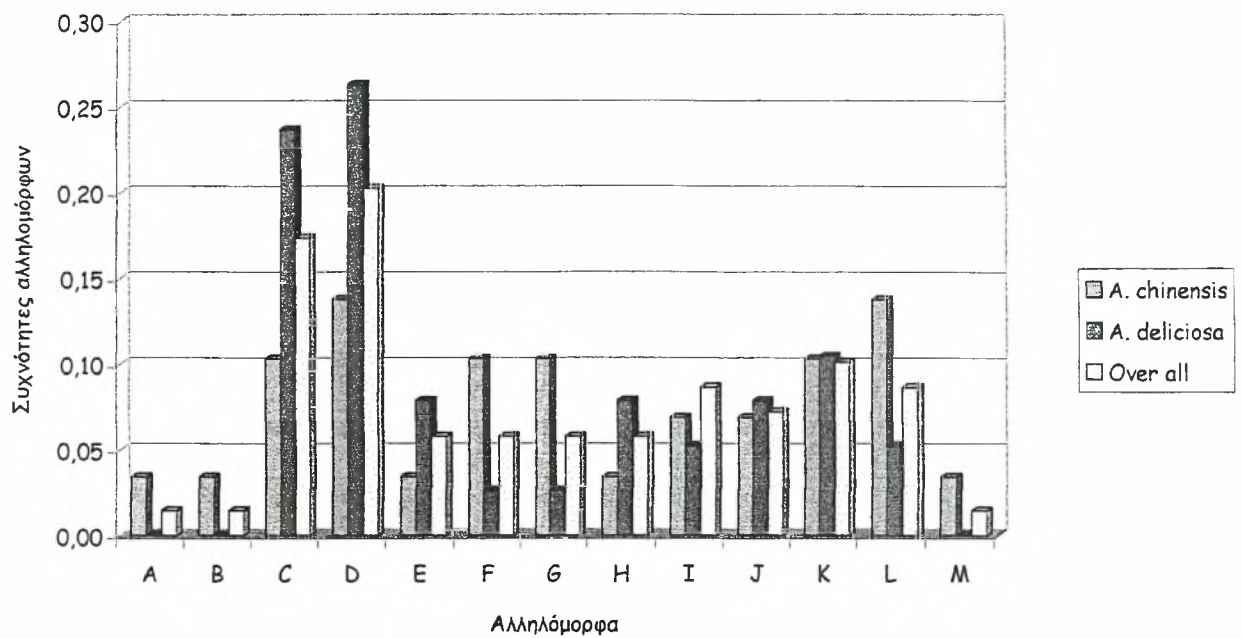
Διάγραμμα 71: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-422 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



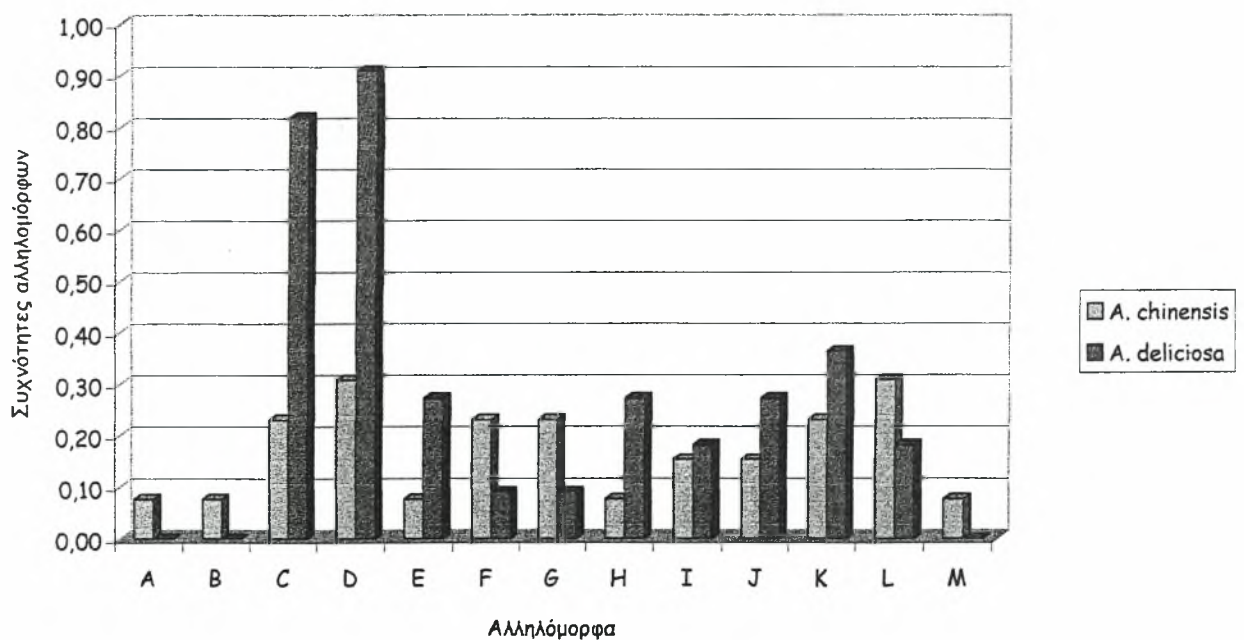
Διάγραμμα 72: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK97-422.



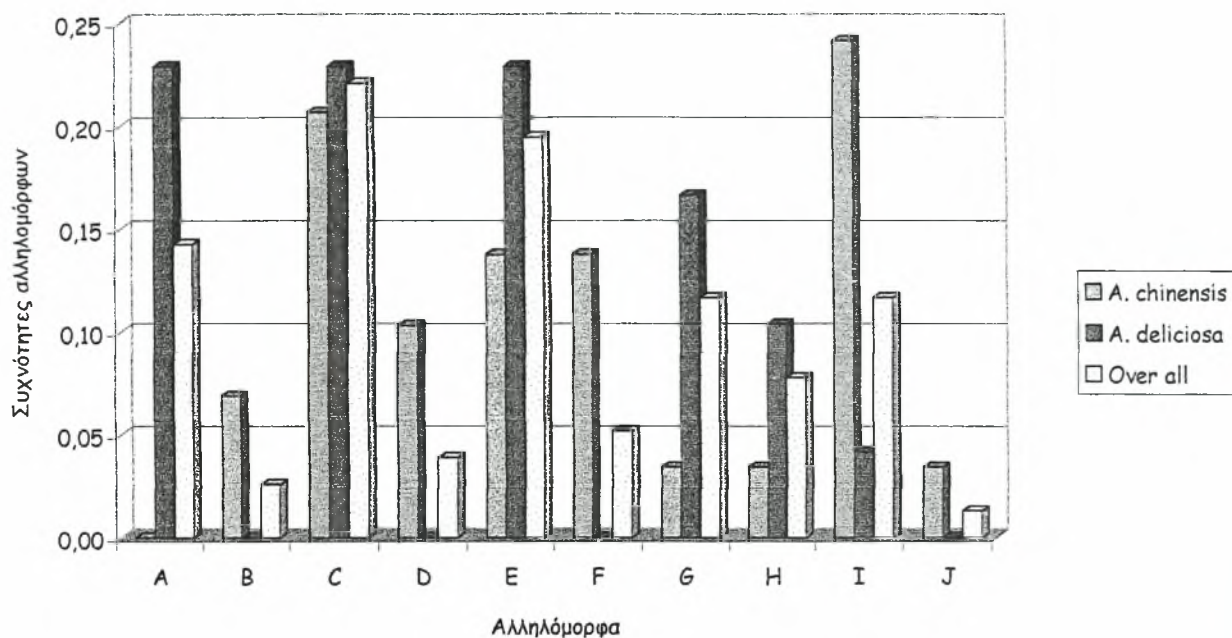
Διάγραμμα 73: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK99-141 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



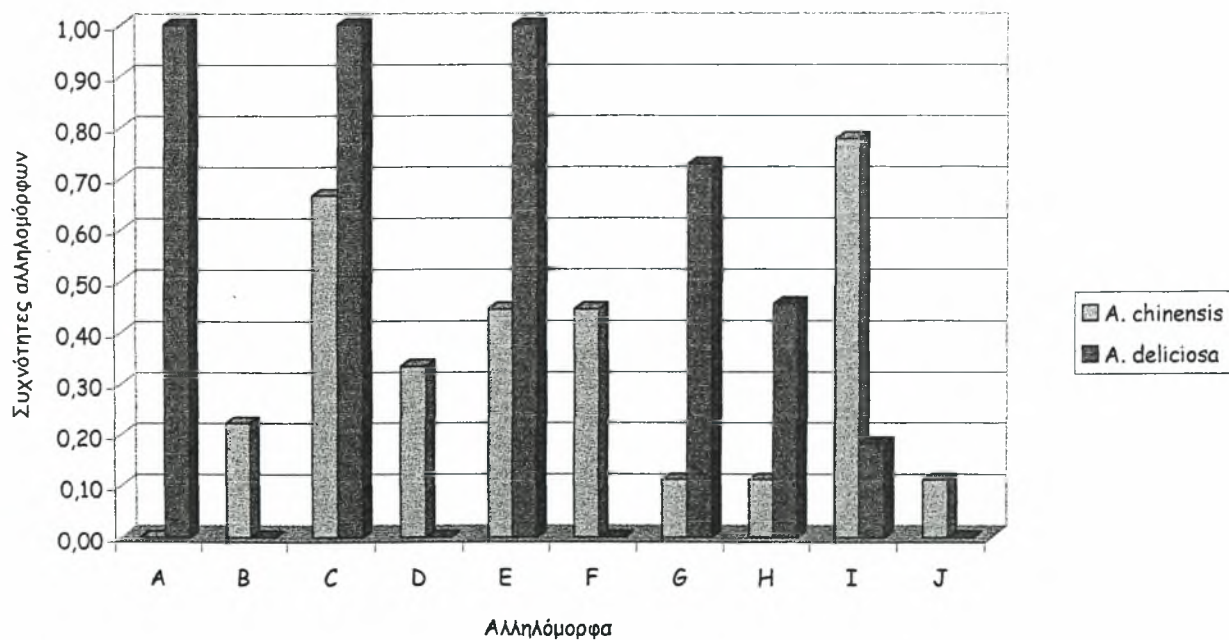
Διάγραμμα 74: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK99-141



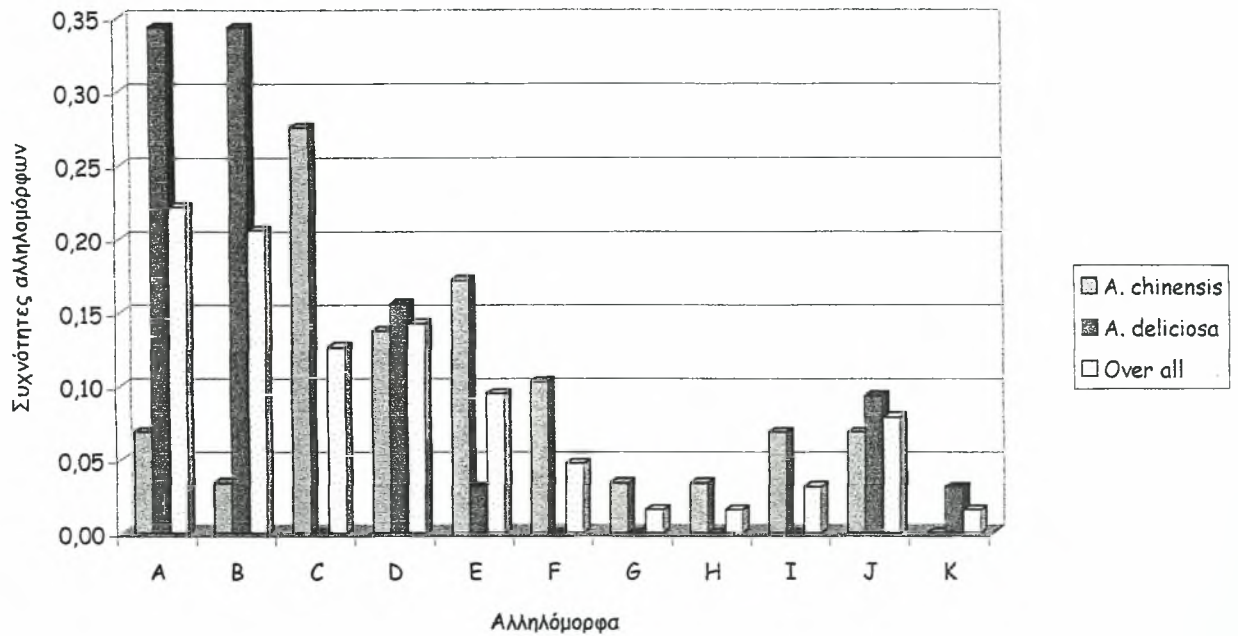
Διάγραμμα 75: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK99-156 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



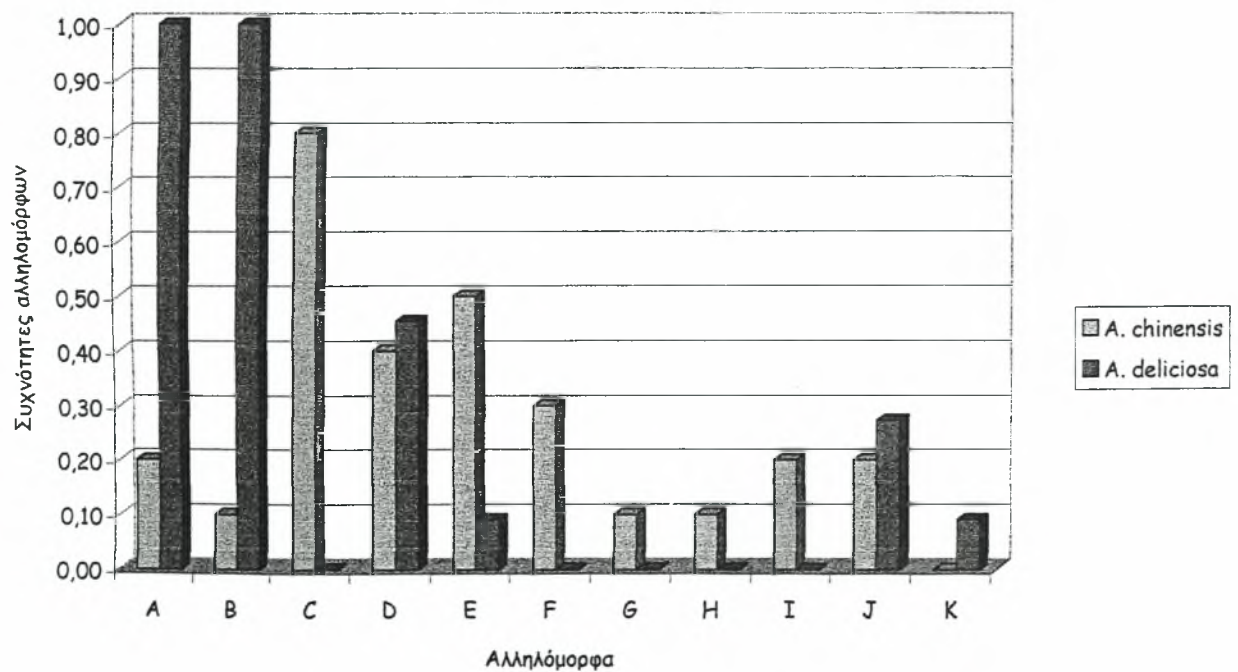
Διάγραμμα 76: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την μικροδορυφορική περιοχή UDK99-156.

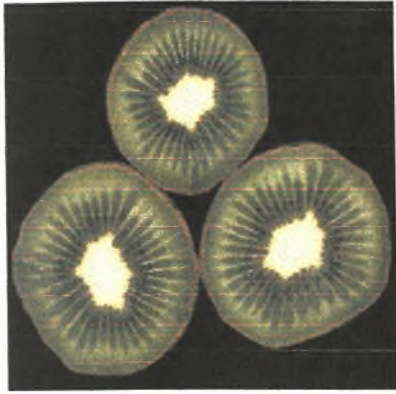


Διάγραμμα 77: Συχνότητες αλληλομόρφων γενώματος για την μικροδορυφορική περιοχή UDK99-168 των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis*.



Διάγραμμα 78: Συχνότητες αλληλομόρφων στα άτομα των ειδών *A. deliciosa* και *A. chinensis* που μελετήθηκαν για την την μικροδορυφορική περιοχή UDK99-168.





A. deliciosa

A. macrosperma



A. chinensis



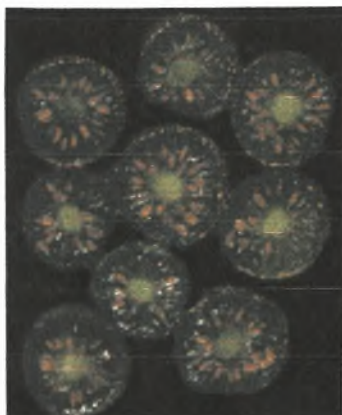
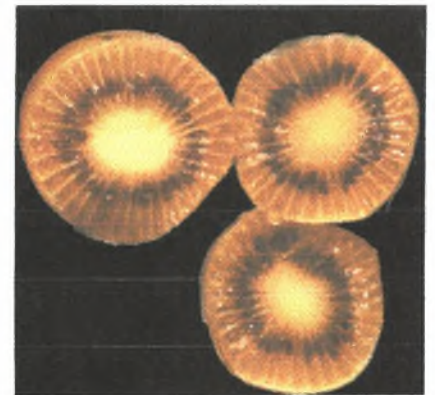
A. kolomikta

A. chinensis

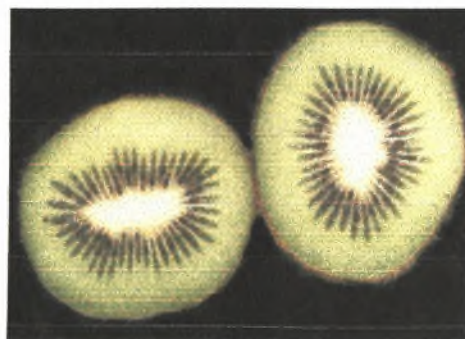
A. arguta



A. eriantha



A. latifolia



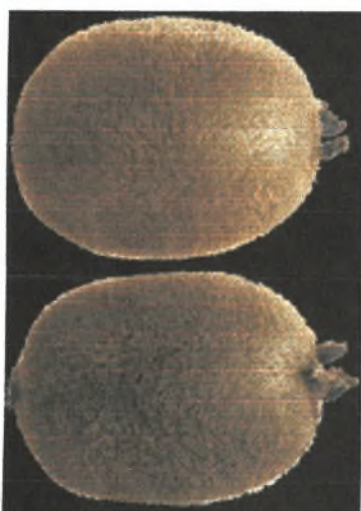
A. chinensis



A. macrosperma



A. chrysantha



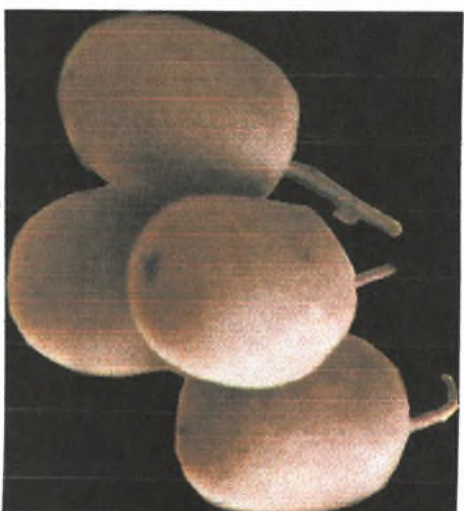
A. deliciosa



A. polygama



A. eriantha



A. chinensis

