

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΑΥΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗ ΣΠΟΡΟΦΥΤΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ
ΑΚΤΙΝΙΔΙΟΥ (cv. TSECHELIDIS) ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΟΥ Α. ΜΙΧΑΛΙΑ (Γεωπόνος, M.Sc.)

ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ Ι.Κ.Υ.

ΒΟΛΟΣ 2013

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΑΥΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗ ΣΠΟΡΟΦΥΤΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΚΤΙΝΙΔΙΟΥ
(cv. TSECHELIDIS) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΟΥ Α. ΜΙΧΑΛΙΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΧΑ ΑΒΡΑΑΜ

Καθηγητής Π.Θ.

Εργαστήριο Γενετικής & Βελτίωσης Φυτών

ΜΑΥΡΟΜΑΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Α.Π.Θ.

Εργαστήριο Γενετικής & Βελτίωσης Φυτών

ΝΑΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Π.Θ.

Εργαστήριο Δενδροκομίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου έρευνας και τη συγγραφή της παρούσας διατριβής, θα ήθελα με τη σειρά μου να ευχαριστήσω όλους εκείνους τους ανθρώπους που συμμετείχαν και συνέβαλλαν με τον τρόπο τους στην εκπλήρωση αυτού του στόχου. Στα χρόνια που διήρκεσε αυτή η προσπάθεια ξεχωρίζω και κρατώ μόνο πρόσωπα, τα οποία είχα τη χαρά να γνωρίσω, να συνεργαστώ και να εκτιμήσω βαθιά... Είμαι πλέον απόλυτα βέβαιη πως αυτό αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα οφέλη που αποκόμισα ολοκληρώνοντας αυτό το διδακτορικό...

Πρώτα και κύρια θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου στον κ. Μαυρομάτη Αθανάσιο, Επίκουρο καθηγητή σήμερα της Γεωπονικής σχολής του Αριστοτελείου παν/μιου Θεσσαλονίκης. Ήταν ο άνθρωπος που εμπνεύστηκε το όλο εγχείρημα και συντόνισε κάθε προσπάθεια μου. Τον ευχαριστώ ειλικρινά γιατί με εμπιστεύτηκε και με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια. Ήταν από τους πρώτους ανθρώπους που πίστεψε σε μένα και δε σταμάτησε να με πιστεύει και να με ενθαρρύνει, ακόμα και τις στιγμές που έχανα την πίστη στον εαυτό μου... Τον ευχαριστώ για όλες τις συζητήσεις που είχαμε επί ποικίλλων θεμάτων, τις συμβουλές, τις προτροπές αλλά κυρίως την κριτική του, που με ωθούσε πάντα να προσπαθώ να γίνω καλύτερος άνθρωπος...

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Αβραάμ Χα, Καθηγητή της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του παν/μιου Θεσσαλίας και κ. Γεώργιο Νάνο, Αναπληρωτή καθηγητή της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του παν/μιου Θεσσαλίας, για την υποστήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης τη διδακτορικής έρευνας.

Θερμές ευχαριστίες στις οικογένειες του κ. Χρήστου Τσεχελίδη και κ. Λάμπρου Καρυπίδη για την ευγενική παραχώρηση των πειραματικών αγρών στην περιοχή της Επισκοπής Ημαθίας, καθώς και για τη γενική επίβλεψη και φροντίδα αυτών, στη διάρκεια όλων των χρόνων της έρευνας. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω ιδιαίτερος για την άψογη συνεργασία που είχαμε αυτά τα χρόνια και κυρίως το

προσωπικό ενδιαφέρον που έδειξαν και τη στήριξη που μου παρείχαν. Πάντα θα εκτιμώ το ότι μου συμπεριφέρθηκαν σαν μέλος της οικογένειας τους και θα νοιώθω μεγάλη τιμή για αυτό. Η τιμιότητα, το ήθος, η εργατικότητα και η μαχητικότητα τους θα αποτελούν πάντα για μένα φωτεινό παράδειγμα.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον επίτιμο Καθηγητή Dr. Koornneef Maarten, διευθυντή του τμήματος Βελτίωσης Φυτών του ινστιτούτου Max Planck, για τη φιλοξενία και την ευκαιρία που μου παρείχε να εκπαιδευτώ στο τμήμα του ως διδακτορική φοιτήτρια. Υπήρξε για μένα σημαντική εμπειρία να τον γνωρίσω προσωπικά, να συζητήσουμε επί της διατριβής μου, να παρακολουθήσω διαλέξεις του και να δουλέψω με την ερευνητική του ομάδα. Ευχαριστώ θερμά επίσης τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Dr. Sheila Adimargono και Dr. Kazumi Nakabayashi για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση τους στην εκπόνηση των μοριακών αναλύσεων της παρούσας έρευνας, κατά τη διάρκεια παραμονής μου στο ινστιτούτο.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για τη χορήγηση τριετούς υποτροφίας για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ την κα. Πανάγου Μίνα, μέλος ΕΕΔΙΠ του εργαστηρίου Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών του παν/μιου Θεσσαλίας, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα κα. Κωστούλα Σταυρούλα για την υποστήριξη και τη φιλία τους που μου πρόσφεραν απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ όλους του φίλους μου για την αγάπη τους και ιδιαίτερος την αδερφική μου φίλη Αργυρώ Σωτηριάδου, για την αμέριστη συμπαράσταση της σε κάθε στιγμή της ζωής μου. Τους ευχαριστώ βαθιά γιατί έκαναν όλη αυτή τη πορεία πιο διασκεδαστική και γεμάτη όμορφες στιγμές για μένα!

Τέλος, ευχαριστώ το Θεό για την οικογένεια που με αξίωσε να έχω και την ευλογία στη ζωή μου... Ένα μεγάλο ευχαριστώ, που μοιάζει ωστόσο μικρό, στη μητέρα μου Ιωάννα και την αδερφή μου Μάρω, για όλη την αγάπη τους, τις αγωνίες που πέρασαν μαζί μου και τις ανάγκες τους, τις οποίες έβαλαν πολλές φορές στην άκρη για να με δουν να πραγματοποιώ το όνειρο μου...

Στη μητέρα μου Ιωάννα και την αδερφή
μου Μάρω, για το μεγαλείο της ψυχής τους
και στον πατέρα μου Αθανάσιο, ο οποίος
θα ήταν πολύ περήφανος σήμερα...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	9
Εισαγωγή	12

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ : Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

1. Η καλλιέργεια της ακτινιδιάς	
1.1 Καταγωγή και Διάδοση	14
1.2 Βοτανική ταξινόμηση	15
1.3 Μορφολογία της ακτινιδιάς	18
2. Οικονομική σημασία της καλλιέργειας	
2.1 Παγκόσμια παραγωγή	20
2.2 Η καλλιέργεια της ακτινιδιάς στην Ελλάδα	21
2.3 Η ελληνική ποικιλία ακτινιδίου «Tsechelidis»	22
2.3.1 Ιστορικό	22
2.3.2 Μορφολογική περιγραφή	23
3. Γενετική της διοικίας	
3.1 Καθορισμός του φύλου στα φυτικά είδη	26
3.2 Γενετική του φύλου στο γένος <i>Actinidia</i>	29
3.3 Ανάπτυξη μοριακών δεικτών που συνδέονται με το φύλο	32
4. Η βελτίωση της ακτινιδιάς	
4.1 Γενικά	36
4.2 Βελτιωτικοί στόχοι	37
4.3 Διειδικές διασταυρώσεις	40
4.4 Εφαρμογές in vitro τεχνικών	41
4.4.1 Μικροπολλαπλασιασμός.....	41
4.4.2 Σωματικός υβριδισμός	42

4.4.3 Γενετική τροποποίηση	43
4.5 Μοριακοί δείκτες και χαρτογράφηση	44
4.6 Κατασκευή γενετικών χαρτών	49

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ : Υλικά και Μέθοδοι

1. Πειράματα αγρού

1.1 Επιλογή φυτικού υλικού	56
1.2 Διεξαγωγή αυτογονιμοποιήσεων	57

2. Κυτταρογενετικές και Φυσικοχημικές αναλύσεις

2.1 Μελέτη μορφολογίας ανθέων	58
2.2 Έλεγχος βιωσιμότητας της γύρης	59
2.3 Αναλύσεις Κυτταρομετρίας Ροής	61
2.4 Μετρήσεις καρπών	61
2.5 Φυσικοχημικές αναλύσεις καρπών	61
2.5.1 Μέθοδος υπολογισμού χρώματος σάρκας	62
2.5.2 Μέθοδος υπολογισμού σκληρότητας σάρκας	62
2.5.3 Μέτρηση συνολικών διαλυτών στερεών	63
2.5.4 Προσδιορισμός ποσοστού ξηρής ουσίας	63
2.5.5 Προσδιορισμός pH	64
2.5.6 Προσδιορισμός οξύτητας	64
2.5.7 Προσδιορισμός συνολικών φαινολικών οξέων	64
2.6 Στατιστική ανάλυση δεδομένων	66

3. Μοριακές Αναλύσεις

3.1 Απομόνωση DNA	68
3.2 Γενετική ανάλυση με μοριακούς δείκτες	70
3.3 Αλληλούχιση προϊόντων μοριακής ανάλυσης	71
3.4 Επεξεργασία δεδομένων	73

ΤΡΙΤΟ ΜΕΡΟΣ : Αποτελέσματα και Συζήτηση

1. Πειράματα αγρού	
1.1 Αποτελέσματα αυτογονιμοποιήσεων	75
1.2 Διαστάσεις καρπών	83
2. Φυσικοχημικές αναλύσεις καρπών	
2.1 Ποιοτικά χαρακτηριστικά καρπών	93
2.2 Συσχέτιση βάρους καρπού και αριθμού σπερμάτων	99
3. Κυτταρογενετικές Αναλύσεις	
3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά ανθέων	104
3.2 Έλεγχος βιωσιμότητας της γύρης	106
3.2.1 Αποτελέσματα για την ποικιλίας «Tsechelidis» στους τρεις αγρούς	106
3.2.2 Συγκριτικά αποτελέσματα για τις ποικιλίες «Tsechelidis», «Hayward» και «Matua»	114
3.3 Γονιμότητα γύρης και αποτελέσματα αυτογονιμοποιήσεων	117
3.4 Αναλύσεις Κυτταρομετρίας Ροής	119
4. Μοριακές Αναλύσεις	
4.1 Ταυτοποίηση με μοριακούς δείκτες του φύλου (SmX, SmY, SmY1)	120
4.2 Αλληλούχιση προϊόντων ενίσχυσης των δεικτών SmX και SmY	125
4.3 Μοριακή ανάλυση με δείκτες DEG (Differentially Expressed Genes)	143
4.4 Αλληλούχιση προϊόντων ενίσχυσης των δεικτών DEG	147
5. Γενική Συζήτηση	165
SUMMARY	171
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	175
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	186

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Actinidia* περιλαμβάνει πάνω από 60 είδη, ωστόσο η πλειοψηφία των καλλιεργούμενων ποικιλιών ακτινιδίου ανήκει στο είδος *A. deliciosa*. Όλα τα είδη του γένους *Actinidia* είναι δίοικα. Τα άνθη των θηλυκών φυτών φέρουν λειτουργική ωοθήκη, η οποία σχηματίζει πολλά ωάρια και λειτουργικούς στύλους. Παρατηρείται επίσης έκπτυξη στημόνων, οι οποίοι όμως δεν αναπτύσσονται πλήρως ποτέ ή, αν αναπτυχθούν, παράγουν άγονους γυρεόκοκκους. Για το λόγο αυτό απαιτείται στον αγρό η εγκατάσταση αρσενικών φυτών που χρησιμεύουν ως επικονιαστές. Εντούτοις, η διοικία δεν είναι απόλυτη κατάσταση στην ακτινιδιά, καθώς έχουν αναφερθεί περιπτώσεις αρσενικών πρεμνών που σχημάτισαν μικρούς καρπούς (*fruiting males*).

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη του φαινομένου της αυτοσυμβατότητας στο ακτινίδιο (*A. deliciosa*). Ως μοντέλο για τη μελέτη αυτή επιλέχθηκε η νέα ελληνική ποικιλία «Tsechelidis», η οποία εκτός από τα πολύ καλά χαρακτηριστικά απόδοσης και ποιότητας καρπών, παρουσιάζει ενδείξεις αυτοσυμβατότητας της γύρης των θηλυκών ανθέων της. Με στόχο να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του φαινομένου στην εν λόγω ποικιλία, αλλά και να διερευνηθεί ο βαθμός στον οποίο αυτό εκφράζεται, οργανώθηκε πείραμα σε τρεις αγρούς με διαφορετική σύνθεση επικονιαστών και πρέμνα διαφορετικής ηλικίας. Εφαρμόστηκαν συστηματικές αυτογονιμοποιήσεις τόσο σε άνθη της ποικιλίας «Tsechelidis», όσο και στην ποικιλία μάρτυρα «Hayward» (θηλυκή ποικιλία) για συγκριτικό έλεγχο. Ακολούθησε μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ανθέων και ελέγχθηκε η βιωσιμότητα της γύρης στο μικροσκόπιο, έπειτα από χρώση των ενεργών γυρεόκοκκων. Με την ολοκλήρωση της περιόδου ωρίμανσης, συλλέχθηκαν οι καρποί οι οποίοι προέκυψαν έπειτα από τις αυτογονιμοποιήσεις ανθέων, καθώς και καρποί ελεύθερης επικονίασης, με σκοπό να υποβληθούν σε περαιτέρω φυσικοχημικές αναλύσεις των ποιοτικών τους χαρακτηριστικών. Με βάση τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις αυτογονιμοποιήσεις ανθέων στον αγρό και τον έλεγχο βιωσιμότητας της γύρης

στο εργαστήριο, έγινε χαρακτηρισμός των επιλεγμένων πρέμνων της ποικιλίας «Tsechelidis», ως προς το βαθμό αυτογονιμότητας που εκδήλωσαν. Από τις ακραίες κλάσεις (χαμηλής – υψηλής αυτογονιμότητας) της κατάταξης αυτής, επιλέχθηκαν συνολικά 18 γενότυποι, οι οποίοι υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε περαιτέρω μοριακή ανάλυση. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες γενότυποι των ποικιλιών «Hayward» και «Matua». Για τη μοριακή ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μοριακοί δείκτες τύπου SCAR, οι οποίοι συνδέονται με την έκφραση του φύλου στο ακτινίδιο. Στη συνέχεια, τα προϊόντα της μοριακής ανάλυσης αλληλούχιστηκαν με σκοπό τον εντοπισμό πολυμορφισμών μεμονωμένων βάσεων (SNP).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής έρευνας, προέκυψε ότι η ποικιλία «Tsechelidis» παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό αυτοσυμβατότητας σε σχέση με την ποικιλία «Hayward», αλλά χαρακτηρίζεται από έντονη παραλλακτικότητα τόσο μεταξύ πρέμνων διαφορετικής ηλικίας, όσο και μεταξύ των ανθέων του ίδιου φυτού. Τα άνθη της ποικιλίας «Tsechelidis» φέρουν την τυπική μορφολογία του θηλυκού άνθους της ακτινιδιάς και δύνανται να παράγουν γόνιμη γύρη. Η γύρη είναι αυτοσυμβατή, καθώς κατέστη δυνατή η παραγωγή καρπών έπειτα από αυτογονιμοποίηση. Οι καρποί που προήλθαν από αυτογονιμοποιήσεις ανθέων χαρακτηρίζονταν από μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς το σχήμα και το μέγεθος τους. Ωστόσο, η φυσικοχημική ανάλυση των καρπών έδειξε ότι οι καρποί αυτογονιμοποίησης, οι οποίοι ανέπτυξαν εμπορικά αποδεκτό μέγεθος, χαρακτηρίζονταν και από υψηλής ποιότητας φυσικοχημικές παραμέτρους. Η γενετική ανάλυση με τους μοριακούς δείκτες του φύλου επιβεβαίωσε τη θηλυκή φύση της ποικιλίας «Tsechelidis». Από τα αποτελέσματα της αλληλούχιστης των προϊόντων της μοριακής ανάλυσης, εντοπίστηκε μια πληθώρα πολυμορφισμών μεμονωμένης νουκλεοτιδικής βάσης (SNP) για το σύνολο των εξεταζόμενων γενοτύπων. Διαπιστώθηκε λοιπόν, ότι οι γενότυποι της ποικιλίας «Tsechelidis», οι οποίοι χαρακτηρίζονταν από χαμηλή αυτογονιμότητα, εμφάνιζαν κατά κύριο λόγο

κοινούς πολυμορφισμούς με τους γενότυπους της ποικιλίας «Hayward» και αντίστοιχα, οι γενότυποι της ποικιλίας «Tsechelidis», οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλή αυτογονιμότητα, παρουσίαζαν κατά κανόνα κοινούς πολυμορφισμούς με τους γενότυπους της ποικιλίας «Matua». Ωστόσο, καθώς δεν έχουν αποκωδικοποιηθεί ακόμα τα γονίδια που ελέγχουν τον καθορισμό του φύλου στην ακτινιδιά και δεν έχουν εντοπιστεί QTL στη συγκεκριμένη χρωμοσωμική περιοχή, δεν είναι δυνατή η διεξαγωγή περαιτέρω συμπερασμάτων αναφορικά με τη φύση και το ρόλο των συγκεκριμένων πολυμορφισμών. Η ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του γονιδιώματος της ακτινιδιάς αναμένεται να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών καθορισμού του φύλου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μεγαλύτερο ποσοστό των καλλιεργούμενων ποικιλιών ακτινιδιάς παγκοσμίως ανήκει στο είδος *A. deliciosa*. Το είδος αυτό είναι λειτουργικά δίοικο και για το λόγο αυτό, απαιτείται η εγκατάσταση επικονιαστών (αρσενικών φυτών) στον αγρό, γεγονός που επιβαρύνει σημαντικά το κόστος παραγωγής της καλλιέργειας. Ωστόσο η διοικία δεν είναι απόλυτη καθώς έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ερμαφρόδιτων φυτών ή παραγωγικών αρσενικών φυτών (*fruiting males*), που παρήγαγαν καρπούς. Η ανάπτυξη θηλυκών γενοτύπων που θα παράγουν βιώσιμη και αυτοσυμβατή γύρη, θα αύξανε κατά πολύ την ανταγωνιστικότητα της καλλιέργειας της ακτινιδιάς καθώς θα συντελούσε στη μείωση του απαιτούμενου αριθμού επικονιαστών στον αγρό ή ακόμα και στην ολοκληρωτική απαλοιφή τους. Επιπλέον, η μονογενοτυπική χρήση της ποικιλίας «Hayward» παγκοσμίως εγκυμονεί κινδύνους γενετικής ευπάθειας σε εχθρούς ή ασθένειες στο εγγύς μέλλον, ενώ παράλληλα δυσχεραίνει την αξιοποίηση της διαθέσιμης γενετικής παραλλακτικότητας. Η νέα ποικιλία «Tsechelidis» αποτελεί την πρώτη επίσημα καταγεγραμμένη ελληνική ποικιλία στο ακτινίδιο, η οποία προέκυψε έπειτα από σποροφυτική επιλογή εντός της ποικιλίας «Hayward». Η εν λόγω ποικιλία διακρίνεται για την υψηλή παραγωγικότητα, το ιδιαίτερα μεγάλο μέγεθος καρπού, οι οποίοι χαρακτηρίζονται και από υψηλής ποιότητας φυσικοχημικές ιδιότητες.

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η γενετική μελέτη της έκφρασης του φύλου στη νέα ποικιλία ακτινιδίου «Tsechelidis», καθώς και η διερεύνηση της εκδήλωσης του φαινομένου της αυτοσυμβατότητας με χρήση κυτταρογενετικών και μοριακών μεθόδων.

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ:

Βιβλιογραφική
Ανασκόπηση

1. Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΙΔΙΑΣ

1.1 Καταγωγή και Διάδοση

Η ακτινιδιά κατάγεται από την Κίνα, όπου απαντώνται έως και σήμερα με την αυτοφυή τους μορφή, πολλά είδη του γένους *Actinidia*. Τα αυτοφυή, άγρια είδη αναπτύσσονται σε διάφορες εδαφοκλιματικές συνθήκες, κυρίως σε παρυφές δασών, και είτε αναρριχώνται σε δασικά δέντρα, είτε έρπονται στο έδαφος σχηματίζοντας συμπαγείς θάμνους σε εκτεθειμένες και ξηρικές τοποθεσίες.

Οι Κινέζοι συνήθιζαν να συλλέγουν τους καρπούς της άγριας ακτινιδιάς για εκατοντάδες χρόνια, όμως ποτέ δεν εξημέρωσαν το φυτό. Το 1904 μεταφέρθηκαν σπόροι του φυτού στη Ν. Ζηλανδία για πρώτη φορά. Τα φυτά που προήλθαν από αυτούς τους σπόρους καρποφόρησαν το 1910 και όλες οι γνωστές ποικιλίες ακτινιδιάς που δημιουργήθηκαν έκτοτε στη Ν. Ζηλανδία, συμπεριλαμβανομένης και της ευρύτατα διαδεδομένης ποικιλίας «Hayward», θεωρείται ότι προέρχονται από εκείνα τα αρχικά φυτά (Ferguson and Bollard, 1990). Με τη βιομηχανική ανάπτυξη της Ν. Ζηλανδίας το 1960, η ακτινιδιά αρχίζει να διαδίδεται σε χώρες της Ευρώπης και της Αμερικής. Έκτοτε η καλλιέργεια γνωρίζει γρήγορη άνοδο και ανάπτυξη και στις μέρες μας καλλιεργείται πλέον σε πολλές χώρες του κόσμου, όπως η Κίνα, η Ν. Ζηλανδία, η Χιλή, η Ιαπωνία, η Γαλλία, η Ιταλία και η Ελλάδα (Nishiyama, 2007). Αρχικά η καλλιέργεια διαδόθηκε με την ονομασία «κινέζικο φραγκοστάφυλο» (*Chinese gooseberry*), όμως αργότερα οι Νεοζηλανδοί το μετονόμασαν σε “kiwi fruit”, ονομασία που τελικά επικράτησε διεθνώς. Η ονομασία “kiwi” προήλθε από ένα πτηνό (*Apteryx spp.*) που συναντάται στη Ν. Ζηλανδία, καθώς θεωρήθηκε ότι το χρώμα και το σχήμα του καρπού ομοιάζει με το εν λόγω πτηνό (Παλούκης και Ντινόπουλος, 1989).



Εικ.1 *Actinidia chinensis*

1.2 Βοτανική Ταξινόμηση

Η ακτινιδιά (*Actinidia deliciosa* [A. Chev.] C.F. Liang *et* A.R. Ferguson) είναι φυτό πολυετές, φυλλοβόλο και αναρριχώμενο. Ανήκει στην οικογένεια Actinidiaceae και στην τάξη Theales. Το γένος *Actinidia* περιλαμβάνει 76 είδη και περίπου 120 υποείδη (Ferguson and Huang, 2007). Η κατάταξη των ειδών και των υποειδών δεν είναι ξεκάθαρη, καθώς οι ερευνητές δημιουργούν διαφορετικές ομάδες, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά που μελετούν ή τις μεθοδολογίες που ακολουθούν. Η σημερινή κατάταξη βασίζεται κυρίως σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, με σημαντικότερα την πυκνότητα του τριχώματος του καρπού και την παρουσία/απουσία φακιδίων στην επιφάνεια του καρπού. Με βάση τα παραπάνω κριτήρια προέκυψαν τέσσερις βασικές ομάδες: *Leocarpae*, *Maculatae*, *Strigosae* και *Stellatae* (Li *et al.*, 2009). Ωστόσο, η εγκυρότητα αυτής της συστηματικής κατάταξης, βασιζόμενης μόνο σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, αμφισβητήθηκε σε πολλές περιπτώσεις, καθώς αφορούσε στη μελέτη μικρού αριθμού γενοτύπων, ενίοτε προερχόμενοι μόνο από ένα φύλο (He *et al.*, 2000). Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται πλέον σύγχρονες μοριακές τεχνικές για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών του γένους *Actinidia* (Cirriani *et al.*, 1996). Τέτοιες μελέτες κατέδειξαν την πολυφυλετικότητα ορισμένων παραδοσιακών ομάδων κατάταξης, θέτοντας έτσι ερωτηματικά για την ορθότητα της υπάρχουσας συστηματικής κατάταξης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έρευνα των Cirriani *et al.*, (1998), οι οποίοι μέσω μοριακών αναλύσεων του χλωροπλαστικού DNA (ctDNA) έδειξαν ότι ορισμένα είδη, όπως το *A. rufa* και *A. kolomikta*, βρίσκονται σε λάθος κατηγορία όσο αφορά την ταξινόμηση τους.

Το επίπεδο πλοειδίας εντός του γένους *Actinidia* ποικίλλει από το διπλοειδές έως το οκταπλοειδές επίπεδο, ανάλογα με το είδος και το υποείδος. Η μεγάλη αυτή παραλλακτικότητα μπορεί να οφείλεται σε εγγενή πολυπλοειδισμό, λόγω της πιθανής ύπαρξης γαμετών με μη μειωμένο αριθμό χρωμοσωμάτων ($2n$) κατά τη γονιμοποίηση (Yan *et al.*, 1997a).

Ο βασικός χρωμοσωμικός αριθμός είναι $x = n = 29$. Ανάλογα με το επίπεδο πλοειδίας, τα βασικότερα είδη του γένους *Actinidia* κατατάσσονται ως εξής (Yan *et al.*, 1994a):

1. Διπλοειδή ($2n = 2x = 58$)

A. chinensis var. *chinensis*, *A. glaucophylla*, *A. setosa*, *A. guilinensis*, *A. indochinensis*

2. Τετραπλοειδή ($2n = 4x = 116$)

A. chinensis var. *chinensis*, *A. arguta* var. *arguta*, *A. valvata*, *A. chrysantha*

3. Εξαπλοειδή ($2n = 6x = 174$)

A. deliciosa

4. Οκταπλοειδή ($2n = 8x = 232$)

A. arguta var. *purpurea*

Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες ανήκουν κατά κύριο λόγο στα είδη *A. deliciosa* και *A. chinensis*, ενώ τα τελευταία χρόνια αρχίζουν να διαδίδονται και ποικιλίες του είδους *A. arguta* (Atkinson and Mcrae, 2007). Για πολλά χρόνια τα είδη *A. deliciosa* και *A. chinensis* θεωρούνταν ποικιλίες του ίδιου είδους, εξαιτίας της μεγάλης ομοιότητας μεταξύ των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών (Ferguson, 1990). Αποδείχθηκε ωστόσο αργότερα, πως το εξαπλοειδές είδος *A. deliciosa* είναι στην ουσία αλλοπολυπλοειδές, με πιθανότερους πρόγονους του το είδος *A. chinensis* και ένα άλλο διπλοειδές είδος, το οποίο δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί. Η αλλοπολυπλοειδής φύση του είδους *A. deliciosa* επιβεβαιώθηκε από τις έρευνες των McNeillage και Considine (1989), οι οποίοι παρατήρησαν ότι το εν λόγω είδος σχηματίζει δισθενή χρωμοσώματα κατά τη μείωση, καθώς και από το γεγονός ότι όταν διασταυρώνεται με διπλοειδή άτομα του είδους *A. chinensis*, ακολουθείται δισωμική κληρονομηση στα τετραπλοειδή άτομα που προκύπτουν, σύμφωνα με δεδομένα ισοενζυμικής ανάλυσης (Huang *et al.*, 1997).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι στην ακτινιδιά οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια κληρονομούνται ξεχωριστά. Η πατρική κληρονόμηση των χλωροπλαστών και η μητρική των μιτοχονδρίων επιβεβαιώθηκε για το είδος *A. deliciosa*, σε ενδοειδικά υβρίδια ευρέως καλλιεργούμενων ποικιλιών (Chat *et al.*, 1999). Σύμφωνα με την επικρατέστερη άποψη, κατά την επιλογή των οργανιδίων δρουν δύο διαφορετικοί μηχανισμοί, εκ των οποίων ο ένας απαλείφει τα πατρικά μιτοχόνδρια και ο άλλος τους θηλυκούς χλωροπλάστες αντίστοιχα. Αυτοί οι μηχανισμοί λαμβάνουν χώρα κατά τα τελευταία στάδια βλάστησης της γύρης, κατά την πορεία της γονιμοποίησης ή κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του ζυγώτη. Οι Chat *et al.*, (2003) κατάφεραν με τη μέθοδο της γυνογένεσης να παράγουν φυτά που έφεραν αποκλειστικά το γένωμα του μητρικού γενότυπου και τους χλωροπλάστες του πατρικού, αποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο ότι οι χλωροπλάστες κληρονομούνται ανεξάρτητα από το υπόλοιπο πυρηνικό γενετικό υλικό του πατρικού φυτού.

Οι Crowhurst *et al.*, (1990) μελετώντας το γενωμικό και χλωροπλαστικό DNA του γένους *Actinidia* κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα είδη *A. chinensis* και *A. deliciosa* συνδέονται στενά όσον αφορά το χλωροπλαστικό τους γένωμα, και καθώς στην ακτινιδιά ακολουθείται αυστηρά η πατρική κληρονόμηση των χλωροπλαστών (Testolin and Cipriani, 1997; Jung *et al.*, 2003), πιθανολογείται πως το είδος *A. chinensis* αποτελεί τον έναν πρόγονο του *A. deliciosa*. Οι Yan *et al.*, (1994b) χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενο DNA και γενωμικούς ιχνηλάτες, κατάφεραν με τη μέθοδο του *in situ* υβριδισμού να αποδείξουν ότι τα τετραπλοειδή άτομα του είδους *A. chinensis* σχετίζονται με τα εξαπλοειδή άτομα του είδους *A. deliciosa*. Ιχνηλάτες που προήλθαν από διπλοειδή άτομα του *A. chinensis* απέτυχαν να διαχωρίσουν τα δύο γενώματα. Επιπλέον εικάζεται το γεγονός πως μια τετραπλοειδής φυλή του είδους *A. chinensis* μπορεί να λειτούργησε ως γενετική γέφυρα για την ενσωμάτωση του δεύτερου γενώματος στην ακτινιδιά (Atkinson *et al.*, 1997).

1.3 Μορφολογία της ακτινιδιάς

Η ακτινιδιά είναι φυτό πολυετές και αναρριχόμενο. Η συμπεριφορά και η βλάστηση του ομοιάζει πολύ με αυτή του αμπελιού. Παρουσιάζει μεγάλη ταχύτητα αύξησης του βλαστού, η οποία μπορεί να φτάσει τα 10 εκ. ημερησίως, κάτω από ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας. Οι βλαστοί έχουν την τάση να περιελίσσονται κατά την αύξηση τους γύρω από υποστηρίγματα (πάσσαλοι, σύρματα, κολώνες), που υποβοηθούν την αναρρίχηση τους.

Το ριζικό σύστημα της ακτινιδιάς αποτελείται από σαρκώδεις, σχετικά χοντρές και έντονα διακλαδιζόμενες ρίζες. Λόγω των υψηλών απαιτήσεων σε οξυγόνο, ο κύριος όγκος του ριζικού συστήματος αναπτύσσεται στο επιφανειακό στρώμα εδάφους (βάθος 3-4 εκ.) και φτάνει μέχρι τα 70-150 εκ. σε ακτίνα ενός μέτρου από τον κορμό. Η ρίζα που αναπτύσσει το σπορόφυτο λέγεται πρωτογενής, ενώ οι ρίζες που προέρχονται από μοσχεύματα του φυτού λέγονται επίκτητες. Οι επίκτητες ρίζες αναπτύσσονται οριζόντια τα πρώτα χρόνια, σε αντίθεση με την πρωτογενή ρίζα των σποροφύτων που αναπτύσσεται κατακόρυφα (Παλούκης και Ντινόπουλος, 1989).

Ο κορμός κατά το νεανικό στάδιο είναι εύκαμπτη κληματίδα που χρειάζεται υποστήλωση. Σε ενήλικα πρέμνα ο κορμός μπορεί να φτάσει διάμετρο 20-30 εκ.

Οι βλαστοί είναι αρκετά τρυφεροί και φέρουν τριχίδια, η πυκνότητα και το χρώμα των οποίων εξαρτάται από την ποικιλία της ακτινιδιάς. Έχουν την τάση να περιελίσσονται σφιχτά γύρω από υποστηρίγματα, αν και στερούνται ελίκων, όπως συμβαίνει με άλλα αναρριχώμενα είδη. Ανάλογα με τον τύπο των οφθαλμών που φέρουν διακρίνονται σε φυλλοφόρους και ανθοφόρους.

Οι οφθαλμοί διακρίνονται σε βλαστοφόρους (στη βάση των ετήσιων βλαστών) και μεικτούς ανθοφόρους. Οι πρώτοι συνήθως φέρονται επάκρια ή πλάγια στο κορυφαίο τμήμα του βλαστού, μετά τον τελευταίο από τους ανθοφόρους οφθαλμούς, που φέρονται στο βασικό τμήμα του βλαστού (Ιλανίδης, 2006).

Τα φύλλα είναι απλά, ωοειδή ή καρδιόσχημα, με οδοντωτή περιφέρεια και εναλλάσσονται κανονικά. Η άνω επιφάνεια τους είναι στιλπνή και το χρώμα

τους κυμαίνεται από σκούρο πράσινο έως πολύ σκούρο πράσινο, ανάλογα με το είδος. Η διάμετρος τους μπορεί να φτάσει τα 20 εκ. Τα φύλλα της ακτινιδιάς δεν παρουσιάζουν διαφορετική μορφολογία μεταξύ αρσενικών και θηλυκών πρέμνων.

Η ακτινιδιά είναι φυτό δίοικο. Τα άνθη είναι μεγάλα, λευκά και φέρουν όλα τα όργανα, αλλά μερικά από αυτά είναι ατελώς ανεπτυγμένα. Έτσι τα άνθη μορφολογικά είναι ερμαφρόδιτα, λειτουργικά όμως διακρίνονται σε αρσενικά και θηλυκά. Τα θηλυκά άνθη αποτελούνται από 5-6 επιμήκη, καφέ σέπαλα, 5-6 λευκά πέταλα, 183 ± 17 στήμονες και ύπερο με 40 ± 5 καρπόφυλλα (Εικ.2). Τα αρσενικά άνθη έχουν τον ίδιο αριθμό πετάλων και σεπάλων με τα θηλυκά, 153 ± 29 στήμονες και φέρουν υποπλαστική ωοθήκη (Εικ.3). Τα άνθη φέρονται στις μασχάλες των φύλλων των 5-6 πρώτων γονάτων των κληματίδων του έτους (Βασιλακάκης, 1996).



Εικ.2 Θηλυκό άνθος ακτινιδιάς



Εικ.3 Αρσενικό άνθος ακτινιδιάς

2. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

2.1 Παγκόσμια Παραγωγή

Αν και πρόσφατα εμπορευματοποιημένη, η καλλιέργεια της ακτινιδιάς αποτελεί έναν μικρό, αλλά σταθερά αναπτυσσόμενο παράγοντα της παγκόσμιας αγοράς, αντιπροσωπεύοντας το 0.25% της παγκόσμιας παραγωγής φρούτων, συγκριτικά με τα εσπεριδοειδή (23%), τη μπανάνα (15%), τα σταφύλια (14%) και τα μήλα (13%). Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής πωλείται ως νωπό προϊόν, με μόνο ένα πολύ μικρό μέρος αυτής να μεταποιείται σε προϊόντα όπως χυμοί και μαρμελάδες. Οι μεγαλύτερες χώρες παραγωγού ακτινιδίου παγκοσμίως είναι η Ιταλία, η Νέα Ζηλανδία, η Κίνα και η Χιλή, με ποσοστά 30%, 21%, 18% και 13% αντίστοιχα (FAOSTAT, 2012). Η Ιταλία παράγει περίπου το 70% της παραγωγής του Β. ημισφαιρίου, με παραγωγή που ξεπερνά τους 400.000 τόνους ετησίως, και εξάγει το 75% της εγχώριας παραγωγής. Η Γαλλία παράγει περισσότερους από 70.000 τόνους ακτινιδίου ετησίως και εξάγει το 30% της παραγωγής αυτής (Πιν.1).

Πίνακας 1. Οι κυριότερες χώρες παραγωγής ακτινιδίου και η συνολική ετήσια παραγωγή τους

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Ιταλία	415.052	434.650	416.997	473.955	447.608	415.877	431.558
Νέα Ζηλανδία	318.000	329.384	365.000	385.000	390.000	378.500	364.958
Χιλή	150.000	170.000	185.000	185.607	227.000	229.000	237.104
Ελλάδα	70.100	87.200	70.100	84.300	104.000	116.310	140.400
Γαλλία	75.605	75.136	70.156	66.851	76.434	71.495	73.395
Η.Π.Α.	33.747	21.228	22.226	20.865	23.224	32.024	38.102
Ιράν	30.000	25.306	27.187	29.540	30.396	34.200	31.576
Τουρκία	8.000	10.962	15.242	19.530	23.689	26.554	29.231
Ιαπωνία	36.400	26.509	32.800	38.400	35.000	29.900	27.185
Ισπανία	10.931	18.463	14.036	17.709	18.800	23.100	23.327
Πορτογαλία	11.293	12.000	12.259	10.998	12.777	14.700	23.473
Κορέα	10.693	10.366	11.298	11.084	10.103	10.400	10.062
Ισραήλ	4.655	5.524	3.703	4.241	4.099	4.001	4.079

(Πηγή: FAOSTAT)

2.2 Η καλλιέργεια της ακτινιδιάς στην Ελλάδα

Η καλλιέργεια της ακτινιδιάς εισήχθη για πρώτη φορά στη χώρα μας το 1975 με την εγκατάσταση των πρώτων φυτειών στην περιοχή της Πιερίας (Παλούκης και Ντινόπουλος, 1989). Πρόκειται για μια πολλά υποσχόμενη καλλιέργεια που βρίσκεται σε διαρκή ανάπτυξη με την εγχώρια παραγωγή να έχει διαρκώς αυξητικές τάσεις. Εκτιμάται ότι τα επόμενα χρόνια η παραγωγή θα φτάσει τους 150.000 τόνους και η Ελλάδα θα καταστεί μία εκ των σημαντικότερων χωρών παραγωγών στην Ευρώπη. Ήδη το 2011 η εγχώρια παραγωγή ακτινιδίου ξεπέρασε τους 140.000 τόνους, κατατάσσοντας την Ελλάδα δεύτερη σημαντικότερη χώρα παραγωγό στην Ευρώπη, μετά την Ιταλία (Πιν.1). Το ακτινίδιο είναι καθαρά εξαγωγίμο προϊόν σε ποσοστό 85% της παραγωγής του. Η Πιερία έχει την πρωτοκαθεδρία στην καλλιέργεια ακτινιδίου παράγοντας περίπου το 40% της εθνικής παραγωγής, ενώ σημαντικές καλλιεργητικές εκτάσεις διαθέτουν οι νομοί Ημαθίας, Πέλλας, Άρτας, Φθιώτιδας και Λάρισας (www.minagric.gr).

Οι εξαγωγές ξεκίνησαν πριν από 7-8 έτη περίπου και σήμερα το ελληνικό ακτινίδιο έχει κερδίσει έδαφος σε χώρες της Ε.Ε., όπως είναι η Ισπανία, η Γαλλία, η Γερμανία, αλλά και σε Ρωσία, Μέση Ανατολή, Καναδά, ΗΠΑ, Χονγκ Κονγκ και Σιγκαπούρη. Ένα από τα μεγάλα πλεονεκτήματα του ακτινιδίου σε σχέση με άλλα προϊόντα, αποτελεί το γεγονός ότι διατηρείται σε κατάλληλους ψυκτικούς χώρους και έτσι μπορεί να διατεθεί στην αγορά ακόμα και ένα εξάμηνο μετά τη συγκομιδή του. Σημείο κλειδί για την επιτυχή ανάπτυξη της καλλιέργειας του ακτινιδίου και της σταθεροποίησης των τιμών σε κερδοφόρα επίπεδα είναι η αύξηση της εγχώριας παραγωγής.

Η ποικιλία ακτινιδίου που καλλιεργείται κατά κόρον, τόσο παγκοσμίως όσο και στον ελλαδικό χώρο, είναι η ποικιλία «Hayward», ενώ τα τελευταία χρόνια άνοδο παρουσιάζει η καλλιέργεια της νέας ελληνικής ποικιλίας «Tsechelidis».

2.3 Η ελληνική ποικιλία ακτινιδίου «Tsechelidis»

2.3.1 Ιστορικό

Η ποικιλία «Tsechelidis» είναι μια νέα ποικιλία ακτινιδίου (*Actinidia deliciosa*), που βρέθηκε στην περιοχή της Επισκοπής Ημαθίας και φέρει το όνομα του δημιουργού της, του παραγωγού κ. Χρήστου Τσεχελίδη. Η ποικιλία προήλθε έπειτα από σποροφυτική επιλογή εντός της ποικιλίας «Hayward», με σκοπό την ανάπτυξη αρσενικών φυτών. Από το αρχικό γκρουπ των 20 επιλεγμένων σποροφύτων, ένα φυτό αναγνωρίστηκε ως θηλυκό. Το συγκεκριμένο φυτό έδωσε για πρώτη φορά καρπούς το 1994 και τα χαρακτηριστικά τους ήταν τόσο ιδιαίτερα, που προκάλεσαν άμεσο ενδιαφέρον για περαιτέρω παρακολούθηση και μελέτη. Το φυτό παρακολούθηθηκε συστηματικά για τα επόμενα 2 χρόνια και παρουσίασε σταθερή συμπεριφορά ως προς τα χαρακτηριστικά του, τα οποία και το διαφοροποίησαν από την ποικιλία «Hayward». Το αρχικό μητρικό φυτό αναπαράγεται αγενώς σε μεγάλη κλίμακα το 1996 και έτσι γεννάται η νέα ποικιλία «Τσεχελίδης». Έκτοτε η ποικιλία αναπαράγεται αγενώς για τα επόμενα 10 χρόνια. Παράλληλα, δημιουργείται μία βάση παρατήρησης με πολλά φυτά και των δύο μαρτύρων, όπου οι καλλιεργητικές φροντίδες και στις δύο ποικιλίες είναι ίδιες. Οι παρατηρήσεις που λαμβάνονται επί σειρά ετών δείχνουν ότι η νέα ποικιλία είναι σταθερή στα χαρακτηριστικά της, χωρίς να παρατηρείται κανένας εκφυλισμός και ταυτόχρονα καταδεικνύουν μία σημαντική υπεροχή έναντι των χαρακτηριστικών της «Hayward».

Το Δεκέμβριο του 2003 γίνεται η πρώτη αίτηση στο Community Plant Variety Office (CPVO), που εδρεύει στη Γαλλία και καλύπτει νομοθετικά τα όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης, για την εξέταση των χαρακτηριστικών αλλά και την κατοχύρωση των δικαιωμάτων της νέας ποικιλίας από το δημιουργό της. Ακολουθεί η κατοχύρωση της ποικιλίας στη Διεθνή Ένωση για την Προστασία Νέων Φυτικών Ποικιλιών (UPOV). Παράλληλα, γίνεται γενετική αποτύπωσή της ποικιλίας από το εργαστήριο Γενετικής και Βελτίωσης φυτών, της Γεωπονικής

σχολής του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας, με την τεχνική της μοριακής ανάλυσης του DNA. Τα δεδομένα της μοριακής ανάλυσης επιβεβαίωσαν την αδιαμφισβήτητη διαφορετικότητα των δύο γενοτύπων (Tsechelidis και Hayward), καθώς εντοπίστηκαν γενετικοί πολυμορφισμοί σε οκτώ (8) τουλάχιστον αλληλόμορφα, σύμφωνα με τους μοριακούς δείκτες τύπου SSR που χρησιμοποιήθηκαν (Mavromatis *et al.*, 2010).

Κυριότερα σημεία υπεροχής είναι η διπλάσια στρεμματική απόδοση της ποικιλίας σε σχέση με τη «Hayward», ο μεγάλος καρπός μέσου βάρους 170-180 γραμμαρίων, η απουσία ατροφικών καρπών και η εκπληκτική τους ομοιομορφία, η υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη C, αντιοξειδωτικών, σακχάρων, καθώς και το ξεχωριστό άρωμα (Sotiropoulos *et al.*, 2009; Mavromatis *et al.*, 2010).

2.3.2 Μορφολογική περιγραφή

Η ποικιλία «Tsechelidis» ανήκει στο είδος *Actinidia deliciosa* του γένους *Actinidia*. Τα φυτά της ποικιλίας είναι θηλυκά και το επίπεδο πλοειδίας της ποικιλίας είναι εξαπλοειδές.

Ο κορμός και οι βλαστοί φέρουν τριχίδια, η πυκνότητα των οποίων χαρακτηρίζεται μέτρια, καθώς και φακίδια μετρίου μεγέθους. Το χρώμα των βλαστών, στην πλευρά που εκτίθεται στο ηλιακό φως, είναι βαθύ κόκκινο έως καφέ. Το σχήμα των φύλλων είναι ευρύ ωοειδές με αιχμηρή κορυφή. Τα φύλλα φέρουν τριχίδια, μέτριας πυκνότητας, τόσο στην επάνω όσο και στην κάτω επιφάνεια τους. Το χρώμα των φύλλων στην επάνω επιφάνεια είναι βαθύ πράσινο, ενώ αντίστοιχα στην κάτω είναι κιτρινοπράσινο. Στους οφθαλμούς παρατηρείται η παρουσία καλύμματος. Το άνοιγμα του καλύμματος των οφθαλμών είναι μέτριο. Η ποικιλία καρποφορεί σε ετήσιους κλάδους και συνήθως φέρει ένα άνθος ανά ταξιανθία. Το στέλεχος του άνθους είναι μακρύ με παρουσία ελαφρού χνοασμού, με μέτριο μήκος χνουδιού. Ο αριθμός σεπάλων είναι >5 χρώματος καστανού με παρουσία χνοασμού κοντού μήκους.

Η διάμετρος των ανθέων είναι πολύ μεγάλη. Τα πέταλα είναι επίπεδα χωρίς καμπύλη προς το πάνω άκρο τους και αλληλεπικαλυπτόμενα. Το χρώμα των πετάλων είναι λευκό. Ο χρωματισμός των πετάλων στην επάνω πλευρά είναι μονόχρωμος με απουσία σκίασης στο χρώμα. Το χρώμα των πετάλων είναι πιο ανοιχτόχρωμο προς το άκρο. Το χρώμα του νηματίου του στήμονα είναι άσπρο με κίτρινο-πορτοκαλί ανθήρα και μεγάλο αριθμό στύλων. Το χρώμα των στύλων είναι λευκό ενώ η θέση τους είναι μερικώς όρθια (Εικ.4). Η εποχή έναρξης της ανθοφορίας είναι μέση-όψιμη και ειδικότερα η άνθιση ξεκινά 7-10 ημέρες νωρίτερα από την άνθιση της ποικιλίας «Hayward».



Εικ.4 Άνθος της ποικιλίας Τσεχελίδης

Ο καρπός είναι πολύ μεγάλος σε μέγεθος (120-290gr) με κυλινδρικό σχήμα. Σε εγκάρσια διατομή είναι κυκλικός. Η γενική μορφή του άκρου του στύλου είναι ελαφρώς κοίλα ενώ η γενική μορφή του ώμου στη ζώνη του μισχικού άκρου είναι τετράγωνη. Η προσκόλληση της φλούδας στο σαρκώδες μέρος του καρπού είναι μεγάλη. Παρατηρείται απουσία κηλίδων στη φλούδα του καρπού. Το χρώμα της φλούδας κατά την ωριμότητα, που καθιστά τον καρπό κατάλληλο για συγκομιδή, είναι μέτρια καστανό. Δεν εμφανίζονται διαμήκεις ραβδώσεις ή λωρίδες στη φλούδα του καρπού, ενώ δεν παρουσιάζεται αλλαγή του χρώματος της φλούδας κατά την ωρίμανση. Το χρώμα της φλούδας κατά την ωριμότητα, που καθιστά τον καρπό κατάλληλο προς κατανάλωση, είναι μέτρια καστανό. Παρουσιάζεται χνούδι στη φλούδα του καρπού. Η πυκνότητα χνοασμού είναι μέτρια, αγκαθωτού τύπου. Η θέση του χνοασμού βρίσκεται



Εικ.5 Καρποί της ποικιλίας Τσεχελίδης

κυρίως στην άκρη του στύλου και ο χρωματισμός αυτού κατά την ωριμότητα είναι μέτρια καστανός (Εικ.5). Η προσκόλληση του χνοασμού στη φλούδα κατά το τρίψιμο είναι ελαφρώς μεγαλύτερη από μέτρια. Η διάμετρος της καρδιάς του καρπού σε σχέση με τη συνολική διάμετρο αυτού, δεδομένη ως η μεγαλύτερη διάμετρος, είναι μικρή έως μέτρια. Η μορφή της καρδιάς σε εγκάρσια διατομή είναι πεπλατυσμένη στους πόλους. Το χρώμα του εξωτερικού περικάρπιου κατά την ωριμότητα, που καθιστά τον καρπό κατάλληλο προς κατανάλωση, είναι σκούρο πράσινο. Το χρώμα του εσωτερικού περικάρπιου είναι πράσινο ενώ το χρώμα της καρδιάς είναι λευκό-πράσινο. Τέλος, η εποχή ωρίμανσης, που καθιστά τον καρπό κατάλληλο για συγκομιδή, χαρακτηρίζεται πρόωμη και συγκριτικά με την ποικιλία «Hayward» ωριμάζει 7-10 ημέρες νωρίτερα.

3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΔΙΟΙΚΙΑΣ

3.1 Καθορισμός του φύλου στα φυτικά είδη

Η εγγενής αναπαραγωγή αποτελεί κυρίαρχο χαρακτηριστικό του κύκλου ζωής των περισσοτέρων ζωικών και φυτικών οργανισμών. Είναι ιδιαίτερης σημασίας διαδικασία, καθώς αυξάνει τη γενετική παραλλακτικότητα και προάγει τον ανασυνδυασμό των γενετικών θέσεων, ώστε να δράσει η φυσική επιλογή. Παρά το γεγονός ότι τα υπάρχοντα φυτικά είδη είναι στην πλειοψηφία τους ερμαφρόδιτα, τα μόνοικα και δίοικα είδη αποτελούν το 75% των αγγειόσπερμων οικογενειών, συμπεριλαμβανομένων των 6 δικοτυλήδων και 5 μονοκοτυλήδων υποκλάσεων. Πιο συγκεκριμένα, τα δίοικα είδη καταλαμβάνουν το 6% (14.620) των ειδών, το 7.1% (959) των γενών και το 38% (167) των οικογενειών του φυτικού βασιλείου (Renner and Ricklefs, 1995).

Η διοικία που συνοδεύεται από διμορφισμό των χρωμοσωμάτων του φύλου, είναι συνηθισμένη κατάσταση στα ζωικά βασίλεια και αρκετά περιορισμένη στο φυτικό. Η εμφάνιση ετερομορφικών χρωμοσωμάτων του φύλου αποτελεί συνέπεια της εξέλιξης των δύο φύλων που διασφαλίζει τη διοικία και ενισχύει την κληρονομική αναλογία 1:1 των αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Χρωμοσώματα του φύλου έχουν αναπτυχθεί σε ένα περιορισμένο αριθμό δίοικων αγγειόσπερμων και μόλις κάποια από αυτά έχουν μελετηθεί σε κυτταρολογικό ή/και μοριακό επίπεδο (Charlesworth, 2002). Τα δίοικα φυτά αποτελούν ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον σύστημα για τη μελέτη της γενετικής και της εξέλιξης των χρωμοσωμάτων του φύλου. Το γεγονός ότι τα μονογενή άνθη σε πολλά φυτικά είδη και γένη αναπτύχθηκαν ανεξάρτητα από προγόνους που ήταν ερμαφρόδιτοι, δίνει την ευκαιρία να μελετηθούν διαφορετικοί μηχανισμοί καθορισμού του φύλου. Επιπλέον, πολλά δίοικα είδη έχουν γόνιμους, ερμαφρόδιτους συγγενείς, καθιστώντας κατά συνέπεια δυνατή τη μελέτη της εξέλιξης των χρωμοσωμάτων του φύλου από αυτόσωμα χρωμοσώματα. Τέλος, στα φυτά είναι εφικτό να μελετηθεί η αμφίδρομη πορεία της εξέλιξης μεταξύ

διοικίας και ερμαφροδιτισμού, καθώς συχνά προκύπτουν στη φύση μεταλλαγμένοι τύποι και των δύο κατηγοριών (Ming *et al.*, 2007).

Πρώτο βήμα για την εξέλιξη των χρωμοσωμάτων του φύλου αποτελεί η ύπαρξη μεταλλάξεων που επάγουν την αρρενοστεριότητα και τη θηλυκή στεριότητα, καταλήγοντας έτσι στη δημιουργία μονογενών ανθέων. Η ανάπτυξη τόσο των στημόνων όσο και των καρπόφυλλων επηρεάζεται από έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στα διάφορα στάδια της εξέλιξης τους. Καθίσταται σαφές λοιπόν, ότι οποιαδήποτε μετάλλαξη ενός ρυθμιστικού γονιδίου δύναται να πυροδοτήσει την αποβολή ή την απώλεια της λειτουργίας των αρσενικών ή/και των θηλυκών οργάνων (Charlesworth, 2008). Στα δίοικα άνθη, μεταλλάξεις που καταλήγουν σε αρρενοστεριότητα μπορεί να συμβούν από τα αρχικά στάδια σχηματισμού της πρωτογενούς μορφής των στημόνων έως και το τελικό στάδιο σχηματισμού των μικροσπορίων. Αντίστοιχα, μεταλλάξεις που οδηγούν σε θηλυκή στεριότητα, μπορεί να λάβουν χώρα από τα αρχικά στάδια σχηματισμού των καρπόφυλλων έως τον τελικό σχηματισμό των μικροσπορίων (Ming *et al.*, 2011).

Μεταξύ των δίοικων ειδών, μόνο κάποια είδη έχουν αναπτύξει χρωμοσώματα του φύλου. Τα χρωμοσώματα του φύλου μπορεί να μην ξεχωρίζουν μορφολογικά (μονομορφικά), όπως στην περίπτωση της παπάγια (*Carica papaya*) και του σπαραγγιού (*Asparagus officinalis*) ή να έχουν εμφανή διαφορά ως προς το μέγεθος τους (ετερομορφικά), όπως συμβαίνει στο είδος *Silene latifolia*. Υπάρχει ωστόσο και μια σπάνια περίπτωση, όπου υπάρχουν παραπάνω από δυο χρωμοσώματα του φύλου ανά άτομο (Εικ.6), όπως συμβαίνει στο είδος *Rumex acetosa* και στην περίπτωση αυτή τα χρωμοσώματα καλούνται πολυμορφικά (Vyskot and Hobbs, 2004).

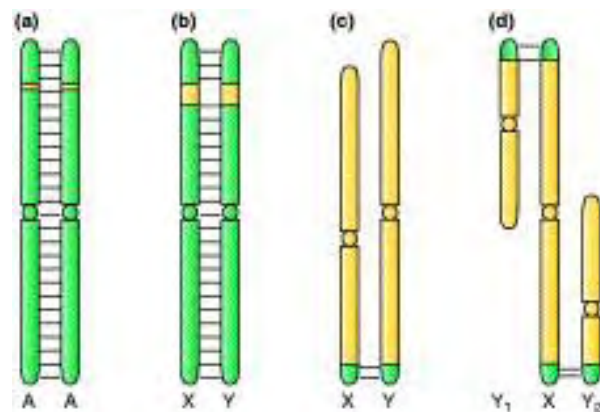
Μέχρι σήμερα έχουν παρατηρηθεί δύο βασικά συστήματα καθορισμού του φύλου στα δίοικα φυτά. Το πρώτο σύστημα περιλαμβάνει ένα ενεργό Y χρωμόσωμα (X/Y σύστημα) και σύμφωνα με το οποίο, το θηλυκό άτομο είναι ομογαμετικό και φέρει δυο ίδια φυλετικά χρωμοσώματα (XX), ενώ αντίστοιχα το

αρσενικό άτομο είναι το ετερογαμετικό και φέρει και τους 2 τύπους φυλετικών χρωμοσωμάτων (XY). Επομένως, γίνεται αντιληπτό πως το χρωμόσωμα Y καθορίζει τον αρσενικό τύπο. Αντιπροσωπευτικό είδος του συστήματος αυτού είναι το *Silene latifolia*. Το ίδιο σύστημα καθορισμού του φύλου ακολουθούν και τα είδη *Carica papaya* και *Asparagus officinalis*, αλλά καθώς τα φυλετικά τους χρωμοσώματα είναι ομομορφικά, υπάρχει μια περιοχή του Y χρωμοσώματος που δεν ανασυνδυάζεται με το X χρωμόσωμα και ουσιαστικά είναι αυτή που καθορίζει το φύλο (Εικ.6b).

Το δεύτερο σύστημα βασίζεται στην αναλογία των X χρωμοσωμάτων προς τα αυτόσωμα χρωμοσώματα (X:A σύστημα) για τον καθορισμό του φύλου, και πιο συγκεκριμένα όταν η τιμή αναλογίας είναι ίση ή

μεγαλύτερη της μονάδας καθορίζει το θηλυκό γένος, ενώ αντίστοιχα μια τιμή μικρότερη του 0.5, καθορίζει το αρσενικό φύλο. Αντιπροσωπευτικά είδη του συστήματος αυτού είναι τα *Rumex acetosa* και *Humulus lupulus*, όπου το θηλυκό είναι XX και το αρσενικό XY₁Y₂. Ωστόσο στην περίπτωση αυτή, οι γενότυποι XX_Y και XX_{Y₁Y₂} είναι επίσης θηλυκά άτομα (Yanan *et al.*, 2004).

Τις τελευταίες δεκαετίες με τη βοήθεια σύγχρονων τεχνικών της μοριακής βιολογίας, κατέστη δυνατό να κλωνοποιηθούν γονίδια που ελέγχουν τον καθορισμό του φύλου στα φυτικά είδη και να αλληλουχηθούν φυλετικά χρωμοσώματα. Συγκεκριμένα, γενετικοί χάρτες έχουν κατασκευαστεί για το σπαράγγι (Reamon-Buttner and Jung, 2000), την παπάγια (Ma *et al.*, 2004) και το λυκίσκο (Seefelder *et al.*, 2000).



Εικ.6. (a) Αυτόσωμα χρωμοσώματα με 1 γενετική θέση για καθορισμό του φύλου. (b) Ομομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα, με μη ανασυνδυαζόμενη περιοχή στο Y χρωμόσωμα. (c) Ετερομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα. (d) Πολυμορφικά φυλετικά χρωμοσώματα

3.2 Γενετική της έκφρασης του φύλου στο γένος *Actinidia*

Το γένος *Actinidia* περιλαμβάνει πάνω από 60 είδη, τα οποία είναι όλα δίοικα. Το άνθος της ακτινιδιάς περιλαμβάνει όλα τα ανθικά μέρη, είναι δηλαδή κατά μία έννοια ερμαφρόδιτο, ωστόσο δεν είναι τέλειο λειτουργικά, καθώς στο ίδιο άνθος δεν είναι εξίσου ανεπτυγμένα και τα δύο μέρη (ανδρείο και γυναικείο). Τα αρσενικά φυτά χαρακτηρίζονται από άνθη που φέρουν πολυάριθμους στήμονες, οι οποίοι παράγουν ενεργούς/ζωντανούς γυρεόκοκκους, ενώ παρατηρείται και η ύπαρξη ωοθήκης, η οποία όμως είναι ατροφική, δεν συνδέεται με στύλο και δεν αναπτύσσει πλακούντα και ωάρια. Αντίθετα, τα άνθη των θηλυκών φυτών φέρουν λειτουργική ωοθήκη, η οποία σχηματίζει πολλά ωάρια και λειτουργικούς στύλους. Παρατηρείται επίσης και η έκπτυξη στημόνων, οι οποίοι όμως δεν αναπτύσσονται πλήρως ποτέ ή, αν αναπτυχθούν, παράγουν άδειους γυρεόκοκκους, καθώς τα μικροσπόρια εκφυλίζονται πριν την άνθιση (McNeillage and Steinhagen, 1998). Οι Coimbra *et al.*, (2004) μελετώντας την ανάπτυξη των μικροσπορίων σε ανθήρες θηλυκών ανθέων του είδους *A. deliciosa*, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ύπαρξη ενός μηχανισμού προγραμματισμένου θανάτου των κυττάρων (Programmed Cell Death) οδηγεί στον εκφυλισμό των μικροσπορίων μετά το στάδιο της τετράδας. Συγκεκριμένα παρατήρησαν συμπύκνωση και συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος, αναδίπλωση της κυτταρικής μεμβράνης και του πυρηνικού φακέλου και συμπύκνωση της χρωματίνης.

Εντούτοις, η διοικία δεν είναι απόλυτη κατάσταση στην ακτινιδιά, καθώς έχουν αναφερθεί περιπτώσεις αρσενικών πρεμνών που σχημάτισαν μικρούς καρπούς (McNeillage, 1991a). Τα πρέμνα αυτά φέρουν αρσενικά και ερμαφρόδιτα άνθη. Τα ερμαφρόδιτα άνθη παράγουν βιώσιμη γύρη, ενώ ο βαθμός ανάπτυξης της ωοθήκης και των στύλων τους ποικίλει, καταλήγοντας στο σχηματισμό μικρού αριθμού γόνιμων ωαρίων. Αυτά τα “off-type” αρσενικά φυτά, παρουσιάζουν διακυμάνσεις στη συχνότητα εμφάνισης ερμαφρόδιτων ανθέων, τόσο από χρονιά σε χρόνια, όσο και κατά την ίδια χρονιά, από πρέμνο

σε πρέμνο, και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως ασταθή ή καρποφόρα αρσενικά (*fruiting males*). Ο McNeilage (1991a) μελέτησε διεξοδικά τη μορφολογία των ανθέων σε θηλυκά, αρσενικά και καρποφόρα αρσενικά φυτά του είδους *Actinidia deliciosa* και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι για το χαρακτηρισμό των ανθέων ως θηλυκά, αρσενικά ή ερμαφρόδιτα, βασικούς δείκτες αποτελούν η ανάπτυξη στύλου στα άνθη και το μήκος αυτού, καθώς και η παρουσία ωαρίων και το μέγεθος τους. Μελετώντας την έκφραση του φύλου αποκλειστικά σε καρποφόρα αρσενικά φυτά (*A. deliciosa* var. *deliciosa*), ο McNeilage (1991b) παρατήρησε διακύμανση στην εμφάνιση ερμαφρόδιτων ανθέων στα φυτά αυτά, καθώς και στη σχετική αναλογία τους με τα αρσενικά άνθη εντός του ίδιου φυτού. Το ποσοστό εμφάνισης κυμάνθηκε από 40 έως 70% και οι αντίστοιχες αναλογίες από 2:3 έως 7:3 ανά ταξιανθία. Η ύπαρξη ασταθών καρποφόρων αρσενικών φυτών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο ερμαφροδιτισμός στην ακτινιδιά είναι καταπιεσμένο γνώρισμα, το οποίο, στη πλειοψηφία των περιπτώσεων, δεν καταλήγει ποτέ σε φαινοτυπική έκφραση. Εμφανίζεται ωστόσο, όταν η γενετική κατανομή ή/και οι περιβαλλοντικές συνθήκες δημιουργήσουν μια ορμονική ισορροπία, η οποία επιτρέπει στο εν λόγω γνώρισμα να εκφραστεί. Ο McNeilage (1991b) υπολόγισε με βάση τη μορφολογία των ανθέων, έναν δείκτη Φαινοτυπικού Γένους (Phenotypic Gender), οι τιμές του οποίου κυμαίνονται από 0 (αμιγώς αρσενικά φυτά) έως 1 (αμιγώς θηλυκά φυτά). Η τιμή 0.5 θα αντιστοιχούσε στο απόλυτα ερμαφρόδιτο φυτό, το οποίο θα φέρει μόνο τέλεια άνθη. Με βάση το δείκτη αυτό, ο McNeilage ορίζει ως αρσενικά καρποφόρα φυτά, τα φυτά για τα οποία οι εκτιμήσεις του δείκτη είναι μεγαλύτερες της τιμής 0 και μικρότερες της τιμής 0.5. Καθίσταται σαφές ότι όσο η τιμή θα πλησιάζει στο 0.5, τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η αναλογία των ερμαφρόδιτων ανθέων στο φυτό.

Οι Testolin *et al.* (1995), θέλοντας να διερευνήσουν το μηχανισμό κληρονόμησης του φύλου στο γένος *Actinidia*, μελέτησαν την αναλογία διάσπασης των απογόνων. Συγκεκριμένα εξέτασαν σπορόφυτα που προέκυψαν

έπειτα από ελεγχόμενες διασταυρώσεις θηλυκών φυτών του είδους *Actinidia deliciosa*, από την αυτογονιμοποίηση ενός καρποφόρου αρσενικού φυτού του είδους *Actinidia deliciosa* και από την ελεύθερη επικονίαση φυτών των ειδών *A.chinensis* και *A.kolomikta*. Η αναλογία διάσπασης του φύλου ελέγχθηκε σε όλα τα σπορόφυτα στην πρώτη περίοδο άνθισης. Όλες οι οικογένειες που προέκυψαν από ελεύθερη επικονίαση, τόσο διπλοειδών όσο και εξαπλοειδών ειδών, καθώς και η πλειοψηφία των οικογενειών των ελεγχόμενων διασταυρώσεων, εμφάνισαν αναλογία φύλου αρσενικού: θηλυκού σχεδόν 1:1. Από τις αυτογονιμοποιήσεις του καρποφόρου αρσενικού προέκυψαν θηλυκά και αρσενικά φυτά σε αναλογία 1:3, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκαν “off-type” φυτά ανάμεσα στους απογόνους. Η παραγωγή τόσο θηλυκών, όσο και αρσενικών απογόνων, έπειτα από αυτογονιμοποίηση καρποφόρων αρσενικών φυτών, καθιστά σαφές ότι το αρσενικό φύλο είναι το ετερογαμετικό. Τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν ότι η έκφραση του φύλου στο γένος *Actinidia*, θα πρέπει να ελέγχεται από ένα μονοπαραγοντικό σύστημα, που είτε βασίζεται σε ένα ή περισσότερα συνδεδεμένα γονίδια, ή στην ύπαρξη ενός ζεύγους X/Y χρωμοσωμάτων.

Οι Marchetti *et al.*, (1992) μελέτησαν την επίδραση διαφόρων ρυθμιστών ανάπτυξης στην έκφραση του φύλου στο είδος *A.deliciosa var. deliciosa*. Συγκεκριμένα εφάρμοσαν διαλύματα NAA, BAP, GA, ABA, TIBA, CCC και Ethephon σε βλαστούς φυτών της επικονιάστριας ποικιλίας «Matua» και της καλλιεργούμενης ποικιλίας «Hayward», με σκοπό τη διερεύνηση τυχόν αλλαγής του φύλου, μέσω της τροποποίησης της μορφολογίας των ανθέων. Καμία μεταχείριση δεν κατέστη δυνατό να προκαλέσει κάποια αλλαγή στα άνθη της θηλυκής ποικιλίας, η γύρη των οποίων χαρακτηρίζονταν από μηδενική βιωσιμότητα. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και στον αγρό, όπου απουσία επικονιαστών, η ποικιλία δεν έδωσε κανένα καρπό. Αντίθετα, η βιωσιμότητα της γύρης επηρεάστηκε αρκετά στα άνθη της αρσενικής ποικιλίας, σε ποσοστό που κυμάνθηκε από 79.2 (ABA) έως 10.3% (GA). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το

γεγονός ότι στη μεταχείριση με γιββερελίνη, η μειωμένη βιωσιμότητα των γυρεόκοκκων συνοδεύονταν από παράλληλη ανάπτυξη στύλων. Η επίδραση του γιββερικού οξέος (GA) στη θηλυκοποίηση των ανθέων επιβεβαιώθηκε και τα επόμενα χρόνια σε δοκιμές που έγιναν, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθέων με στοιχεία ερμαφροδιτισμού.

3.3 Ανάπτυξη μοριακών δεικτών που συνδέονται με το φύλο στο γένος *Actinidia*

Ο προσδιορισμός του φύλου στα σπορόφυτα της ακτινιδιάς καθίσταται πρακτικά αδύνατος σε πρώιμο στάδιο, καθώς τα νεαρά φυτά δεν φέρουν κανενός είδους διακριτικά γνώρισμα (κυτταρολογικά ή φαινοτυπικά). Τα φυτά φτάνουν σε αναπαραγωγική ωριμότητα έπειτα από 3-5 χρόνια, με τα αρσενικά να αποτελούν συνήθως το 50% του πληθυσμού (Gill *et al.*, 1998). Η ανάγκη να βρεθεί μία μέθοδος, ικανή να προσδιορίζει το φύλο των νεαρών φυταρίων, προτού αυτά εισέλθουν σε αναπαραγωγικό στάδιο, κρίνεται αναγκαία για την περίπτωση της ακτινιδιάς.

Μια μέθοδος, ικανή να αναγνωρίζει το φύλο των σποροφύτων, θα αύξανε την αποτελεσματικότητα ενός βελτιωτικού προγράμματος, καθώς θα επέτρεπε την έγκαιρη απομάκρυνση των ανεπιθύμητων γενοτύπων. Προς την κατεύθυνση αυτή κινήθηκαν οι Harvey *et al.*, (1997), οι οποίοι χρησιμοποιώντας τη Ομαδική μέθοδο Διαχωρισμού (Bulk Segregant Analysis), προσπάθησαν να εντοπίσουν δείκτες που συνδέονται με το φύλο σε οικογένειες του είδους *A.chinensis*. Η συγκεκριμένη μέθοδος κρίνεται ιδιαίτερα αποτελεσματική για τον εντοπισμό δεικτών που συνδέονται με ένα συγκεκριμένο γνώρισμα και βασίζεται στη ανάλυση δύο συγκεντρωτικών δειγμάτων DNA (pooled DNA) από μεμονωμένα φυτά, απογόνους ελεγχόμενης διασταύρωσης. Η κατανομή των φυτών στα δύο συγκεντρωτικά δείγματα DNA γίνεται με βάση το διαχωρισμό τους ως προς το γνώρισμα που μελετάται. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η παρουσία όλων των αλληλομόρφων στα 2 δείγματα DNA (bulk), τα οποία διαφοροποιούνται

μόνο ως προς το υπό εξέταση γνώρισμα. Στη συνέχεια τα δείγματα αναλύονται με πλήθος γενετικών δεικτών για τον εντοπισμό εκείνων που τα διαχωρίζουν και κατά συνέπεια συνδέονται και με το εν λόγω γνώρισμα. Οι Harvey *et al.* (1997) εφάρμοσαν τη συγκεκριμένη μέθοδο σε bulk δείγματα DNA αρσενικών και θηλυκών φυτών που προέκυψαν έπειτα από ελεγχόμενες διασταυρώσεις φυτών του είδους *Actinidia chinensis*. Το 80% των μοριακών δεικτών τύπου RAPD που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, έδωσαν παραπλήσια προϊόντα και μόνο 2 δείκτες, εκ των 500 που εξετάστηκαν, έδωσαν έναν σαφή πολυμορφισμό μεταξύ των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, ο δείκτης SmY έδωσε μια βάση 800bp στο αρσενικό συγκεντρωτικό δείγμα, η οποία απουσίαζε ή εμφανίζονταν πολύ ασθενώς στο αντίστοιχο θηλυκό δείγμα. Σε έλεγχο που πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο ατομικών φυτών, όλα τα αρσενικά φυτά εμφάνισαν τη χαρακτηριστική ζώνη, ενώ αυτή απουσίαζε σε 19 από τους 20 θηλυκούς γενοτύπους που ελέχθησαν. Η ίδια ζώνη εντοπίστηκε στον αρσενικό γονέα ενώ απουσίαζε στο θηλυκό. Αντίστοιχα ο δείκτης SmX έδωσε μια χαρακτηριστική ζώνη 850bp, η οποία εντοπίστηκε στο θηλυκό δείγμα και απουσίαζε στο αρσενικό. Σε επίπεδο ατομικού φυτού η ζώνη απουσίαζε σε όλους τους αρσενικούς γενοτύπους που εξετάστηκαν και εντοπίστηκε στους 18 από τους 20 θηλυκούς. Με βάση τον τρόπο κληρονομής των δεικτών και έπειτα από μελέτη της αναλογίας των απογόνων στις οικογένειες, οι Harvey *et al.* (1997) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το φύλο στο γένος *Actinidia* ελέγχεται από ένα ζεύγος χρωμοσωμάτων τύπου X/Y, όπου το αρσενικό ετερογαμετικό φύλο παράγει εξίσου θηλυκούς (X) και αρσενικούς γαμέτες (Y), ενώ το ομογαμετικό μόνο θηλυκούς.

Οι Gill *et al.* (1998) βασιζόμενοι στην ύπαρξη των συγκεκριμένων RAPD δεικτών, του δείκτη SmX, που κληρονομούνται από τον θηλυκό γονέα στους θηλυκούς απογόνους, και του δείκτη SmY, ο οποίος κληρονομούνται από τον αρσενικό γονέα στους αρσενικούς απογόνους, προχώρησαν περαιτέρω και μετέτρεψαν τους RAPD δείκτες σε δείκτες τύπου SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions). Οι δέκτες τύπου SCAR ενισχύουν ζώνες ανταποκρινόμενες

σε εντοπισμένους γονιδιακούς τόπους, είναι λιγότερο ευαίσθητοι στις συνθήκες αντίδρασης σε σχέση με τους RAPD δείκτες και έχουν την ικανότητα να μετατραπούν σε συγκυρίαρχους δείκτες. Οι Gill *et al.* (1998) εφάρμοσαν τους συγκεκριμένους δείκτες σε 120 φυτά του είδους *A.chinensis* και επιβεβαίωσαν το φύλο των φυτών αυτών στην πρώτη τους άνθιση, βάση τη μορφολογία των ανθέων τους. Στην πρώτη εφαρμογή των δεικτών αυτών κατάφερε να προσδιοριστεί με επιτυχία το φύλο στα 92 από τα 120 συνολικά φυτά που ελέχθησαν (77%), με 50 φυτά να χαρακτηρίζονται ως αρσενικά και 42 ως θηλυκά. Από τα 28 φυτά, που δεν κατέστη δυνατό να προσδιοριστεί το φύλο τους στην πρώτη εφαρμογή, τα 13 προσδιορίστηκαν στη δεύτερη, ανεβάζοντας το ποσοστό επιτυχίας της μεθόδου στο 88%. Ωστόσο όταν εφαρμόστηκαν οι εν λόγω δείκτες σε φυτά του είδους *A.deliciosa*, ο δείκτης SmX έπαψε να είναι πολυμορφικός ανάμεσα στα δύο φύλα, ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες αποδιάταξης, ενώ ο δείκτης SmY εμφάνισε μια κυρίαρχη ζώνη σε μερικά μόνο από τα αρσενικά φυτά. Οι δείκτες δεν εμφάνισαν καμία ζώνη όταν εφαρμόστηκαν σε φυτά των ειδών *A.eriantha*, *A.arguta*, *A.latifolia*, *A.setosa*, και *A.rufa*. Τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης αλλά και της αναλογίας των απογόνων, που άγγιζε το 1:1, επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των Harvey *et al.* (1997) και ενισχύουν την άποψη ότι το φύλο στο γένος *Actinidia* καθορίζεται από ένα ζεύγος X/Y χρωμοσωμάτων, με το αρσενικό φύλο να είναι το ετερογαμετικό.

Οι Shirkot *et al.* (2002) κατάφεραν να ομαδοποιήσουν με βάση το φύλο 7 ποικιλίες του είδους *A.deliciosa*, χρησιμοποιώντας μοριακούς δείκτες τύπου RAPD. Με βάση τη μοριακή γενετική ανάλυση οι ποικιλίες ομαδοποιήθηκαν σε 2 διακριτές ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελούνταν από τις 2 αρσενικές ποικιλίες και η δεύτερη από τις υπόλοιπες 5 θηλυκές. Από το σύνολο των 34 εκκινητών που εφαρμόστηκαν, οι 21 ήταν πολυμορφικοί, ενώ κάποιοι από αυτούς εμφάνισαν μοναδικά προφίλ πολυμορφικών ζωνών. Συγκεκριμένα 2 εκκινητές εμφάνισαν χαρακτηριστικές ζώνες στις αρσενικές ποικιλίες, οι οποίες δεν

εμφανίστηκαν στο προφίλ των θηλυκών ποικιλιών. Δεδομένου του μικρού αριθμού των φυτών που εξετάστηκαν, μένει να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίο κληρονομούνται οι συγκεκριμένοι δείκτες προκειμένου να επιβεβαιωθεί η εξειδίκευση που φαίνεται να παρουσιάζουν για το αρσενικό φύλο. Ωστόσο, η συγκεκριμένη έρευνα αποτελεί την πρώτη προσπάθεια εντοπισμού μοριακών δεικτών που συνδέονται με το φύλο στο είδος *A.deliciosa* var. *deliciosa*.

4. Η ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΙΔΙΑΣ

4.1 Γενικά

Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες της ακτινιδιάς ανήκουν κατά κύριο λόγο στο είδος *A. deliciosa*, με την ποικιλία «Hayward» να αποτελεί την κύρια καλλιεργούμενη και ευρύτερα διαδεδομένη ποικιλία. Καθώς η παγκόσμια παραγωγή βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε μία και μόνο ποικιλία, αναγνωρίζεται εύκολα η ανάγκη για τη δημιουργία και τη διάδοση νέων ποικιλιών ακτινιδιάς και για το λόγο αυτό, πολλά βελτιωτικά προγράμματα προσανατολίζονται προς αυτήν την κατεύθυνση (Nishiyama, 2007). Το δυναμικό της ακτινιδιάς για περαιτέρω ανάπτυξη με τη βοήθεια μεθόδων τόσο της κλασσικής βελτίωσης, όσο και της βιοτεχνολογίας είναι πολύ υψηλό, καθώς υπάρχουν περισσότερα από 70 είδη στο γένος *Actinidia*, που παρουσιάζουν ποικιλομορφία σε πληθώρα χαρακτηριστικών. Η διαθέσιμη γενετική παραλλακτικότητα αφορά κυρίως τα χαρακτηριστικά του καρπού, όπως το μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα της φλούδας και της σάρκας, τη σκληρότητα της σάρκας, την πυκνότητα τριχιδίων της φλούδας, την υφή της σάρκας, τη γευστικότητα αλλά και τη χημική σύσταση του καρπού (Εικ.7). Επιπλέον, υπάρχει διακύμανση μεταξύ των ειδών όσο αφορά τον χρόνο ωρίμανσης των καρπών, το διάστημα συντήρησης, τις αλλαγές στο χρώμα και τη δομή της σάρκας και της φλούδας κατά την ωρίμανση, στο ρυθμό ανάπτυξης των πρέμνων, την αντοχή τους σε ασθένειες και την προσαρμογή τους σε διαφορετικές εδαφοκλιματικές συνθήκες (Huang *et al.*, 2004). Ωστόσο, η μεγάλη αυτή γενετική παραλλακτικότητα παραμένει ανεκμετάλλευτη,



Εικ.7 Γενετική παραλλακτικότητα του γένους *Actinidia*.

καθώς μόνο τα είδη *A. chinensis*, *A. deliciosa* και *A. arguta* έχουν αξιοποιηθεί εμπορικά (Seal, 2003). Σημαντικό περιοριστικό παράγοντα στα διάφορα βελτιωτικά προγράμματα αποτελεί εντούτοις και η μεγάλη διακύμανση του επιπέδου πλοειδίας που χαρακτηρίζει το γένος *Actinidia* και δυσχεραίνει τις διασταυρώσεις τόσο μεταξύ των ειδών, όσο και μεταξύ διαφορετικών φυλών του ίδιου είδους (Ferguson, 2007).

4.2 Βελτιωτικοί στόχοι

Η δημιουργία και η χρήση βελτιωμένων ποικιλιών, που ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις της καλλιέργειας και της κατανάλωσης, αποτελούν τους βασικότερους στόχους της βελτίωσης όλων των καλλιεργούμενων φυτών (Jauhar, 2006). Το βελτιωτικό έργο γίνεται συνεχώς δυσκολότερο, καθώς ο βελτιωτής καλείται να συγκεντρώσει σε μια ποικιλία όλο και περισσότερα επιθυμητά χαρακτηριστικά, που γενετικά συχνά συσχετίζονται αρνητικά μεταξύ τους. Ειδικότερα για την καλλιέργεια της ακτινιδιάς, οι βασικότεροι βελτιωτικοί στόχοι αφορούν κυρίως τα χαρακτηριστικά του καρπού και την αύξηση της παραγωγής, ενώ πιο μακροπρόθεσμα βελτιωτικά προγράμματα εστιάζουν στη δημιουργία ερμαφρόδιτων ποικιλιών αλλά και στην ανάπτυξη καινοτόμων ποιοτικών χαρακτηριστικών του καρπού που θα συμβάλλουν στην υγεία του καταναλωτή.

❖ Βελτίωση των χημικών χαρακτηριστικών του καρπού

Οι καρποί πολλών ειδών του γένους *Actinidia* περιέχουν αξιόλογες χημικές ενώσεις, που βελτιώνουν το άρωμα και τη γεύση του καρπού, όπως εστέρες, τερπένια και αλδεΐδες (Young *et al.*, 1995; Jordan *et al.*, 2002). Καρποί που προέρχονται από επιλογές εντός του είδους *A. arguta* έχει αναφερθεί ότι έχουν γεύση που ομοιάζει με αυτή της ώριμης φράουλας και μπανάνας, ή ακόμα και με τη γεύση των υπερώριμων αχλαδιών (Williams *et al.*, 2003).

Η γεύση στο ακτινίδιο εξαρτάται από την αναλογία των οξέων και των διαλυτών στερεών συστατικών του καρπού, ενώ η αποδοχή του καταναλωτικού κοινού αυξάνει με την αύξηση της περιεκτικότητας του καρπού σε διαλυτά στερεά. Τα γονίδια που ελέγχουν τον μεταβολισμό των σακχάρων έχουν εντοπιστεί, απομονωθεί και χρησιμοποιούνται για βελτιωτικούς σκοπούς (Rossiter *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2004). Το χρώμα της σάρκας στο ακτινίδιο ποικίλλει και μπορεί να είναι ανοιχτό ή σκούρο πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μωβ ή πράσινο/κίτρινο με κοκκινωπή απόχρωση στο κέντρο. Προσπάθειες γίνονται για την απομόνωση γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση καροτενοειδών και ανθοκυανών στο ακτινίδιο (McGhie and Ainge, 2002).

❖ Βελτίωση της διατροφικής αξίας των καρπών

Ο καρπός του ακτινιδίου περιέχει υψηλή συγκέντρωση βιταμίνης C, η οποία έχει αναγνωριστεί ως φυσικό αντιοξειδωτικό και ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού. Τα είδη *A. kolomikta* και *A. latifolia* έχουν αναφερθεί ότι περιέχουν περισσότερα από 1000mg βιταμίνης C ανά 100g ωπού βάρους καρπού (Ferguson, 1990). Επιπλέον, το ακτινίδιο είναι πλούσιο σε φυτικές ίνες που συμβάλλουν στην καλή λειτουργία του πεπτικού συστήματος. Οι καρποί του είδους *A. polygama* περιέχουν ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, ενώ κάποιες από αυτές αξιοποιούνται στη θεραπεία της ρευματικής αρθρίτιδας (Kim *et al.*, 2003). Γενικότερα, ο καρπός του ακτινιδίου διακρίνεται για την υψηλή θρεπτική του αξία, καθώς περιέχει ιχνοστοιχεία (μαγνήσιο, κάλιο, φολικό οξύ) και βιταμίνες (C και E), η αύξηση της συγκέντρωσης των οποίων αποτελεί σημαντικό στόχο των προγραμμάτων βελτίωσης (Ferguson and Ferguson, 2003).

❖ Βελτίωση χαρακτηριστικών με μετασυλλεκτική αξία

Σημαντικό κριτήριο στη βελτίωση του ακτινιδίου αποτελεί η διάρκεια αποθήκευσης και συντήρησης του νωπού προϊόντος. Οι καρποί του είδους *A. deliciosa* μπορούν να αποθηκευτούν έως και 4-6 μήνες από τη συγκομιδή τους. Επιμήκυνση του χρόνου συντηρησιμότητας των καρπών θα αύξανε το οικονομικό κέρδος της καλλιέργειας, καθώς θα αύξανε την περίοδο εμπορίας του προϊόντος. Για το λόγο αυτό μελετούνται οι διαδικασίες ενδογενούς παραγωγής αιθυλενίου και οι παράγοντες ωρίμανσης των καρπών του ακτινιδίου (White *et al.*, 2005).

Επιπλέον, πολλά είδη του γένους *Actinidia* παρουσιάζουν δευτερογενή χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στα πλαίσια δημιουργίας βελτιωμένων ποικιλιών ακτινιδιάς, όπως για παράδειγμα τα είδη *A. arguta* και *A. kolomikta* που χαρακτηρίζονται από υψηλή αντοχή στο κρύο, φυλές του είδους *A. eriantha* που παράγουν καρπούς με αποκολλησίμη φλούδα και το είδος *A. arguta* που παράγει καρπούς πολύ μικρού μεγέθους, που θα μπορούσαν να καταναλώνονται σαν σνακ, με εδώδιμη φλούδα (Williams *et al.*, 2003).

Τέλος, πολύ σημαντικό στόχο στη βελτίωση της ακτινιδιάς αποτελεί η δημιουργία ερμαφρόδιτων ποικιλιών. Η προοπτική αυτή θα μείωνε σημαντικά το κόστος καλλιέργειας, καθώς δεν θα απαιτούνταν πλέον η φύτευση και η συντήρηση αρσενικών πρέμων που λειτουργούν ως επικονιαστές. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί μόνο περιπτώσεις καρποφόρων αρσενικών φυτών, των οποίων όμως η αγρονομική συμπεριφορά χαρακτηρίζεται ως ασταθής (McNeilage, 1991a; McNeilage and Steinhagen, 1998; Testolin *et al.*, 2004).

4.3 Διειδικές διασταυρώσεις

Παρά το γεγονός ότι οι υπάρχουσες ποικιλίες ακτινιδίου είναι σε μεγάλο βαθμό ετερόζυγες, εντούτοις έχουν ιδιαίτερα στενή γενετική βάση, καθώς αποτελούν έμμεσες ή άμεσες επιλογές από τους άγριους τύπους και όχι αποτέλεσμα σχεδιασμένων και ελεγχόμενων διασταυρώσεων μεταξύ γονέων που έχουν επιλεγεί προσεκτικά με βάση τη βελτιωτική τους αξία (Li *et al.*, 2010). Επομένως, υπάρχει μεγάλη δυνατότητα για περαιτέρω βελτίωση των υπάρχουσών ποικιλιών μέσω διασταυρώσεων τους με άγρια είδη του γένους *Actinidia*, με σκοπό τη μεταφορά πολλών επιθυμητών χαρακτηριστικών, ή ακόμα και τη δημιουργία νέων ποικιλιών που θα προκύψουν ως αποτέλεσμα διειδικών διασταυρώσεων. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί αρκετές απόπειρες διασταυρώσεων μεταξύ ειδών του γένους *Actinidia* (Ke *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994, 2000; An *et al.*, 1995). Κάποιες από αυτές είναι ιδιαίτερα επιτυχημένες, επιτρέποντας την παραγωγή χιλιάδων υβριδικών φυτών, όπως για παράδειγμα η διασταύρωση των ειδών *A. chinensis* x *A. eriantha* (Wang *et al.*, 2000). Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου το αποτέλεσμα μιας διειδικής διασταύρωσης αποδίδει πολύ μικρό αριθμό καρπών, με ακόμα μικρότερο ποσοστό βιώσιμων σπόρων. Οι περιπτώσεις αυτές αφορούν κυρίως διασταυρώσεις μεταξύ ειδών διαφορετικού επιπέδου πλοειδίας. Με την τεχνική της εμβρυοδιάσωσης ωστόσο, είναι δυνατό να επιτευχθούν διασταυρώσεις, οι οποίες θα αποτύγχαναν υπό φυσιολογικές συνθήκες (Harvey *et al.*, 1995; Hirsch *et al.*, 2001).

Στην περίπτωση της ακτινιδιάς, μεγάλο ποσοστό των παραγόμενων F₁ διειδικών υβριδίων δεν μπορούν να αξιοποιηθούν εμπορικά άμεσα και απαιτούνται περαιτέρω διασταυρώσεις ή επαναδιασταυρώσεις με κάποιον γονέα. Η γονιμότητα των υβριδίων εξαρτάται από την παραγωγή ισορροπημένων γαμετών και από το καλό ζευγάρωμα των χρωμοσωμάτων τους. Για τη συγκέντρωση των διαφόρων γενετικών χαρακτηριστικών είναι αναγκαίο το καλό ταίριασμα μεταξύ των χρωμοσωμάτων των γονέων. Ο τύπος

ζευγαρώματος των χρωμοσωμάτων μπορεί να ανιχνευθεί με την τεχνική του γενωμικού *in situ* υβριδισμού (GISH). Γνωρίζοντας τον τύπο ζευγαρώματος των χρωμοσωμάτων, ο βελτιωτής μπορεί να αποφασίσει ορθότερα για την πορεία του βελτιωτικού προγράμματος, επιλέγοντας είτε να προχωρήσει στην παραγωγή F₂ υβριδίων, είτε στην επαναδιασταύρωση με κάποιον από τους δύο γονείς (Keith *et al.*, 2001).

4.4 Εφαρμογή *in vitro* τεχνικών βελτίωσης

Τα περισσότερα είδη του γένους *Actinidia* αντιδρούν γενικά θετικά στις διάφορες τεχνικές ιστοκαλλιέργειας για μικροπολλαπλασιασμό, αναγέννηση φυτών, γενετική τροποποίηση και χειρισμό του επιπέδου πλοειδίας, και για το λόγο αυτό συμπεριλαμβάνονται πολλές φορές στα διάφορα βελτιωτικά προγράμματα.

4.4.1 Μικροπολλαπλασιασμός

Η ακτινιδιά πολλαπλασιάζεται εύκολα με σπόρο, όμως τα φυτά που προκύπτουν χαρακτηρίζονται από υψηλή παραλλακτικότητα. Για τον πολλαπλασιασμό των εμπορικών ποικιλιών χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο ο αγενής πολλαπλασιασμός και συγκεκριμένα τα μοσχεύματα μαλακού ή σκληρού ξύλου. Ο πολλαπλασιασμός *in vitro* αποτελεί μια αξιόπιστη και εύκολη τεχνική, ικανή να παράγει γρήγορα μεγάλες ποσότητες φυτών, όπου κρίνεται αναγκαίο. Επιπλέον, παρατηρείται ελάχιστη ή μηδενική παραλλακτικότητα όταν καλλιεργούνται ακραία μεριστώματα βλαστών ή έκφυτα με μασχαλαίους οφθαλμούς, καθώς και στους βλαστούς που διαφοροποιούνται και ριζοβολούν για να δώσουν νέα φυτά (Xiao, 1999; Xu *et al.*, 2003).

Στο γένος *Actinidia* έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί διαφορετικοί τύποι ιστού για την αναγέννηση φυτών από κάλλο, ανάλογα με το είδος (Sharma and Shirkot, 2004; Oliveira and Fraser, 2005). Αναγέννηση φυτών έχει προκληθεί επίσης από καλλιέργεια και διαφοροποίηση πρωτοπλαστών (Xiao, 1999; Gan *et al.*, 2003).

Ωστόσο η αναγέννηση φυτών από κάλλο εμπεριέχει πάντα τον κίνδυνο εμφάνισης σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας (Palombi and Damiano, 2002; Prado *et al.*, 2007), φαινόμενο πολύ συνηθισμένο σε φυτά ακτινιδιάς, προερχόμενα από καλλιέργεια πρωτοπλαστών, η οποία πολλές φορές συνοδεύεται και από παραλλακτικότητα ως προς τον χρωμοσωμικό αριθμό (He *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2003).

4.4.2 Σωματικός Υβριδισμός

Καθώς η διοικία και η πολυπλοειδία του γένους *Actinidia* περιορίζουν σημαντικά τις δυνατότητες βελτίωσης, ο σωματικός υβριδισμός προσφέρει έναν εναλλακτικό τρόπο για τον συνδυασμό διαφορετικών γενοτύπων, ακόμα και γενοτύπων του ίδιου φύλου, καθώς επίσης και έναν τρόπο να ξεπεραστεί η ασυμβατότητα πολλών διειδικών διασταυρώσεων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέου γενετικού υλικού, που θα συνδυάζει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά δύο ειδών. Ο σωματικός υβριδισμός επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της σύντηξης πρωτοπλαστών. Μέθοδοι απομόνωσης πρωτοπλαστών από κάλλο, καλλιέργειες εναιωρημάτων, κοτυληδόνες και το μεσόφυλλο, έχουν αναπτυχθεί για πολλά είδη του γένους *Actinidia* (Oliveira and Pais, 1991; 1992; Zhang *et al.*, 1995; Xiao and Hirsch, 1996; 1997). Αναφορές για επιτυχημένη σωματική σύντηξη πρωτοπλαστών και αναγέννηση, υπάρχουν για τα είδη *A. chinensis* x *A. deliciosa*, και *A. chinensis* x *A. kolomikta* (Xiao and Han, 1997; Xiao *et al.*, 2004). Από καταμετρήσεις του αριθμού χρωμοσωμάτων, μετρήσεις του επιπέδου πλοειδίας και αναλύσεις του γενετικού υλικού, επιβεβαιώθηκε πως τουλάχιστον ένα από τα φυτά που αναπτύχθηκαν ήταν σωματικό υβρίδιο των ειδών *A. chinensis* και *A. kolomikta*, και παρουσίαζε την ίδια αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες με αυτή του είδους *A. kolomikta* (Xiao *et al.*, 2004).

4.4.3 Γενετική Τροποποίηση

Η πρώτη αναφορά για γενετική τροποποίηση στην ακτινιδιά έγινε το 1991, από τους Rugini *et al.*, οι οποίοι κατάφεραν να δημιουργήσουν και να αναγεννήσουν διαγονιδιακά φυτά του είδους *A. deliciosa*. Τα εν λόγω φυτά έφεραν στο γένωμα τους *rol* γονίδια του βακτηρίου *A. rhizogenes*, με σκοπό την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο μύκητα *Botrytis cinerea*. Έκτοτε, έχουν αναφερθεί απόπειρες γενετικής τροποποίησης με τη μέθοδο του ριζοβακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* για τα είδη *A. chinensis*, *A. kolomikta*, *A. eriantha* και *A. arguta*, ενώ ειδικά για τα είδη *A. deliciosa* και *A. eriantha* υπάρχουν αναφορές διαγονιδιακών φυτών που αναπτύχθηκαν μέχρι το στάδιο της καρποφορίας. Στους απογόνους των φυτών αυτών διαπιστώθηκε η κληρονόμηση των διαγονιδίων (Rugini *et al.*, 1997; Fung *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2006). Μοριακές αναλύσεις των γενετικά τροποποιημένων φυτών του είδους *A. eriantha*, έδειξαν ότι τα μεταφερόμενα γονίδια είχαν ενσωματωθεί στο γένωμα και εκφράζονταν σε ιστούς φύλλων, βλαστών, ριζών, ανθέων και καρπών (Wang *et al.*, 2006).

Συγκριτικά με άλλα οπωροφόρα είδη, η ακτινιδιά ανταποκρίνεται καλύτερα στη γενετική τροποποίηση, παρουσιάζοντας υψηλά ποσοστά επιτυχίας, που κυμαίνονται από 5% έως 30%, ανάλογα με το είδος (Wang *et al.*, 2007). Μέχρι σήμερα ωστόσο, η εφαρμογή της γενετικής τροποποίησης στην ακτινιδιά περιορίζεται αποκλειστικά για ερευνητικούς και πειραματικούς σκοπούς, χωρίς να συμπεριλαμβάνεται σε προγράμματα βελτίωσης, καθώς η αγορά παρουσιάζεται ακόμα απρόθυμη να δεχτεί καρπούς από διαγονιδιακές ποικιλίες ακτινιδίου.

4.5 Μοριακοί δείκτες και χαρτογράφηση

Ανεξάρτητα με τους στόχους που θέτει κάθε βελτιωτικό πρόγραμμα, απαραίτητη κρίνεται η χαρτογράφηση του γενώματος της ακτινιδιάς. Η ολοκλήρωση του γενετικού χάρτη θα παρείχε χρήσιμες πληροφορίες για πληθώρα γενετικών και φαινοτυπικών γνωρισμάτων και θα διευκόλυνε τον εντοπισμών δεικτών που συνδέονται στενά με τα γονίδια που ελέγχουν τα γνωρίσματα αυτά. Η δυναμική των μοριακών δεικτών ενισχύεται από το γεγονός ότι υπάρχει δυνατότητα μεταφοράς τους σε πολλά είδη του γένους *Actinidia* (Tsang *et al.*, 2007).

Οι μοριακοί δείκτες τύπου SSR (Simple Sequence Repeats) ή μικροδορυφόροι, αναδεικνύονται ιδιαίτερα αποτελεσματικοί για τη δημιουργία μοριακού αποτυπώματος καθώς είναι έντονα πολυμορφικοί και μοναδικοί για κάθε γένος. Χαρακτηρίζονται από υψηλή επαναληψιμότητα τόσο στο χώρο όσο και στον χρόνο, γεγονός που τους καθιστά ιδιαίτερα αξιόπιστους. Στο ακτινίδιο χρησιμοποιούνται ευρέως για τον χαρακτηρισμό και την ταξινόμηση των ειδών, καθώς και στη δημιουργία γενετικών χαρτών. Οι Weising *et al.*, (1996) κατάφεραν να απομονώσουν μικροδορυφόρους από γενωμική βιβλιοθήκη του είδους *A.chinensis* και στη συνέχεια να σχεδιάσουν 18 ζεύγη εκκινητών, τους οποίους εφάρμοσαν σε 10 διαφορετικά είδη του γένους *Actinidia*. Οι εκκινητές στην πλειοψηφία τους κατάφεραν να ενισχύσουν ζώνες σε όλα τα είδη, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι τα είδη *A.chinensis* και *A.deliciosa* παρουσίασαν πολύ υψηλό βαθμό πολυμορφισμού. Τα ζεύγη εκκινητών με τον υψηλότερο δείκτη πολυμορφισμού (PIC) χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία στην ταυτοποίηση ποικιλιών του είδους *A.deliciosa*. Σε ανάλογη εργασία τους, οι Huang *et al.*, (1998) απομόνωσαν και αλληλούχισαν 263 μικροδορυφορικούς τόπους από γενωμική βιβλιοθήκη του είδους *A.chinensis*. Ακολούθως σχεδιάστηκαν 40 ζεύγη εκκινητών οι οποίοι εφαρμόστηκαν σε διπλοειδείς και τετραπλοειδείς φυλές του είδους *A.chinensis*. Ο υψηλός βαθμός πολυμορφισμού, που παρατηρήθηκε για το σύνολο των δεικτών, τους καθιστά χρήσιμα εργαλεία τόσο για σκοπούς

χαρτογράφησης, όσο και για την ταυτοποίηση ποικιλιών των δύο κύρια καλλιεργούμενων ειδών *A.chinensis* και *A.deliciosa*. Τα περισσότερα ζεύγη εκκινητών έδωσαν μεμονωμένα προϊόντα ενίσχυσης. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι κάποιοι εκκινητές (περίπου 20%) παρήγαγαν προφίλ ζωνών που συνάδουν με την ενίσχυση δύο διαφορετικών γονιδιακών τόπων. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει την άποψη ότι τα διπλοειδή είδη του γένους *Actinidia* ($2n=2x = 58$) είναι τελικώς πολυπλοειδή στην καταγωγή, με βασικό χρωμοσωμικό αριθμό $x = 14/15$, ως αποτέλεσμα διπλασιασμού που θα πρέπει να έλαβε χώρα κατά τη διάρκεια εξέλιξης του γένους. Οι Fraser *et al.*, (2001) εφάρμοσαν σε τρία διαφορετικά είδη του γένους *Actinidia*, που αντιπροσώπευαν 3 διαφορετικά επίπεδα πλοειδίας, ένα σετ 9 μικροδορυφόρων, οι οποίοι είχαν προκύψει από γενωμική βιβλιοθήκη του εξαπλοειδούς είδους *A.deliciosa* και της εμπορικής ποικιλίας «Hayward» ειδικότερα. Όλοι οι δείκτες υπήρξαν έντονα πολυμορφικοί για το συγκεκριμένο είδος. Από το σύνολο των 9 δεικτών που εξετάστηκαν, οι 8 διατήρησαν την πολυμορφικότητα τους στις οικογένειες του διπλοειδούς είδους *A.chinensis*, ενώ στο πιο απομακρυσμένο γενετικά τετραπλοειδές είδος *A.arguta*, μόνο οι 4 από τους 9 δείκτες ήταν πολυμορφικοί. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι εν λόγω δείκτες προέρχονται από μη κωδικοποιημένες περιοχές του γενώματος και για το λόγο αυτό αναμένεται μεγαλύτερη δυνατότητα μεταβίβασης σε δείκτες που θα προκύψουν από περιοχές εκφραζόμενων αλληλουχιών (EST's).

Τα δύο κυρίως καλλιεργούμενα είδη *A.chinensis* και *A.deliciosa* συνδέονται στενά μεταξύ τους και πολλά εργαλεία βελτίωσης, όπως οι μοριακοί δείκτες, βρίσκουν εφαρμογή και στα δύο είδη, βασιζόμενα στην κοινή καταγωγή τους. Ωστόσο, το γένος *Actinidia* περιλαμβάνει πολυάριθμα είδη, με αγρονομικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά ποιότητας καρπού που ενδιαφέρουν τους βελτιωτές. Για την ενίσχυση των βελτιωτικών και ερευνητικών προγραμμάτων, που αφορούν τα είδη του γένους *Actinidia*, έχει δημιουργηθεί μια πληθώρα EST βιβλιοθηκών. Τα EST's προέρχονται από εύρος φυτικών ιστών (σωματικοί και

αναπαραγωγικοί), σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Η καταγραφή σε βάσεις δεδομένων ολοένα και περισσότερων EST's που σχετίζονται με σημαντικά καλλιεργούμενα είδη, σημειώνει συνεχή πρόοδο τα τελευταία χρόνια. Κατά συνέπεια, η δημιουργία μικροδορυφόρων από EST's αποτελεί μια δυναμική προοπτική στις μελέτες και τις εφαρμογές της γενετικής. Οι μικροδορυφόροι απαιτείται να είναι στην περίπτωση αυτή μεταφερτοί ανάμεσα στα είδη του ίδιου γένους και έντονα πολυμορφικοί (Atkinson and MacRae, 2007).

Ομάδα ερευνητών του Ινστιτούτου “HortSearch” της Νέας Ζηλανδίας, δημιούργησε βάση δεδομένων με περισσότερους από 130.000 δείκτες εκφραζόμενων αλληλουχιών EST's (Expressed Sequence Tags) για την εκμετάλλευση του γενετικού δυναμικού της ακτινιδιάς. Οι εν λόγω δείκτες προήλθαν από 35 γενωμικές βιβλιοθήκες και κάλυπταν ένα εύρος ιστών και διαφορετικών ειδών του γένους *Actinidia* (πίν.2). Οι γενετικές βιβλιοθήκες κατασκευάστηκαν για να διερευνηθεί η δυνατότητα εντοπισμού γονιδίων στα διάφορα είδη του γένους *Actinidia*. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε εκτενής δειγματοληψία ανάμεσα στα διάφορα είδη. Οι περιοχές – στόχοι περιελάμβαναν δευτερεύοντες μεταβολίτες, με ιδιαίτερο σκοπό την ανακάλυψη μηχανισμών που σχετίζονταν με το άρωμα και τη γεύση του καρπού, καθώς και βιοχημικών μονοπατιών που αφορούν σε μεταβολίτες που σχετίζονται με την ανθρώπινη υγεία, βιταμίνη C, σύνθεση και την αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών και το λήθαργο των οφθαλμών. Οι βιβλιοθήκες επίσης κατασκευάστηκαν από εύρος διαφορετικών ιστών για την απόκτηση γονιδίων που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση μικροσυστοιχείων (microarray analysis). Αυτές οι βιβλιοθήκες κατασκευάστηκαν αρχικά από διπλοειδείς γενοτύπους του είδους *A.chinensis* για να μειωθεί ο αντίκτυπος της πολυπλοειδίας. Στο είδος *A.deliciosa* οι κυρίαρχοι στόχοι ήταν γονίδια που ευθύνονταν για το σπάσιμο του λήθαργου των οφθαλμών και τη ρύθμιση της άνθισης (Crowhurst *et al.*, 2008).

Πίνακας 2. Συνολικός αριθμός EST's που έχουν εντοπιστεί ανά φυτικό ιστό και ανά είδος του γένους *Actinidia*.

Αριθμός EST's ανά τύπο ιστού		Αριθμός EST's ανά είδος	
Καλλιέργεια κυττάρων	4.759	<i>A. arguta</i>	7.370
Καρπός	38.992	<i>A. chinensis</i>	47.568
Φύλλο	17.886	<i>A. deliciosa</i>	59.163
Πέταλα	16.019	<i>A. eriantha</i>	13.030
Ρίζα	4.808	<i>A. polygama, A. setosa, A. indocinensis</i>	7.185
Οφθαλμοί	50.841		
Βλαστός	1.031		

(Πηγή: Atkinson & McRae, 2007)

Με σκοπό την αύξηση της ταχύτητας και τη μείωση του κόστους της κατασκευής γενετικού χάρτη για τα είδη του γένους *Actinidia*, οι Fraser *et al.*, (2004) επέλεξαν ένα εύρος μικροδορυφόρων, οι οποίοι προέρχονταν από EST (στόχοι εκφραζόμενης αλληλουχίας), με σκοπό την αξιολόγηση της συχνότητας εμφάνισης τους στο γένωμα και του βαθμού πολυμορφισμού τους. Οι μικροδορυφόροι που επιλέχθηκαν ήταν τέλειες δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις, διαφορετικού μήκους, με την πλειοψηφία αυτών να είναι επαναλήψεις του μοτίβου (CT)_n/(GA)_n. Συνολικά επιλέχθηκαν 150 μικροδορυφόροι ως πιθανοί δείκτες, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τη χαρτογράφηση πληθυσμού που προέκυψε ύστερα από ενδοειδική διασταύρωση του διπλοειδούς είδους *A. chinensis*. Οι γονείς επιλέχθηκαν με βάση τη διαφορετικότητα τους σε κύρια αγρονομικά χαρακτηριστικά και τη γεωγραφική τους απομάκρυνση. Οι δείκτες αποδείχτηκαν έντονα πολυμορφικοί σε ποσοστό 93.5%, ενώ το 22.6% ενίσχυσαν περιοχές σε παραπάνω από ένα γονιδιακό τόπο. Τα αποτελέσματα της έρευνας αποδεικνύουν ότι οι μικροδορυφόροι που προέρχονται από EST δύναται να προσδώσουν ένα μεγάλο αριθμό δεικτών σε σύντομο χρονικό διάστημα και με λογικό κόστος. Η αφθονία των μικροδορυφόρων στις μεταγραφόμενες περιοχές

του γενώματος, καθώς και ο υψηλός βαθμός πολυμορφισμού που τους χαρακτηρίζει, καθιστούν τις EST βιβλιοθήκες μια αξιόλογη πηγή τροφοδοσίας μοριακών δεικτών κατάλληλων για τη χαρτογράφηση γένους *Actinidia*.

Προχωρώντας ένα βήμα παραπάνω, οι Fraser *et al.*, (2005) επέλεξαν 20 μικροδορυφορικούς δείκτες, που προέκυψαν από EST και βρέθηκαν να είναι πλήρως πληροφοριακοί στη χαρτογράφηση ενδοειδικού πληθυσμού του είδους *A.chinensis* (Fraser *et al.*, 2004), και τους εφάρμοσαν σε 120 επιλεγμένους γενοτύπους, οι οποίοι ανήκαν σε 21 διαφορετικά είδη και αντιπροσώπευαν όλα τα επίπεδα πλοειδίας του γένους *Actinidia*, από το διπλοειδές έως το οκταπλοειδές επίπεδο. Με τον τρόπο αυτό θέλησαν να ελέγξουν τη δυνατότητα μεταβίβασης των δεικτών ανάμεσα σε διαφορετικά είδη, καθώς και τη διατήρηση της πολυμορφικότητάς τους. Όλοι οι δείκτες κατάφεραν να παράγουν προϊόντα ενίσχυσης στους υπό εξέταση γενοτύπους. Ο πιο επιτυχημένος δείκτης κατάφερε να ενισχύσει περιοχές σε όλα τα είδη, ενώ ο λιγότερο επιτυχημένος ενίσχυσε τμήματα μόνο στα είδη *A.chinensis* και *A.deliciosa*. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δείκτες παρέμειναν ιδιαίτερα πολυμορφικοί. Ο αυξημένος πολυμορφισμός ωστόσο, θα μπορούσε να θεωρηθεί αναμενόμενος, δεδομένης της μεγάλης φαινοτυπικής παραλλακτικότητας μεταξύ των ειδών, τη σχετικά πρόσφατη εξημέρωση τους και τη μειωμένη διεξαγωγή βελτιωτικών προγραμμάτων. Αναμφισβήτητα όμως, ο υψηλός βαθμός μεταβίβασης των EST μικροδορυφόρων από τα είδη *A.chinensis* και *A.deliciosa* στα υπόλοιπα 19 είδη που εξετάστηκαν, καθώς και τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού που σημείωσαν, τους καθιστά αξιόλογους δείκτες για περαιτέρω αξιοποίηση τους σε βελτιωτικά προγράμματα.

4.6 Κατασκευή γενετικών χαρτών

Καθώς η καλλιέργεια του ακτινιδίου αποτελεί μια σχετικά νέα καλλιέργεια, η γνώση γύρω από τη γενετική του σύσταση είναι ακόμα περιορισμένη. Η ανάπτυξη ενός περιεκτικού γενετικού χάρτη και η χρήση μοριακών δεικτών θα μπορούσαν να βοηθήσουν στον εντοπισμό και στην απομόνωση γονιδίων, συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση στην αποτελεσματικότητα των βελτιωτικών προγραμμάτων για την παραγωγή νέων ποικιλιών.

Ωστόσο, η κατασκευή ενός γενετικού χάρτη σε ένα υποχρεωτικά δίοικο είδος, όπως είναι το *A. chinensis*, είναι σαφέστατα πιο περίπλοκη διαδικασία, σε σχέση με τη χαρτογράφηση ενός πληθυσμού με ομόζυγους γονείς. Στην περίπτωση αυτή, τον πληθυσμό χαρτογράφησης αποτελεί μια F₁ γενιά απογόνων, αποτέλεσμα διασταύρωσης δύο μη συσχετιζόμενων και υψηλά ετερόζυγων ατόμων. Η περιπλοκότητα της κατασκευής έγκειται στο γεγονός ότι δύναται να υπάρχει διάσπαση έως και 4 αλληλομόρφων σε κάθε γονιδιακό τόπο, με τον έναν ή και τους δύο γονείς ετερόζυγους σε κάθε γονιδιακή θέση. Η φάση σύνδεσης των μοριακών δεικτών είναι συχνά άγνωστη και μπορεί να διαφέρει για τους δύο γονείς, προσδίδοντας με αυτό τον τρόπο ανακρίβεια στις εκτιμήσεις των συχνοτήτων ανασυνδυασμού. Ωστόσο, οι εν λόγω συχνότητες μπορούν να εκτιμηθούν ξεχωριστά για τον κάθε γονέα, με την ανάπτυξη δύο χαρτών σε αυτή την περίπτωση, οι οποίοι στη συνέχεια δύναται να ενσωματωθούν με τη βοήθεια μοριακών δεικτών, ετερόζυγων στους δύο γονείς (Ferguson, 2007). Η κατασκευή ενιαίου γενετικού χάρτη από τη διασταύρωση ενός ετερομεικτικού είδους, έναντι της κατασκευής ξεχωριστού χάρτη για τον κάθε γονέα, εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα μοριακών δεικτών, ετερόζυγων για τους δύο γονείς. Οι δείκτες αυτοί σχηματίζουν αλληλικές γέφυρες. Κυρίαρχοι δείκτες, όπως οι RAPD ή οι AFLP, χρησιμοποιούνται περιορισμένα για το συνδυασμό γονικών χαρτών. Στην περίπτωση που απαιτείται η ενσωμάτωση των ομόλογων ομάδων σύνδεσης των γονέων του υπό χαρτογράφηση πληθυσμού, επιλέγονται συγκυρίαρχοι δέκτες, όπως οι μικροδορυφόροι και οι RLFP.

Ακολουθώντας τη μέθοδο αυτή, οι Testolin *et al.*, (2001) κατασκεύασαν με τη βοήθεια μικροδορυφόρων και μοριακών δεικτών τύπου RLFP, ένα γενετικό χάρτη σύνδεσης στο ακτινίδιο. Χρησιμοποιώντας τους απογόνους που προήλθαν από τη διασταύρωση των ειδών *A.chinensis* και *A.callosa* ανέπτυξαν δύο χάρτες χαμηλής πυκνότητας, έναν για κάθε γονέα. Ο χάρτης του θηλυκού γονέα αποτελούνταν από 203 γονιδιακούς τόπους, οι οποίοι κατανέμονταν σε 38 ομάδες σύνδεσης. Είχε μήκος 1.758,5cM και κάλυπτε το 46% του εκτιμωμένου μήκους γενώματος. Αντίστοιχα, ο χάρτης του αρσενικού γονέα αποτελούνταν από 143 γονιδιακούς τόπους, οι οποίοι κατανέμονταν σε πάνω από 30 ομάδες σύνδεσης. Είχε μήκος 1.104,1cM και κάλυπτε το 34% του εκτιμωμένου μήκους γενώματος.

Οι Fraser *et al.*, (2009) κατασκεύασαν δύο περιεκτικούς χάρτες σύνδεσης για τους γονείς ενδοειδικής διασταύρωσης του είδους *A.chinensis*, τους οποίους στη συνέχεια ενσωμάτωσαν με τη βοήθεια συγκυρίαρχων δεικτών. Προσδιορίστηκαν 29 ομάδες σύνδεσης, ενώ κατάφεραν να εντοπίσουν τη θέση γονιδιακών τόπων που σχετίζονται με τον καθορισμό του φύλου. Ειδικότερα, κατέστη δυνατό να προσδιοριστούν σε μια ομάδα σύνδεσης του αρσενικού χάρτη, σε μια υποτελομερική περιοχή, ο μοριακός δείκτης SmY, που συνδέεται με το αρσενικό φύλο, και ο φαινοτυπικός δείκτης «φύλο άνθους». Η απουσία ανασυνδυασμού στην περιοχή αυτή, χαρακτηριστικό γνώρισμα των περιοχών που σχετίζονται με τον καθορισμό του φύλου, δεν επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό των γονιδίων που εμπλέκονται στον μηχανισμό αυτό. Ωστόσο είναι η πρώτη αναφορά εντοπισμού αρχικών X και Y χρωμοσωμάτων στο γένος *Actinidia*. Ο ακριβής αριθμός των γονιδίων που ελέγχουν τον καθορισμό του φύλου στο γένος *Actinidia* δεν είναι μέχρι σήμερα γνωστός. Ωστόσο οι Fraser *et al.*, (2009) εικάζουν ότι θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 2 γονίδια υπεύθυνα για την ανάπτυξη της διοικίας στο ακτινίδιο. Σύμφωνα με ένα πιθανό μοντέλο που έχει προταθεί (McNeillage, 1991a; Harvey *et al.*, 1997) υπάρχει ένα κυρίαρχο αλληλόμορφο, που καταπιέζει την ανάπτυξη στύλου, στενά συνδεδεμένο με

κυρίαρχο αλληλόμορφο που ευνοεί την ανάπτυξη γύρης στο χρωμόσωμα Υ, ενώ στην αντίστοιχη διαφοροποιημένη περιοχή του χρωμοσώματος Χ υπάρχουν δύο υποτελή αλληλόμορφα, το ένα εκ των οποίων επιτρέπει την ανάπτυξη στύλου και το άλλο οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των μικροσπορίων.

Σκοπός και πειραματικοί στόχοι

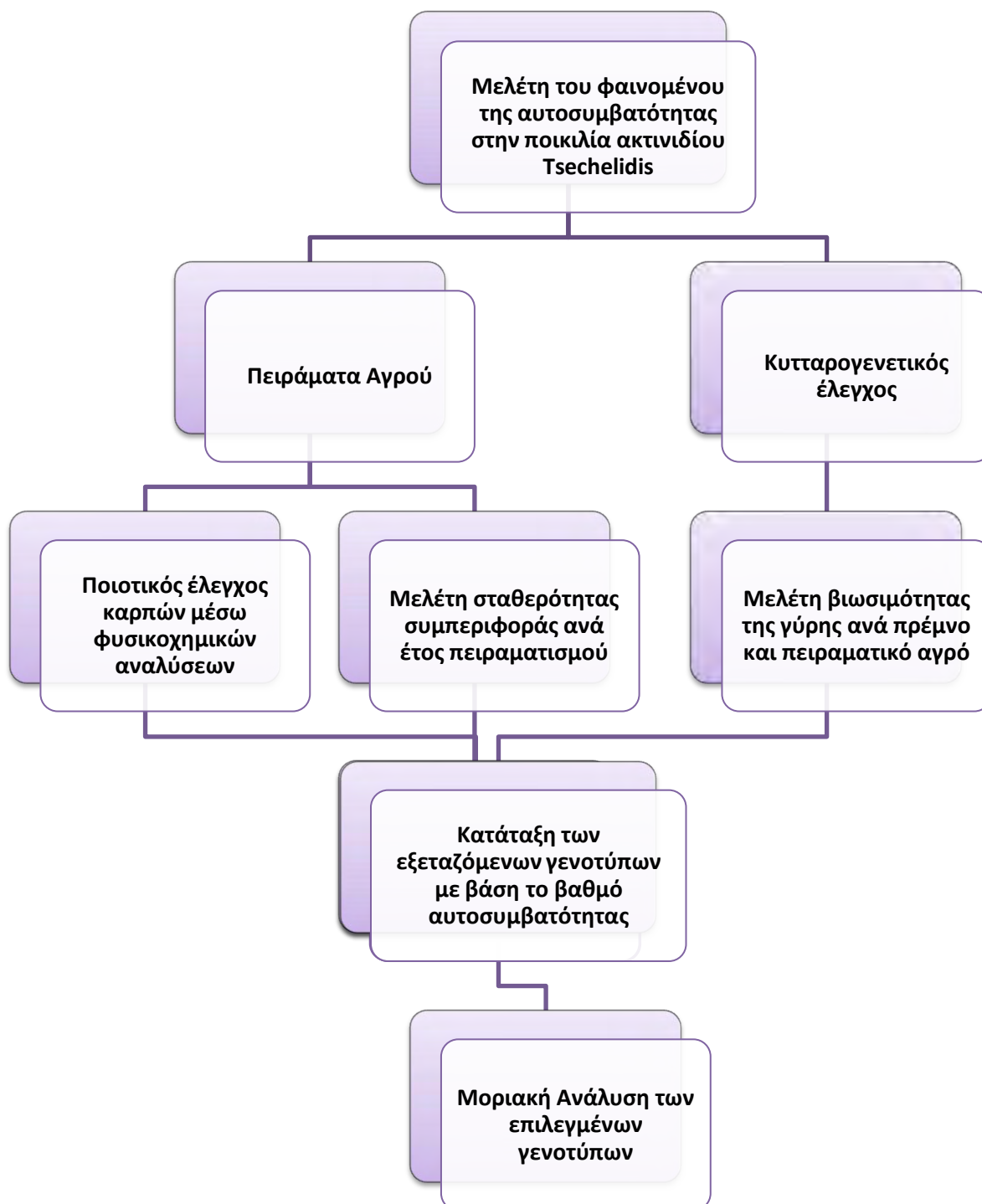
ΣΚΟΠΟΣ & ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Ως σκοπός της παρούσας διδακτορικής έρευνας ορίστηκε η μελέτη του φαινομένου της αυτοσυμβατότητας στην ποικιλία ακτινιδίου «Tsechelidis», καθώς και η μελέτη της σύνδεσης του φαινομένου αυτού με το μηχανισμό της έκφρασης του φύλου στην ακτινιδιά.

Αρχικό στόχο του πειραματικού σχεδιασμού αποτέλεσε η διερεύνηση της έκφρασης του φαινομένου της αυτοσυμβατότητας στην εν λόγω ποικιλία, μέσω πειραμάτων στον αγρό, που θα επιβεβαίωναν την ύπαρξη ή την απουσία του φαινομένου. Στην περίπτωση που τα δεδομένα θα επαλήθευαν την αρχική υπόθεση, επόμενο στόχο θα αποτελούσε η μελέτη της σταθερότητας του φαινομένου (βαθμός έκφρασης, παραλλακτικότητα μεταξύ πρέμων, μεταξύ ετών, μεταξύ αγρών διαφορετικής ηλικίας, κτλ.) στην ποικιλία «Tsechelidis». Παράλληλα, σημαντικό στόχο αποτέλεσε και η διατήρηση της υψηλής ποιότητας των καρπών της συγκεκριμένης ποικιλίας, και για το λόγο αυτό στο σχεδιασμό του πειράματος συμπεριλήφθηκε ποιοτικός έλεγχος των καρπών αυτογονιμοποίησης, μέσω φυσικοχημικών αναλύσεων.

Με βάση τα αποτελέσματα που θα πρόεκυπταν από τα πειραματικά δεδομένα του αγρού, τις φυσικοχημικές αναλύσεις και τους κυττολογικούς ελέγχους επί σειρά ετών, τελικό στόχο της παρούσας έρευνας αποτέλεσε ο εντοπισμός γενοτύπων της ποικιλίας «Tsechelidis» που θα χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό αυτογονιμότητας και σταθερότητα συμπεριφοράς στην πορεία των ετών. Η πρακτική αξία του εντοπισμού τέτοιων γενοτύπων έγκειται στον κλωνικό αναπολλαπλασιασμό αυτών, για τη δημιουργία ενός πληθυσμού ακτινιδίου, με υψηλή αυτογονιμότητα, που θα απαιτεί μηδενικό ή σημαντικά μικρότερο ποσοστό επικονιαστών κατά την καλλιέργεια στο χωράφι. Παράλληλα, με την κατάταξη των εξεταζόμενων γενοτύπων σε κλάσεις, ανάλογα με το βαθμό της αυτοσυμβατότητας που εκφράζουν, επόμενο στόχο αποτέλεσε η μοριακή ανάλυση των δύο ακραίων κλάσεων (χαμηλή – υψηλή έκφραση του φαινομένου) για τον εντοπισμό τυχόν διαφορών σε γενετικό επίπεδο και μελέτη της σύνδεσης

αυτών με μηχανισμούς που συνδέονται με τον καθορισμό του φύλου στο ακτινίδιο. Η πλήρης κατανόηση αυτού του μηχανισμού, θα συντελούσε στη δημιουργία ερμαφρόδιτων ποικιλιών, γεγονός που αποτελεί και πρωταρχικό στόχο στη βελτίωση της ακτινιδιάς παγκοσμίως. Διαγραμματικά ο πειραματικός σχεδιασμός δίδεται παρακάτω:



ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ:

Υλικά & Μέθοδοι

1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΓΡΟΥ

1.1 Επιλογή φυτικού υλικού

Με βάση το σχεδιασμό του πειράματος, επιλέχθηκαν και οργανώθηκαν στην περιοχή της Επισκοπής Ημαθίας τρεις οπωρώνες ακτινιδίου, κατά την καλλιεργητική περίοδο 2008-2009. Οι οπωρώνες αυτοί αποτέλεσαν σταθερά τους τρεις πειραματικούς αγρούς, συνολικά για όλα τα χρόνια διεξαγωγής της παρούσας ερευνητικής μελέτης. Η επιλογή των πειραματικών αγρών σχεδιάστηκε προσεκτικά ώστε να καλύπτει τις ανάγκες της έρευνας και να εξασφαλίζει τη μέγιστη δυνατή γενετική παραλλακτικότητα, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τις επιδράσεις του περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, οι οπωρώνες διέφεραν ως προς α) την ηλικία των πρέμνων και β) τη σύσταση των εγκατεστημένων ποικιλιών μέσα σε αυτούς, αλλά βρίσκονταν στην ίδια τοποθεσία (κοινές συνθήκες μικροκλίματος) και δέχονταν ακριβώς τις ίδιες καλλιεργητικές φροντίδες καθ' όλη τη διάρκεια του έτους.

Ειδικότερα, η σύσταση των τριών πειραματικών αγρών αναλύεται ως εξής:

- α) ο **Αγρός I** περιείχε πρέμνα των ποικιλιών «Tsechelidis», «Hayward» και της ποικιλίας επικονιαστή «Matua». Τα πρέμνα ήταν ηλικίας 12 ετών.
- β) ο **Αγρός II** περιείχε μόνο πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis» και της επικονιάστριας ποικιλίας «Matua». Τα πρέμνα ήταν ηλικίας 5 ετών.
- γ) ο **Αγρός III** περιείχε μόνο πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis», ηλικίας 3 ετών, απουσία επικονιαστή.

Σε κάθε πειραματικό αγρό επιλέχθηκε ορισμένος αριθμός πρέμνων ανά ποικιλία, ο οποίος αποτέλεσε το φυτικό υλικό της παρούσας έρευνας. Συγκεκριμένα, στον αγρό I επιλέχθηκαν 10 πρέμνα για κάθε μια από τις τρεις ποικιλίες, στον αγρό II επιλέχθηκαν 15 πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis» και 10 της ποικιλίας «Matua», ενώ στον αγρό III επιλέχθηκαν άλλα 15 πρέμνα «Tsechelidis». Η επιλογή των πρέμνων ήταν τυχαία, στοχεύοντας στην εξασφάλιση της μέγιστης δυνατής παραλλακτικότητας. Οι ποικιλίες «Hayward»

και «Matua» αποτέλεσαν ουσιαστικά τους μάρτυρες σύγκρισης, σύμφωνα με το σχεδιασμό του πειράματος. Όλα τα επιλεγμένα πρέμνα επισημάνθηκαν με ειδικές ταμπέλες και καταγράφηκε η ακριβής θέση τους στο χωράφι (γραμμή και θέση πάνω στη γραμμή), ώστε να διασφαλιστεί η σταθερότητα του φυτικού υλικού από χρονιά σε χρονιά.

1.2 Διεξαγωγή αυτογονιμοποιήσεων

Στα επιλεγμένα πρέμνα των ποικιλιών «Tsechelidis» και «Hayward» πραγματοποιήθηκαν ελεγχόμενες αυτογονιμοποιήσεις ανθέων για τρεις συνεχόμενες καλλιεργητικές περιόδους (2008-2010). Κατά τις δύο πρώτες χρονιές, πραγματοποιήθηκαν 10 αυτογονιμοποιήσεις ανθέων ανά επιλεγμένο πρέμνο και για κάθε ένα από τους τρεις πειραματικούς αγρούς. Συγκεκριμένα, στον αγρό I αυτογονιμοποιήθηκαν 100 άνθη της ποικιλίας «Tsechelidis» και 100 άνθη της ποικιλίας «Hayward», ενώ στους αγρούς II και III αυτογονιμοποιήθηκαν από 150 άνθη της ποικιλίας «Tsechelidis» σε κάθε αγρό. Την τελευταία χρονιά ο αριθμός των αυτογονιμοποιημένων ανθέων αυξήθηκε στα 25 άνθη ανά πρέμνο, αγγίζοντας τις 1250 αυτογονιμοποιήσεις για το σύνολο των επιλεγμένων πρέμνων και στους τρεις αγρούς.

Τα άνθη καλύπτονταν με χάρτινες σακούλες, πριν από την έναρξη της ανθοφορίας, και επισημαίνονταν με ειδικό καρτελάκι που έφερε την ημερομηνία διεξαγωγής της αυτογονιμοποίησης. Οι σακούλες σφραγίζονταν ερμητικά προς αποφυγή εισόδου εντόμων και ξένης γύρης (Εικ.1). Μετά το πέρας της ανθοφορίας και σε διάστημα περίπου ενός μηνός, οι χάρτινες σακούλες αφαιρούνταν και καταγράφονταν



Εικ.1 Αυτογονιμοποιήσεις ανθέων στον αγρό

το ποσοστό καρπόδεσης ανά πρέμνο. Καταγραφή του ποσοστού καρπόδεσης σε μηνιαία βάση, πραγματοποιούνταν μέχρι τη συγκομιδή των καρπών. Την περίοδο της συγκομιδής, όσοι καρποί προέρχονταν από αυτογονιμοποίηση συγκομίζονταν ξεχωριστά και σημειώνονταν ο κωδικός του πρέμνου για κάθε καρπό. Επιπλέον, συγκομίζονταν και 5 καρποί ανοιχτής επικονίασης από κάθε επιλεγμένο πρέμνο, οι οποίοι χρησιμοποιούνταν ως μάρτυρες για τις φυσικοχημικές αναλύσεις των καρπών. Στα πρέμνα που το ποσοστό καρπόδεσης των αυτογονιμοποιήσεων ήταν μηδενικό, δεν λαμβάνονταν δείγματα καρπών ανοιχτής επικονίασης καθώς δεν θα υπήρχε βάση σύγκρισης. Όλοι οι συγκομισμένοι καρποί μεταφέρονταν ακολούθως στο εργαστήριο για περαιτέρω μετρήσεις και αναλύσεις που αφορούσαν τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους.

2. ΚΥΤΤΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

2.1 Μελέτη μορφολογίας ανθέων

Κατά την περίοδο της άνθισης, συλλέγονταν 10 ανοιχτά άνθη από κάθε επιλεγμένο πρέμνο, σε καθένα από τους τρεις πειραματικούς αγρούς, με σκοπό την καταγραφή των κυριοτέρων μορφολογικών χαρακτηριστικών τους. Η διαδικασία αυτή εφαρμόστηκε για δύο καλλιεργητικές περιόδους (2008 και 2009). Η επιλογή των προς μελέτη χαρακτηριστικών έγινε με βάση τον οδηγό ΥΡΟΝ για την ακτινιδιά, και συγκεκριμένα καταγράφονταν τα εξής μορφολογικά γνωρίσματα:

- Αριθμός σεπάλων
- Αριθμός πετάλων
- Μήκος μίσχου
- Διάμετρος άνθους
- Διάταξη πετάλων (όψη από κάτω)

- Καμπύλη κορυφής πετάλων
- Χρώμα σεπάλων
- Χρώμα πετάλων
- Τύπος χρωματισμού πετάλων στη βάση
- Παρουσία σκιών στο χρώμα πετάλων
- Διαβάθμιση χρώματος πετάλων
- Χρώμα ανθήρων
- Αριθμός στύλων

2.2 Έλεγχος βιωσιμότητας της γύρης

Για τον έλεγχο της βιωσιμότητας της γύρης, συλλέγονταν κατά την περίοδο της άνθισης 10 κλειστά άνθη από κάθε επιλεγμένο πρέμνο των τριών εξεταζόμενων ποικιλιών (Tsechelidis, Hayward και Matua), για το σύνολο των πειραματικών αγρών. Ο έλεγχος της βιωσιμότητας της γύρης γινόταν με τη μέθοδο της ακετορκαμίνης (1%), σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Chang και Neuffer (1989). Ακολούθως τα παρασκευάσματα εξετάζονταν σε μικροσκόπιο Axio Lab A1 (Zeiss) και καταγράφονταν ο αριθμός των ενεργών γυρεόκοκκων (χρωματισμένοι πυρήνες) σε καταμέτρηση συνολικά περίπου 500 γυρεόκοκκων ανά άνθος (Εικ.2). Το ποσοστό (%) των βιώσιμων (ενεργών) γυρεόκοκκων υπολογίζονταν ξεχωριστά για κάθε άνθος και τα ποσοστά των 10 συνολικά εξεταζόμενων ανθέων ανά πρέμνο αθροίζονταν για να υπολογιστεί η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση για κάθε πρέμνο. Ο έλεγχος της γύρης πραγματοποιήθηκε για δύο χρονιές (2009 και 2010) και η παραλλακτικότητα υπολογίστηκε με ανάλυση της ομοιογένειας τόσο μεταξύ, όσο και εντός των ποικιλιών.



Εικ.2 Χρώση δειγμάτων και παρατήρηση στο μικροσκόπιο

2.3 Αναλύσεις Κυτταρομετρίας Ροής

Με βάση τα αποτελέσματα των τριών προηγούμενων ετών πειραματισμού, έγινε κατάταξη των επιλεγμένων πρέμων της ποικιλίας «Tsechelidis», αναφορικά με το βαθμό αυτογονιμότητάς τους. Από τις δύο ακραίες κλάσεις της κατάταξης αυτής (υψηλή – χαμηλή αυτογονιμότητα) επιλέχθηκαν τελικώς 18 γενότυποι, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, με σκοπό την εκτίμηση της ποσότητας DNA των κυττάρων τους και του επιπέδου πλοειδίας τους. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν γενότυποι των ποικιλιών «Hayward» και «Matua».

Οι αναλύσεις κυτταρομετρίας ροής διεξήχθησαν στο εργαστήριο Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών, του τμήματος Φυτικής Παραγωγής Φλώρινας, του Τ.Ε.Ι. Δυτικής Μακεδονίας. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρητής ροής CyFlow SL, της εταιρείας PARTEC (Εικ.3), με ανάλυση 5 οπτικών παραμέτρων (FSC, SSC, FL-1, FL-2, FL-3). Για την παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν μικρά τμήματα νεαρών φύλλων ακτινιδιάς, τα οποία μετά την προσθήκη 500μl διαλύματος απομόνωσης των πυρήνων (extraction buffer), τεμαχίζονταν σε πολύ μικρά τμήματα με τη βοήθεια κοφτερής λεπίδας ξυραφιού, ώστε να επιτευχθεί ο κατακερματισμός των κυττάρων και η απελευθέρωση των πυρήνων στο διάλυμα. Ακολουθούσε φιλτράρισμα του διαλύματος με μικροφίλτρα διαμέτρου 50μm για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων τμημάτων. Στο εναπομείναν διάλυμα προσθέτονταν 2ml από το διάλυμα χρώσης, στο οποίο είχαν προστεθεί νωρίτερα 6 μl RNase (PI staining solution). Τα δείγματα διατηρούνταν στο σκοτάδι για τουλάχιστον 30 λεπτά έως 1 ώρα και ακολουθούσε μέτρηση της ποσότητας DNA του πυρήνα των κυττάρων με την τοποθέτησή τους στον υποδοχέα δειγμάτων.



Εικ.3 Κυτταρομετρητής Ροής CyFlow SL

2.4 Μετρήσεις καρπών

Οι μετρήσεις καρπών αφορούσαν όλους τους καρπούς που συγκομίζονταν από τα επιλεγμένα πρέμνα των ποικιλιών «Tsechelidis» και «Hayward», τόσο αυτούς που προέρχονταν από αυτογονιμοποίηση ανθέων, όσο και τους προερχόμενους από ελεύθερη επικονίαση. Η συγκομιδή γινόταν όταν το ποσοστό των διαλυτών στερεών συστατικών στον καρπό ήταν 6,6 – 7%. Οι καρποί παρέμεναν για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα διατηρούνταν στους 4°C σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας μέχρι το πέρας των αναλύσεων. Αρχικά μετρούνταν με παχύμετρο οι διαστάσεις του καρπού, και συγκεκριμένα το μήκος και οι 2 διάμετροι (μικρό και μεγάλο πλάτος). Στη συνέχεια ζυγίζονταν και καταγράφονταν το νωπό τους βάρος. Με σκοπό τη μελέτη συσχέτισης μεταξύ του βάρους και του αριθμού σπερμάτων του καρπού, έγινε καταμέτρηση των σπόρων όλων των καρπών. Οι σπόροι αφαιρούνταν από τη σάρκα των καρπών, καθαρίζονταν προσεχτικά και αφήνονταν να στεγνώσουν. Στη συνέχεια ζυγίζονταν το συνολικό δείγμα σπόρων ανά καρπό, καθώς και το βάρος 100 σπόρων, ώστε με αναγωγή να εκτιμηθεί ο συνολικός αριθμός σπερμάτων ανά καρπό.

2.5 Φυσικοχημικές αναλύσεις καρπών

Σε περαιτέρω φυσικοχημικές αναλύσεις υποβλήθηκαν μόνο οι καρποί των αυτογονιμοποιήσεων των ποικιλιών «Tsechelidis» και «Hayward», που είχαν νωπό βάρος >60γρ., καθώς κάτω από το όριο αυτό οι καρποί κρίνονται εμπορικά μη αποδεκτοί και δεν θα είχε καμία πρακτική αξία η φυσικοχημική τους ανάλυση. Ως μάρτυρες και για τις δύο ποικιλίες χρησιμοποιούνταν 5 καρποί ελεύθερης επικονίασης ανά επιλεγμένο πρέμνο. Οι φυσικοχημικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Δενδροκομίας της Γεωπονικής σχολής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2.5.1. Μέθοδος υπολογισμού Χρώματος σάρκας

Το χρώμα της σάρκας του καρπού μετρήθηκε με χρωματόμετρο Hunter LAB (Miniscan XE Plus), έπειτα από σταντάρισμα με άσπρη και μαύρη πλάκα. Συνολικά πάρθηκαν 10 μετρήσεις για κάθε επανάληψη (2 τιμές ανά καρπό) και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων αυτών για κάθε επανάληψη. Από το όργανο καταγράφονται οι παράμετροι L^* , a^* και b^* . Οι παράμετροι a^* και b^* χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των χρωματικών παραμέτρων C^* και h° (McGuire, 1992). Ο παράγοντας L^* (Lightness) αποθηκεύει όλη την πληροφορία φωτεινότητας της εικόνας παίρνοντας τιμές από 0 (μαύρο) έως 100 (λευκό), ενώ οι παράγοντες a^* και b^* την πληροφορία χρώματος χωρίς να υπάρχουν για αυτά κάποια αριθμητικά όρια. Θετικές τιμές του a^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του κόκκινου. Αρνητικές τιμές του a^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του πράσινου. Θετικές τιμές του b^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του κίτρινου. Αρνητικές τιμές b^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του μπλε. Η παράμετρος χρωματική πυκνότητα C^* (Chroma), προσδιορίζει τη συγκέντρωση, δηλαδή την ένταση ή την καθαρότητα του χρώματος ή διαφορετικά τη σχέση μεταξύ της έντασης και της φωτεινότητας της μελετώμενης απόχρωσης. Η παράμετρος h° (hue angle), μετράται σε μοίρες και προσδιορίζει την απόχρωση παίρνοντας τιμές 0° για το κόκκινο-πορφυρό, 90° για το κίτρινο, 180° για το γαλαζοπράσινο και 270° για το μπλε. Σε συνδυασμό τα C^* και h° δίνουν το ακριβές, πραγματικό χρώμα, ιδιαίτερα για έγχρωμους καρπούς.

2.5.2. Μέθοδος υπολογισμού Σκληρότητας σάρκας

Ο βαθμός σκληρότητας της σάρκας μετρήθηκε με πιεσόμετρο τύπου Effegi, που αποτελείται από ένα δυναμόμετρο που φέρει κυλινδρικό έμβολο διαμέτρου 7,9mm. Ο κύλινδρος βυθιζόταν στη μία πλευρά του καρπού, σε σημείο όπου είχε αφαιρεθεί ο φλοιός, και καταγράφονταν η ένδειξη του δυναμόμετρου σε κιλά.

Έγιναν 2 μετρήσεις αντιδιαμετρικά σε κάθε καρπό και υπολογίστηκε ο μέσος όρος.

2.5.3. Μέτρηση Διαλυτών Στερεών Συστατικών (%)

Για τον προσδιορισμό των διαλυτών στερεών συστατικών χρησιμοποιήθηκε φορητό διαθλασίμετρο Pocket Refractometer Pal-1, της εταιρείας Atago (Εικ.4), με αυτόματη ρύθμιση της θερμοκρασίας. Η μέτρηση αφορούσε τον χυμό των καρπών των ακτινιδίων και συγκεκριμένα μια σταγόνα φιλτραρισμένου χυμού τοποθετούνταν στη γυάλινη πλάκα του οργάνου και σημειώνονταν η ένδειξη του διαθλασίμετρου που εκφράζει το ποσοστό (%) της περιεκτικότητας του χυμού σε Δ.Σ.Σ. (βαθμοί Brix).



Εικ.4 διαθλασίμετρο Pocket Refractometer (Atago)

2.5.4. Προσδιορισμός ποσοστού Ξηρής ουσίας

Για τον προσδιορισμός της Ξηρής ουσίας κόβονταν μια φέτα, πάχους περίπου 2εκ. και χωρίς την αφαίρεση της φλούδας, από κάθε καρπό-δείγμα με εγκάρσια τομή στον κάθετο άξονα του καρπού. Στη συνέχεια, τοποθετούνταν σε κυπελάκι αλουμινίου γνωστού βάρους και ζυγίζονταν το νωπό βάρος σε ζυγό 2 δεκαδικών ψηφίων. Τέλος, τα δείγματα τοποθετούνταν σε φούρνο για 72 ώρες, σε θερμοκρασία 75 °C. Μετά το πέρας της ξήρανσης τα δείγματα επαναζυγίζονταν στον ίδιο ζυγό. Στην περίπτωση των καρπών από ανοιχτή επικονίαση η μέτρηση γινόταν από τη λήψη 5 φετών από αντίστοιχο αριθμό καρπών και η μέτρηση ακολουθούσε την ίδια διαδικασία. Ο προσδιορισμός του ποσοστού της Ξηρής ουσίας υπολογίζονταν από τη διαίρεση του τελικού βάρους προς το αρχικό, πολλαπλασιαζόμενο επί 100.

2.5.5. Προσδιορισμός pH

Η μέτρηση του pH γινόταν σε ποσότητα χυμού 2 ml από κάθε καρπό-δείγμα, ο οποίος αναμειγνύονταν στη συνέχεια με 18 ml απιονισμένου νερού. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ψηφιακού πεχάμετρου HI 9024, της εταιρείας Hanna Instruments. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είχε ως εξής: τοποθέτηση του ηλεκτροδίου μέσα στο παραπάνω διάλυμα, με συνεχή ανάδευση, έως τη σταθεροποίηση της ενδείξεως του πεχάμετρου και καταγραφή της αντίστοιχης μέτρησης. Στην περίπτωση των καρπών της ανοιχτής επικοινωνίας, η μέτρηση γινόταν σε 2 ml χυμού, ο οποίος προερχόταν από την ανάμειξη των χυμών των 5 καρπών που συλλέχθηκαν ανά πρέμνο.

2.5.6. Προσδιορισμός Οξύτητας

Ο προσδιορισμός της οξύτητας ακολουθούσε τον προσδιορισμό του pH και γίνονταν με τιτλοδότηση του παραπάνω διαλύματος χυμού με 0,1 N NaOH μέχρι το pH να φτάσει τιμή 8,2. Ο προσδιορισμός της οξύτητας γινόταν με τον υπολογισμό της (%) περιεκτικότητας του χυμού σε κιτρικό οξύ.

2.5.7. Προσδιορισμός Φαινολικών Οξέων

Ο υπολογισμός των συνολικών φαινολικών οξέων έγινε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Για τη μέθοδο αυτή απαιτείται η παρασκευή των παρακάτω διαλυμάτων:

1. Παρασκευή αραιού διαλύματος Folin-Ciocalteu:

Προσθήκη 25ml Folin-Ciocalteu εμπορίου σε 225ml νερό (αραίωση 1:10).

Χρήση μόνο για την ημέρα παρασκευής.

2. Παρασκευή διαλύματος ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 (0,075 gr Na_2CO_3 /ml):

Προσθήκη 75 gr άνυδρου ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 σε 925 ml νερού.

Διατήρηση στο ράφι.

3. Προσδιορισμός με καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος:

Για την παρασκευή stock διαλύματος γίνεται προσθήκη 0,5 gr ξηρού γαλλικού οξέος σε 100 ml νερού (5mg γαλλικού οξέος ανά ml ή 500mg%). Ακολουθεί θέρμανση και ταυτόχρονη ανάδευση σε συσκευή stirrer, έως ότου διαλυθεί τελείως. Τέλος διατηρείται στο ψυγείο για λίγες εβδομάδες.

4. Δημιουργία των παρακάτω αραιώσεων σε πλαστικές ογκομετρικές φιάλες:

Πίνακας 1. Αραιώσεις διαλυμάτων για τον προσδιορισμό των φαινολικών οξέων

Τελική συγκέντρωση (mg%)	Προσθήκη stock διαλύματος (ml)	Προσθήκη νερού (ml)
2.5	0.25	50
5	0.5	49.5
7.5	0.75	49.25
10	1	49
15	1.5	48.5

Μετά την εκτέλεση των παραπάνω βημάτων ακολουθεί η διαδικασία προσδιορισμού των συνολικών φαινολικών οξέων. Σε 18ml αποσταγμένου νερού προσθέτονταν 2ml χυμού (αραίωση χυμού 1:10) και στη συνέχεια μεταφέρονταν 2ml αυτής της αραίωσης σε δοκιμαστικό σωλήνα όπου προσθέτονταν άλλα επιπλέον 2ml αποσταγμένου νερού. Ως μηδενικό δείγμα (blank) χρησιμοποιούνταν δοκιμαστικός σωλήνας που περιείχε μόνο 4 ml αποσταγμένου νερού. Μετά από 2 λεπτά προσθέτονταν 10 ml αραιού διαλύματος Folin-Ciocalteu και αναδεύονταν σε συσκευή vortex. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνταν στους 5 °C για 30-60 λεπτά και μετά το τέλος της παραμονής τους μετρούνταν η απορρόφηση τους στα 760 nm. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε με το φασματοφωτόμετρο Spectronic 301, της εταιρείας Milton Roy Company, με χρήση κυψελίδας χαλαζία.

2.6 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των στατιστικών πακέτων STATA 11.1 (StataCorp. College Station, TX) και SPSS 17.0 για την ανάλυση της παραλλακτικότητας (ANOVA). Στατιστικώς σημαντικές διαφορές γίνονταν αποδεκτές για επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Οι μοριακές αναλύσεις διεξήχθησαν στο ερευνητικό ινστιτούτο Max Planck, στο τμήμα Βελτίωσης φυτών που εδρεύει στην Κολωνία της Γερμανίας, και αφορούσαν 25 επιλεγμένους γενοτύπους των ποικιλιών «Tsechelidis» (18), «Hayward» (3) και «Matua» (4). Η επιλογή των γενοτύπων της ποικιλίας «Tsechelidis» έγινε με βάση την κατάταξη τους ως προς το βαθμό αυτοσυμβατότητας που παρουσίασαν, όπως προέκυψε από τη συνδυασμένη ανάλυση των δεδομένων των πειραμάτων αγρού και του ελέγχου βιωσιμότητας της γύρης στο εργαστήριο. Η αρρενόστειρη (θηλυκή) ποικιλία «Hayward» και η επικονιάστρια (αρσενική) ποικιλία «Matua» χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι 18 επιλεγμένοι γενοτύποι της ποικιλίας «Tsechelidis», οι οποίοι ανήκαν στις δύο ακραίες κλάσεις της κατάταξης, με υψηλό και χαμηλό βαθμό αυτοσυμβατότητας αντίστοιχα.

Πίνακας 2. Οι 18 επιλεγμένοι γενοτύποι της ποικιλίας «Tsechelidis»

ΑΓΡΟΣ	ΣΕΙΡΑ	ΘΕΣΗ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ
II	4	6	1	Υψηλή αυτοσυμ.
	4	9	2	Υψηλή αυτοσυμ.
	4	19	5	Υψηλή αυτοσυμ.
	8	6	6	Υψηλή αυτοσυμ.
	8	10	7	Υψηλή αυτοσυμ.
	8	21	9	Υψηλή αυτοσυμ.
	13	20	15	Υψηλή αυτοσυμ.
	8	22	10	Χαμηλή αυτοσυμ.
III	13	9	12	Χαμηλή αυτοσυμ.
	13	2	1	Υψηλή αυτοσυμ.
	13	10	4	Υψηλή αυτοσυμ.
	13	12	5	Υψηλή αυτοσυμ.
	4	7	13	Υψηλή αυτοσυμ.
	4	12	15	Υψηλή αυτοσυμ.
	8	12	9	Χαμηλή αυτοσυμ.
	8	4	6	Χαμηλή αυτοσυμ.
	4	5	12	Χαμηλή αυτοσυμ.
	4	9	14	Χαμηλή αυτοσυμ.

3.1 Απομόνωση DNA

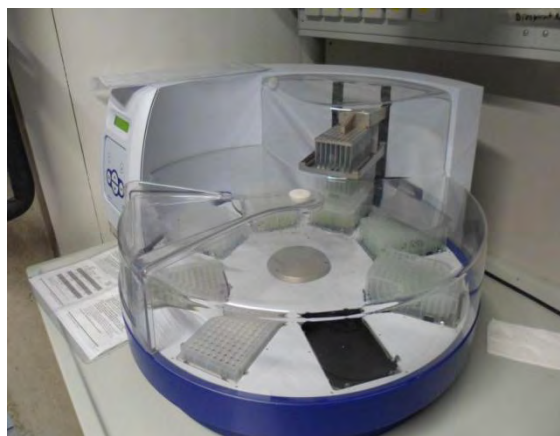
Η απομόνωση DNA από τους 25 επιλεγμένους γενοτύπους ακτινιδίου έγινε αρχικά με τη τροποποιημένη μέθοδο CTAB (Doyle and Doyle, 1990). Για τη διαδικασία απομόνωσης του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν νεαρά φύλλα, τα οποία είχαν συλλεχθεί από τους πειραματικούς αγρούς μια ημέρα πριν. Χρησιμοποιήθηκαν 0,3γρ. φρέσκου ιστού από κάθε γενότυπο, τα οποία κονιορτοποιήθηκαν με τη βοήθεια υγρού αζώτου σε αποστειρωμένα, πορσελάνινα γουδιά. Στη συνέχεια το δείγμα μεταφέρονταν σε πλαστικό σωληνάριο και προσθέτονταν 900μl ρυθμιστικού διαλύματος CTAB, 10 μl β-μερκαπτοαιθανόλης και 2μl RNA-άσης. Το δείγμα αναδεύονταν καλά μέχρι να ομογενοποιούνταν πλήρως και κατόπιν αφήνονταν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 65° C για περίπου 20 λεπτά. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15λεπτά στις 14.000 στροφές, με σκοπό το διαχωρισμό του ιζήματος του φυτικού ιστού από το διάλυμα. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρονταν σε νέο πλαστικό σωληνάριο και προσθέτονταν 500μl διαλύματος χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Κατόπιν φυγοκεντρώνταν για 5λεπτά στις 10.000 στροφές για το διαχωρισμό των δύο φάσεων. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρονταν εκ νέου σε πλαστικό σωληνάριο, όπου προσθέτονταν ποσότητα ισοπροπανόλης ίση με τα 2/3 του όγκου της υδατικής φάσης και αφήνονταν στον πάγο για περίπου 10 λεπτά. Καθώς η ακτινιδιά περιέχει πολλούς πολυσακχαρίτες, έγινε προσπάθεια απομάκρυνσης τους από το τελικό προϊόν με διάλυμα NaCl 1.0M (Guowei *et al.*, 1992). Ο καθαρισμός του DNA γινόταν δύο φορές με διάλυμα αιθανόλης 70% και άλατος (K-acetate) 0,1M και μια φορά με καθαρή αιθανόλη (97%). Το τελικό προϊόν διαλύονταν σε 200 μl διαλύματος TE και διατηρούνταν στην κατάψυξη.

Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί την πλέον διαδεδομένη και ευρέως εφαρμοζόμενη μέθοδο απομόνωσης γενωμικού γενετικού υλικού από φρέσκο ιστό. Ωστόσο, στην περίπτωση του ακτινιδίου η τεχνική κρίθηκε ακατάλληλη, καθώς το τελικό προϊόν ήταν πάντα κακής ποιότητας, με χαμηλή καθαρότητα

λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας σε πολυσακχαρίτες και πολύ χαμηλή συγκέντρωση, παρά τις όποιες τροποποιήσεις και αν δοκιμάστηκαν.

Εναλλακτικά επιχειρήθηκε να γίνει απομόνωση γενετικού υλικού με τη βοήθεια της συσκευής Biosprint 96, της εταιρείας Qiagen (Εικ. 1). Πρόκειται για ένα άκρως αυτοματοποιημένο ρομποτικό σύστημα, όπου η θραύση των ιστών γίνεται σε ειδικά πλαστικά σωληνάκια που περιέχουν διάλυμα λύσης των κυτταρικών τοιχωμάτων, με τη

βοήθεια μαγνητικών σφαιριδίων και μηχανικού αναδευτή (shaker), ο οποίος κινείται με μεγάλες ταχύτητες. Κατόπιν, το δείγμα του ομογενοποιημένου ιστού μεταφέρεται στις ειδικές πλακέτες που εφαρμόζουν στη συσκευή και παράλληλα ετοιμάζονται άλλες 6



Εικ.1. Συσκευή Biosprint 96, της εταιρείας Qiagen

πλακέτες με τα αντίστοιχα διαλύματα, όπως αυτά ορίζονται από το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Οι πλακέτες τοποθετούνται στη συσκευή σε ορισμένη θέση, το σύστημα κλείνει και η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται, χωρίς καμία επιπλέον εξωτερική παρέμβαση, σε 20λεπτά. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης απομόνωσης γενετικού υλικού από 96 γενοτύπους κάθε φορά. Ωστόσο, στην περίπτωση της ακτινιδιάς, η τελική συγκέντρωση των δειγμάτων σε DNA (ng/μl) ήταν πολύ μικρή, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις τα δείγματα είχαν αυξημένη συγκέντρωση πολυσακχαριτών.

Τελικώς η απομόνωση του γενετικού υλικού από τους επιλεγμένους γενότυπους έγινε με τη βοήθεια του Dneasy kit, της εταιρείας Qiagen. Η θραύση των ιστών έγινε σε πορσελάνινα γουδιά, με χρήση υγρού αζώτου. Η υπόλοιπη διαδικασία απομόνωσης διεξήχθη σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, με τη βοήθεια των διαλυμάτων και των ειδικών στηλών που παρέχονται στη συσκευασία του προϊόντος. Η συγκέντρωση (ng DNA/μl δείγματος) και η

καθαρότητα των δειγμάτων (αναλογία πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών) προσδιορίστηκε με τη βοήθεια νανοφωτόμετρου Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie).

3.2 Γενετική ανάλυση με μοριακούς δείκτες

Για τη μοριακή γενετική ανάλυση επιλέχθηκαν 3 ζεύγη εκκινητών τύπου SCAR, οι οποίοι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σχετίζονται με την έκφραση του φύλου στο γένος *Actinidia* (Gill *et al.*, 1998). Επιπλέον, επιλέχθηκαν 5 ζεύγη εκκινητών, οι οποίοι προήλθαν από γονίδια που εκφράζονται διαφορετικά σε θηλυκά και αρσενικά άνθη του γένους *Actinidia* (DEG - differentially expressed gene) και φαίνεται να επηρεάζουν τους μηχανισμούς διαφοροποίησης του φύλου (Kim *et al.*, 2010). Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα ζεύγη των εκκινητών και οι ακολουθίες τους. Οι εκκινητές SmX, SmY και SmY₁ σχετίζονται με τον καθορισμό του φύλου, και συγκεκριμένα ο SmX χαρακτηρίζει τα θηλυκά άτομα, ενώ οι SmY και SmY₁ τα αρσενικά.

Πίνακας 3. Τα 8 ζεύγη εκκινητών και οι αλληλουχίες τους

	Εκκινητής Forward	Εκκινητής Reverse
SmX	AGGAGTCGGAGAGAGTAGAGAAG	AGGAGTCGGATGACCGTTGGTGA
SmY	GACGCGAACCACCCACATTTGAG	GACGCGAACCCGGCAAGTCGAAC
SmY₁	TCGCAATTTCGTTAGGGATGATGCG	CATAATCAACCATCCATAAAAACCAT
KiwiDEG1	ACAAGAACGAGGTTCTCAAATAACT	ATTACAATTGATTGTTTCTCTCAGG
KiwiDEG3	GATAGGCTCGGTGACATTTTCTTTT	AGAAACCCACGAAAGTTGTAACATA
KiwiDEG9	CCAATGCAATGAATGCTGCGGAAAT	TCTGTGTCTCCATGAATAGCCAAGT
KiwiDEG12	CAAGAACATTGAGAAAAGCCTAGTA	GACTTCTTCCTCATCTCATCAAGTA
KiwiDEG13	CTCTCTCTCATCTATCTATGGTTGG	CAATCTCTCTAAACTTCTGAGTTGC

Οι αντιδράσεις ήταν τελικού όγκου 25μl και περιείχαν 10mM Tris HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl, 2.5 mM dNTPs, 10 μM εκκινητή, 50 ng γενωμικού DNA και 1.0 U ενζύμου Taq πολυμεράσης. Για καλύτερα αποτελέσματα δοκιμάστηκε τόσο η προσθήκη BSA 100x (10mg/ml), όσο και η προσθήκη DMSO στις αντιδράσεις. Ακολούθησε η ενίσχυση των μικροδορυφορικών περιοχών DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Έπειτα από πολλαπλές δοκιμές για τη βελτιστοποίηση των θερμοκρασιακών συνθηκών, οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

Πίνακας 4. Θερμικό προφίλ της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ
Αρχική αποδιάταξη	94°C	5 min
Αποδιάταξη	94°C	30 sec
Επανυβριδισμός	53-45°C	30 sec
Επέκταση	72°C	1.5 min
Τελική επέκταση	72°C	5 min

Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR διαχωρίζονταν σε πηκτή αγαρόζης (2%), που περιείχε 0.004% (w/v) βρωμιούχο αιθίδιο. Οι ζώνες εμφανίζονταν υπό υπεριώδη ακτινοβολία UV και φωτογραφίζονταν. Για την εκτίμηση του μοριακού βάρους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε ladder (1Kb) των 100 βάσεων με ζώνες 100bp έως 1000bp. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, η όλη διαδικασία επαναλαμβάνονταν τουλάχιστον 3 φορές για κάθε ζεύγος εκκινητή.

3.3 Αλληλούχιση προϊόντων μοριακής ανάλυσης

Τα επιθυμητά προϊόντα ενίσχυσης της PCR (ζώνες συγκεκριμένου μοριακού μεγέθους), για το σύνολο των 8 εκκινητών, στάλθηκαν για αλληλούχιση με σκοπό τον εντοπισμό τυχόν γενετικών διαφορών μεταξύ των 24 εξεταζόμενων

γενοτύπων, σε επίπεδο μεμονωμένων νεοκλουτιδικών βάσεων (πολυμορφισμοί SNP – Single Nucleotide Polymorphism). Η αλληλούχιση των δειγμάτων διεξήχθη από το Genome Center, που λειτουργεί στις εγκαταστάσεις του ινστιτούτου Max Planck, στην Κολωνία. Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν σταλούν για αλληλούχιση, περιελάμβανε την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος και τον καθαρισμό του για την απομάκρυνση των υπόλοιπων συστατικών που συμμετείχαν στην αντίδραση της PCR. Στην περίπτωση που η αντίδραση με κάποιο εκκινητή παρήγαγε και δευτερογενή προϊόντα ενίσχυσης (επιπλέον ζώνες) πέραν της ζώνης-στόχου, τότε ο διαχωρισμός των προϊόντων γινόταν σε πηκτή αγαρόζης (1%). Το τμήμα του τζελ που έφερε την επιθυμητή ζώνη κοβόταν προσεκτικά με τη βοήθεια εργαστηριακής λαβίδας, πάνω σε πλάκα με ακτινοβολία UV, και μεταφέρονταν σε ειδικά πλαστικά σωληνάρια. Κατόπιν, ο καθαρισμός των δειγμάτων γινόταν με τη βοήθεια του Qiaquick Gel Extraction kit, της εταιρείας Qiagen, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Στην περίπτωση που η αντίδραση παρήγαγε μόνο την επιθυμητή ζώνη, τότε ο καθαρισμός γινόταν απευθείας στο προϊόν της PCR με τη βοήθεια του Qiaquick PCR Purification kit, της εταιρείας Qiagen. Η εκτίμηση της τελικής συγκέντρωσης DNA των δειγμάτων γινόταν με τη χρήση νανοφωτόμετρου Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer, προτού σταλούν για αλληλούχιση, καθώς απαιτείται τα δείγματα να έχουν ορισμένη συγκέντρωση, ανάλογα με το μοριακό μέγεθος του προϊόντος που θα αλληλουχιθεί (Πιν.5).

Πίνακας 5. Αναλογία μεγέθους ζώνης προς αλληλούχιση και συγκέντρωσης DNA δειγμάτων

Μέγεθος ζώνης (bp)	Συγκέντρωση DNA
< 500bp	7,5 – 10ng/μl
500 – 1000bp	12,5 – 15ng/μl
>1000bp	20ng/μl

3.4 Επεξεργασία δεδομένων

Η αρχική επεξεργασία και επιδιόρθωση των δεδομένων αλληλούχισης έγινε με το πρόγραμμα Chromas Lite (version 2.0). Ο συνδυασμός των δύο αλληλουχιών (forward/reverse) για κάθε γενότυπο έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος SeqMan Pro., ενώ η τελική ευθυγράμμιση των αλληλουχιών για το σύνολο των 24 γενοτύπων, για κάθε ένα εκκινητή, έγινε με χρήση του προγράμματος MegAlign (version 4.0.43). Τα δύο αυτά προγράμματα συμπεριλαμβάνονται στο ειδικό λογισμικό πακέτο για ανάλυση αλληλουχιών DNASTAR Lasergene (version 8.0.2).

ΤΡΙΤΟ ΜΕΡΟΣ:

Αποτελέσματα
& Συζήτηση

1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΓΡΟΥ

1.1 Αποτελέσματα αυτογονιμοποιήσεων

Τα αποτελέσματα των ελεγχόμενων αυτογονιμοποιήσεων επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του φαινομένου της αυτοσυμβατότητας στην ποικιλία «Tsechelidis», καθώς κατέστη δυνατό να γονιμοποιηθεί σημαντικός αριθμός ανθέων από τα επιλεγμένα πρέμνα της συγκεκριμένης ποικιλίας, και εν συνεχεία να παράγουν καρπούς, χωρίς την παρέμβαση ξένης γύρης. Οι καρποί που προέκυψαν ως αποτέλεσμα των ελεγχόμενων αυτογονιμοποιήσεων, διατηρήθηκαν στα πρέμνα έως τη συγκομιδή. Το ποσοστό καρπόδεσης που καταγράφονταν αρχικά δεν μεταβάλλονταν σημαντικά μέχρι το στάδιο της συγκομιδής (δεν παρατηρούνταν μεγάλη πτώση καρπών μετά την αυτογονιμοποίηση), αλλά διέφερε σημαντικά τόσο μεταξύ των 3 πειραματικών αγρών, όσο και μεταξύ των πρέμνων του ίδιου αγρού. Ειδικά για τον πειραματικό αγρό I, όπου συνυπήρχαν οι ποικιλίες «Tsechelidis» και «Hayward», αναφέρεται πως σχεδόν όλα τα επιλεγμένα πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis» κατάφεραν να παράγουν καρπούς έπειτα από αυτογονιμοποίηση, σε ποσοστό που κυμαίνονταν από 20-60% κατά την πρώτη χρονιά πειραματισμού (Πιν.1). Η ίδια εικόνα παρουσιάστηκε και τις επόμενες χρονιές (2009 και 2010), όπου τα πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis» στην πλειοψηφία τους παρήγαγαν καρπούς έπειτα από αυτογονιμοποίηση, με μικρές διακυμάνσεις ως προς τα ποσοστά καρπόδεσης. Αντίθετα, η ποικιλία «Hayward», η οποία αποτέλεσε την ποικιλία – μάρτυρα, παρουσίασε γενικά μηδενικά ποσοστά ή σημαντικά μικρότερα ποσοστά καρπόδεσης (10-20%), τα οποία σημειώθηκαν σε μόλις 3 από τα 10 επιλεγμένα πρέμνα, κατά την πρώτη χρονιά (2008). Τα συγκεκριμένα πρέμνα της ποικιλίας «Hayward» διατήρησαν τα χαμηλά ποσοστά καρπόδεσης και τη 2^η χρονιά (2009), ενώ μικρή μεταβολή σημειώθηκε το 2010, όπου αυξήθηκε ο συνολικός αριθμός των πρέμνων που κατάφεραν να παράγουν καρπούς αυτογονιμοποίησης, όχι όμως και ο αριθμός καρπών ανά πρέμνο (Πιν.1).

Πίνακας 1. Αποτελέσματα αυτογονιμοποιήσεων για τις ποικιλίες Tsechelidis και Hayward, στον αγρό Ι, για 3 καλλιεργητικές περιόδους (2008-2010)

ΑΓΡΟΣ Ι								
Έτος	Tsechelidis				Hayward			
	Πρέμνο	Αυτογ. άνθη	Καρποί	Ποσοστό (%) καρπόδεσης	Πρέμνο	Αυτογ. άνθη	Καρποί	Ποσοστό (%) καρπόδεσης
2008	1	10	4	40%	1	10	1	10%
	2	10	5	50%	2	10	1	10%
	3	10	4	40%	3	10	0	0%
	4	10	3	30%	4	10	0	0%
	5	10	3	30%	5	10	0	0%
	6	10	5	50%	6	10	0	0%
	7	10	6	60%	7	10	0	0%
	8	10	0	0%	8	10	0	0%
	9	10	2	20%	9	10	0	0%
	10	10	2	20%	10	10	3	30%
2009	1	10	4	40%	1	10	1	10%
	2	10	4	40%	2	10	0	0%
	3	10	3	30%	3	10	2	20%
	4	10	2	20%	4	10	1	10%
	5	10	4	40%	5	10	0	0%
	6	10	2	20%	6	10	0	0%
	7	10	5	50%	7	10	0	0%
	8	10	1	10%	8	10	0	0%
	9	10	0	0%	9	10	0	0%
	10	10	2	20%	10	10	1	10%
2010	1	25	7	28%	1	25	3	12%
	2	25	5	20%	2	25	0	0%
	3	25	6	24%	3	25	0	0%
	4	25	0	0%	4	25	0	0%
	5	25	4	16%	5	25	0	0%
	6	25	0	0%	6	25	0	0%
	7	25	4	16%	7	25	2	8%
	8	25	3	12%	8	25	1	4%
	9	25	0	0%	9	25	1	4%
	10	25	6	24%	10	25	2	8%



Εικ.1 Άνθη στο στάδιο της αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας Tsechelidis.



Εικ.2 Κλείσιμο ανθέων σε χάρτινες σακούλες για την επίτευξη της αυτογονιμοποίησης



Εικ.3 Αυτογονιμοποιημένο άνθος που δεν καρποφόρησε



Εικ.4 Καρπός της ποικιλίας Hayward, που προέκυψε έπειτα από αυτογονιμοποίηση

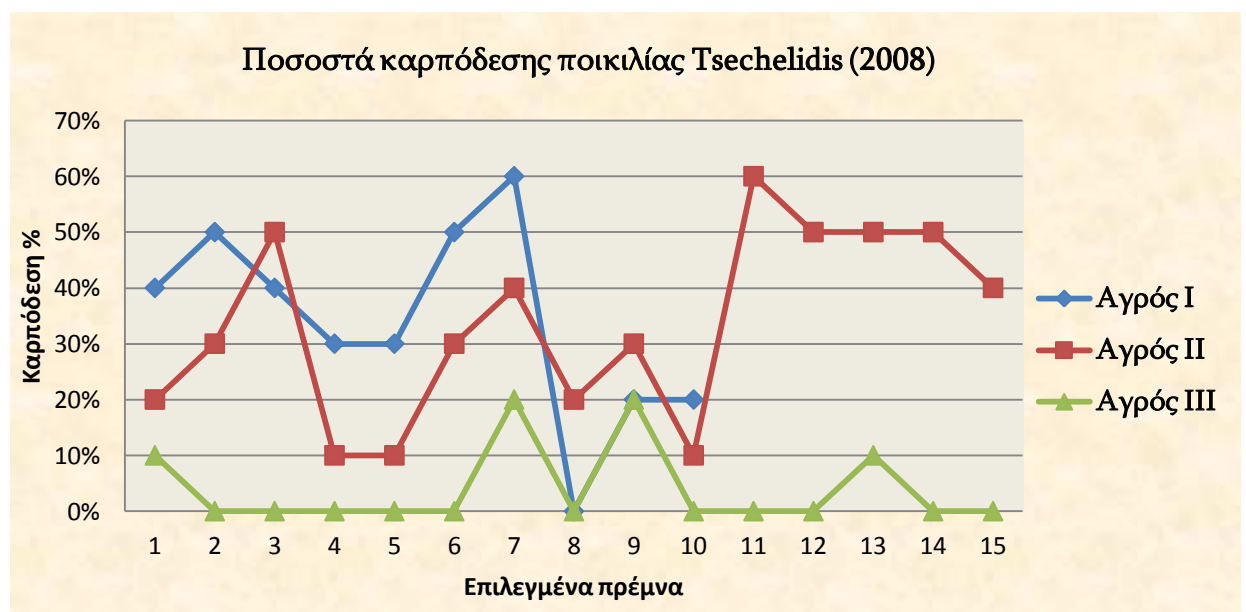


Εικ.5 Καρπός αυτογονιμοποίησης του πρέμνου 4 της ποικιλίας Tsechelidis, στον αγρό I



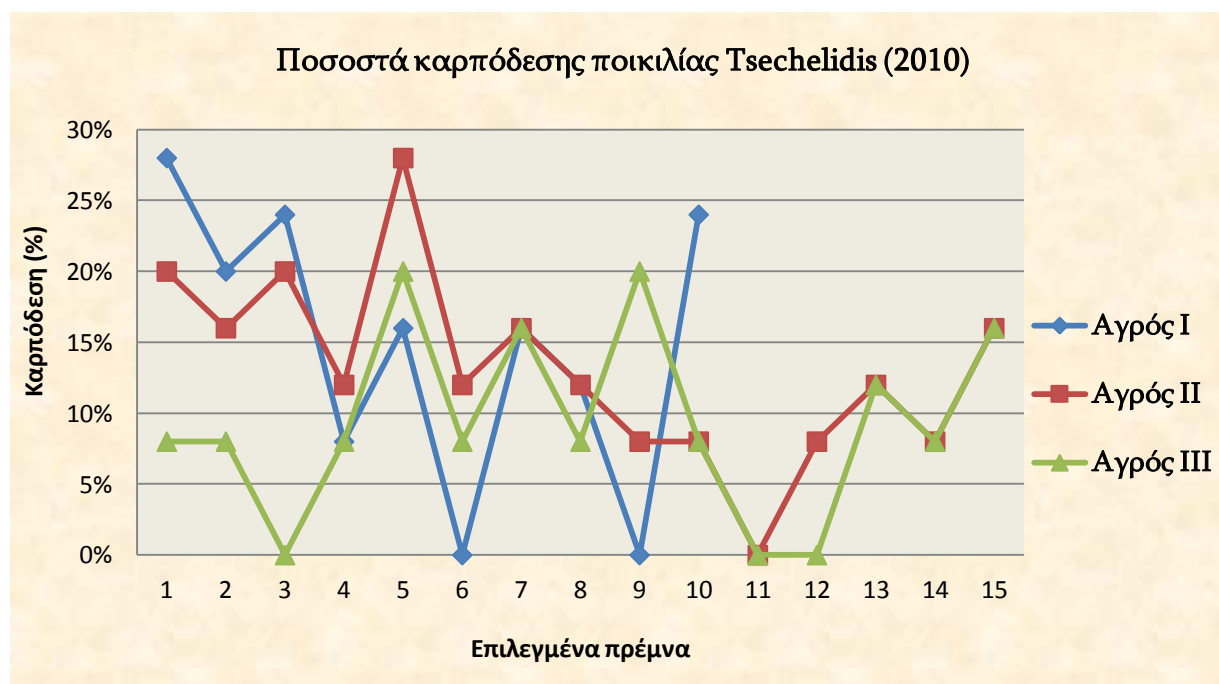
Εικ.6 Καρπός αυτογονιμοποίησης του πρέμνου 1 της ποικιλίας Tsechelidis, στον αγρό I

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των αυτογονιμοποιήσεων που διεξήχθησαν κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2008 και 2010 για την ποικιλία «Tsechelidis», στους τρεις πειραματικούς αγρούς (I, II και III), εμφανίζονται στα γραφήματα των εικόνων 7 και 8 αντίστοιχα. Τα πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis» στους αγρούς I και II εμφάνισαν υψηλά ποσοστά καρπόδεσης, που σε κάποιες περιπτώσεις άγγιζαν το 60%, κατά την καλλιεργητική περίοδο 2008 (Εικ. 7). Αξίζει να σημειωθεί επίσης πως καρπούς αυτογονιμοποίησης παρήγαγαν και διατήρησαν έως τη συγκομιδή όλα τα επιλεγμένα πρέμνα των αγρών I και II, με εξαίρεση μόνο το πρέμνο 8 στον αγρό I, που παρουσίασε μηδενικό ποσοστό καρπόδεσης στις αυτογονιμοποιήσεις. Ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά καρπόδεσης παρουσίασαν το πρέμνο 1 (40%), το πρέμνο 2 (50%) και τον πρέμνο 7 (60%) στον αγρό I, καθώς και το πρέμνο 3 (50%), πρέμνο 7 (40%), πρέμνο 11 (60%), τα πρέμνα 12, 13, 14 (50%) και το πρέμνο 15 (40%) στον αγρό II, αντίστοιχα. Ο αγρός III ωστόσο, που έφερε και τα νεαρότερης ηλικίας πρέμνα, παρουσίασε πολύ διαφορετική εικόνα κατά την καλλιεργητική περίοδο 2008, καθώς μόνο 4 από τα 15 αρχικώς επιλεγμένα πρέμνα κατάφεραν να παράγουν καρπούς αυτογονιμοποίησης. Ο αριθμός των παραγόμενων καρπών ανά πρέμνο ήταν επίσης πολύ μικρός και περιορίστηκε σε 1-2 καρπούς ανά πρέμνο.



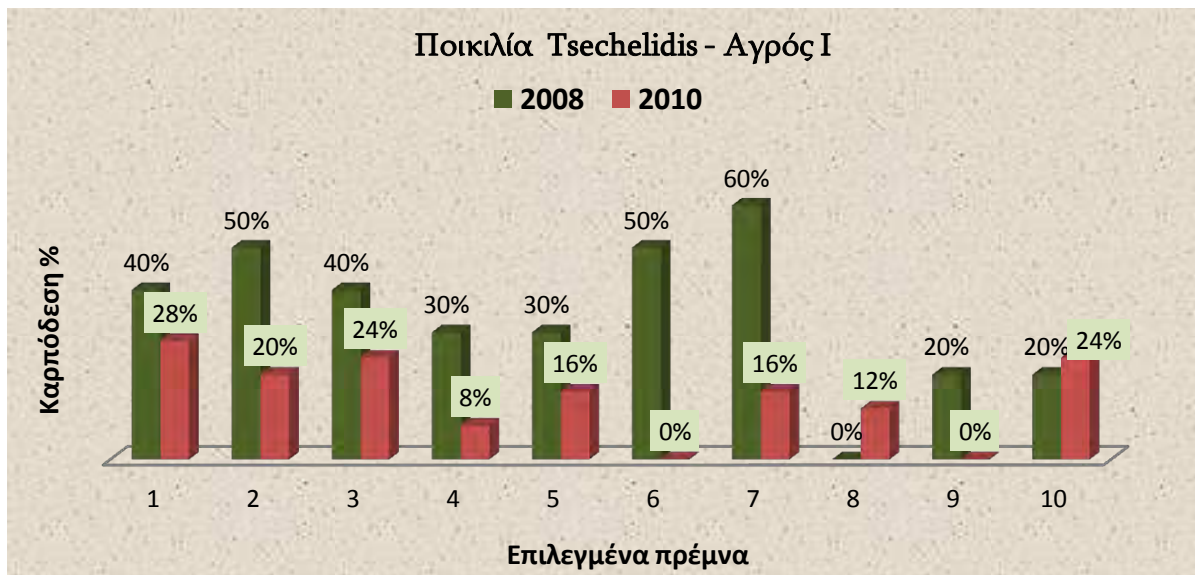
Εικόνα 7. Ποσοστά καρπόδεσης για την ποικιλία Tsechelidis στους 3 πειραματικούς αγρούς (2008)

Τα ποσοστά καρπόδεσης κατά την καλλιεργητική περίοδο 2010 (Εικ. 8) κυμάνθηκαν σε μικρότερα επίπεδα για τους αγρούς I και II, ενώ σημαντική άνοδος παρατηρήθηκε στα ποσοστά των πρέμνων του αγρού III, σε σχέση με την πρώτη χρονιά αυτογονιμοποιήσεων (2008). Στον αγρό I, τα υψηλότερα ποσοστά καρπόδεσης παρουσίασαν το πρέμνο 1 (28%), πρέμνο 2 (20%) και τα πρέμνα 3 και 10 (24%). Στον αγρό II δεν παρουσιάστηκαν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των ποσοστών καρπόδεσης των 15 επιλεγμένων πρέμνων. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πρέμνα στην πλειοψηφία τους παρήγαγαν καρπούς έπειτα από αυτογονιμοποίηση, με εξαίρεση το πρέμνο 11, το οποίο ήταν το μοναδικό πρέμνο στον αγρό II που παρουσίασε μηδενικό ποσοστό καρπόδεσης. Το υψηλότερο ποσοστό κατείχε το πρέμνο 5 (28%). Αναφορικά με τον αγρό 3, τα υψηλότερα ποσοστά καρπόδεσης κατείχαν τα πρέμνα 5 και 9 (20%). Τα υπόλοιπα πρέμνα δεν παρουσίασαν μεγάλες διακυμάνσεις, με εξαίρεση τα πρέμνα 3, 11 και 12, τα οποία δεν κατάφεραν να παράγουν κανένα καρπό έπειτα από αυτογονιμοποίηση.



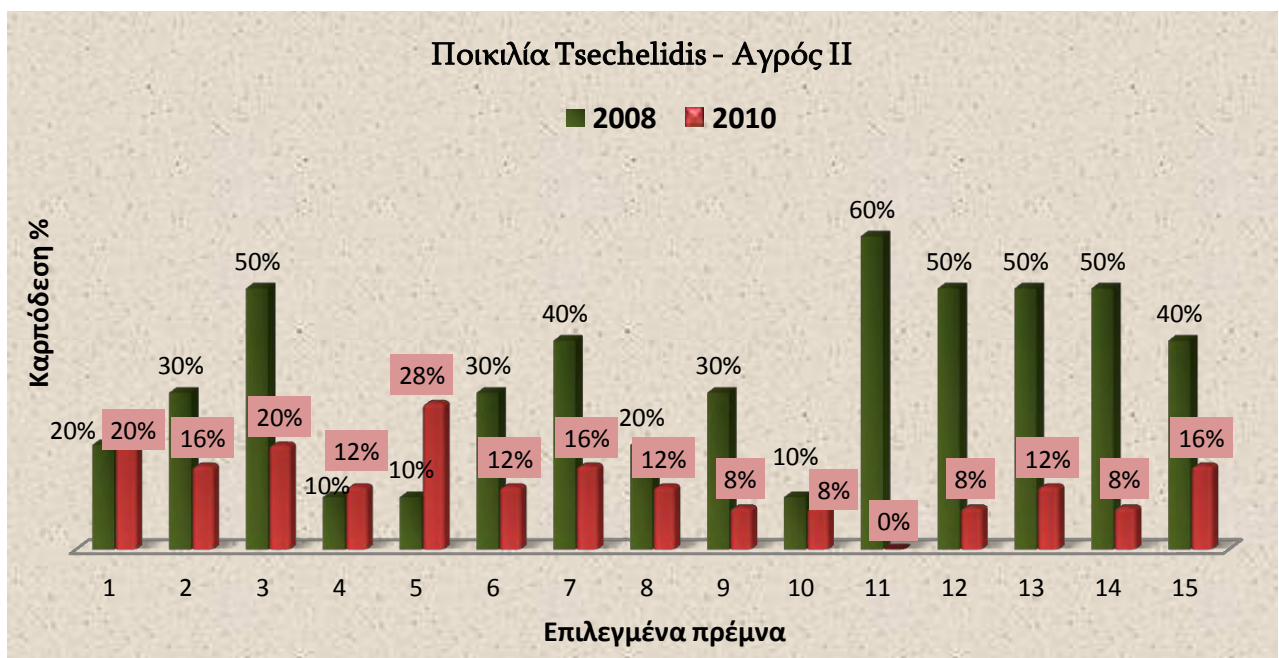
Εικόνα 8. Ποσοστά καρπόδεσης για την ποικιλία Tsechelidis στους 3 πειραματικούς αγρούς (2010)

Στα γραφήματα που ακολουθούν (Εικ. 9 και 10) παρουσιάζονται τα ποσοστά καρπόδεσης της ποικιλίας «Tsechelidis» σε κάθε πειραματικό αγρό, συνδυαστικά για τις 2 καλλιεργητικές περιόδους (2008-2010). Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να αναφερθεί ότι κατά την καλλιεργητική περίοδο 2010, και συγκεκριμένα κατά τον μήνα Ιούλιο, σημειώθηκαν στην περιοχή της Επισκοπής Ημαθίας έντονα καιρικά φαινόμενα με ισχυρούς ανέμους και βροχοπτώσεις, καθώς και χαλαζόπτωση, που είχαν ως αποτέλεσμα την πτώση πολλών νεαρών καρπών, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις σημειώθηκε και θραύση νεαρών κλάδων. Ενδεικτικά αναφέρεται με βάση τα επίσημα στοιχεία του Εθνικού Αστεροσκοπείου Αθηνών από το μετεωρολογικό σταθμό που βρίσκεται στο Μακροχώρι Βεροίας, ότι στις 2/07, 21/07, 24-25/7 και 27/7/2010 έπνεαν στην περιοχή ισχυροί άνεμοι με ταχύτητα 38km/h, ενώ τις ημέρες αυτές σημειώθηκε και η μέγιστη βροχόπτωση (21-28 mm βροχής). Όπως ήταν αναμενόμενο, οι συνθήκες αυτές επηρέασαν και το ποσοστό καρπόδεσης των αυτογονιμοποιημένων ανθέων, καθώς σε πολλά πρέμνα σημειώθηκαν σημαντικές απώλειες. Κατά συνέπεια τα ποσοστά καρπόδεσης για την καλλιεργητική περίοδο 2010 εμφανίζονται σαφώς μικρότερα σε σχέση με το 2008 συνολικά και στους τρεις πειραματικούς αγρούς. Πιο αναλυτικά στον αγρό I, αν και παρατηρείται μείωση του ποσοστού καρπόδεσης ανά πρέμνο το 2010, όπως παρουσιάζεται στο γράφημα της εικόνας 9, εντούτοις τα επιλεγμένα πρέμνα στην πλειοψηφία τους παρήγαγαν καρπούς έπειτα από αυτογονιμοποίηση, με εξαίρεση τα πρέμνα 6 και 9, τα οποία είχαν μηδενικό ποσοστό καρπόδεσης το 2010. Τα πρέμνα 1, 2 και 3 κατείχαν υψηλά ποσοστά και τις δύο χρονιές, ενώ τα πρέμνα 6 και 7 παρουσίασαν μεγάλη πτώση του ποσοστού καρπόδεσης τους τη δεύτερη χρονιά. Δεδομένων των καιρικών συνθηκών που αναφέρθηκαν προηγουμένως, πιθανόν αυτή η αλλαγή στη συμπεριφορά των πρέμνων να οφείλεται εν μέρει στην επίδραση του περιβάλλοντος.



Εικόνα 9. Ποσοστά καρπώδεσης για την ποικιλία Tsechelidis στον αγρό I για 2 καλλιεργητικές περιόδους (2008 και 2010)

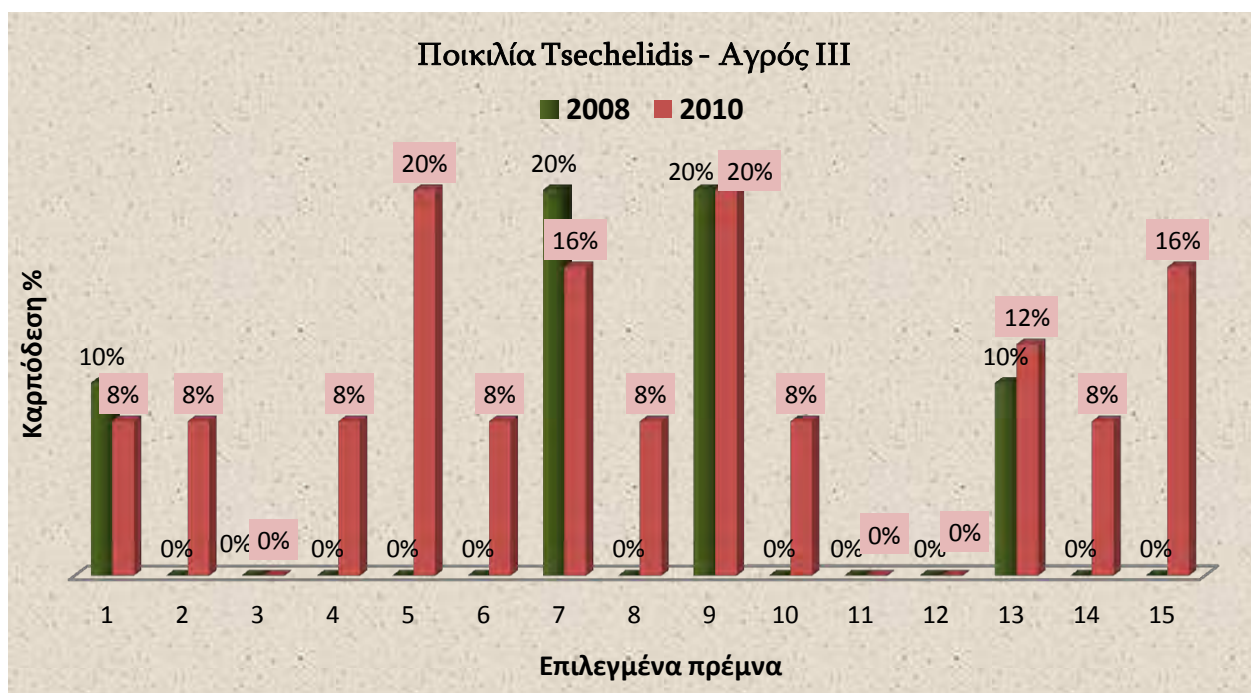
Όσο αφορά τον αγρό II (Εικ. 10), παρατηρείται ότι όλα τα επιλεγμένα πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis» παρήγαγαν καρπούς έπειτα από αυτογονιμοποίηση και τις δύο χρονιές, με εξαίρεση το πρέμνο 11, το οποίο παρουσίασε μηδενικό ποσοστό καρπώδεσης το 2010.



Εικόνα 10. Ποσοστά καρπώδεσης για την ποικιλία Tsechelidis στον αγρό II για 2 καλλιεργητικές περιόδους (2008 και 2010)

Ωστόσο, και στον αγρό II υπήρξαν διακυμάνσεις στα ποσοστά καρπόδεσης του κάθε πρέμνου, μεταξύ των δύο ετών. Τη μεγαλύτερη πτώση το 2010 σημείωσαν τα πρέμνα 11, 12, 13 και 14, τα οποία κατείχαν τα υψηλότερα ποσοστά καρπόδεσης το 2008.

Σημαντικά διαφορετική εικόνα παρουσίασε ο αγρός III κατά τις δύο χρονιές (Εικ. 11). Την πρώτη χρονιά (2008) μόνο 4 από τα 15 επιλεγμένα πρέμνα απέδωσαν καρπούς αυτογονιμοποίησης, ενώ το 2010 ο αριθμός αυτός αυξήθηκε στα 12 πρέμνα. Εξαίρεση αποτέλεσαν τα πρέμνα 3, 11 και 12, τα οποία διατήρησαν μηδενικά ποσοστά καρπόδεσης και τις δύο χρονιές. Τα πρέμνα 1, 7, 9 και 13 είχαν σταθερή συμπεριφορά, καθώς παρουσίασαν μικρή έως μηδενική διακύμανση στα ποσοστά τους μεταξύ των δύο ετών.



Εικόνα 11. Ποσοστά καρπόδεσης για την ποικιλία Tsechelidis στον αγρό III για 2 καλλιεργητικές περιόδους (2008 και 2010)

1.2 Διαστάσεις και βάρος καρπών

Όλοι οι καρποί που προέκυψαν από τις αυτογονιμοποιήσεις, καθώς και 5 καρποί ανοιχτής επικονίασης από κάθε επιλεγμένο πρέμνο των ποικιλιών «Tsechelidis» και «Hayward», ζυγίστηκαν και μετρήθηκαν οι βασικές τους διαστάσεις (μήκος, μεγάλο και μικρό πλάτος). Οι μέσοι όροι με τις τυπικές αποκλίσεις του νωπού βάρους και των διαστάσεων των καρπών για τις δύο ποικιλίες και τις δύο μεθόδους επικονίασης, για δύο καλλιεργητικές περιόδους (2008 και 2010), παρουσιάζονται στους πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα, και αφορούν μόνο τους καρπούς που συγκομίστηκαν στον πειραματικό αγρό Ι, όπου συνυπήρχαν οι δύο ποικιλίες.

Πίνακας 2. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση για νωπό βάρος και διαστάσεις καρπών των ποικιλιών Tsechelidis και Hayward, κατά το έτος 2008.

ΑΓΡΟΣ Ι					
Ποικιλία	Μέθοδος επικονίασης	Νωπό Βάρος (g)	Μήκος (cm)	Πλάτος Μεγάλο (cm)	Πλάτος Μικρό (cm)
Tsechelidis	Ελεύθερη	173,85 ± 24,21	7,86 ± 0,51	5,56 ± 0,28	5,1 ± 0,3
	Αυτογονιμοποίηση	114,99 ± 50,49	6,2 ± 1,38	5,11 ± 0,73	4,67 ± 0,71
Hayward	Ελεύθερη	107,61 ± 12,45	6,9 ± 0,4	5,29 ± 0,22	4,48 ± 0,27
	Αυτογονιμοποίηση	45,6 ± 19,56	4,04 ± 1,56	3,75 ± 1,73	3,36 ± 0,94
Στατιστική Ανάλυση					
Ποικιλία (F)		** 51,06	** 35,12	** 30,66	** 45,42
Μέθοδος (F)		** 40,58	** 51,06	** 45,75	** 29,95

(**p = 0,01)

Σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν για το σύνολο των χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν, τόσο μεταξύ των καρπών των ποικιλιών «Tsechelidis» και «Hayward», όσο και μεταξύ των καρπών της κάθε ποικιλίας, για τις δύο διαφορετικές μεταχειρίσεις, της ανοιχτής επικονίασης και της ελεγχόμενης αυτογονιμοποίησης αντίστοιχα (Πιν.2). Συγκεκριμένα, το μέσο νωπό βάρος των καρπών της ελεύθερης επικονίασης για την ποικιλία «Tsechelidis» ήταν 173,85γρ. και διέφερε σημαντικά από το αντίστοιχο μέσο βάρος των καρπών της ποικιλίας «Hayward», που ήταν 107,61γρ. Σημαντικά διέφεραν επίσης και τα αντίστοιχα βάρη των καρπών που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση των δύο ποικιλιών. Το μέσο βάρος για την ποικιλία «Tsechelidis» ήταν σχεδόν 115γρ., τιμή η οποία αν και διέφερε σημαντικά από την αντίστοιχη των καρπών της ελεύθερης επικονίασης (≈ 174 γρ.), ωστόσο αποτελεί μια εμπορικά αποδεκτή τιμή νωπού βάρους καρπού για το ακτινίδιο. Αξίζει επίσης να επισημανθεί, ότι το μέσο βάρος των καρπών αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας «Tsechelidis» ήταν μεγαλύτερο ακόμα και από το μέσο βάρος των καρπών ανοιχτής επικονίασης της ποικιλίας «Hayward». Στο σημείο αυτό θα πρέπει ωστόσο να αναφερθεί, ότι οι καρποί της ποικιλίας «Tsechelidis» που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση, παρουσίασαν μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς το βάρος και το μέγεθος τους, γεγονός που υποδεικνύεται από τις υψηλές τιμές της τυπικής απόκλισης, οι οποίες ήταν σχεδόν διπλάσιες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των καρπών ελεύθερης επικονίασης, για το σύνολο των χαρακτηριστικών που μετρήθηκαν (Πιν.2). Πιο συγκεκριμένα, το νωπό βάρος για τους καρπούς της ποικιλίας «Tsechelidis», που προήλθαν από αυτογονιμοποιήσεις ανθέων στον αγρό I, κυμάνθηκε από 19,2γρ. έως 188,6γρ. για το έτος 2008. Το αντίστοιχο εύρος για το νωπό βάρος των καρπών αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας «Hayward» ήταν σαφώς μικρότερο και κυμάνθηκε από 13,7γρ. έως 65,8γρ., με μέση τιμή 45,6γρ. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι κανένας καρπός αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας «Hayward» δεν είχε το εμπορικά αποδεκτό βάρος και σχήμα, καθώς οι συγκεκριμένοι καρποί

ήταν στο σύνολο τους μικρού μεγέθους και παραμορφωμένοι, και απέκλιναν σημαντικά από το χαρακτηριστικό σχήμα καρπού της συγκεκριμένης ποικιλίας.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των ποικιλιών «Tsechelidis» και «Hayward» για τη καλλιεργητική περίοδο 2008, τόσο για τους καρπούς της ελεύθερης επικονίασης, όσο και για τους καρπούς των αυτογονιμοποιήσεων στον αγρό I, επαληθεύτηκαν από τα αποτελέσματα της δεύτερης καλλιεργητικής περιόδου (2010), όπως φαίνεται στον πίνακα 3 που ακολουθεί.

Πίνακας 3. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση για νωπό βάρος και διαστάσεις καρπών των ποικιλιών Tsechelidis και Hayward κατά το έτος 2010.

ΑΓΡΟΣ I					
Ποικιλία	Μέθοδος επικονίασης	Νωπό Βάρος (g)	Μήκος (cm)	Πλάτος Μεγάλο (cm)	Πλάτος Μικρό (cm)
Tsechelidis	Ελεύθερη	159,31 ± 29,90	7,98 ± 0,68	5,95 ± 0,40	4,99 ± 0,37
	Αυτογονιμοποίηση	113,44 ± 45,59	6,23 ± 1,30	5,18 ± 0,71	4,47 ± 0,61
Hayward	Ελεύθερη	103,43 ± 22,50	6,95 ± 0,66	5,59 ± 0,55	4,84 ± 0,31
	Αυτογονιμοποίηση	45,47 ± 14,24	4,28 ± 1,08	4,20 ± 0,66	3,76 ± 0,54
Στατιστική Ανάλυση					
Ποικιλία (F)		*	*	*	*
		41,84	34,35	23,42	32,12
Μέθοδος (F)		*	*	*	*
		27,56	30,24	32,75	17,29

(*p = 0,05)

Σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν για το σύνολο των χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν, τόσο μεταξύ των ποικιλιών «Tsechelidis» και «Hayward», όσο και μεταξύ των καρπών της κάθε ποικιλίας για τις δύο διαφορετικές μεθόδους επικονίασης (Πιν.3). Το μέσο νωπό βάρος των καρπών της ελεύθερης επικονίασης για την ποικιλία «Tsechelidis» ήταν 159,31γρ. και διέφερε σημαντικά από το αντίστοιχο μέσο βάρος των καρπών της ποικιλίας «Hayward», που ήταν

103,43γρ. Σημαντικά διέφεραν επίσης και τα αντίστοιχα βάρη των καρπών που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση των δύο ποικιλιών. Το μέσο βάρος για την ποικιλία «Tsechelidis» ήταν 113,44γρ., τιμή που ξεπερνά και πάλι το όριο της εμπορικά αποδεκτής τιμής νωπού βάρους για το ακτινίδιο, το οποίο ορίζεται περίπου στα 90γρ. Αξίζει επίσης να επισημανθεί, ότι για δεύτερη χρονιά το μέσο βάρος των καρπών αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας «Tsechelidis» ήταν μεγαλύτερο ακόμα και από το μέσο βάρος των καρπών ανοιχτής επικονίασης της ποικιλίας «Hayward». Ωστόσο, στα ίδια υψηλά επίπεδα διατηρήθηκε και η παραλλακτικότητα μεταξύ των καρπών αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας «Tsechelidis», με αποτέλεσμα το νωπό βάρος των καρπών να κυμαίνεται από 30,6γρ έως 184,7γρ. Το αντίστοιχο εύρος για το νωπό βάρος των καρπών αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας «Hayward» ήταν σαφώς μικρότερο και κυμάνθηκε από 19γρ. έως 68,1γρ., με μέση τιμή 45,47γρ.

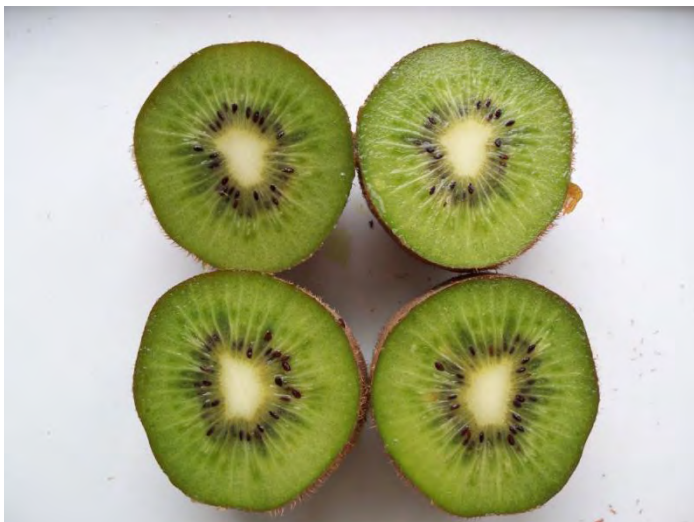
Σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν και για το σύνολο των διαστάσεων του καρπού που μετρήθηκαν (μήκος, μικρό και μεγάλο πλάτος). Οι καρποί ελεύθερης επικονίασης της ποικιλίας «Tsechelidis» είχαν σημαντικά μεγαλύτερο μήκος από τους αντίστοιχους καρπούς της ποικιλίας «Hayward». Το ιδιαίτερα μεγάλο μήκος καρπού (σχεδόν 8εκ.) προσδίδει και το χαρακτηριστικό κυλινδρικό σχήμα των καρπών της ποικιλίας «Tsechelidis» (Εικ.1). Οι καρποί της εν λόγω ποικιλίας που προέκυψαν έπειτα από αυτογονιμοποίηση, παρουσίασαν μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς το σχήμα και τις διαστάσεις τους (Εικ.2). Υπήρξαν ωστόσο και περιπτώσεις καρπών αυτογονιμοποίησης, οι οποίοι λόγω της πλήρους και φυσιολογικής τους ανάπτυξης, ομοιάζαν πολύ με τους καρπούς της ελεύθερης επικονίασης και δεν διακρίνονταν οπτικά. Αντίθετα, στην περίπτωση της ποικιλίας «Hayward», όλοι οι καρποί που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση είχαν περιορισμένη ανάπτυξη και παραμορφωμένο σχήμα και κατά συνέπεια απέκλιναν σημαντικά από τους καρπούς της ελεύθερης επικονίασης (Εικ. 5 και 6).



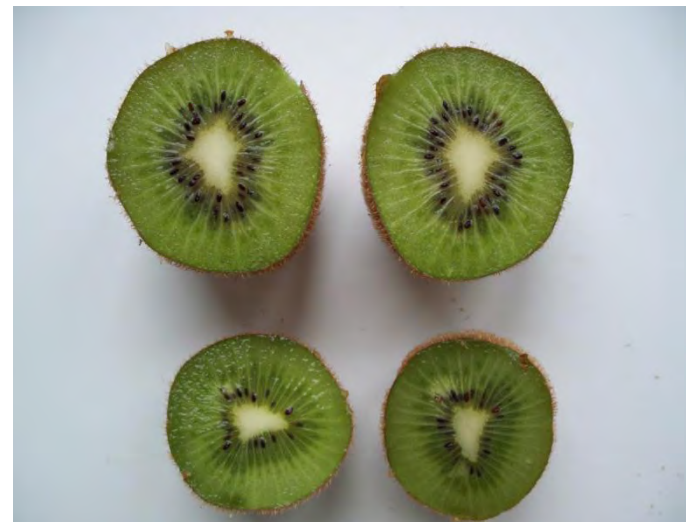
Εικ.12 Καρποί ελεύθερης επικονίασης της ποικιλίας Tsechelidis.



Εικ.13 Καρποί αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας Tsechelidis.



Εικ.14 Καρποί ελεύθερης επικονίασης της ποικιλίας Tsechelidis σε τομή



Εικ.15 Καρποί αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας Tsechelidis σε τομή.



Εικ.16 Καρποί ελεύθερης επικονίασης της ποικιλίας Hayward.



Εικ.17 Καρποί αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας Hayward.

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μετρήσεων των καρπών της ποικιλίας «Tschelidis», για τους τρεις πειραματικούς αγρούς, κατά την καλλιεργητική περίοδο 2008. Από την ανάλυση των δεδομένων προέκυψαν σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των καρπών ελεύθερης επικονίασης και αυτογονιμοποίησης σε κάθε αγρό, όσο και μεταξύ των καρπών διαφορετικών αγρών, για την ίδια μέθοδο επικονίασης.

Συγκεκριμένα, ο αγρός I παρουσίασε τη μεγαλύτερη μέση τιμή νωπού βάρους, τόσο για τους καρπούς της ελεύθερης επικονίασης (173,85γρ.), όσο για τους καρπούς που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση (114,99γρ.), συγκριτικά με τους αγρούς II και III. Ειδικά για τους καρπούς αυτογονιμοποίησης, το μέσο βάρος στον αγρό II ήταν 67,44γρ. και 73,28γρ. στον αγρό III, αντίστοιχα.

Πίνακας 4. Μέσοι όροι και τυπική απόκλιση για νωπό βάρος και διαστάσεις καρπών της ποικιλίας Tschelidis, για 2 μεθόδους επικονίασης και στους 3 πειραματικούς αγρούς, κατά το έτος 2008

TSCHELIDIS					
Μέθοδος επικονίασης	Αγρός	Νωπό Βάρος (g)	Μήκος (cm)	Πλάτος Μεγάλο (cm)	Πλάτος Μικρό (cm)
Ελεύθερη επικονίαση	I	173,85 ± 24,21	7,86 ± 0,51	5,56 ± 0,28	5,1 ± 0,3
	II	126,48 ± 18,86	6,87 ± 0,44	5,18 ± 0,31	4,82 ± 0,22
	III	105,29 ± 24,89	6,28 ± 0,39	5,16 ± 0,36	4,95 ± 0,36
Αυτογονιμοποίηση	I	114,99 ± 50,49	6,2 ± 1,38	5,11 ± 0,73	4,67 ± 0,71
	II	67,44 ± 35,16	4,96 ± 1,36	4,35 ± 0,71	3,98 ± 0,63
	III	73,28 ± 40,63	5,48 ± 1,49	4,39 ± 1	3,86 ± 0,67
Στατιστική Ανάλυση					
Μέθοδος (F)		**	**	**	**
		52,16	47,85	34,7	35,7
Αγρός (F)		**	*	ns	ns
		42,51	24,01		

Υπενθυμίζεται ωστόσο ότι ο αγρός II παρουσίασε γενικότερα καλύτερη εικόνα όσο αφορά την επιτυχία των αυτογονιμοποιήσεων σε σχέση με τον αγρό III, όπως έχει ήδη αναφερθεί (βλ. Κεφ. Αποτελέσματα, παράγραφος 1.1), καθώς και το σύνολο των 15 επιλεγμένων πρέμνων απέδωσαν καρπούς αυτογονιμοποίησης. Κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση του αγρού III, όπου μόλις 4 από τα 15 επιλεγμένα πρέμνα απέδωσαν καρπούς αυτογονιμοποίησης, με μέγιστο αριθμό 2 καρπούς ανά πρέμνο. Επομένως, το δείγμα από το οποίο υπολογίστηκε η μέση τιμή του βάρους και των διαστάσεων του καρπού στον αγρό III, ήταν σημαντικά μικρότερο συγκριτικά με το αντίστοιχο δείγμα του αγρού II. Ανεξάρτητα πάντως από τον συνολικό αριθμό των παραγόμενων καρπών σε κάθε αγρό, έντονη παραλλακτικότητα παρατηρήθηκε μεταξύ των καρπών αυτογονιμοποίησης σε κάθε πειραματικό αγρό, όπως αποδεικνύεται και από τις αντίστοιχες υψηλές τιμές της τυπικής απόκλισης. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το νωπό βάρος για τους καρπούς αυτογονιμοποίησης κυμάνθηκε από 34,1γρ. έως 184,7γρ. στον αγρό I, από 9,7γρ. έως 128,1γρ. στον αγρό II και από 36,6γρ. έως 112,5γρ. στον αγρό III.

Αναφορικά με τις διαστάσεις των καρπών, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν, για το σύνολο των διαστάσεων που μετρήθηκαν, μεταξύ των καρπών ελεύθερης επικονίασης και των καρπών αυτογονιμοποίησης σε κάθε αγρό. Ο αγρός I παρουσίασε τις μεγαλύτερες τιμές διαστάσεων, τόσο για τους καρπούς της ελεύθερης επικονίασης, όσο και για τους καρπούς αυτογονιμοποίησης και διέφερε σημαντικά από τους αγρούς II και III. Το πλάτος των καρπών δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ των τριών αγρών για τους καρπούς που προήλθαν από την ίδια μέθοδο επικονίασης.

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μετρήσεων των καρπών της ποικιλίας «Tschelidis», για τους τρεις πειραματικούς αγρούς, κατά την καλλιεργητική περίοδο 2010.

Πίνακας 5. Μέσοι όροι και τυπική απόκλιση για νωπό βάρος και διαστάσεις καρπών της ποικιλίας Tsechelidis, για 2 μεθόδους επικονίασης και στους 3 πειραματικούς αγρούς, κατά το έτος 2010.

TSECHELIDIS					
Μέθοδος επικονίασης	Αγρός	Νωπό Βάρος (g)	Μήκος (cm)	Πλάτος Μεγάλο (cm)	Πλάτος Μικρό (cm)
Ελεύθερη επικονίαση	I	159,31 ± 29,90	7,98 ± 0,68	5,95 ± 0,40	4,99 ± 0,37
	II	118,31 ± 23,53	7,09 ± 0,66	5,36 ± 0,39	4,73 ± 0,40
	III	114,73 ± 21,64	6,90 ± 0,70	5,33 ± 0,43	4,74 ± 0,40
Αυτογονιμοποίηση	I	113,44 ± 45,59	6,23 ± 1,30	5,18 ± 0,71	4,47 ± 0,61
	II	83,66 ± 26,36	5,83 ± 0,85	4,81 ± 0,52	4,14 ± 0,55
	III	85,02 ± 25,90	6,03 ± 0,73	4,94 ± 0,44	4,48 ± 0,41
Στατιστική Ανάλυση					
Μέθοδος (F)		*	*	*	*
		43,17	29,20	31,25	28,79
Αγρός (F)		*	ns	ns	ns
		28,83			

(*p = 0,05)

Από την ανάλυση των δεδομένων της δεύτερης χρονιάς προέκυψαν σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των καρπών ελεύθερης επικονίασης και αυτογονιμοποίησης σε κάθε αγρό, όσο και μεταξύ των καρπών διαφορετικών αγρών, για την ίδια μέθοδο επικονίασης. Συγκεκριμένα, ο αγρός I παρουσίασε τη μεγαλύτερη μέση τιμή νωπού βάρους για τους καρπούς της ελεύθερης επικονίασης (159,31γρ.), συγκριτικά με τους αγρούς II (118,31γρ.) και III (114,73γρ.). Όσο αφορά τους καρπούς αυτογονιμοποίησης, ο αγρός I υπερέχει έναντι των αγρών II και III, με μέση τιμή νωπού βάρους 113,44γρ. Οι αγροί II και III είχαν μέση τιμή νωπού βάρους 83,66γρ. και 85,02γρ. αντίστοιχα, τιμές οι οποίες διέφεραν σημαντικά από τη μέγιστη μέση τιμή (αγρός I). Εντούτοις, δεν παραβλέπεται το γεγονός ότι μεμονωμένα αποτελούν αρκετά ικανοποιητικές τιμές βάρους για τον καρπό του ακτινιδίου. Η έντονη παραλλακτικότητα μεταξύ

των καρπών αυτογονιμοποίησης του κάθε αγρού που παρατηρήθηκε το 2008, διατηρήθηκε και τη δεύτερη χρονιά, καθώς οι τιμές της τυπικής απόκλισης παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα και το 2010. Συγκεκριμένα, στον αγρό I το εύρος τιμών για το νωπό βάρος των καρπών αυτογονιμοποίησης κυμάνθηκε από 30,6γρ. έως 173,6γρ. Αντίστοιχα, στον αγρό II κυμάνθηκε από 25,8γρ. έως 128,9γρ. και στον αγρό III από 50,8γρ. έως 134,8γρ.

Σημαντικές διαφορές βρέθηκαν για το σύνολο των διαστάσεων που μετρήθηκαν μεταξύ καρπών ελεύθερης επικονίασης και αυτογονιμοποίησης σε κάθε αγρό. Μεταξύ των αγρών ωστόσο, για την ίδια μέθοδο επικονίασης, δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές για τα χαρακτηριστικά αυτά.

2. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΚΑΡΠΩΝ

2.1 Ποιοτικά χαρακτηριστικά καρπών

Οι καρποί που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση υποβλήθηκαν σε περαιτέρω ποιοτικό έλεγχο. Για τις αναλύσεις επιλέχθηκαν μόνο οι καρποί των οποίων το βάρος ξεπερνούσε τα 60γρ. για την ποικιλία «Tsechelidis», ενώ για την ποικιλία «Hayward» δεν έγινε καμία επιλογή, καθώς ο συνολικός αριθμός των καρπών ήταν πολύ μικρός και μόλις 2 καρποί ξεπερνούσαν τα 50γρ. Ως μάρτυρες για τη κάθε ποικιλία χρησιμοποιήθηκαν καρποί ανοιχτής επικονίασης. Οι αναλύσεις αφορούσαν τους καρπούς που παρήχθησαν το 2010. Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις για τα κυριότερα χαρακτηριστικά ποιότητας καρπού, για τις ποικιλίες «Tsechelidis» και «Hayward», στον πειραματικό αγρό I.

Αναφορικά με τη σκληρότητα σάρκας, σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν τόσο μεταξύ των δύο ποικιλιών, για ορισμένη μέθοδο επικονίασης, όσο και εντός της κάθε ποικιλίας, μεταξύ διαφορετικών μεθόδων επικονίασης (πιν. 1). Ειδικότερα για τους καρπούς της ελεύθερης επικονίασης, η μέση τιμή σκληρότητας σάρκας ήταν 9,8kgF για την ποικιλία «Hayward» και υπερέιχε έναντι της αντίστοιχης τιμής (8,2kgF) της ποικιλίας «Tsechelidis». Στους καρπούς που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση ωστόσο, η υπεροχή όσο αφορά τη σκληρότητα σάρκας ανατράπηκε, καθώς η ποικιλία «Tsechelidis» παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη τιμή (9,4kgF) σε σχέση με την ποικιλία «Hayward» (6,0kgF). Η σκληρότητα σάρκας αποτελεί σημαντικό παράγοντα της ποιότητας του ακτινιδίου, καθώς σχετίζεται άμεσα με την ωρίμανση του καρπού και τον χρόνο αποθήκευσης του. Επομένως, για την εξασφάλιση υψηλής ποιότητας και μακράς συντηρησιμότητας των καρπών, είναι επιθυμητό κατά τη συγκομιδή οι καρποί να έχουν σκληρότητα σάρκας ≥ 8 kgF.

Πίνακας 1. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση για χαρακτηριστικά ποιότητας καρπού των ποικιλιών Tsechelidis και Hayward και για δύο μεθόδους επικονίασης

ΑΓΡΟΣ Ι				
Ποικιλία	Μέθοδος επικονίασης	Σκληρότητα Σάρκας (KgF)	Σ.Δ.Σ. (%)	Οξύτητα (%)
Tsechelidis	Ελεύθερη	8,2 ± 0,35	13,2 ± 0,84	1,29 ± 0,13
	Αυτογονιμοποίηση	9,4 ± 0,34	13,7 ± 0,92	2,94 ± 2,2
Hayward	Ελεύθερη	9,8 ± 0,22	12,13 ± 0,61	1,09 ± 0,20
	Αυτογονιμοποίηση	6,0 ± 0,27	10,37 ± 0,82	0,87 ± 0,18
Στατιστική Ανάλυση				
Ποικιλία (F)		*	*	*
		4,28	64,06	4,26
Μέθοδος (F)		*	ns	*
		3,88		4,31

(*p = 0,05)

Πίνακας 2. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση για χαρακτηριστικά ποιότητας καρπού των ποικιλιών Tsechelidis και Hayward και για δύο μεθόδους επικονίασης

ΑΓΡΟΣ Ι				
Ποικιλία	Μέθοδος επικονίασης	Φαινολικά (mg/100ml)	Ξηρή Ουσία (%)	pH
Tsechelidis	Ελεύθερη	12,37 ± 1,16	17,35 ± 0,48	3,66 ± 0,10
	Αυτογονιμοποίηση	10,35 ± 5,99	17,99 ± 2,36	3,83 ± 0,26
Hayward	Ελεύθερη	10,38 ± 0,73	15,30 ± 0,57	3,71 ± 0,12
	Αυτογονιμοποίηση	6,76 ± 2,34	15,42 ± 1,53	3,28 ± 0,11
Στατιστική Ανάλυση				
Ποικιλία (F)		*	*	ns
		19,28	43,03	
Μέθοδος (F)		*	ns	ns
		23,48		

(*p = 0,05)

Συγκρίνοντας τις τιμές για το εν λόγω χαρακτηριστικό ποιότητας σε κάθε ποικιλία, για καρπούς που προήλθαν από διαφορετική μέθοδο αυτογονιμοποίησης, προκύπτει ότι οι καρποί αυτογονιμοποίησης υπερείχαν έναντι των καρπών της ελεύθερης επικονίασης στην περίπτωση της ποικιλίας «Tsechelidis». Ανεξάρτητα όμως από τη μέθοδο επικονίασης των καρπών, οι καρποί της ποικιλίας «Tsechelidis» παρουσίασαν σε κάθε περίπτωση υψηλή σκληρότητα σάρκας κατά τη συγκομιδή. Αντίθετα, στην περίπτωση της ποικιλίας «Hayward» οι καρποί ελεύθερης επικονίασης παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερη σκληρότητα σάρκας (9,8kgF) σε σχέση με τους καρπούς αυτογονιμοποίησης (6,0kgF), των οποίων η μέση τιμή ήταν αρκετά χαμηλότερη από το επιθυμητό όριο.

Η συγκέντρωση των στερεών διαλυτών συστατικών (Δ.Σ.Σ. %) διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ των δύο ποικιλιών, για κάθε μέθοδο επικονίασης (πιν. 1). Συγκεκριμένα, η ποικιλία «Tsechelidis» είχε υψηλότερη περιεκτικότητα διαλυτών στερεών, τόσο στους καρπούς της ελεύθερης επικονίασης (13,2%), όσο και στους καρπούς της αυτογονιμοποίησης (13,7%) σε σχέση με την ποικιλία «Hayward», της οποίας οι καρποί είχαν συγκεντρώσεις 12,13% και 10,37% αντίστοιχα. Σημαντικές διαφορές δεν προέκυψαν εντός των ποικιλιών, μεταξύ διαφορετικών μεθόδων επικονίασης, γεγονός που υποδηλώνει πως οι καρποί που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση δεν υστερούσαν σε συγκέντρωση διαλυτών στερεών, έναντι των καρπών της ανοιχτής επικονίασης. Η συγκέντρωση των διαλυτών στερεών συστατικών αυξάνει με την ωρίμανση του καρπού, επηρεάζοντας την τελική του γεύση. Ειδικότερα για το ακτινίδιο, απαιτείται συγκέντρωση διαλυτών στερεών $\geq 14\%$, με βάση την αποδοχή του καταναλωτικού κοινού (Burdon *et al.*, 2004). Η συγκέντρωση των καρπών της ποικιλίας «Tsechelidis», ανεξαρτήτως μεθόδου επικονίασης, ήταν αρκετά κοντά στο επιθυμητό όριο, και καθώς οι μετρήσεις δεν διεξήχθησαν σε πλήρως ώριμους καρπούς, ενδεχομένως κατά την πλήρη ωρίμανση τους να έφταναν ή ακόμα και να ξεπερνούσαν το όριο αυτό.

Αναφορικά με την οξύτητα των καρπών, σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν τόσο μεταξύ των δύο ποικιλιών, για ορισμένη μέθοδο επικονίασης, όσο και εντός της κάθε ποικιλίας, μεταξύ διαφορετικών μεθόδων επικονίασης (πιν. 1). Συγκεκριμένα, η ποικιλία «Tsechelidis» είχε μεγαλύτερες τιμές οξύτητας, τόσο στους καρπούς της ελεύθερης επικονίασης, όσο και στους καρπούς αυτογονιμοποίησης, σε σχέση με τους αντίστοιχους καρπούς της ποικιλίας «Hayward». Την υψηλότερη οξύτητα παρουσίασαν οι καρποί αυτογονιμοποίησης (2,94%) της ποικιλίας «Tsechelidis», ενώ τη μικρότερη τιμή οι αντίστοιχοι καρποί της ποικιλίας «Hayward» (0,87%). Η γεύση στο ακτινίδιο καθορίζεται από την αναλογία των διαλυτών στερεών και της οξύτητας, επομένως η υψηλή οξύτητα της ποικιλίας «Tsechelidis», σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση σε διαλυτά στερεά συστατικά, προσδίδει πιο έντονη γεύση στους καρπούς της εν λόγω ποικιλίας.

Οι καρποί της ποικιλίας «Tsechelidis» είχαν σημαντικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε συνολικά φαινολικά και στις δύο μεθόδους επικονίασης (πιν.6). Αξίζει να σημειωθεί ότι η περιεκτικότητα σε φαινολικά των καρπών αυτογονιμοποίησης (10,35mg) της ποικιλίας «Tsechelidis», ήταν σαφώς μεγαλύτερη έναντι της περιεκτικότητας των αντίστοιχων καρπών (6,76mg) της ποικιλίας «Hayward» και σχεδόν ίση με την περιεκτικότητα των καρπών ελεύθερης επικονίασης (10,38mg).

Το ποσοστό της ξηρής ουσίας διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ των δύο ποικιλιών, για κάθε μέθοδο επικονίασης. Οι καρποί της ποικιλίας «Tsechelidis» είχαν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ξηρής ουσίας σε σχέση με τους καρπούς της ποικιλίας «Hayward» (πιν. 2). Συγκεκριμένα, όσο αφορά τους καρπούς της ελεύθερης επικονίασης, το ποσοστό της ξηρής ουσίας ήταν 17,35% για την ποικιλία «Tsechelidis» και 15,3% για την ποικιλία «Hayward», ενώ για τους καρπούς αυτογονιμοποίησης ήταν 17,99% και 15,42% αντίστοιχα. Διαφορές δεν εντοπίστηκαν εντός των ποικιλιών και μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων επικονίασης, καθώς οι καρποί που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση δεν

υστερούσαν σε περιεκτικότητα ξηρής ουσίας σε σχέση με τους καρπούς της ανοιχτής επικονίασης.

Στους πίνακες 3 και 4 παρουσιάζονται συνολικά τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των καρπών της ποικιλίας «Tsechelidis», στους τρεις πειραματικούς αγρούς. Σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν τόσο σε επίπεδο αγρού, για ορισμένη μέθοδο επικονίασης, όσο και εντός του κάθε αγρού, μεταξύ των καρπών αυτογονιμοποίησης και ανοιχτής επικονίασης, για την πλειοψηφία των ποιοτικών χαρακτηριστικών που μετρήθηκαν. Συγκεκριμένα, όσο αφορά τη σκληρότητα της σάρκας, οι καρποί του αγρού I είχαν σημαντικά υψηλότερη τιμή σε σχέση με τους καρπούς των αγρών II και III, ανεξαρτήτως της μεθόδου επικονίασης (πιν. 3). Ο αγρός II είχε τις μικρότερες τιμές, τόσο για τους καρπούς της ελεύθερης επικονίασης (6,3KgF), όσο και για τους καρπούς της αυτογονιμοποίησης (5,5 KgF). Αναφορικά με τη συγκέντρωση των διαλυτών στερεών συστατικών, δεν υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των καρπών αυτογονιμοποίησης και ελεύθερης επικονίασης, καθώς όλες οι συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν σε ικανοποιητικά επίπεδα. Διαφορές εντοπίστηκαν ωστόσο σε επίπεδο αγρού, για καρπούς που προήλθαν από την ίδια μέθοδο επικονίασης. Στην περίπτωση της ελεύθερης επικονίασης, τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε διαλυτά στερεά κατείχαν οι καρποί του αγρού III (13,33%), ενώ στην περίπτωση της αυτογονιμοποίησης, τη μέγιστη τιμή είχαν οι καρποί του αγρού I (13,7%).

Πίνακες 3-4. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση για χαρακτηριστικά ποιότητας καρπού της ποικιλίας Tsechelidis σε τρεις πειραματικούς αγρούς και για δύο μεθόδους επικοινωνίας

TSECHELIDIS				
Μέθοδος επικοινωνίας	Αγρός	Σκληρότητα Σάρκας (KgF)	Σ.Δ.Σ. (%)	Οξύτητα (%)
Ελεύθερη επικοινωνία	I	8,2 ± 0,35	13,2 ± 0,84	1,29 ± 0,13
	II	6,3 ± 0,16	13,16 ± 0,83	1,11 ± 0,09
	III	6,9 ± 0,21	13,33 ± 0,69	1,27 ± 0,10
Αυτογονιμοποίηση	I	9,4 ± 0,34	13,7 ± 0,92	2,94 ± 2,2
	II	5,5 ± 0,13	12,82 ± 0,78	0,92 ± 0,2
	III	6,1 ± 0,17	12,93 ± 0,81	1,16 ± 0,17
Στατιστική Ανάλυση				
Μέθοδος (F)		*	ns	*
		6,96		14,79
Αγρός (F)		*	*	*
		17,10	28,21	10,1

(*p = 0,05)

TSECHELIDIS				
Μέθοδος επικοινωνίας	Αγρός	Φαινολικά (mg/100ml)	Ξηρή Ουσία (%)	pH
Ελεύθερη επικοινωνία	I	12,37 ± 1,16	17,35 ± 0,48	3,66 ± 0,10
	II	15,03 ± 1,87	16,05 ± 0,53	3,50 ± 0,16
	III	11,66 ± 1,37	16,78 ± 1,05	3,51 ± 0,12
Αυτογονιμοποίηση	I	10,35 ± 5,99	17,99 ± 2,36	3,83 ± 0,26
	II	13,29 ± 1,82	16,31 ± 4,82	3,54 ± 0,20
	III	10,71 ± 0,73	17,54 ± 2,71	3,61 ± 0,19
Στατιστική Ανάλυση				
Μέθοδος (F)		*	*	ns
		12,88	10,12	
Αγρός (F)		*	*	ns
		19,61	7,75	

Όσο αφορά την οξύτητα των καρπών, σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν τόσο μεταξύ των τριών αγρών, για ορισμένη μέθοδο επικοινωνίας, όσο και εντός του κάθε αγρού, για καρπούς που προήλθαν από διαφορετική μέθοδο επικοινωνίας (πιν. 3). Ο αγρός II είχε τη χαμηλότερη οξύτητα, τόσο για τους καρπούς της ανοιχτής επικοινωνίας (1,11%), όσο και για τους καρπούς της αυτογονιμοποίησης (0,92%). Η οξύτητα των καρπών σχετίζεται άμεσα με τη γεύση τους, και ειδικότερα στο ακτινίδιο η γεύση καθορίζεται από το λόγο της συγκέντρωσης των διαλυτών στερεών προς την οξύτητα του καρπού. Καθώς λοιπόν οι καρποί του αγρού II είχαν παράλληλα και τις μικρότερες συγκεντρώσεις σε διαλυτά στερεά συστατικά, ενδεχομένως να μην επηρεάζεται σημαντικά η τελική αναλογία και κατ' επέκταση, να μην διαφοροποιείται έντονα η γεύση των καρπών αυτών σε σχέση με τους καρπούς των αγρών I και III.

Οι καρποί που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση, είχαν γενικά μικρότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά, σε σχέση με τους καρπούς της ελεύθερης επικοινωνίας, ανεξαρτήτως αγρού. Τις μέγιστες τιμές κατείχαν οι καρποί του αγρού II και στις δύο μεθόδους επικοινωνίας. Αξίζει μάλιστα να σημειωθεί, ότι η περιεκτικότητα σε φαινολικά των καρπών αυτογονιμοποίησης (13,29mg) του αγρού II, αν και ήταν μικρότερη σε σχέση με τη συγκέντρωση των καρπών ελεύθερης επικοινωνίας (15,03 mg) του ίδιου αγρού, εντούτοις υπερείχε έναντι της περιεκτικότητας των καρπών των αγρών I και III, ανεξαρτήτως της μεθόδου επικοινωνίας (πιν. 4).

Αναφορικά με την περιεκτικότητα των καρπών σε ξηρή ουσία, σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν τόσο μεταξύ των τριών αγρών, όσο και εντός του κάθε αγρού, για διαφορετική μέθοδο επικοινωνίας. Ωστόσο, η περιεκτικότητα σε ξηρή ουσία κυμάνθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα για το σύνολο των καρπών, ανεξαρτήτου κατηγορίας. Μεταξύ των καρπών της ελεύθερης επικοινωνίας, το υψηλότερο ποσοστό κατείχαν οι καρποί του αγρού I (17,35%), ενώ για τους καρπούς αυτογονιμοποίησης, υψηλότερη περιεκτικότητα είχαν και πάλι οι καρποί του αγρού I (17,99%).

2.2 Συσχέτιση βάρους καρπών και αριθμού σπερμάτων

Στο ακτινίδιο έχει βρεθεί ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στο βάρος των καρπών και του αριθμού των σπερμάτων (σπόρων) που περιέχουν. Συγκεκριμένα αναφέρεται ότι απαιτείται αριθμός σπόρων > 1000 για ένα ικανοποιητικό τελικό βάρος καρπού (Gonzalez *et al.*, 1998). Για να επιτευχθεί αυτό ωστόσο, είναι απαραίτητο ένα αποτελεσματικό σύστημα επικονίασης. Οι McPherson *et al.* (2001) μελέτησαν τους παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος του καρπού σε πρέμνα της ποικιλίας «Hayward» και εντόπισαν θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του βάρους καρπού και του αριθμού των σπόρων του, με συντελεστή συσχέτισης που κυμαινόταν από 0,71 έως 0,83. Οι συσχετίσεις αυτές αφορούσαν καρπούς που προέκυψαν από ελεύθερη επικονίαση, με τη συμβολή ποικιλίας επικονιαστή. Καθώς λοιπόν, στην παρούσα διδακτορική έρευνα κατέστη για πρώτη φορά δυνατή η παραγωγή καρπών ακτινιδίου έπειτα από αυτογονιμοποίηση μιας θεωρητικά θηλυκής ποικιλίας (Tsechelidis), κρίθηκε ενδιαφέρον να διερευνηθεί στην περίπτωση αυτή, η ύπαρξη γραμμικής συσχέτισης μεταξύ του βάρους καρπών και του αριθμού των σπερμάτων.

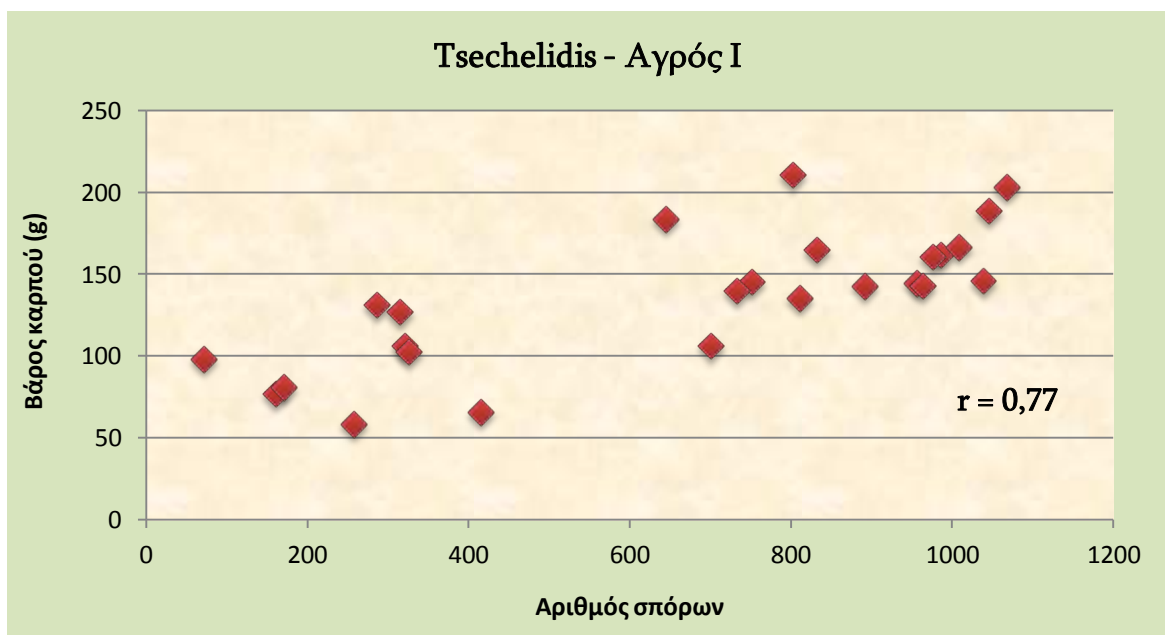
Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται ο αριθμός σπόρων ανά καρπό και το νωπό βάρος όλων των καρπών αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας «Tsechelidis», στους τρεις πειραματικούς αγρούς. Ο συντελεστής συσχέτισης στον αγρό I ήταν 0,77 και 0,73 στον αγρό II, επιβεβαιώνοντας τη γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων του καρπού και στην περίπτωση της αυτογονιμοποίησης. Καρποί με ιδιαίτερα μεγάλο βάρος (>100 γρ.) είχαν και σημαντικά αυξημένο αριθμό σπερμάτων, ο οποίος άγγιζε ή και ξεπερνούσε τους 1000 σπόρους/ καρπό. Το δείγμα των καρπών αυτογονιμοποίησης για τον αγρό III ήταν πολύ μικρό (μόλις 3 καρποί) και επομένως οποιαδήποτε εκτίμηση συσχέτισης, βασιζόμενη σε τόσο μικρό δείγμα τιμών, κρίνεται επισφαλής. Όμως και σε αυτήν την περίπτωση, καρποί με νωπό βάρος >100 γρ. περιείχαν >1000 σπόρους.

Πίνακας 5. Αριθμός σπόρων και βάρος καρπού για τους καρπούς αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας “Tsechelidis” σε τρεις πειραματικούς αγρούς.

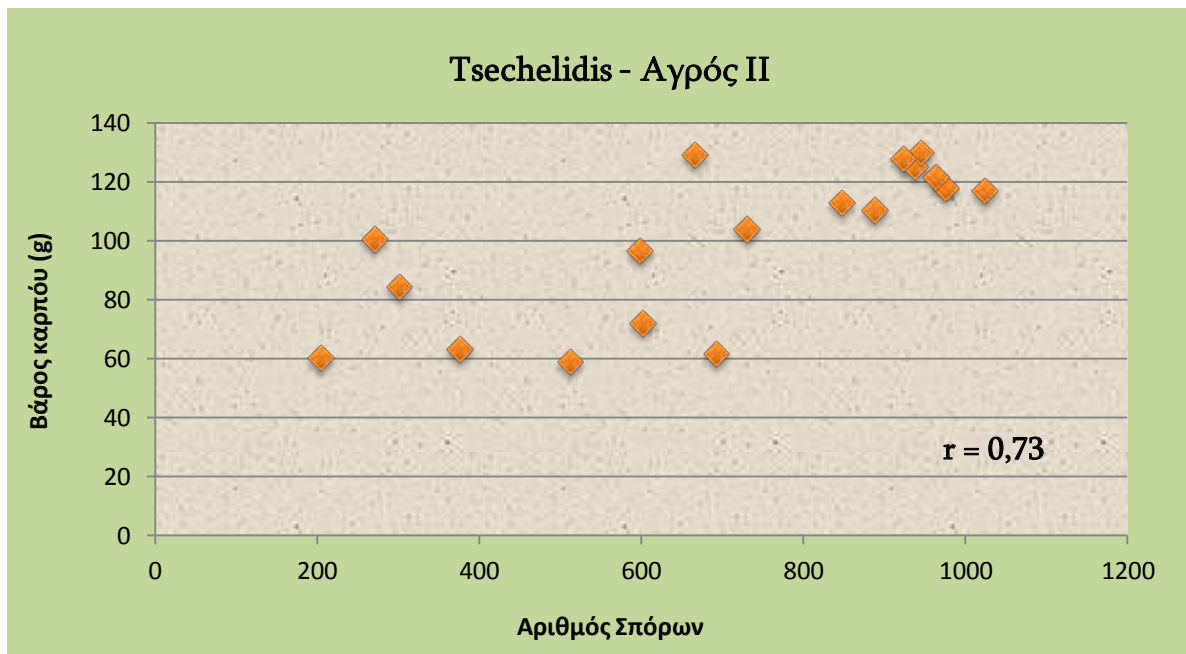
TSECHELIDIS							
Αγρός	Πρέμνο	Καρποί αυτογ.	Βάρος 100 σπόρων (γρ.)	Συνολικό Βάρος σπόρων (γρ.)	Αριθμός σπόρων	Μ.Ο. αριθμού σπόρων	Βάρος καρπού (γρ.)
I	1	1	0,142	1,475	1038,73	875,46 ± 176,96	146,1
		2	0,15	1,479	986		161,9
		3	0,158	1,315	832,28		165
		4	0,154	0,993	644,81		183,6
	2	1	139	1,454	1046,04	728,53 ± 569,55	188,6
		2	0,124	1,325	1068,55		203,3
		3	152	-	71		98,2
	3	1	0,16	1,284	802,5	603,37 ± 359,52	210,5
		2	0,152	1,534	1009,21		166,4
		3	0,153	0,501	315,09		127,1
		4	0,165	0,473	286,66		131,4
	4	1	0,153	1,494	976,47	568,74 ± 576,62	160,5
		2	0,167	0,267	161		76,9
	5	1	0,112	0,785	700,89	558,02 ± 202,05	106,1
		2	0,132	0,548	415,15		65,4
	6	1	0,148	1,415	956,08	534,3 ± 365,28	144,5
		2	0,15	0,481	320,66		106,1
		3	0,149	0,486	326,17		102,7
	7	1	0,167	1,255	751,5	716,25 ± 318,29	145,1
		2	0,156	1,391	891,66		142,6
		3	0,154	1,485	964,28		143
		4	0,165	0,425	257,57		58,5
	9	1	0,132	0,968	733,33	452,16 ± 397,63	140
		2	0,162	0,277	170,99		80,7
	10	1	0,158	1,283	812,02	-	135

Αγρός	Πρέμνο	Καρποί αυτού.	Βάρος 100 σπόρων (γρ.)	Συνολικό Βάρος σπόρων (γρ.)	Αριθμός σπόρων	Μ.Ο. αριθμού σπόρων	Βάρος καρπού (γρ.)
II	3	1	0,145	1,484	1023,45	866,05 ± 233,25	117,2
		2	0,154	1,504	976,62		118,1
		3	0,156	0,933	598,08		96,6
	7	1	0,142	1,369	964,08	512,06 ± 391,76	121,6
		2	0,165	0,447	270,91		100,6
		3	0,17	0,512	301,18		84,6
	12	1	0,123	0,74	601,63	423,32 ± 173,26	72,2
		2	0,114	0,428	375,44		63,3
		3	0,148	0,302	204,05		60,4
		4	0,107	0,548	512,15		59
		5	0,097	0,672	692,78		61,6
	13	1	0,163	1,085	665,64	834,63 ± 118,5	129,3
		2	0,14	1,243	887,86		110,4
		3	0,147	1,246	847,62		112,9
		4	0,139	1,303	937,41		125,1
5		0,142	1,343	945,77	130		
III	9	1	0,144	1,217	845,14	807,01 ± 280,44	112,5
		2	0,148	0,754	509,46		87,2
	13	1	0,14	1,493	1066,43		125

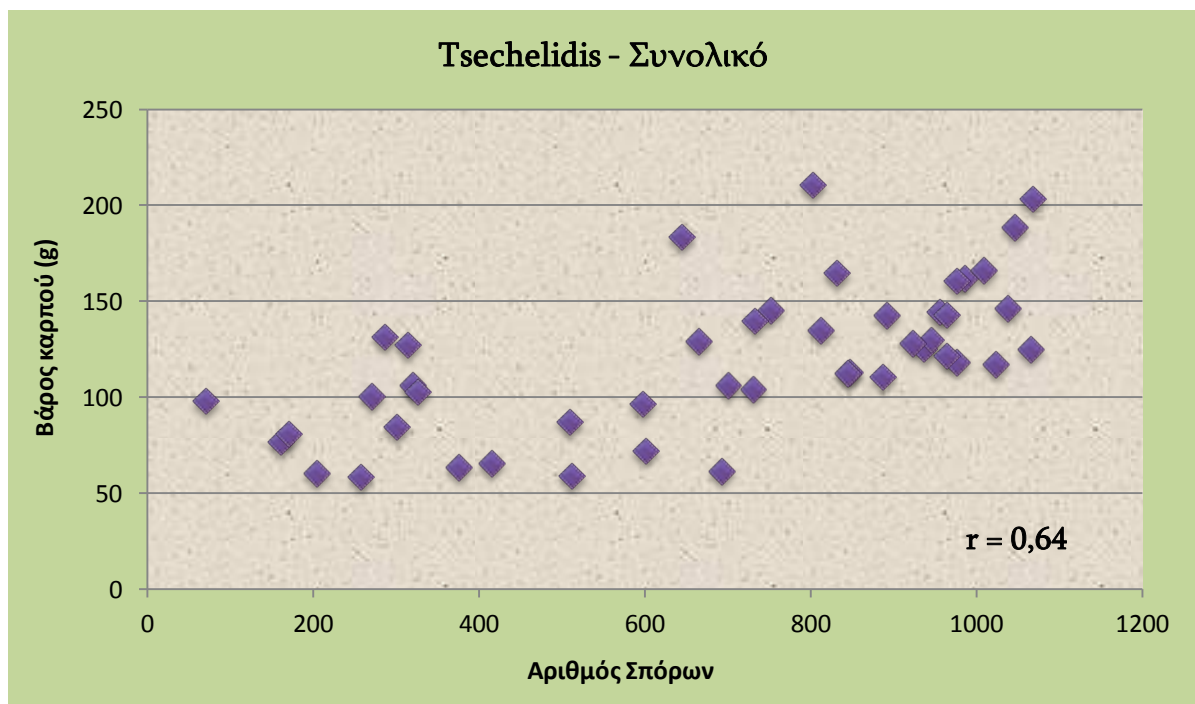
Στα διαγράμματα που ακολουθούν εμφανίζεται η διασπορά των ζευγών τιμών για τους αγρούς I και II (Εικ. 1 και 2 αντίστοιχα), καθώς και η συνδυασμένη ανάλυση όλων των καρπών αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας «Tschelididis», συνολικά και από τους τρεις αγρούς (Εικ. 3). Ο συντελεστής συσχέτισης του νωπού βάρους και του αριθμού των σπόρων, για το σύνολο των καρπών αυτογονιμοποίησης και ανεξαρτήτως πειραματικού αγρού, ήταν 0,64.



Εικ. 1. Συσχέτιση νωπού βάρους και αριθμού σπόρων ανά καρπό και διασπορά τιμών για τους καρπούς αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας Tschelididis στον αγρό I



Εικ. 2. Συσχέτιση νωπού βάρους και αριθμού σπόρων ανά καρπό και διασπορά τιμών για τους καρπούς αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας Tsechelidis στον αγρό II



Εικ. 3. Συσχέτιση νωπού βάρους και αριθμού σπόρων ανά καρπό και διασπορά τιμών για το σύνολο των καρπών αυτογονιμοποίησης της ποικιλίας Tsechelidis (αγροί I, II, III)

3. ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά ανθέων

Η μελέτη της μορφολογίας των ανθέων έγινε σε 10 άνθη από κάθε επιλεγμένο πρέμνο των ποικιλιών «Tsechelidis» και «Hayward», για τρεις συνεχόμενες καλλιεργητικές περιόδους, με βάση τον οδηγό της UPOV (upov.org). Από τα αποτελέσματα της καταγραφής δεν προέκυψαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των ανθέων της κάθε ποικιλίας, τόσο μεταξύ διαφορετικών πρέμνων, όσο και μεταξύ διαδοχικών ετών. Ορισμένες διαφορές ωστόσο, εντοπίστηκαν στη μορφολογία των ανθέων των δύο ποικιλιών, οι σημαντικότερες εκ των οποίων αναφέρονται στον πίνακα 1 και αφορούν τα άνθη των επιλεγμένων πρέμνων του αγρού I, όπου συνυπήρχαν οι δύο ποικιλίες. Η πλήρης καταγραφή όλων των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ανθέων των ποικιλιών «Hayward» και «Tsechelidis» για τους αγρούς I, II και III παρατίθεται στο Παράρτημα.

Θα πρέπει ωστόσο να τονισθεί ότι τα άνθη της ποικιλίας «Tsechelidis», παρά τις όποιες διαφοροποιήσεις εμφανίζουν από τα άνθη της ποικιλίας «Hayward», φέρουν την τυπική μορφολογία του θηλυκού άνθους της ακτινιδιάς και για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη ποικιλία χαρακτηρίζεται ως θηλυκή κατά UPOV.

Γενικά τα άνθη της ποικιλίας «Tsechelidis» έχουν διάμετρο άνθους 6-7 εκ., φέρουν 5-6 σέπαλα, χρώματος πράσινου και 6-7 πέταλα, χρώματος λευκού. Ο χρωματισμός των πετάλων στην επάνω πλευρά είναι μονόχρωμος με απουσία σκίασης στο χρώμα (Εικ. 1) Αναφορικά με τον αριθμό των στύλων ανά άνθος, παρατηρήθηκε ένα εύρος τιμών, τόσο μεταξύ διαφορετικών ανθέων του ίδιου πρέμνου, όσο και μεταξύ διαφορετικών πρέμνων. Γενικά κυμάνθηκε από 35 έως 45 για την ποικιλία «Tsechelidis» και από 30 έως 40 για την ποικιλία «Hayward».

Πίνακας 1. Κυριότερες διαφορές ως προς τη μορφολογία ανθέων των ποικιλιών Tsechelidis και Hayward

Μορφολογικά χαρακτηριστικά	Ποικιλίες Ακτινιδιάς		Κωδικός ΥΡΟΝ
	Tsechelidis	Hayward	
Μήκος μίσχου (cm)	8-10	6-7	42
Χρώμα σεπάλων	Πράσινο	Καφέ	46
Διάταξη πετάλων (όψη από κάτω)	Συμφύονται	Αλληλο-επικαλύπτονται	50
Καμπύλη κορυφής πετάλων	Απουσία ή ασθενής	Έντονη	51
Διαβάθμιση χρώματος πετάλων	Όχι	Ναι	55
Χρώμα ανθήρων	Κίτρινο-πορτοκαλί	Κίτρινο	59
Αριθμός στύλων	35-45	30-40	60



Εικ.1 Άνθος της ποικιλίας Tsechelidis. Λευκά πέταλα (7), απουσία καμπύλης στα πέταλα, ανθήρες χρώματος κίτρινο-πορτοκαλί, στύλοι 35-45



Εικ.2 Άνθος της ποικιλίας Hayward. Λευκά πέταλα (6), έντονη παρουσία καμπύλης στα πέταλα, ανθήρες χρώματος κίτρινου, στύλοι 30-35

3.2 Έλεγχος βιωσιμότητας της γύρης

3.2.1 Αποτελέσματα για την ποικιλία «Tsechelidis» στους τρεις αγρούς (I,II,III)

Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο της βιωσιμότητας της γύρης έδειξαν ότι τα πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis» δύνανται να παράγουν γόνιμη γύρη, η οποία είναι αυτοσυμβατή και συντελεί στην παραγωγή καρπών, όπως επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα των ελεγχόμενων αυτογονιμοποιήσεων στον αγρό.

Η ηλικία των πρέμνων (η οποία υποδηλώνεται με τον παράγοντα «Αγρός» στο συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό) φαίνεται να αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην έκφραση του φαινομένου της αυτοσυμβατότητας στην ποικιλία «Tsechelidis», καθώς βρέθηκε ότι τα πρέμνα μεγαλύτερης ηλικίας εμφανίζουν υψηλότερο βαθμό αυτοσυμβατότητας, σε σχέση με τα νεότερα πρέμνα. Συγκεκριμένα, από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων για τη βιωσιμότητα της γύρης των πρέμνων της ποικιλίας «Tsechelidis» (πιν. 2), στους τρεις διαφορετικής ηλικίας πειραματικούς αγρούς (I,II και III), προέκυψε ότι ο αγρός I (πρέμνα μεγαλύτερης ηλικίας) είχε τα υψηλότερα ποσοστά γόνιμης γύρης, ενώ ο αγρός III (πρέμνα νεότερης ηλικίας) κατείχε τα χαμηλότερα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και τις δύο χρονιές που διεξήχθη ο έλεγχος (2009 και 2010). Σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) προέκυψαν τόσο μεταξύ των τριών αγρών για κάθε χρονιά, όσο και σε κάθε αγρό μεταξύ διαφορετικών ετών. Η μέση τιμή (%) της γόνιμης γύρης αυξήθηκε σημαντικά τη δεύτερη χρονιά και στους τρεις αγρούς, όπως παρατηρείται στον πίνακα 2. Ωστόσο, παρά την αύξηση των ποσοστών η τελική κατάταξη δεν άλλαξε τη δεύτερη χρονιά, καθώς ο αγρός I κατείχε σταθερά τη μεγαλύτερη τιμή (26,58%) και ο αγρός III τη μικρότερη (17,67%). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την παράλληλη αύξηση του ποσοστού της γόνιμης γύρης των πρέμνων από χρονιά σε χρονιά, υποδηλώνει ότι η έκφραση της αυτογονιμότητας στην ποικιλία «Tsechelidis» επηρεάζεται από την ηλικία των πρέμνων, σημειώνοντας αυξητική τάση με την πάροδο του χρόνου.

Πίνακας 2. Γονιμότητα γύρης (%) της ποικιλίας Tsechelidis, σε τρεις αγρούς διαφορετικής ηλικίας (I,II,III) και για δύο χρονιές πειραματισμού (2009 και 2010)

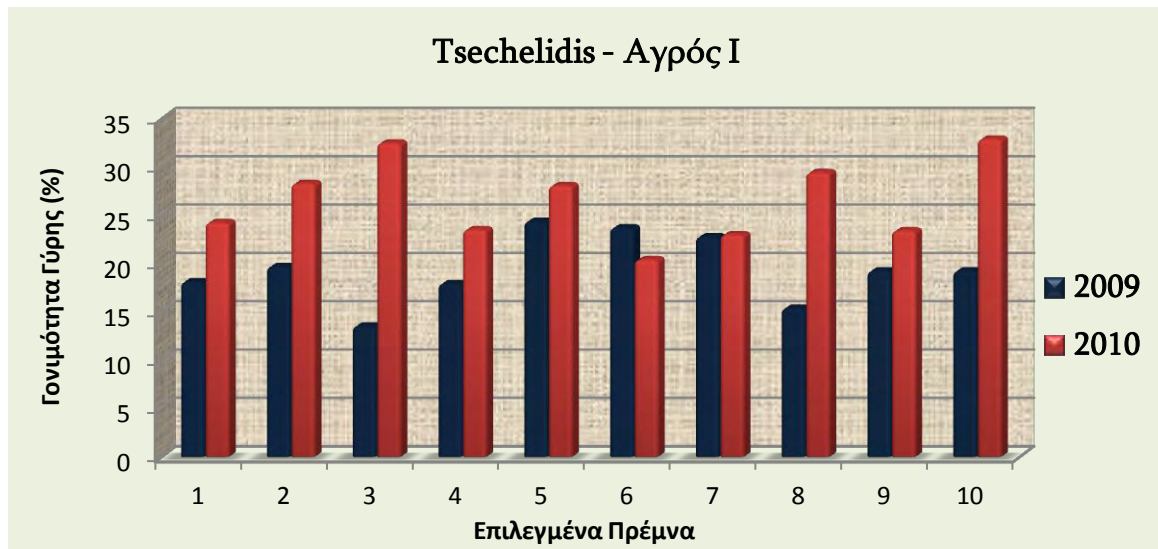
		F	P	CV (%)	Ποσοστό γόνιμης γύρης (\bar{x} %)	Εύρος		Έλεγχος Ομοιογένειας		
						min (%)	max (%)	σ (StDv) μεταξύ πρέμνων	σ (StDv) εντός πρέμνου	Συντελεστής Ομοιογένειας
Αγρός I	2009	1.49	0.162	4.74	19.42 ± 0.92	13.55	24.39	2.00	9.01	0.33
	2010	0.42	0.923	2.57	26.58 ± 0.68	23.03	32.92	.	20.90	0.00
Αγρός II	2009	1.0	0.453	0.59	16.34 ± 0.1	9.51	21.66	.	9.71	0.00
	2010	3.28	0.0002	0.94	19.35 ± 0.18	3.06	38.91	7.89	16.52	0.69
Αγρός III	2009	2.27	0.008	0.92	7.72 ± 0.07	3.42	13.87	2.31	6.48	0.55
	2010	5.29	0.00	0.94	17.67 ± 0.17	7.96	38.64	9.19	14.03	0.81

Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο, ότι υπήρξε μεγάλη παραλλακτικότητα εντός του κάθε αγρού, ως προς τα ποσοστά γονιμότητας της γύρης των μεμονωμένων πρέμνων. Το μεγαλύτερο εύρος τιμών παρουσίασαν και τις δύο χρονιές τα πρέμνα των αγρών II και III (πιν. 2). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το ποσοστό γονιμότητας της γύρης ανά πρέμνο, κυμάνθηκε από 3,06% έως 38,91% στον αγρό II (2010) και από 6,8% έως 38,64% στον αγρό III (2010). Αντίθετα, τα πρέμνα του αγρού I παρουσίασαν σταθερότερη συμπεριφορά και μικρότερη παραλλακτικότητα, με αποτέλεσμα το εύρος των τιμών να κυμανθεί σε μικρότερα όρια και τις δύο χρονιές.

Η μέση τιμή (%) για τη γονιμότητα της γύρης του κάθε πρέμνου προέκυπτε με βάση τα ποσοστά των ενεργών γυρεόκοκκων που καταμετρούνταν στην εξέταση 10 ανθέων ανά πρέμνο και στη συνέχεια, η μέση τιμή (%) για κάθε αγρό υπολογίζονταν από τα αντίστοιχα ποσοστά γονιμότητας των επιλεγμένων πρέμνων του κάθε αγρού. Η παραλλακτικότητα που παρατηρήθηκε στα ποσοστά γονιμότητας σε κάθε περίπτωση ήταν πολύ μεγάλη και επομένως, για

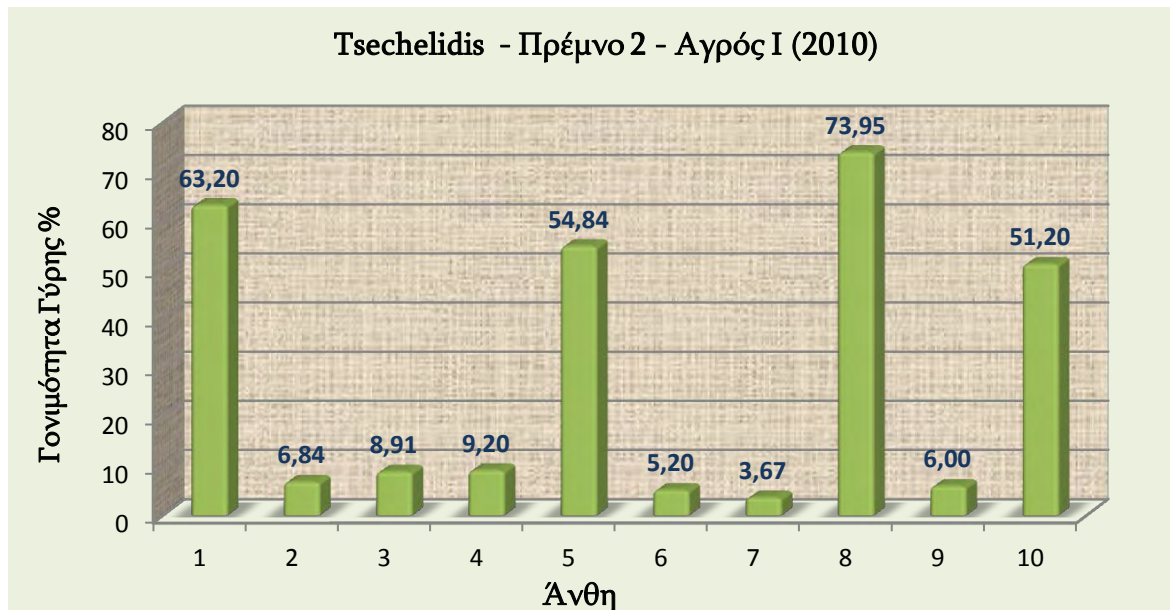
τον έλεγχο της ομοιογένειας, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση, τόσο μεταξύ των ποσοστών γονιμότητας των πρέμων εντός του κάθε αγρού, όσο και μεταξύ των ποσοστών γονιμότητας των ανθέων του ίδιου πρέμνου (πιν. 2). Από τον έλεγχο προέκυψε ότι το μεγαλύτερο μέρος της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε και στους τρεις πειραματικούς αγρούς, οφείλονταν κατά κύριο λόγο σε αποκλίσεις μεταξύ των ποσοστών γονιμότητας των μεμονωμένων ανθέων του κάθε πρέμνου, και λιγότερο σε αποκλίσεις μεταξύ των συνολικών ποσοστών γονιμότητας μεταξύ των πρέμων σε κάθε αγρό. Ειδικά σε κάποιες περιπτώσεις, όπως στον αγρό I (2010) και στον αγρό II (2009), η παραλλακτικότητα οφείλονταν εξ ολοκλήρου σε αποκλίσεις των τιμών γονιμότητας εντός των πρέμων. Ο συντελεστής ομοιογένειας για κάθε αγρό (πιν.2) υπολογίστηκε με βάση το λόγο των δύο τυπικών αποκλίσεων (σ μεταξύ πρέμων / σ εντός του πρέμνου). Συγκεκριμένα, όσο η τιμή του συντελεστή πλησιάζει τη μονάδα, τόσο ο αγρός χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη συνολική ομοιογένεια. Προκύπτει λοιπόν ότι τη μεγαλύτερη ομοιογένεια, για το έτος 2010, παρουσίασαν οι αγροί II και III με τιμές συντελεστή 0.69 και 0.81 αντίστοιχα. Στις περιπτώσεις όπου η τυπική απόκλιση μεταξύ των πρέμων του κάθε αγρού ήταν μη υπολογίσιμη (συμβολίζεται με “.” στον πίνακα), ο συντελεστής ομοιογένειας προέκυπτε μηδενικός.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν, παρουσιάζονται αναλυτικά για κάθε αγρό, τα ποσοστά γονιμότητας του κάθε πρέμνου ξεχωριστά, και για τα δύο έτη που πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της γύρης. Συγκεκριμένα στον αγρό I, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3, δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των 10 πρέμων που εξετάστηκαν, αναφορικά με το ποσοστό γονιμότητας της γύρης. Τα ποσοστά κυμάνθηκαν από 13,55% (Πρέμνο 3) έως 24,39% (Πρέμνο 5) κατά την πρώτη χρονιά (2009).



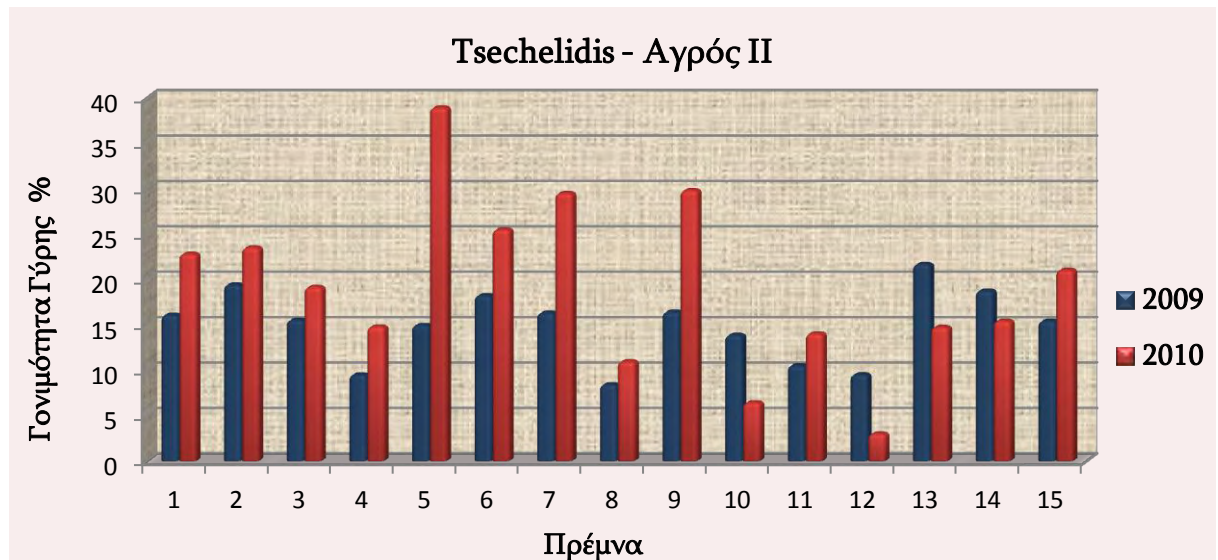
Εικ. 3. Ποσοστά γονιμότητας γύρης των 10 επιλεγμένων πρέμνων της ποικιλίας Tsechelidis στον αγρό I, για δύο χρονιές (2009-2010)

Τη δεύτερη χρονιά (2010), σχεδόν όλα τα πρέμνα παρουσίασαν αυξημένα ποσοστά γονιμότητας, όμως η γενική εικόνα του αγρού παρέμεινε σταθερή, χωρίς να σημειωθούν και πάλι μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των πρέμνων. Τα ποσοστά κυμάνθηκαν από 23% (Πρέμνο 7) έως 32,90% (Πρέμνο 10). Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί, η μεγάλη ανομοιογένεια που παρατηρήθηκε εντός των πρέμνων και μεταξύ των ανθέων που εξετάστηκαν. Η παραλλακτικότητα που σημειώθηκε ήταν μάλιστα τόσο μεγάλη, ώστε σε κάποιες περιπτώσεις να καταγράφονται στο ίδιο πρέμνο άνθη με μηδενική γονιμότητα γύρης (τελείως στείρα) και άνθη με πολύ υψηλά ποσοστά γονιμότητας (>70%). Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του πρέμνου με κωδικό 2 στον αγρό I, το οποίο είχε μια μέση τιμή γονιμότητας 28,3% κατά το έτος 2010. Ωστόσο, τα ποσοστά γονιμότητας μεταξύ των 10 ανθέων του συγκεκριμένου πρέμνου, κυμάνθηκαν από 3,67% έως 73,95%, όπως εμφανίζεται στο γράφημα της εικόνας 4. Ο ίδιος βαθμός ανομοιογένειας χαρακτήριζε και τα υπόλοιπα πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis» στον αγρό I.

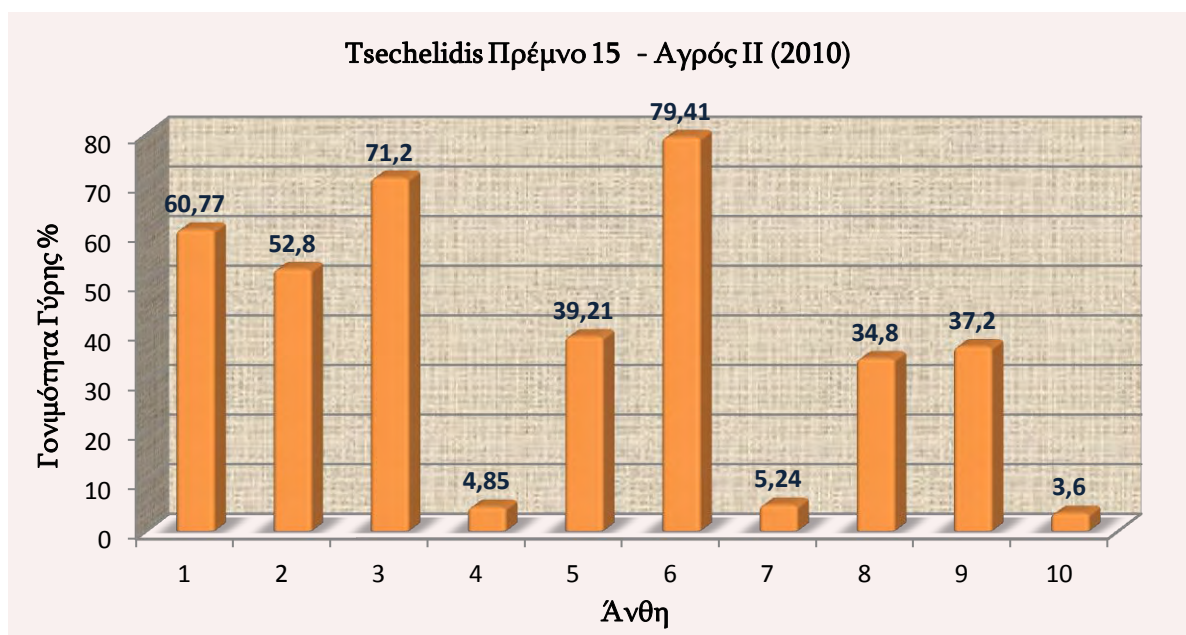


Εικ. 4. Ποσοστά γονιμότητας γύρης των 10 ανθέων του πρέμνου 2 της ποικιλίας Tsechelidis, στον αγρό I, κατά το 2010.

Αναφορικά με τον αγρό II (Εικ. 5), δεν παρουσιάστηκαν μεγάλες αποκλίσεις στα ποσοστά γονιμότητας της γύρης των 15 επιλεγμένων πρέμνων, κατά τη πρώτη χρονιά (2009), τα οποία κυμάνθηκαν από 9,51% (Πρέμνο 4) έως 21,66% (Πρέμνο 13). Την επόμενη χρονιά (2010) τα περισσότερα πρέμνα εμφάνισαν αυξημένα ποσοστά γονιμότητας γύρης, όμως υπήρξαν και περιπτώσεις πρέμνων (πρέμνα 10 και 12) όπου το ποσοστό μειώθηκε, με αποτέλεσμα να σημειωθούν τελικώς μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των τιμών των πρέμνων, που κυμαίνονταν από 3,06% (Πρέμνο 12) έως 38,91% (Πρέμνο 5). Αυξημένη ήταν και η παραλλακτικότητα που σημειώθηκε εντός των πρέμνων, μεταξύ των ποσοστών γονιμότητας της γύρης των διαφορετικών ανθέων που ελέγχθηκαν. Ενδεικτικά παρατίθεται η περίπτωση του πρέμνου με κωδικό 15 (Εικ. 6), το οποίο είχε μέση τιμή για τη γονιμότητα της γύρης 38,91% το 2010. Ωστόσο, οι αποκλίσεις μεταξύ των επιμέρους τιμών των 10 ανθέων του συγκεκριμένου πρέμνου ήταν πολύ μεγάλες και κυμαίνονταν από 3,6% έως 79,41%. Ανάλογη εικόνα (μεγάλη ανομοιογένεια) παρουσίασαν και τα υπόλοιπα πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis» στον αγρό II, και τις δύο χρονιές που διεξήχθη ο έλεγχος της βιωσιμότητας της γύρης (Εικ. 5).



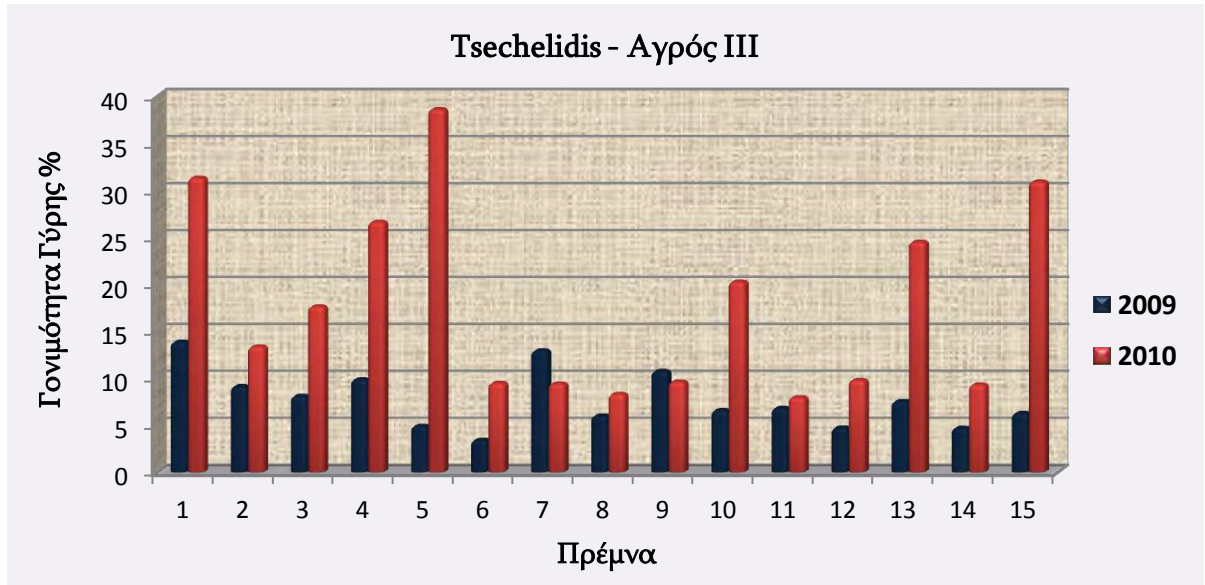
Εικ. 5. Ποσοστά γονιμότητας γύρης των 15 επιλεγμένων πρέμνων της ποικιλίας Tsechelidis στον αγρό II, για δύο χρονιές (2009-2010)



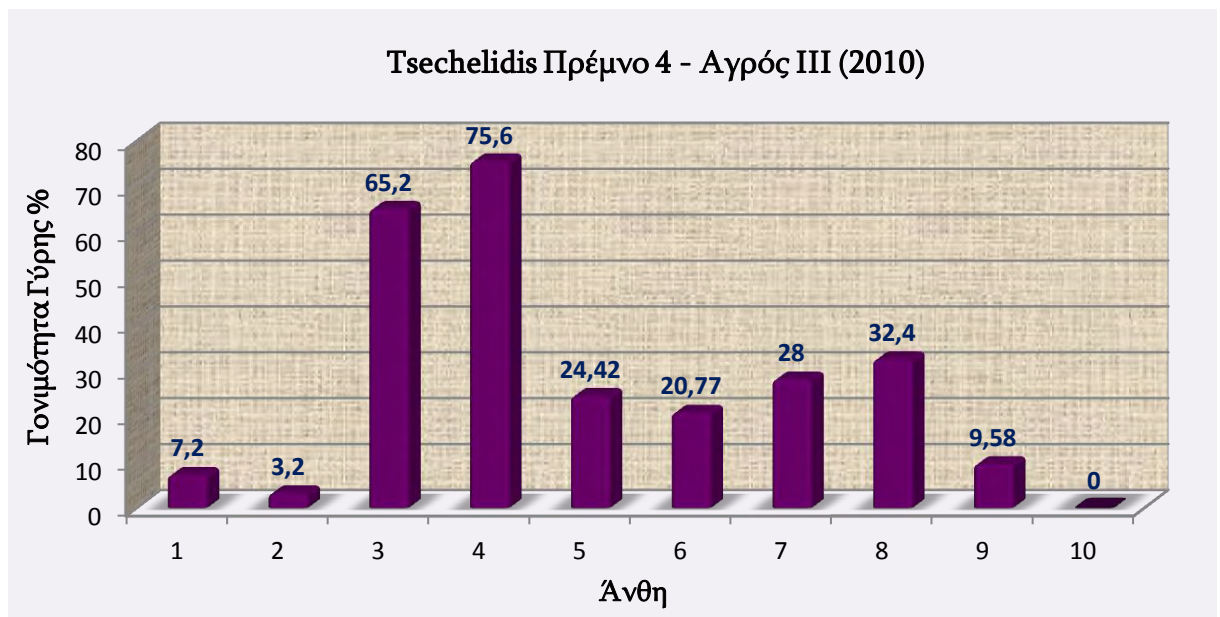
Εικ. 6. Ποσοστά γονιμότητας γύρης των 10 ανθέων του πρέμνου 15 της ποικιλίας Tsechelidis, στον αγρό II, κατά το 2010.

Αναλύοντας τα επιμέρους ποσοστά γονιμότητας των επιλεγμένων πρέμνων στον αγρό III (Εικ. 7), προκύπτει ότι και σε αυτή την περίπτωση δεν παρουσιάστηκαν μεγάλες αποκλίσεις στα ποσοστά γονιμότητας της γύρης των 15 επιλεγμένων πρέμνων, κατά τη πρώτη χρονιά (2009), τα οποία κυμάνθησαν από 3,42% (Πρέμνο 6) έως 13,87% (Πρέμνο 1). Την επόμενη χρονιά (2010) τα περισσότερα πρέμνα εμφάνισαν αυξημένα ποσοστά γονιμότητας γύρης, όμως υπήρξαν και περιπτώσεις πρέμνων (πρέμνα 7 και 9) όπου το ποσοστό μειώθηκε, με αποτέλεσμα να σημειωθούν τελικώς μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των τιμών των πρέμνων, που κυμαίνονταν από 7,96% (Πρέμνο 11) έως 38,64% (Πρέμνο 5).

Αυξημένη ήταν και στη περίπτωση του αγρού III, η παραλλακτικότητα που σημειώθηκε εντός των πρέμνων, μεταξύ των ποσοστών γονιμότητας της γύρης των διαφορετικών ανθέων που ελέγχθηκαν. Ενδεικτικά παρατίθεται η περίπτωση του πρέμνου με κωδικό 4 (Εικ. 8), το οποίο είχε μέση τιμή για τη γονιμότητα της γύρης 26,64% το 2010. Οι αποκλίσεις ωστόσο μεταξύ των επιμέρους τιμών των 10 ανθέων του συγκεκριμένου πρέμνου ήταν πολύ μεγάλες και κυμαίνονταν από 0% έως 75,6%. Ανάλογη εικόνα (μεγάλη ανομοιογένεια) παρουσίασαν και τα υπόλοιπα πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis» στον αγρό III, και τις δύο χρονιές που διεξήχθη ο έλεγχος της βιωσιμότητας της γύρης.



Εικ. 7. Ποσοστά γονιμότητας γύρης των 15 επιλεγμένων πρέμνων της ποικιλίας Tsechelidis στον αγρό III, για δύο χρονιές (2009-2010)



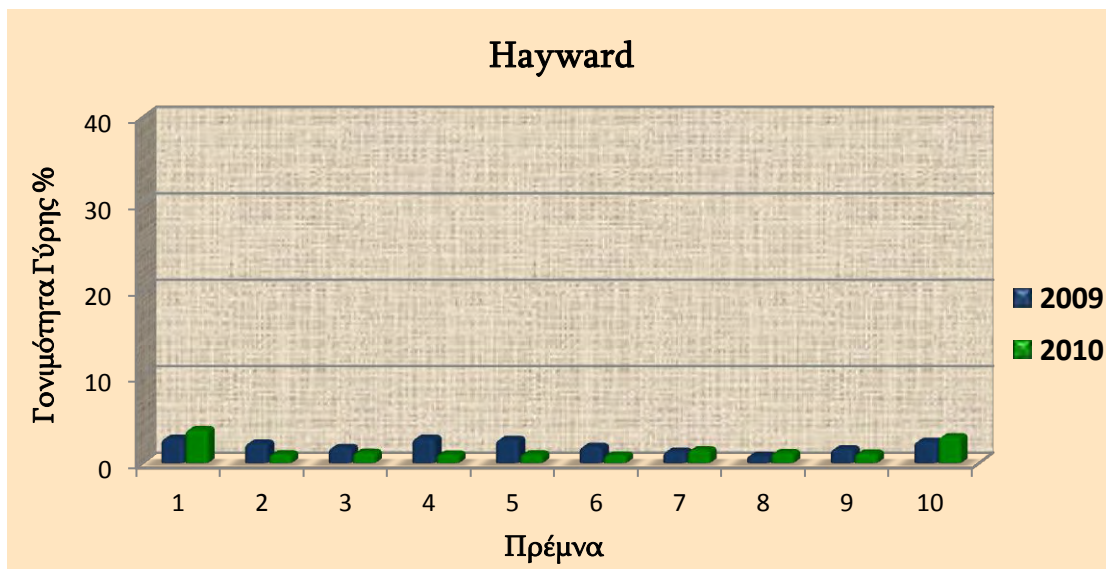
Εικ. 8. Ποσοστά γονιμότητας γύρης των 10 ανθέων του πρέμνου 4 της ποικιλίας Tsechelidis, στον αγρό III, κατά το 2010.

3.2.2 Συγκριτικά αποτελέσματα για τις ποικιλίες Tsechelidis, Hayward και Matua

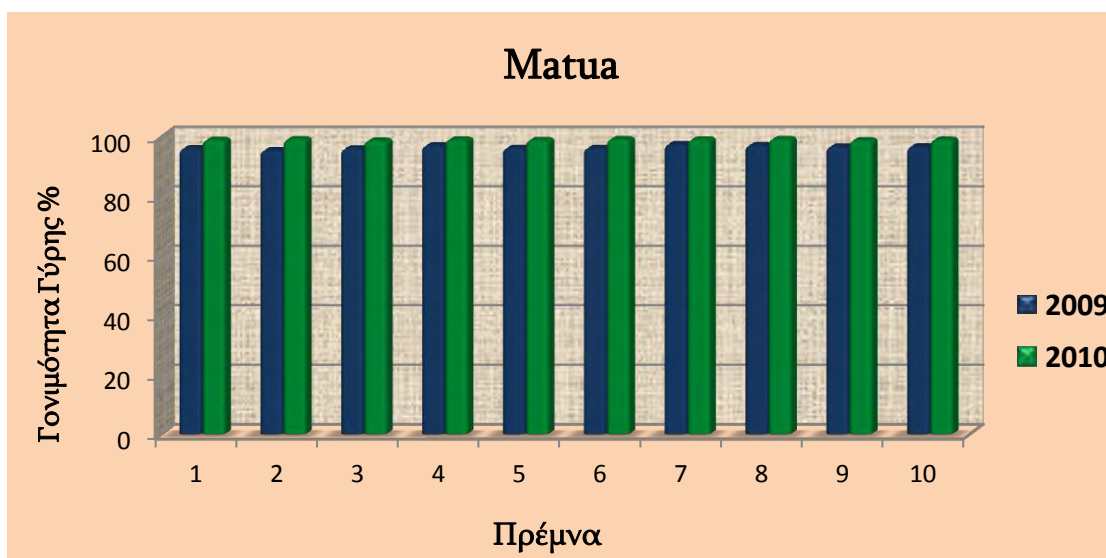
Στον πίνακα 3, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τον έλεγχο βιωσιμότητας της γύρης, για τις ποικιλίες «Tsechelidis», «Hayward» και «Matua» (επικονιαστής). Από τη συγκριτική ανάλυση των δεδομένων προέκυψε ότι η ποικιλία «Tsechelidis» είχε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό γονιμότητας γύρης, σε σχέση με την ποικιλία «Hayward», και τις δύο χρονιές. Η ποικιλία «Hayward» εμφανίστηκε πρακτικά αρρενόστειρη, με ποσοστό γονιμότητας γύρης 2,1% την πρώτη χρονιά (2009) και 1,81% τη δεύτερη (2010). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα, καθώς η ποικιλία «Hayward» είναι χαρακτηρισμένη ως θηλυκή ποικιλία ακτινιδίου και τα άνθη της έχουν την τυπική μορφολογία του φύλου. Αντίστοιχα, η ποικιλία «Matua», η οποία είναι αρσενική ποικιλία και χρησιμοποιείται ως επικονιαστής, χαρακτηρίζονταν από σχεδόν 100% γονιμότητα και τις δύο χρονιές. Τόσο η ποικιλία «Hayward», όσο και η ποικιλία «Matua» διακρίνονταν από μεγάλη ομοιογένεια μεταξύ των ποσοστών γονιμότητας των επιμέρους πρέμνων τους και σταθερότητα συμπεριφοράς από χρονιά σε χρονιά (Εικ. 9 και 10).

Πιν.3 Αποτελέσματα γονιμότητα γύρης (%) των ποικιλιών Tsechelidis, Hayward και Matua για δύο χρονιές (2009 και 2010)

	Ποικιλία	F	P	CV (%)	Ποσοστό γόνιμης γύρης (\bar{x} %)	Εύρος		Έλεγχος Ομοιογένειας		
						min (%)	max (%)	σ (StDv) μεταξύ πρέμνων	σ (StDv) εντός πρέμνου	Συντελεστής Ομοιογένειας
2009	Tsechelidis	1.49	0.162	4.74	19.42 ± 0.92	13.55	24.39	2.00	9.01	0.33
	Hayward	1.88	0.066	0.76	2.10 ± 0.02	0.87	2.89	0.47	1.58	0.46
	Matua	1.89	0.063	0.02	98.84 ± 0.02	98.32	100	0.43	1.44	0.47
2010	Tsechelidis	0.42	0.923	2.57	26.58 ± 0.68	23.03	32.92	.	20.90	0.00
	Hayward	4.91	0.00	1.27	1.81 ± 0.02	0.91	2.98	1.26	2.02	0.79
	Matua	0.25	0.985	0.02	99.48 ± 0.02	98.63	100	.	1.04	0.00



Εικ. 9. Ποσοστά γονιμότητας γύρης των 10 επιλεγμένων πρέμνων της ποικιλίας Hayward, για δύο χρονιές (2009-2010)



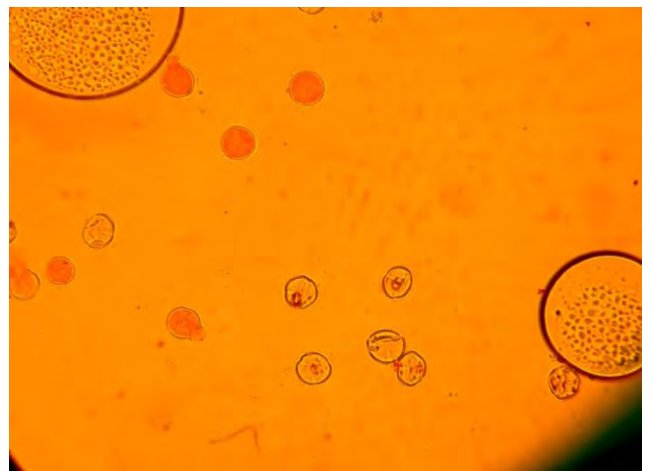
Εικ. 10. Ποσοστά γονιμότητας γύρης των 10 επιλεγμένων πρέμνων της ποικιλίας Matua, για δύο χρονιές (2009-2010)

Αντίθετα, η ποικιλία «Tsechelidis» χαρακτηρίζονται, όπως έχει προαναφερθεί (βλ. § 3. 2.1), από μεγάλη ανομοιογένεια, με το μεγαλύτερο μέρος της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε να οφείλεται κατά κύριο λόγο σε αποκλίσεις μεταξύ των ποσοστών γονιμότητας των μεμονωμένων ανθέων του κάθε πρέμνου, και λιγότερο σε αποκλίσεις μεταξύ των συνολικών ποσοστών γονιμότητας των πρέμνων σε κάθε αγρό.

Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται δείγματα από τον έλεγχο της βιωσιμότητας της γύρης σε άνθη των ποικιλιών «Tsechelidis», «Hayward» και «Matua», όπως καταγράφηκαν με τη βοήθεια μικροσκοπίου. Οι ενεργοί γυρεόκοκκοι (βιώσιμοι) διακρίνονται από τους άγονους (στείρους) λόγω της ιδιότητας τους να απορροφούν τη χρωστική ουσία έπειτα από διαδικασία χρώσης του δείγματος. Οι άγονοι γυρεόκοκκοι παραμένουν άχρωμοι.



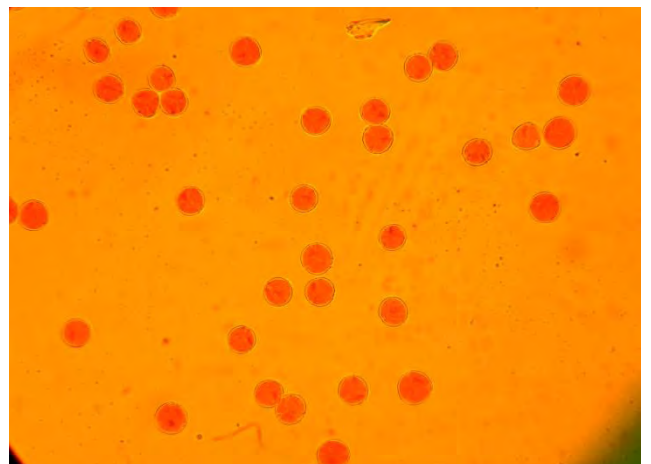
Εικ.11 Ανθήρες από άνθος της ποικιλίας Tsechelidis, στο στάδιο τινάγματος της γύρης



Εικ.12 Δείγμα από άνθος της ποικιλίας Tsechelidis. Παρουσία ενεργών (έγχρωμων) και άγονων (άχρωμων) γυρεόκοκκων



Εικ.13 Δείγμα από άνθος της ποικιλίας Hayward. Παρουσία μόνο άγονων (άχρωμων) γυρεόκοκκων



Εικ.14 Δείγμα από άνθος της ποικιλίας Matua. Έντονη παρουσία ενεργών (έγχρωμων)

3.3 Γονιμότητα γύρης και αποτελέσματα αυτογονιμοποιήσεων

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα από τον έλεγχο της βιωσιμότητας της γύρης στο εργαστήριο με τα αποτελέσματα των ελεγχόμενων αυτογονιμοποιήσεων στον αγρό, προκύπτει ότι τα πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis», τα οποία είχαν τα υψηλότερα ποσοστά αναφορικά με τη γονιμότητα της γύρης, είχαν αντίστοιχα και τα υψηλότερα ποσοστά καρπόδεσης στις ελεγχόμενες αυτογονιμοποιήσεις που διεξήχθησαν. Συγκεκριμένα στον αγρό I, τα πρέμνα με τα υψηλότερα ποσοστά καρπόδεσης, ήταν σταθερά κάθε χρονιά τα πρέμνα με τους κωδικούς 1, 2, 3, 5 και 7 (βλ. § 1.1 Αποτελέσματα αυτογονιμοποιήσεων, πιν.1), ενώ το 2010 υψηλό ποσοστό σημείωσε και το πρέμνο με κωδικό 10. Τα ίδια πρέμνα είχαν αντίστοιχα υψηλά ποσοστά και στη γονιμότητα της γύρης, όπως προέκυψε από τον έλεγχο των ανθέων τους (βλ. § 3.2.1, εικόνα 4). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του πρέμνου με κωδικό 8, το οποίο αν και παρουσίασε αρκετά υψηλό ποσοστό γονιμότητας γύρης (32,9% το 2010), τα ποσοστά καρπόδεσης των αυτογονιμοποιήσεων ήταν πολύ χαμηλά σε κάθε χρονιά.

Αντίστοιχα και στους αγρούς II και III, τα πρέμνα με τα υψηλότερα ποσοστά γονιμότητας της γύρης κατείχαν και τα υψηλότερα ποσοστά καρπόδεσης στις αυτογονιμοποιήσεις. Συγκεκριμένα στον αγρό II ξεχώρισαν τα πρέμνα με κωδικούς 1, 2, 5, 6, 7, 9 και 15, όχι μόνο για τα υψηλά ποσοστά τους, αλλά και για τη σταθερότητα συμπεριφοράς για τα γνωρίσματα που μετρήθηκαν από χρονιά σε χρονιά. Στον αγρό III ξεχώρισαν τα πρέμνα με κωδικούς 1, 4, 5, 13 και 15. Τα πρέμνα αυτά, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και τη σταθερότητα συμπεριφοράς τους από χρονιά σε χρονιά, εντάχθηκαν στην κατηγορία της «υψηλής αυτογονιμότητας». Υπήρξαν ωστόσο και περιπτώσεις πρέμνων που εμφάνισαν σταθερή συμπεριφορά, σημειώνοντας χαμηλά ποσοστά τόσο στην καρπόδεση των αυτογονιμοποιήσεων, όσο και στη γονιμότητα γύρης. Τα

πρέμνα αυτά αποτέλεσαν αντίστοιχα την κατηγορία της «χαμηλής αυτογονιμότητας».

Υπενθυμίζεται ωστόσο, ότι τα πρέμνα με τα υψηλά ποσοστά καρπόδεσης παρουσίασαν και μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς το βάρος των καρπών αυτογονιμοποίησης. Για ορισμένα πρέμνα το βάρος αυτών των καρπών κυμάνθηκε περίπου από 30γρ. έως 150γρ. Οι μεγάλες αυτές αποκλίσεις ως προς το βάρος των καρπών αυτογονιμοποίησης, θα μπορούσαν να αποδοθούν στην αντίστοιχα μεγάλη παραλλακτικότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ των ποσοστών γονιμότητας των ανθέων του κάθε πρέμνου, που σε κάποιες περιπτώσεις κυμαίνονταν από 0 έως 70%, καθώς στο ακτινίδιο έχει βρεθεί ότι το βάρος καρπού σχετίζεται θετικά με τον αριθμό σπερμάτων και κατά συνέπεια με την επαρκή και αποτελεσματική επικονίαση (Gonzalez *et al.*, 1998). Συγκριμένα, οι Lescourret *et al.*, (1998) ανέπτυξαν μοντέλα για τη μελέτη της επικονίασης και του ρυθμού αύξησης των καρπών και κατέληξαν ότι η γονιμοποίηση ενός άνθους ακτινιδιάς εξαρτάται από τέσσερις βασικές διαδικασίες:

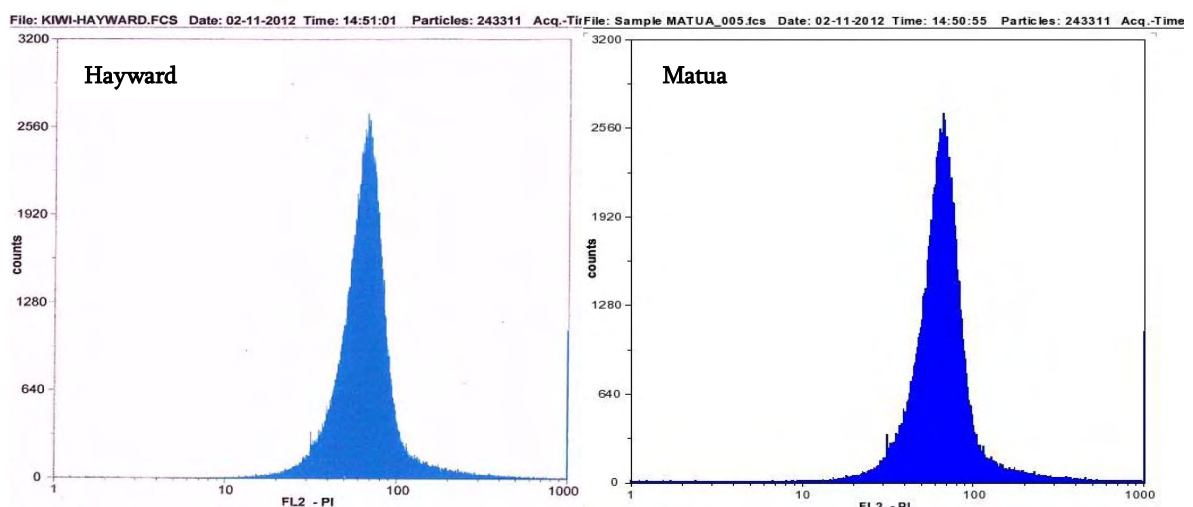
- 1) Την εναπόθεση των γυρεόκοκκων πάνω στην επιφάνεια του στίγματος
- 2) Την επιλογή των γόνιμων γυρεόκοκκων (αυτών δηλαδή που δύνανται να αναπτύξουν γυρεοσωλήνες και να φτάσουν τα ωάρια)
- 3) Την επιλογή των γόνιμων ωαρίων
- 4) Τη γονιμοποίηση των ωαρίων από τον ένα σπερματικό πυρήνα

Επιπλέον, η ανάγκη για επαρκή επικονίαση στην ακτινιδιά, καταδεικνύεται και από το γεγονός ότι στα θηλυκά άνθη, η κάθε ωοθήκη σχηματίζεται από την ένωση 26-40 καρπόφυλλων, κάθε ένα εκ των οποίων φέρει έως 40 ωάρια, καταλήγοντας σε ένα συνολικό αριθμό 1400-1500 ωαρίων ανά άνθος (Howpage *et al.*, 1998). Επομένως, καθίσταται σαφές ότι για μια αποτελεσματική γονιμοποίηση, απαιτείται ένας τεράστιος αριθμός γυρεόκοκκων, καθώς γονιμοποίηση μεγάλου αριθμού ωαρίων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγάλου βάρους καρπών. Στην περίπτωση των ελεγχόμενων αυτογονιμοποιήσεων της ποικιλίας «Tschelidis», η γύρη προέρχονταν

αποκλειστικά από τους στήμονες του ίδιου του άνθους, η γονιμότητα των οποίων βρέθηκε να ποικίλλει σημαντικά ακόμα και μεταξύ ανθέων του ίδιου πρέμνου. Είναι λογικό επομένως να υποτεθεί, ότι στην περίπτωση που η διαθεσιμότητα της γόνιμης γύρης ήταν περιορισμένη (άνθη με χαμηλό ποσοστό γονιμότητας), δεν επιτελούνταν επαρκής γονιμοποίηση των ωαρίων και κατά συνέπεια δεν αναπτύσσονταν καρποί μεγάλου βάρους. Αντίθετα, σε περιπτώσεις όπου υπήρχε επάρκεια γόνιμης γύρης (άνθη με υψηλά ποσοστά γονιμότητας), η γονιμοποίηση ήταν αποτελεσματική και οι καρποί αποκτούσαν μεγάλο μέγεθος. Λοιποί παράγοντες που δύνανται να επηρεάσουν το μέγεθος των καρπών, όπως κλαδέματα, αραιώματα, λίπανση και άρδευση, αποκλείονται καθώς όλα τα πρέμνα δέχονταν εξίσου τις ίδιες καλλιεργητικές φροντίδες. Επιπλέον, η θετική συσχέτιση που βρέθηκε μεταξύ του βάρους των καρπών αυτογονιμοποίησης και του αριθμού σπερμάτων που περιείχαν, συνηγορεί στο συμπέρασμα ότι το μεγάλο βάρος των καρπών ήταν αποτέλεσμα γονιμοποίησης ικανοποιητικού αριθμού ωαρίων.

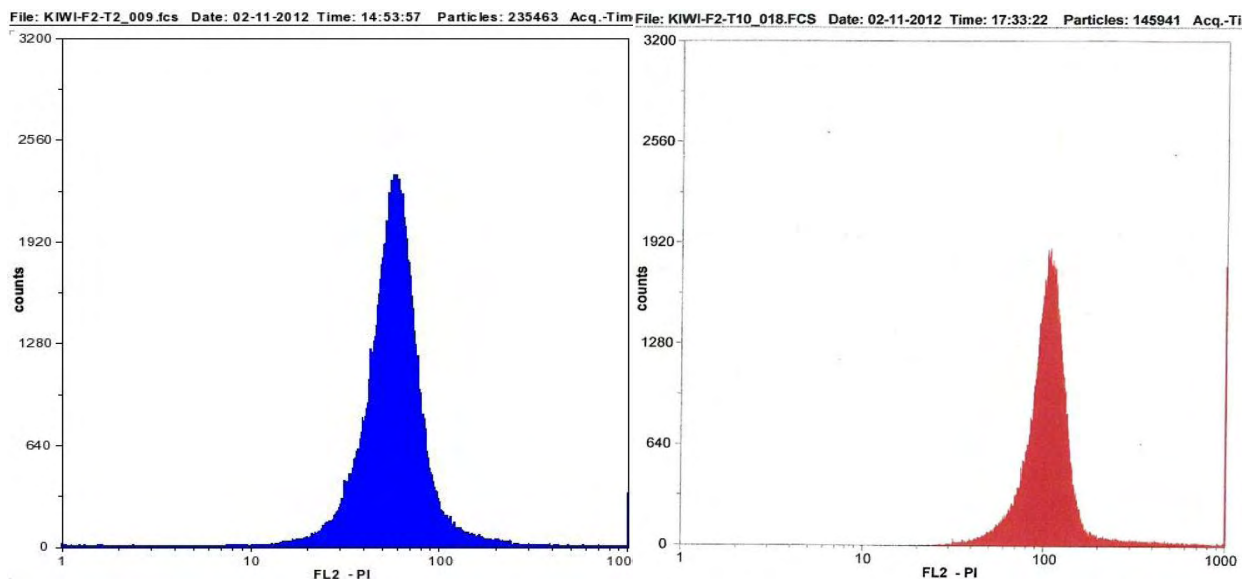
3.4 Αναλύσεις Κυτταρομετρίας Ροής

Με βάση τα ιστογράμματα φθορισμού των αναλύσεων κυτταρομετρίας ροής, βρέθηκε ότι οι ποικιλίες μάρτυρες «Hayward» και «Matua» είχαν ένταση φθορισμού (παράμετρος FL2) περίπου 70nm (Εικ. 15).



Εικ.15 Ιστογράμματα φθορισμού για τις ποικιλίες μάρτυρες «Hayward» και «Matua»

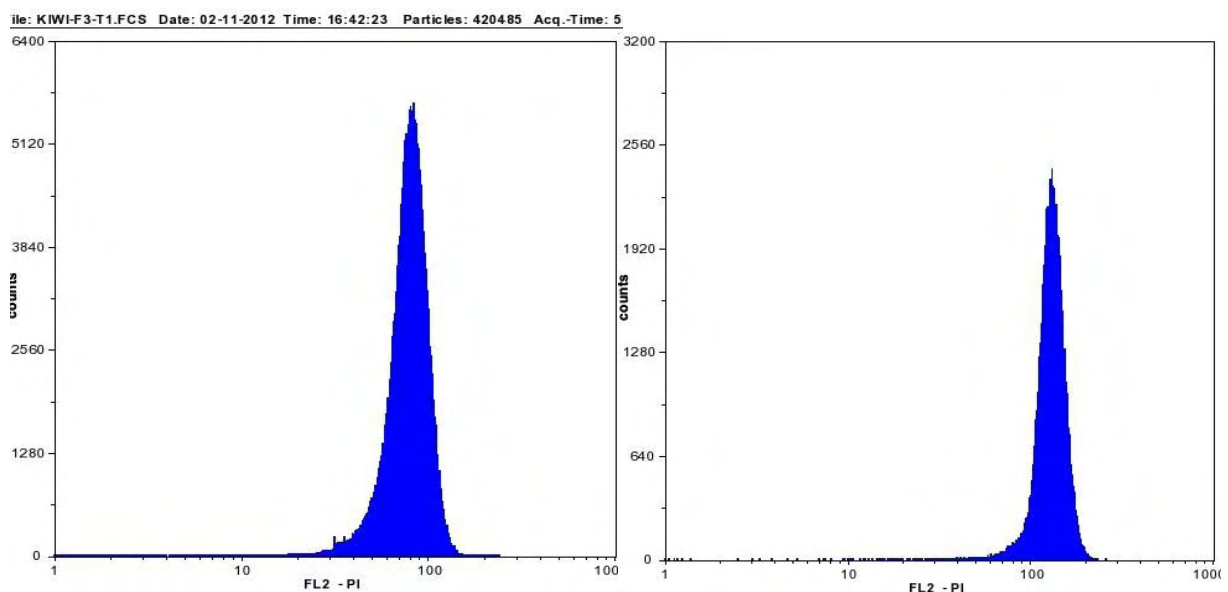
Όσο αφορά την ποικιλία «Tsechelidis», υπενθυμίζεται ότι στην ανάλυση συμμετείχαν μόνο οι 24 επιλεγμένοι γενότυποι των δύο ακραίων κλάσεων, υψηλής και χαμηλής αυτογονιμότητας. Οι γενότυποι αυτοί προέρχονταν από διαφορετικής ηλικίας πειραματικούς αγρούς και συγκεκριμένα, από τους αγρούς II (μεγαλύτερης ηλικίας πρέμνα) και III (νεαρότερα πρέμνα). Αναφορικά με τον αγρό II, τα πρέμνα που χαρακτηρίζονταν από υψηλή αυτογονιμότητα, παρουσίασαν ίδιες τιμές φθορίζουσας ακτινοβολίας με τις ποικιλίες μάρτυρες, γεγονός που υποδηλώνει και ίδια ποσότητα DNA, ενώ αντίθετα τα πρέμνα που χαρακτηρίζονταν από χαμηλή αυτογονιμότητα, χαρακτηρίζονταν από μεγαλύτερη ένταση φθορίζουσας ακτινοβολίας (Εικ.16) και κατά συνέπεια μεγαλύτερη ποσότητα DNA.



Εικ.16 Ιστογράμματα φθορισμού για το γενότυπο 2 υψηλής αυτογονιμότητας (μπλε) και το γενότυπο 10 χαμηλής αυτογονιμότητας (κόκκινο), της ποικιλίας «Tsechelidis», στον αγρό II.

Στον αγρό III ωστόσο, η γενική εικόνα ήταν διαφορετική, καθώς τόσο ορισμένα πρέμνα υψηλής αυτογονιμότητας, όσο και τα πρέμνα χαμηλής αυτογονιμότητας, βρέθηκε ότι περιείχαν μεγαλύτερες ποσότητες DNA από τους μάρτυρες (Εικ.17). Οι Ollitrault-Sammarcelli *et al.* (1994) μελετώντας το επίπεδο πλοειδίας στα είδη του γένους *Actinidia* με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, προσδιόρισαν το μέγεθος του γενώματος του είδους *A. deliciosa* 3,97 (pg/2C).

Στην ανάλυση συμμετείχαν και σπορόφυτα από καρποφόρο αρσενικό πρέμνο (*fruiting male*) του είδους *A. deliciosa*, τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε ιστοκαλλιέργεια. Τα φυτά αυτά βρέθηκε ότι περιείχαν σημαντικά αυξημένη ποσότητα DNA συγκριτικά με άλλα φυτά του είδους, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν και αυξημένο επίπεδο πλοειδίας, το οποίο εκτίμησαν ως εννιαπλοειδές ($2n = 9x$). Ωστόσο, η αυξημένη ποσότητα DNA συνοδεύονταν από γενετική αστάθεια, καθώς παρατηρήθηκε ότι τα σπορόφυτα αυτά είχαν σημαντικά μειωμένη ευρωστία, παρατεταμένη βλαστική περίοδο και μειωμένη ικανότητα να ανθίζουν. Ενδεχομένως, η αστάθεια που παρατηρείται στα πρέμνα της ποικιλίας «Tschelidis» αναφορικά με τα επίπεδα γονιμότητας της γύρης, και ειδικότερα στα πρέμνα τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλή αυτογονιμότητα, να επηρεάζεται εν μέρει από την αυξημένη ποσότητα DNA, που βρέθηκε πως περιέχουν. Η ηλικία των πρέμνων φαίνεται να συμβάλλει στη σταθεροποίηση της ποσότητας του γενώματος, και ενδεχομένως στην αύξηση του βαθμού αυτοσυμβατότητας των πρέμνων, καθώς βρέθηκε αυξημένη ποσότητα DNA σε πρέμνα νεαρής ηλικίας (αγρός III) υψηλής και χαμηλής αυτογονιμότητας. Αντίθετα, σε πρέμνα μεγαλύτερης ηλικίας (αγρός II) αυξημένη ποσότητα DNA εντοπίστηκε μόνο σε πρέμνα χαμηλής αυτογονιμότητας.



Εικ.17 Ιστογράμματα φθορισμού για το γενότυπο 1 υψηλής αυτογονιμότητας (αριστερά) και το γενότυπο 6 χαμηλής αυτογονιμότητας (δεξιά), της ποικιλίας «Tschelidis», στον αγρό III.

4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

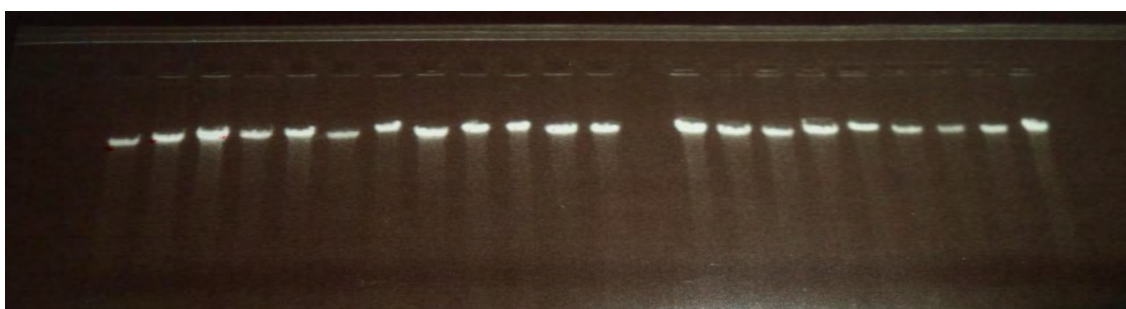
4.1 Ταυτοποίηση με μοριακούς δείκτες του φύλου (SmX, SmY, SmY1)

Η απομόνωση του DNA από τους 24 επιλεγμένους γενοτύπους έγινε επιτυχώς με τη βοήθεια του DNeasy kit (Qiagen). Στον πίνακα 1 εμφανίζεται η αρχική συγκέντρωση και η καθαρότητα των δειγμάτων, όπως εκτιμήθηκε με τη βοήθεια της συσκευής Nanodrop. Επίσης αναγράφεται και η κωδικοποίηση των 24 γενοτύπων, σύμφωνα με την οποία αναφέρονται στα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων. Η τελική συγκέντρωση των δειγμάτων προσαρμόστηκε, έπειτα από αραίωση, στα 20ng/μL.

Πιν.1 Αποτελέσματα της απομόνωσης DNA για τους 24 επιλεγμένους γενοτύπους

Γενοτύπος	Κωδικός	Συγκέντρωση (ng/μL)	260/280	260/230
Hayward	1	82,73	1,82	1,92
Hayward	1a	36,60	1,78	1,25
Hayward	21	30,27	1,64	1,01
Tsechelidis 1 (Αγρός II)	9	31,87	1,68	1,24
Tsechelidis 2 (Αγρός II)	10	23,33	1,66	1,08
Tsechelidis 5 (Αγρός II)	4	35,02	1,78	1,34
Tsechelidis 6 (Αγρός II)	19	35,47	1,68	0,99
Tsechelidis 7 (Αγρός II)	15	44,13	1,79	1,53
Tsechelidis 9 (Αγρός II)	14	57,60	1,78	1,55
Tsechelidis 10 (Αγρός II)	11	55,13	1,75	1,49
Tsechelidis 15 (Αγρός II)	13	46,53	1,74	1,32
Tsechelidis 1 (Αγρός III)	3	72,67	1,77	1,69
Tsechelidis 4 (Αγρός III)	16	81,73	1,80	1,64
Tsechelidis 5 (Αγρός III)	5	49,93	1,71	1,37
Tsechelidis 6 (Αγρός III)	18	26,03	1,75	1,07
Tsechelidis 9 (Αγρός III)	12	34,07	1,75	1,33
Tsechelidis 12 (Αγρός III)	2	68,40	1,76	1,57
Tsechelidis 13 (Αγρός III)	7	21,87	1,74	1,07
Tsechelidis 14 (Αγρός III)	17	44,33	1,77	1,29
Tsechelidis 15 (Αγρός III)	6	65,40	1,73	1,52
Matua	8	65,13	1,75	1,56
Matua	8a	58,71	1,73	1,65
Matua	20	22,07	1,53	0,94
Matua	20a	31,05	1,55	1,13

Με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό (Κεφ. Υλικά & Μέθοδοι, § 3.Μοριακές Αναλύσεις, πιν. 2), είχαν επιλεγεί αρχικά 18 γενότυποι της ποικιλίας «Tsechelidis». Ωστόσο, δεν κατέστη δυνατό να απομονωθεί γενωμικό υλικό από τον γενότυπο «Tsechelidis» 12 (Αγρός II), καθώς τα δείγματα του φυτικού ιστού από τον συγκεκριμένο γενότυπο δεν βρέθηκαν σε καλή κατάσταση, έπειτα από την αποστολή τους στο ερευνητικό ινστιτούτο Max Planck, όπου και διεξήχθησαν οι μοριακές αναλύσεις.

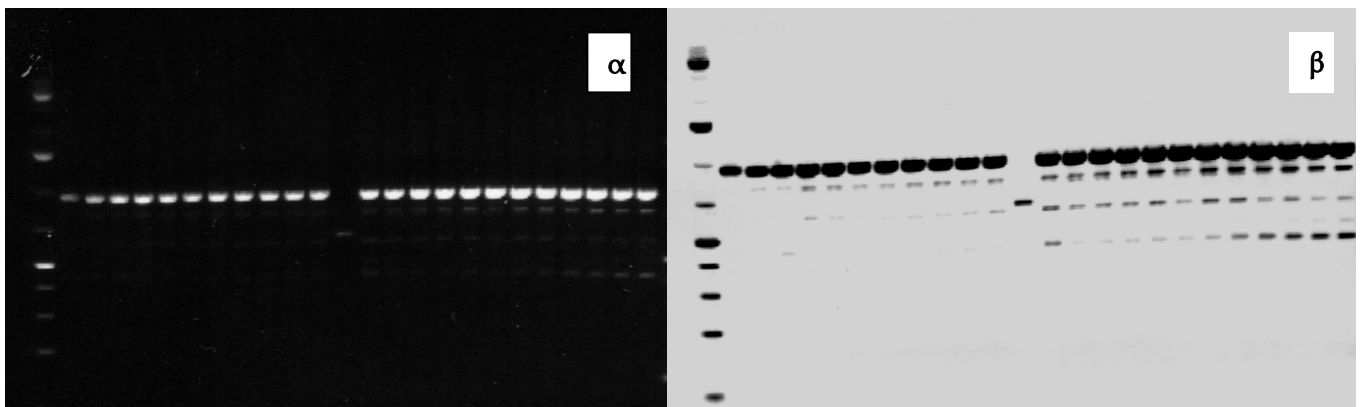


Εικ.1 Αρχική συγκέντρωση DNA των 21 επιλεγμένων γενοτύπων (αγαρόζη 0,8%)

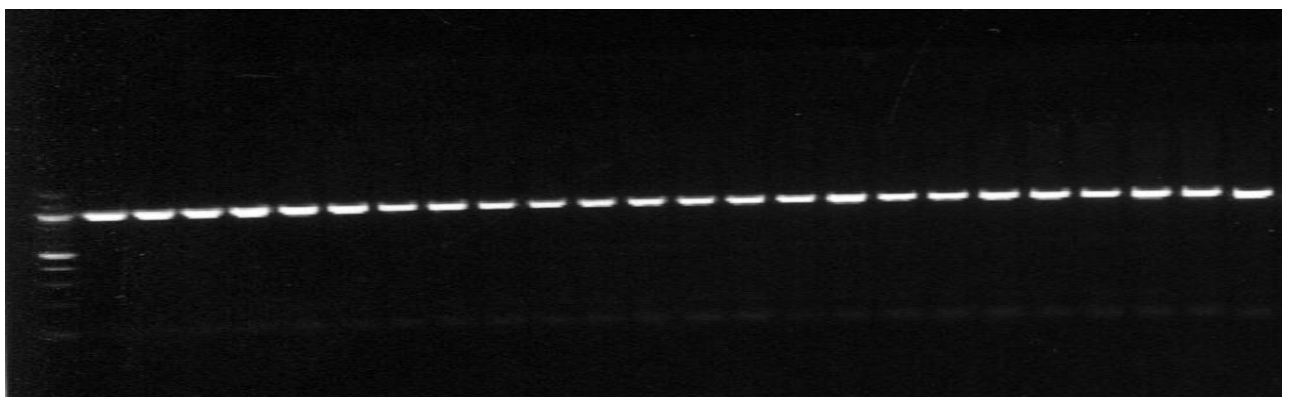
Με σκοπό την ταυτοποίηση του φύλου των 17 επιλεγμένων γενοτύπων της ποικιλίας «Tsechelidis», πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση με τους δείκτες SmX, SmY και SmY1 (τύπου SCAR). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν γενότυποι της ποικιλίας «Hayward» (θηλυκή ποικιλία) και γενότυποι της ποικιλίας «Matua» (αρσενική ποικιλία). Ο δείκτης SmX συνδέεται με το θηλυκό γένος στα είδη *A. chinensis* και *A. deliciosa* και δίνει χαρακτηριστικό προϊόν 950bp. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος δείκτης δεν είναι πολυμορφικός, καθώς η ζώνη των 950bp εμφανίζεται τόσο σε θηλυκούς, όσο και σε αρσενικούς απογόνους.

Στην πρώτη ανάλυση με τον εκκινητή SmX και τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), σχεδόν όλοι οι εξεταζόμενοι γενότυποι εμφάνισαν το επιθυμητό προϊόν (950bp), με εξαίρεση μόνο έναν γενότυπο της ποικιλίας «Tsechelidis» (Εικ.2). Αναφέρεται ότι η σειρά φόρτωσης των προϊόντων ενίσχυσης της PCR στην πηκτή αγαρόζης είναι αρχικά οι 3 γενότυποι της ποικιλίας «Hayward», ακολούθως οι 17 γενότυποι της ποικιλίας «Tsechelidis» και τέλος οι 4 γενότυποι της ποικιλίας «Matua». Η καταγραφή των ζωνών έγινε σε

πηκτική αγαρόζης (2%), με τη βοήθεια 1Kb DNA plus ladder. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2β, ο εκκινητής SmX έδωσε επιπλέον προϊόντα ενίσχυσης (δευτερεύουσες ζώνες), πέρα από την επιθυμητή ζώνη των 950bp. Σε επαναλήψεις της αντίδρασης που πραγματοποιήθηκαν, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία των δευτερευόντων προϊόντων ενίσχυσης ήταν ασταθής και η συγκέντρωσή τους πολύ μικρή για να κριθούν κατάλληλα για αλληλούχιση. Κατά συνέπεια εφαρμόστηκε πρόγραμμα σταδιακής μείωσης της θερμοκρασίας επανυβριδισμού 58-50° C στον θερμικό κυκλοποιητή, με στόχο την εξάλειψη των υποπροϊόντων. Το αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης ήταν η ενίσχυση αποκλειστικά του κύριου προϊόντος για το σύνολο των 24 γενοτύπων, το οποίο κρίθηκε κατάλληλο για αλληλούχιση (Εικ. 3).



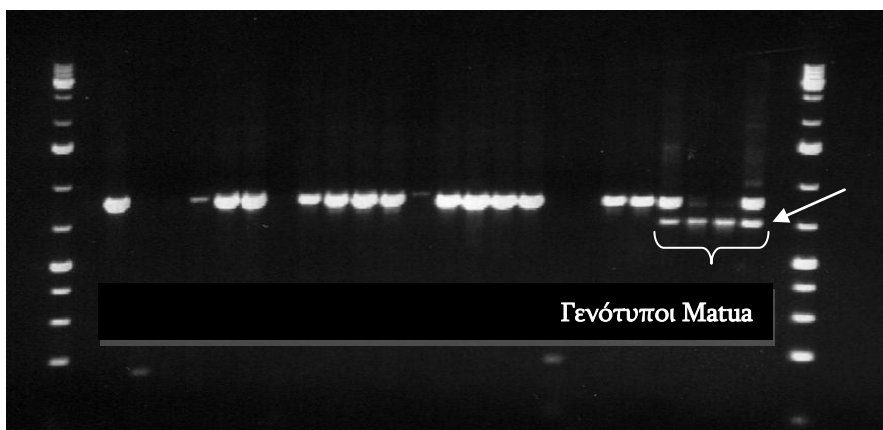
Εικ. 2 Αποτελέσματα PCR για τον εκκινητή SmX. Χαρακτηριστική ζώνη στα 950 bp. Παρουσία δευτερευόντων ζωνών (β)



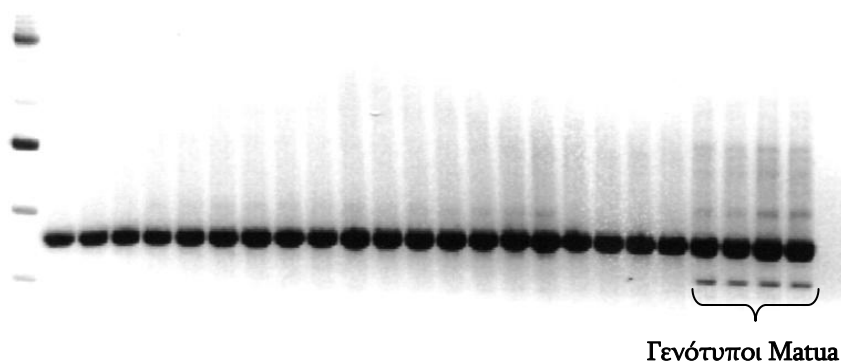
Εικ. 3 Αποτελέσματα PCR για τον εκκινητή SmX. Χαρακτηριστική ζώνη στα 950 bp για το σύνολο των 24 γενοτύπων, χωρίς την παρουσία δευτερευόντων ζωνών

Ο δείκτης SmY συνδέεται με το αρσενικό γένος στα είδη *A. chinensis* και *A. deliciosa* και δίνει δύο χαρακτηριστικές ζώνες, των 870bp και 770bp. Η ζώνη των 870bp ωστόσο, εμφανίζεται τόσο σε θηλυκούς, όσο και σε αρσενικούς απογόνους, ενώ η ζώνη των 770bp μόνο στους αρσενικούς. Με βάση την αλληλουχία της συγκεκριμένης ζώνης δημιουργήθηκε ο κυρίαρχος δείκτης SmY1, με τον οποίο μπορεί να γίνει έγκυρη αναγνώριση των αρσενικών γενοτύπων (Gill *et al.*, 1998).

Στην πρώτη ανάλυση με τον εκκινητή SmY και τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), δεν εμφάνισαν όλοι οι εξεταζόμενοι γενότυποι τη μονομορφική ζώνη των 870bp. Ωστόσο, η ζώνη των 770bp, η οποία συνδέεται με το αρσενικό φύλο, εμφανίστηκε και στους 4 γενότυπους της αρσενικής ποικιλίας «Matua» (Εικ.4). Σε επαναλήψεις της αντίδρασης που πραγματοποιήθηκαν, όλοι οι γενότυποι εμφάνισαν τελικώς τη ζώνη των 870bp, ενώ η ζώνη των 770bp εμφανίζονταν σταθερά μόνο στους γενότυπους της ποικιλίας «Matua» (Εικ. 5). Η μονομορφική ζώνη των 870bp απομονώθηκε για το σύνολο των 24 γενοτύπων και αλληλουχίστηκε.

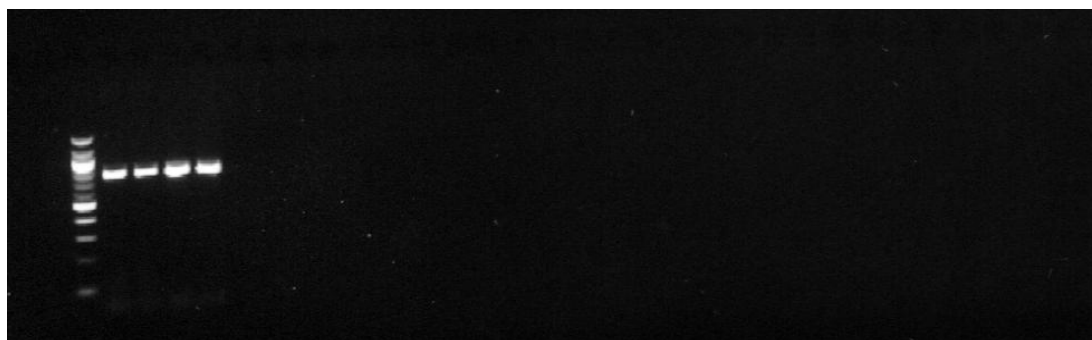


Εικ. 4 Αρχικά αποτελέσματα PCR για τον εκκινητή SmY. Η ζώνη των 870bp (μονομορφική) δεν εμφανίζεται σε όλους τους γενότυπους. Οι γενότυποι της ποικιλίας Matua ωστόσο, εμφάνισαν τη χαρακτηριστική ζώνη για το αρσενικό γένος, στα 770 bp.



Εικ. 5 Τελικά αποτελέσματα PCR για τον εκκινητή SmY. Η ζώνη των 870bp (μονομορφική) εμφανίζεται σε όλους τους γενότυπους. Οι γενότυποι της ποικιλίας Matua εμφάνισαν επιπλέον τη χαρακτηριστική ζώνη για το αρσενικό γένος, στα 770 bp.

Στις αντιδράσεις με τον εκκινητή SmY1, μόνο οι γενότυποι της ποικιλίας «Matua» εμφάνισαν τη ζώνη των 770bp (Εικ. 6). Όπως έχει προαναφερθεί, ο SmY1 είναι κυρίαρχος δείκτης και βοηθά στη διάκριση των δύο φύλων στο ακτινίδιο, καθώς τα αρσενικά φέρουν τη χαρακτηριστική ζώνη (παρουσία) και τα θηλυκά όχι (απουσία).



Εικ. 6 Αποτελέσματα PCR για τον εκκινητή SmY1. Η ζώνη των 770bp εμφανίζεται μόνο στους αρσενικούς γενότυπους

Η ταυτοποίηση του φύλου των 24 εξεταζόμενων γενοτύπων ακτινιδιάς, με τη βοήθεια των μοριακών δεικτών SmX, SmY και SmY1, κρίνεται επιτυχής, καθώς κατέστη δυνατό να διακριθούν οι αρσενικοί από τους θηλυκούς γενότυπους. Οι γενότυποι των ποικιλιών «Hayward» και «Matua» αποτέλεσαν τους μάρτυρες για το θηλυκό και αρσενικό γένος αντίστοιχα. Οι γενότυποι της ποικιλίας «Tsehelidis» χαρακτηρίστηκαν ως θηλυκοί, καθώς εμφάνισαν τις χαρακτηριστικές ζώνες του δείκτη SmX, ο οποίος συνδέεται με το θηλυκό γένος και παράλληλα χαρακτηρίστηκαν από την απουσία των χαρακτηριστικών ζωνών που συνδέονται με το αρσενικό φύλο, στην ανάλυση με τους δείκτες SmY και SmY1. Στη συγκεκριμένη μελέτη τα δείγματα προέρχονταν από γενότυπους των οποίων το φύλο ήταν ήδη γνωστό με βάση τη μορφολογία των ανθέων τους, καθώς επρόκειτο για πλήρως ανεπτυγμένα πρέμνα. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των συγκεκριμένων δεικτών στην ταυτοποίηση του φύλου σε πρώιμο στάδιο είναι πολύ μεγάλη και μπορεί να εφαρμοστεί με ακρίβεια σε νεαρά φυτά ακτινιδιάς, πριν αυτά εισέλθουν στο στάδιο της ανθοφορίας. Οι Gill *et al.*, 1998 χρησιμοποίησαν τους συγκεκριμένους δείκτες για να χαρακτηρίσουν

έναν πληθυσμό 120 νεαρών φυτών του είδους *A. chinensis*. Η ταυτοποίηση του φύλου με τη χρήση των δεικτών είχε ποσοστό επιτυχίας 88%, καθώς κατέστη δυνατό να προσδιοριστεί σωστά το φύλο 105 γενοτύπων, όπως επιβεβαιώθηκε αργότερα από την ανθοφορία των φυτών. Οι δείκτες είχαν επίσης υψηλά ποσοστά ακρίβειας σε πληθυσμούς του είδους *A. deliciosa*, όχι όμως σε πληθυσμούς άλλων ειδών του γένους *Actinidia*, καθώς δεν παρήγαγαν προϊόντα ενίσχυσης.

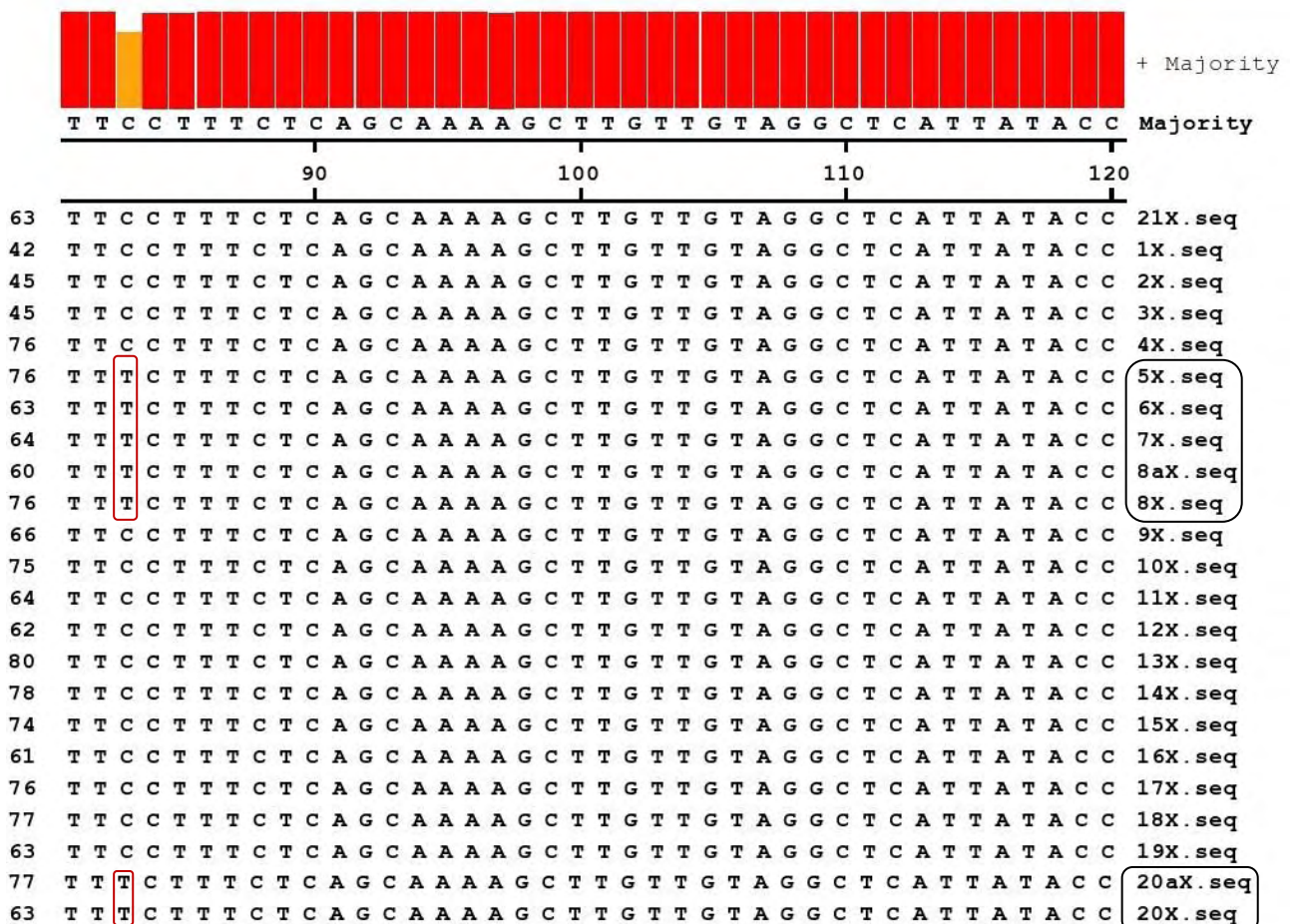
4.2 Αλληλούχιση προϊόντων ενίσχυσης των δεικτών SmX και SmY

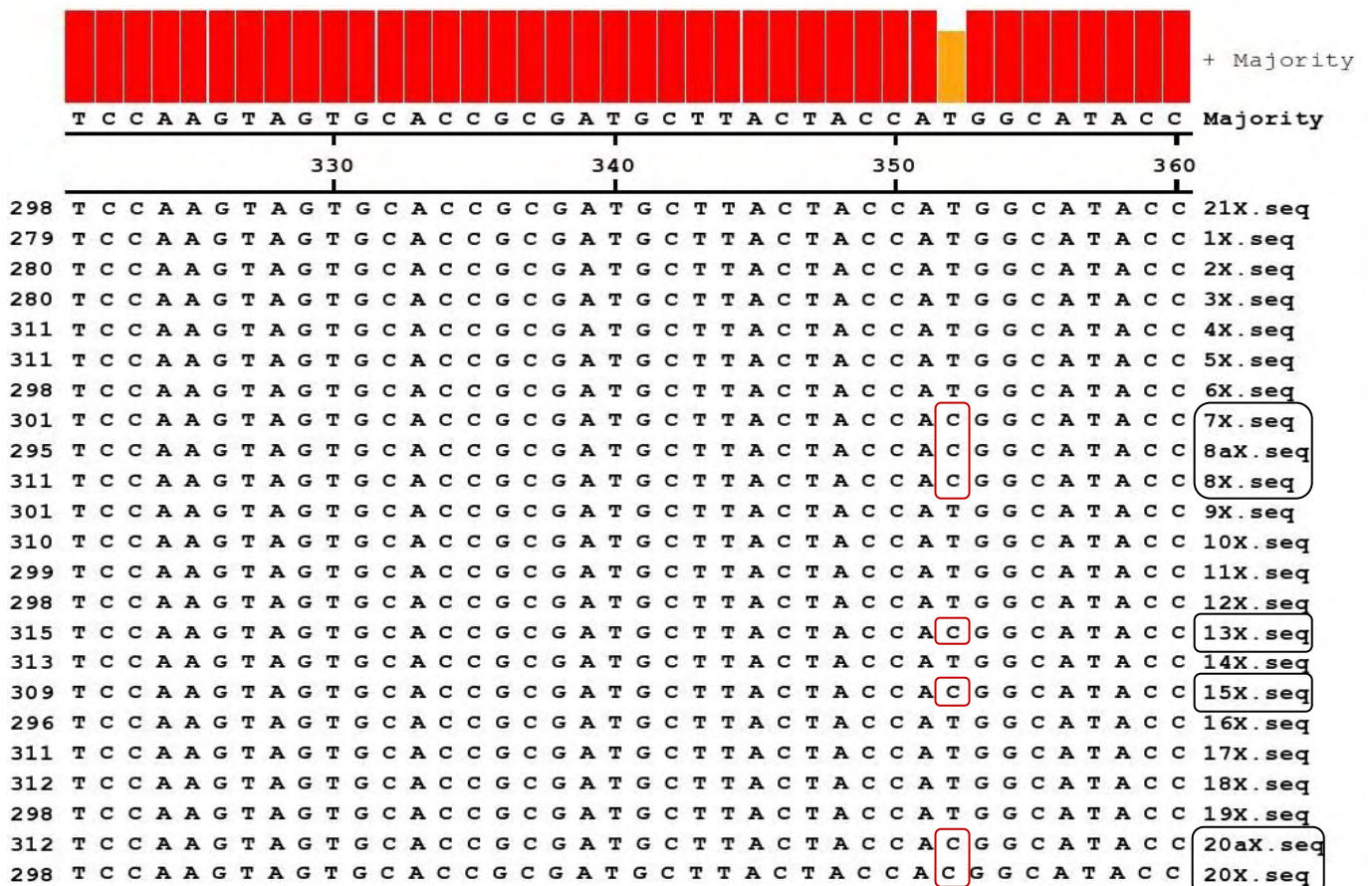
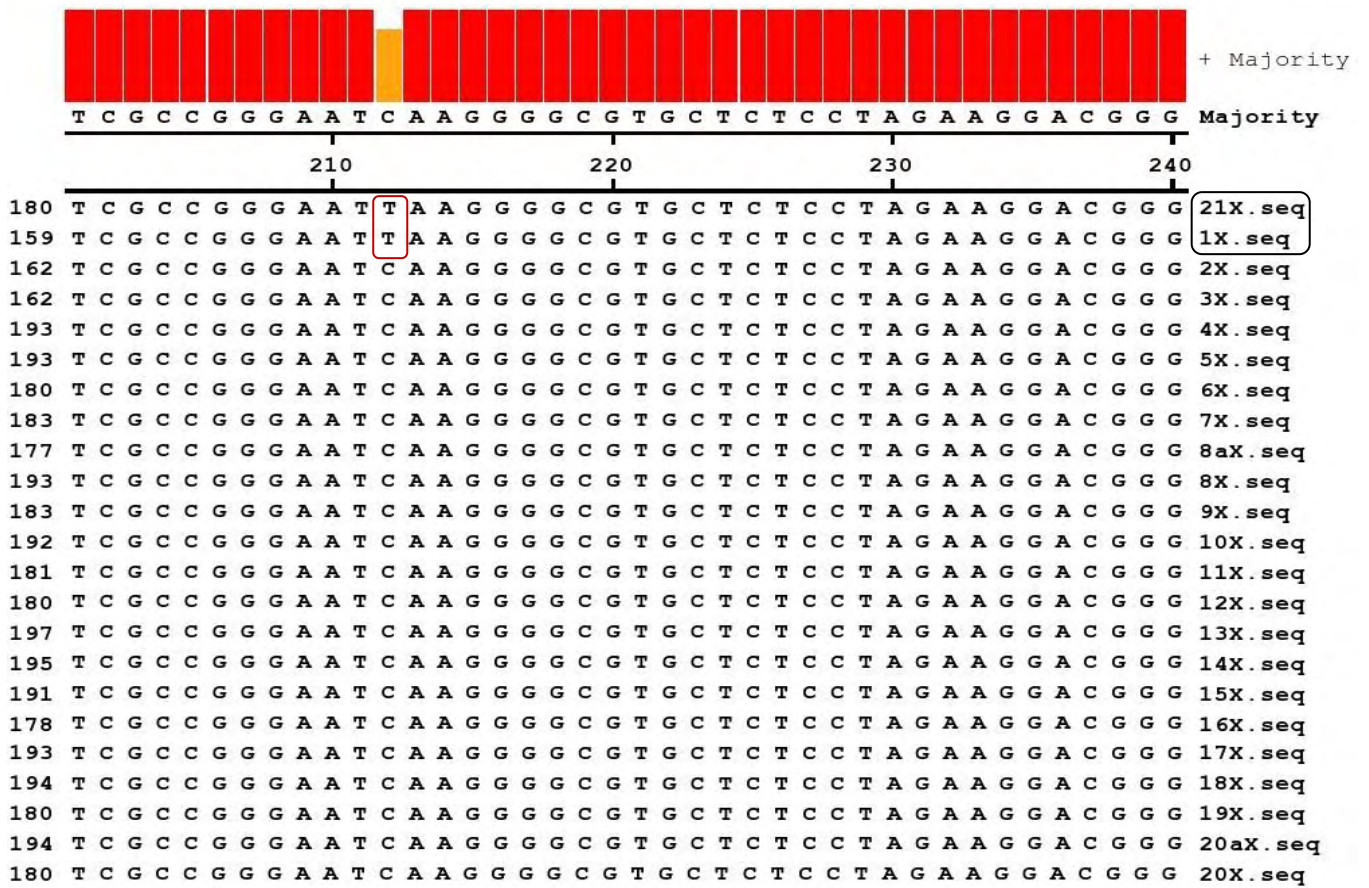
Από τη μοριακή ανάλυση με τους δείκτες του φύλου δεν προέκυψαν διαφορές, που να βασίζονται στην πολυμορφικότητα των ζωνών, τόσο μεταξύ των γενοτύπων των ποικιλιών «Hayward» και «Tsechelidis», όσο και μεταξύ των γενοτύπων των δύο ακραίων κλάσεων της ποικιλίας «Tsechelidis». Για το λόγο αυτό, οι μονομορφικές ζώνες των εκκινητών SmX (950bp) και SmY (870bp) απομονώθηκαν και αλληλουχίστηκαν, με σκοπό τον εντοπισμό πολυμορφισμών μεταξύ των γενοτύπων σε επίπεδο μεμονωμένης νουκλεοτιδικής βάσης (SNP).

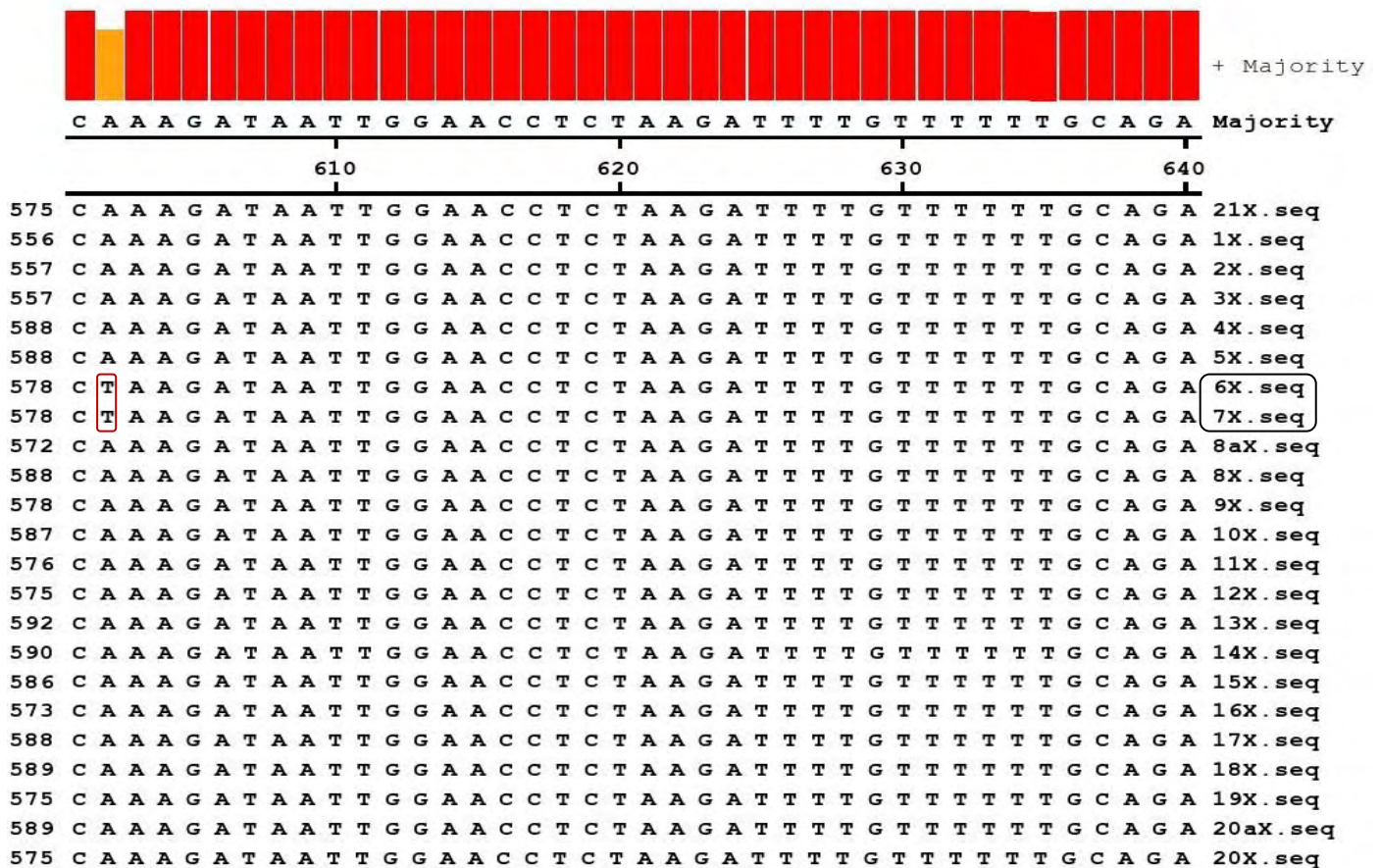
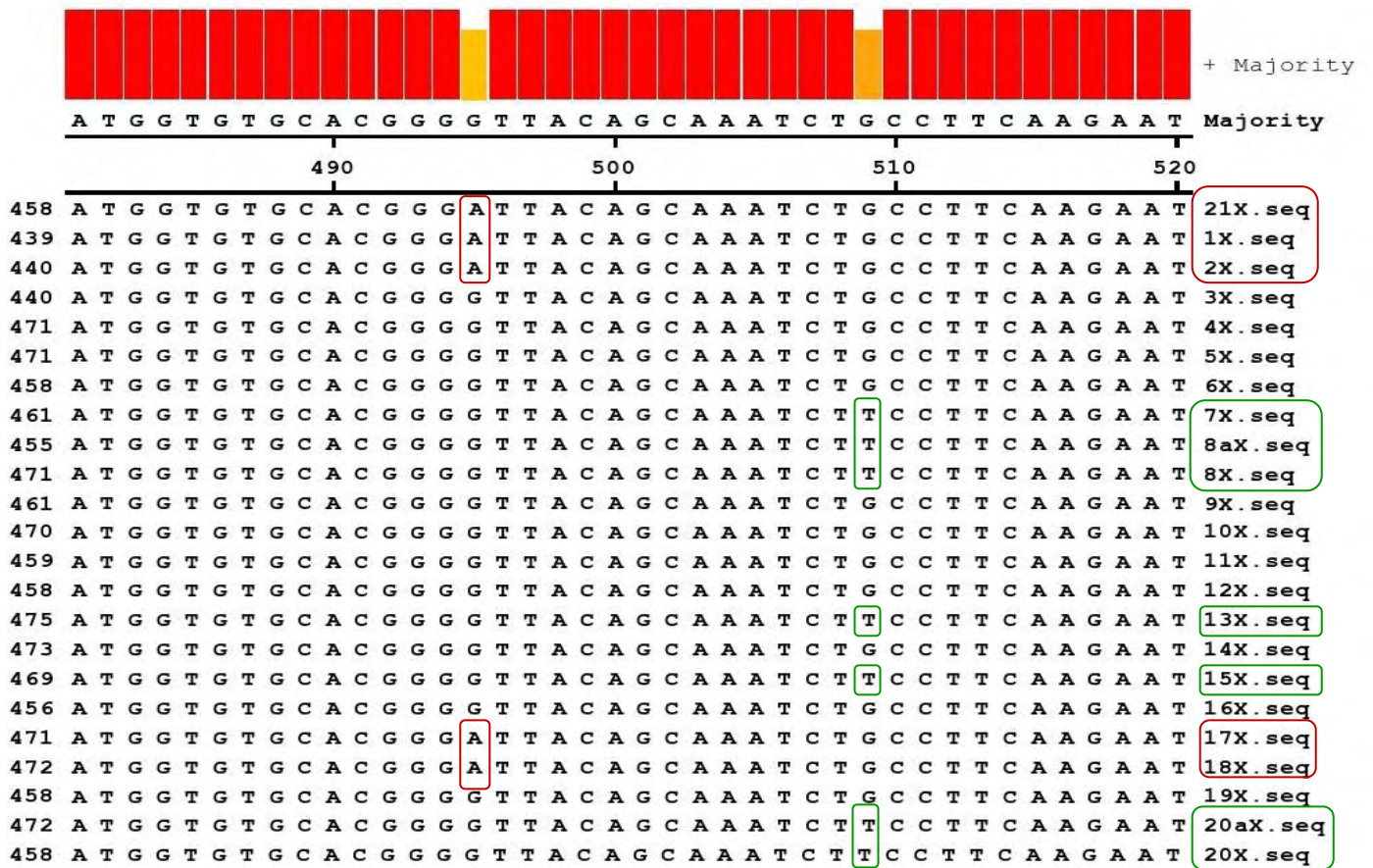
Η αλληλουχία της ζώνης των 950bp του εκκινητή SmX προσδιορίστηκε για κάθε ένα από τους 24 εξεταζόμενους γενότυπους ξεχωριστά και με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού προγράμματος έγινε η τελική ευθυγράμμιση όλων των αλληλουχιών για τη συγκριτική μελέτη και τον εντοπισμών τυχόν πολυμορφισμών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες που ακολουθούν. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί έναν χρωματικό κώδικα (χρωματιστές μπάρες στην κορυφή κάθε διαγράμματος) για τον εύκολο εντοπισμό των πολυμορφισμών. Ο κώδικας ξεκινά από το κόκκινο χρώμα, με το οποίο δηλώνεται η πλήρης ταύτιση των νουκλεοτιδικών βάσεων της αλληλουχίας του εκκινητή με τις αντίστοιχες βάσεις στις αλληλουχίες των γενοτύπων και εκτείνεται με χρωματικές διαβαθμίσεις έως το μπλε χρώμα, το οποίο δηλώνει την πλήρη απόκλιση των γενοτύπων από την αλληλουχία του εκκινητή (100%

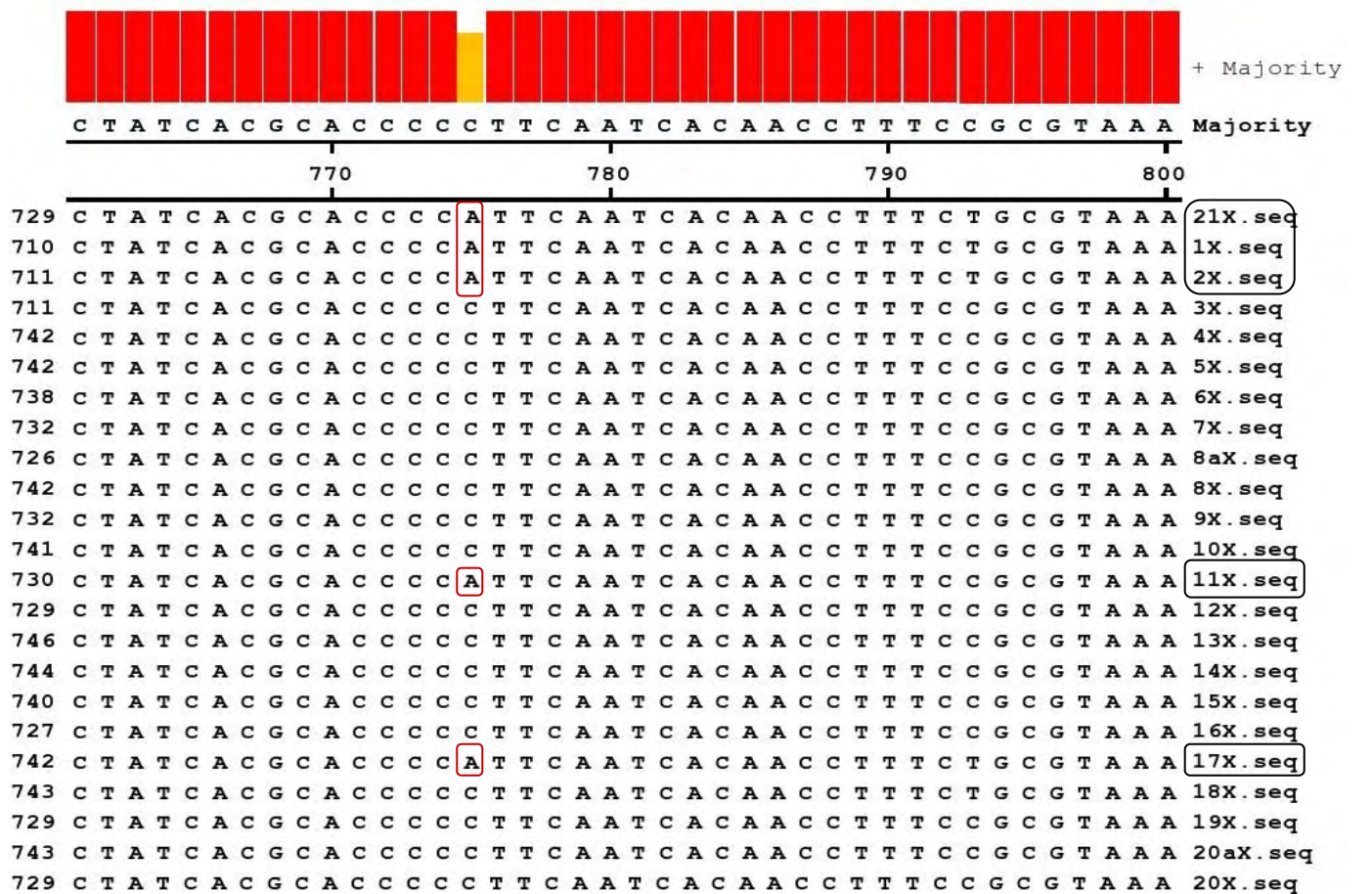
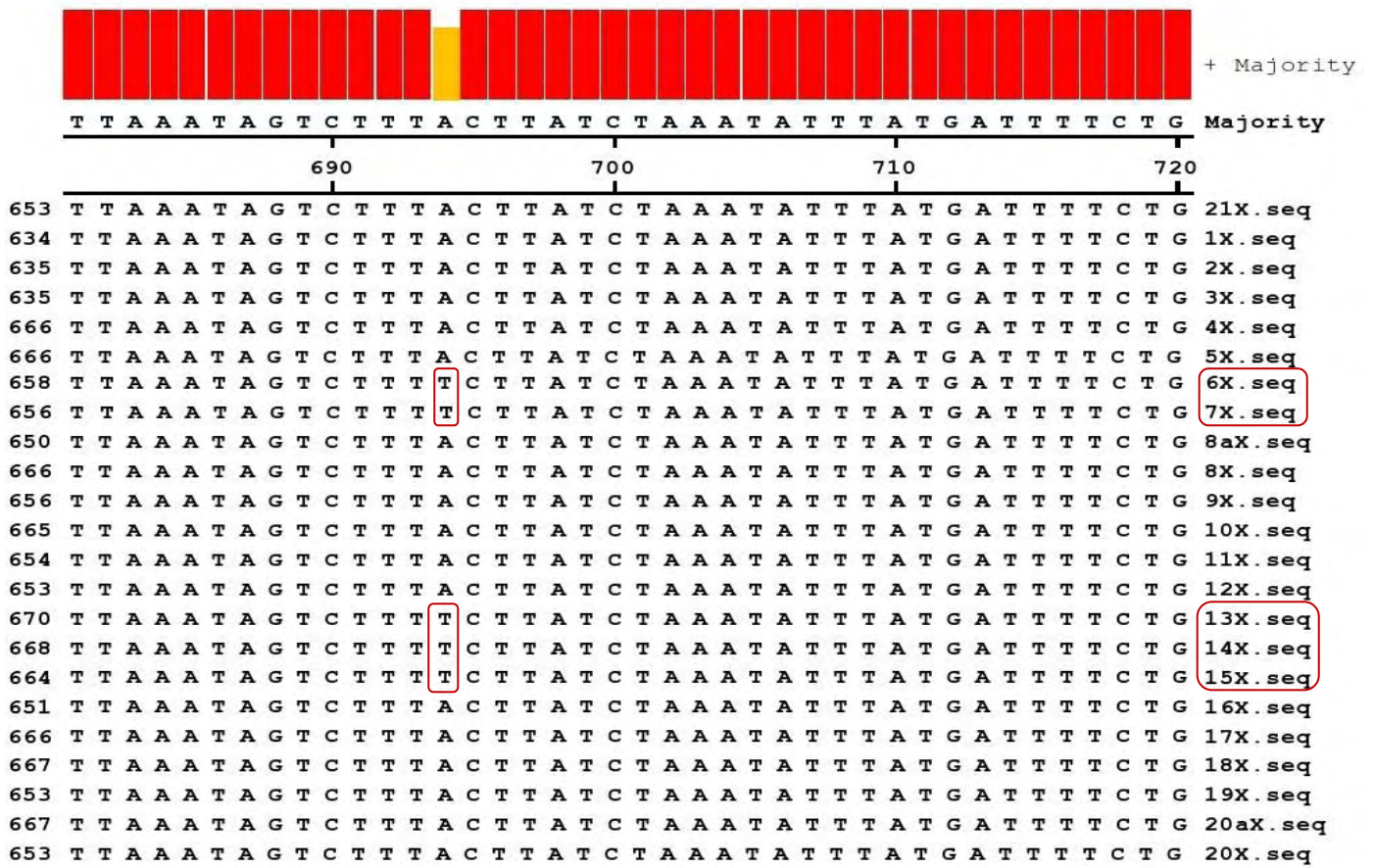
πολυμορφική θέση). Ενδιάμεσες αποχρώσεις δηλώνουν την παρουσία πολυμορφισμού στη συγκεκριμένη θέση της αλληλουχίας, η συχνότητα του οποίου μεταξύ των γενοτύπων υποδηλώνεται από την αντίστοιχη απόχρωση (αποχρώσεις του κόκκινου χρώματος δηλώνουν μικρή συχνότητα). Κάτω από τις χρωματικές μπάρες εμφανίζεται η αλληλουχία του εκκινητή και η αρίθμηση για τα ζεύγη βάσεων. Ακολουθως εμφανίζονται οι ακολουθίες των γενοτύπων, οι κωδικοί των οποίων αναγράφονται στη στήλη δεξιά και αντιστοιχούν στους κωδικούς του πίνακα 1 (§ 4.1). Στη συγκριτική ανάλυση δεν περιλαμβάνεται ο γενότυπος 1α της ποικιλίας «Hayward», καθώς η χαμηλή καθαρότητα του δείγματος δεν επέτρεψε την αλληλούχιση του. Στη συνέχεια παρουσιάζονται μόνο τα τμήματα της αλληλουχίας του εκκινητή SmX, στα οποία εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί (Εικ. 7). Ολόκληρη η ακολουθία του εκκινητή ωστόσο, παρατίθεται στο Παράρτημα.

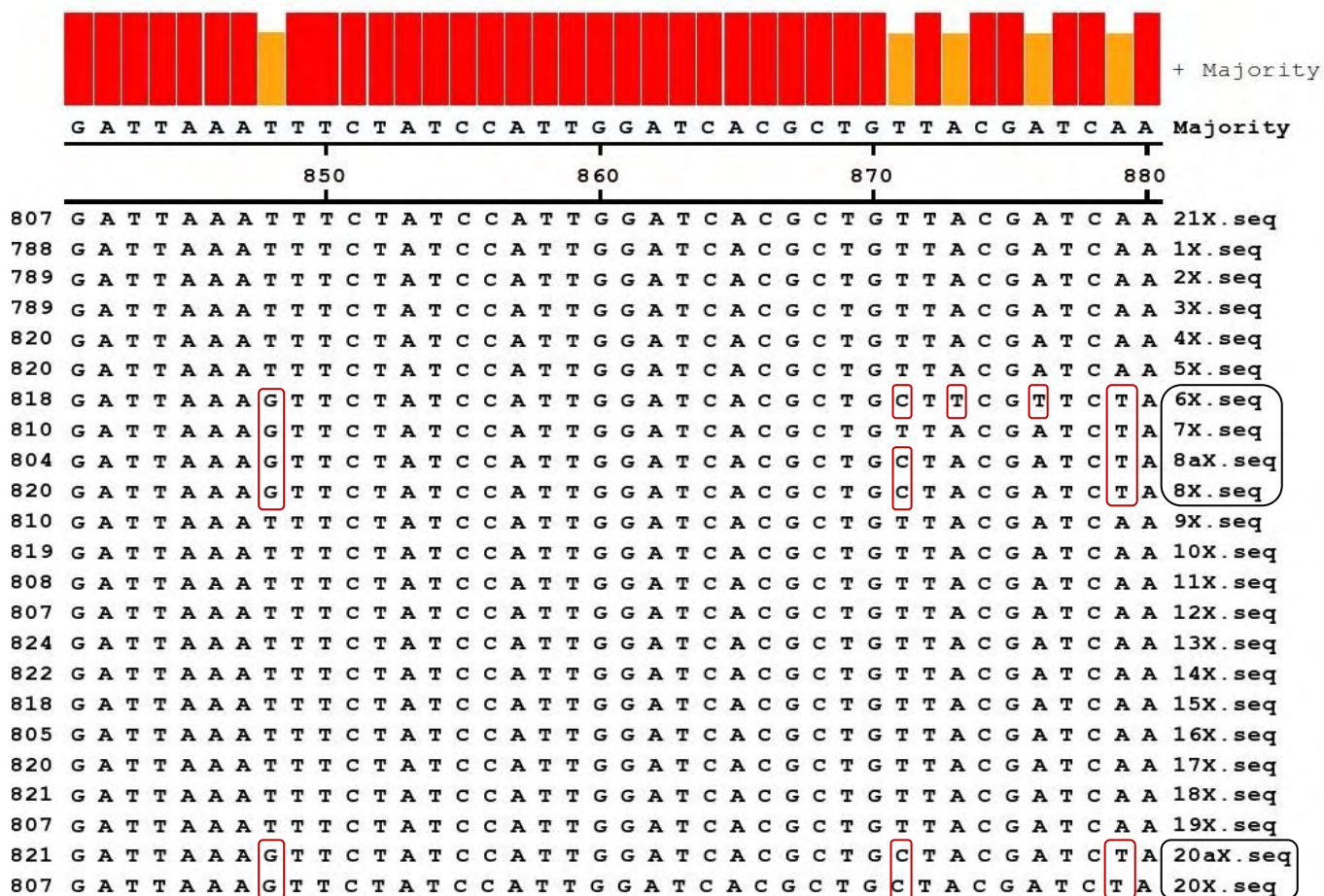
Εικόνα 7. Αποτελέσματα αλληλούχισης για τον εκκινητή SmX (ζώνη 950bp)











Όπως φαίνεται και στην εικόνα 7, πολυμορφισμοί τύπου SNP εντοπίστηκαν σε διάφορα σημεία της αλληλουχίας του εκκινητή SmX. Αυτό που παρουσιάζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον ωστόσο, είναι η ομαδοποίηση των γενοτύπων με βάση αυτούς τους πολυμορφισμούς. Συγκριμένα, στο 83^ο ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας εντοπίστηκε πολυμορφισμός C/T. Στην αλληλουχία του εκκινητή, καθώς και των περισσότερων γενοτύπων, υπάρχει κυτοσίνη (C) στη θέση αυτή, ενώ στην αλληλουχία των γενοτύπων της αρσενικής ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α) και τριών γενοτύπων της ποικιλίας «Tsechelidis» (5, 6, και 7) υπάρχει αντίστοιχα θυμίνη (T). Οι γενότυποι της ποικιλίας «Hayward» (1 και 21) εμφάνισαν πολυμορφισμό στο 212^ο ζεύγος βάσεων, καθώς αντί για κυτοσίνη (C) είχαν θυμίνη (T) στη θέση αυτή. Σημειώνεται πως κανένας άλλος γενότυπος των άλλων δύο ποικιλιών δεν εμφάνισε τον πολυμορφισμό αυτό. Στο 352^ο ζεύγος βάσεων εντοπίστηκε επιπλέον πολυμορφισμός τύπου C/T, τον οποίο εμφάνισαν

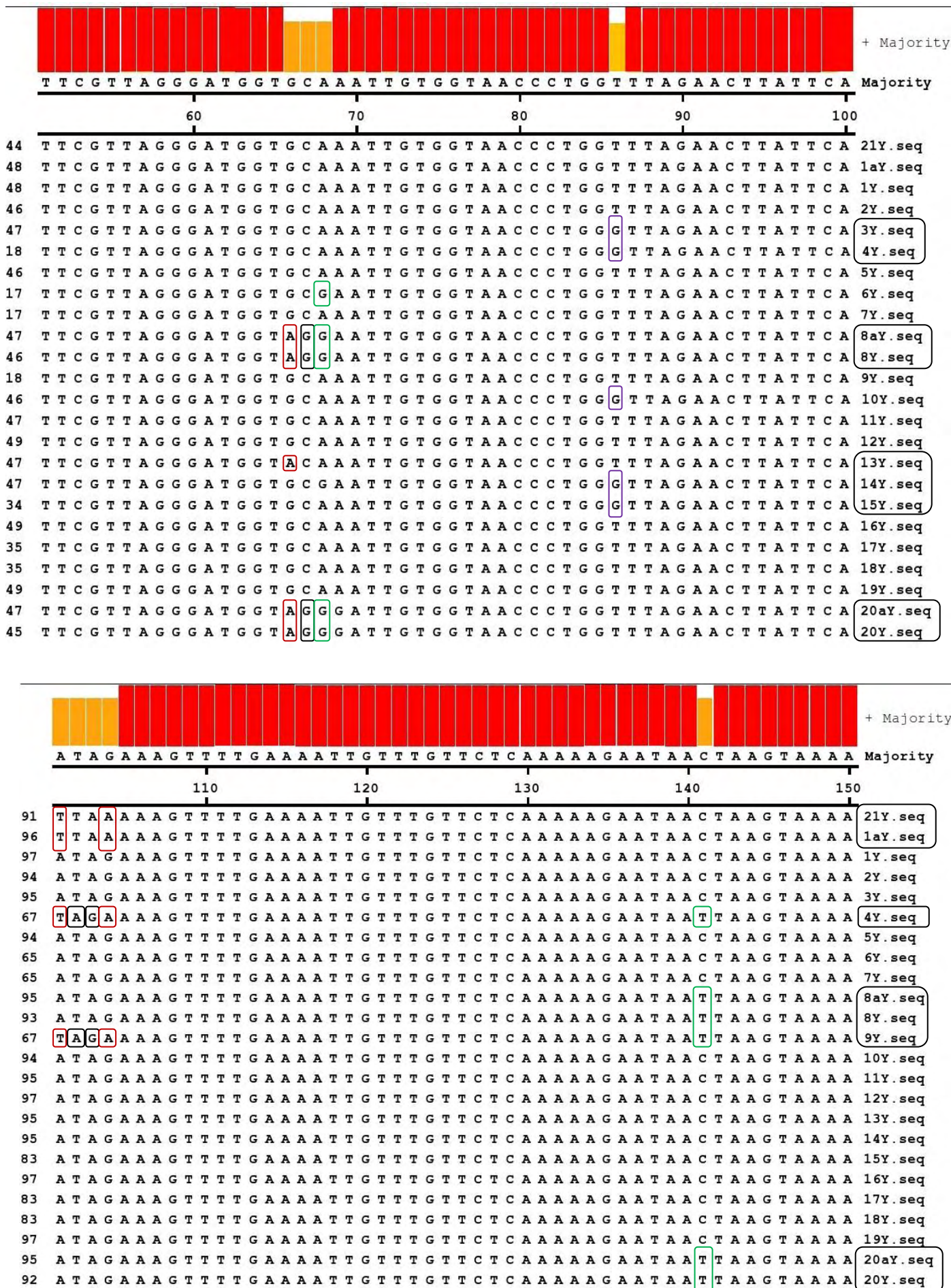
οι γενότυποι της ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α) και οι γενότυποι 7, 13 και 15 της ποικιλίας «Tsechelidis». Οι γενότυποι της ποικιλίας «Hayward» (1 και 21), καθώς και οι γενότυποι 2, 17 και 18 της ποικιλίας «Tsechelidis» εμφάνισαν πολυμορφισμό τύπου G/A στο 495° ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας τους. Στο 509° ζεύγος βάσεων εντοπίστηκε πολυμορφισμός τύπου G/T στους γενότυπους της ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α) και στους γενότυπους 7, 13, 15 της ποικιλίας «Tsechelidis». Οι γενότυποι 6 και 7 της ποικιλίας «Tsechelidis» εμφάνισαν πολυμορφισμό τύπου A/T στο 602° ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας τους και οι γενότυποι 6, 7, 13, 14 και 15 πολυμορφισμό τύπου A/T στο 694° ζεύγος βάσεων. Οι γενότυποι της ποικιλίας «Hayward» (1 και 21), καθώς και οι γενότυποι 2, 11 και 17 της ποικιλίας «Tsechelidis» εμφάνισαν πολυμορφισμό τύπου C/A στο 775° ζεύγος βάσεων. Στο 871° ζεύγος βάσεων εντοπίστηκε πολυμορφισμός τύπου T/C στους γενότυπους της ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α) και στους γενότυπους 6 και 7 της ποικιλίας «Tsechelidis». Μόνο ο γενότυπος 6 ωστόσο, εμφάνισε επιπλέον πολυμορφισμούς στο 873° και στο 876° (τύπου A/T) ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας του. Τέλος, στο 879° ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας εντοπίστηκε πολυμορφισμός τύπου A/T στους γενότυπους της ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α) και στους γενότυπους 6 και 7 της ποικιλίας «Tsechelidis».

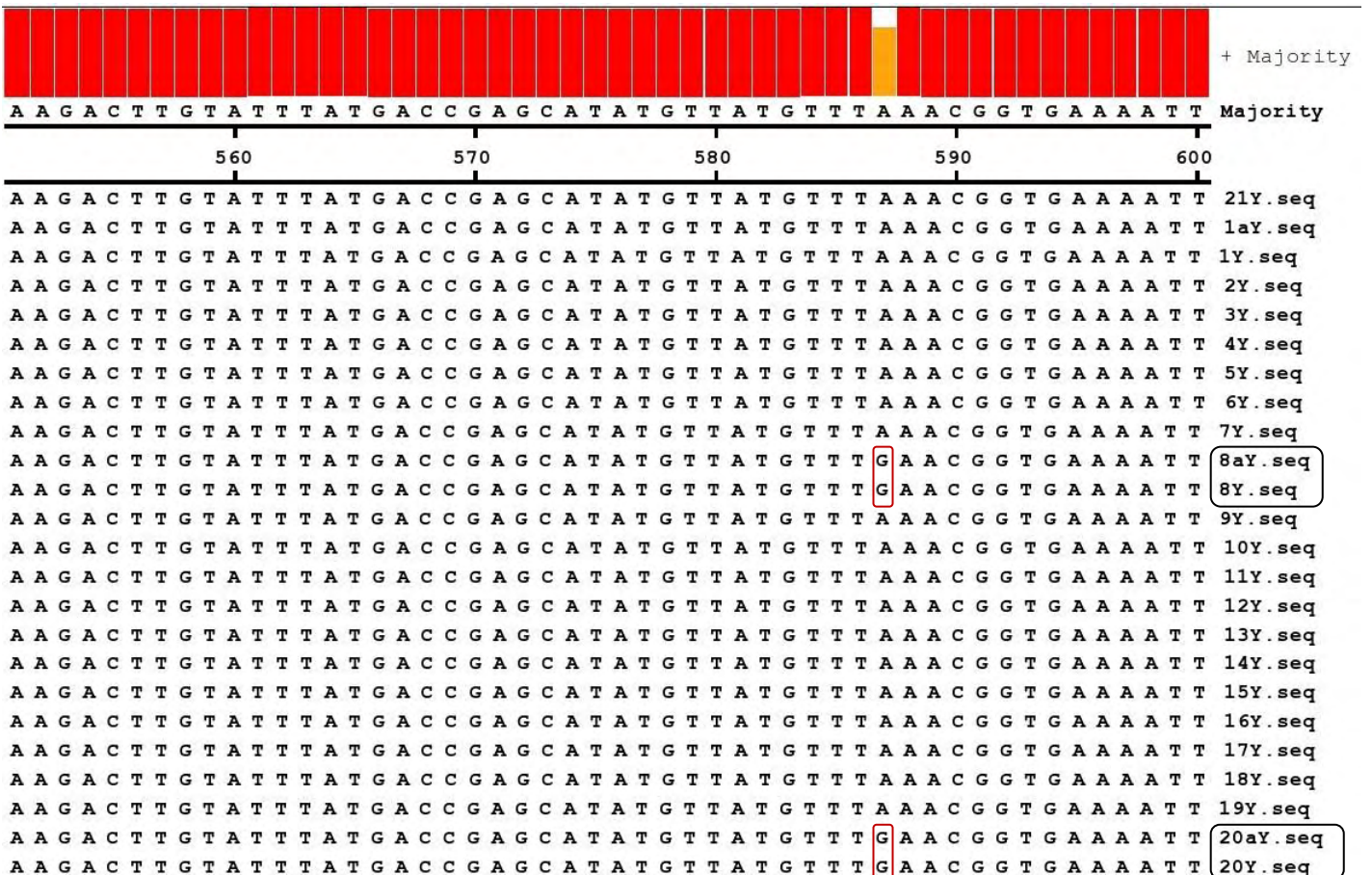
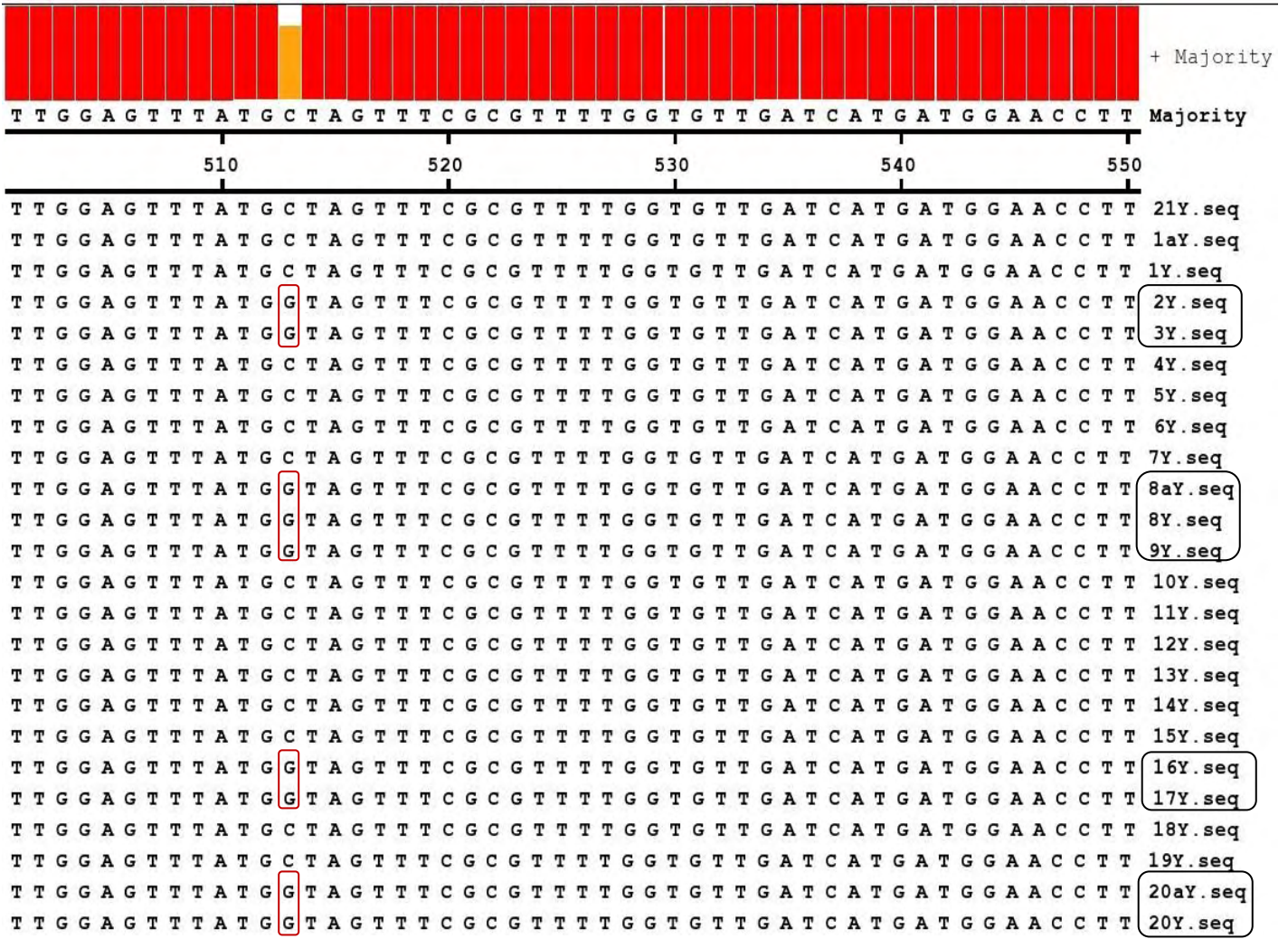
Μελετώντας συνολικά τους πολυμορφισμούς τύπου SNP των εξεταζόμενων γενοτύπων για τον εκκινητή SmX, προκύπτει μια γενική ομαδοποίηση των γενοτύπων σε τρεις κύριες ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τους γενότυπους της αρσενικής ποικιλίας «Matua» και τους γενότυπους 6, 7, 13 και 15 της ποικιλίας «Tsechelidis», καθώς εμφάνισαν σταθερά τον ίδιο πολυμορφισμό σε κάθε θέση της αλληλουχίας. Αποκωδικοποιώντας τους γενότυπους της ποικιλίας «Tsechelidis» (πιν. 1, § 4.1 του παρόντος κεφαλαίου), προκύπτουν τα πρέμνα 15 και 13 από τον αγρό III και τα πρέμνα 15 και 7 από τον αγρό II, τα οποία είχαν αρχικά χαρακτηριστεί ως αυτογόνιμα υψηλού βαθμού, βάση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα αγρού και τον έλεγχο της γύρης.

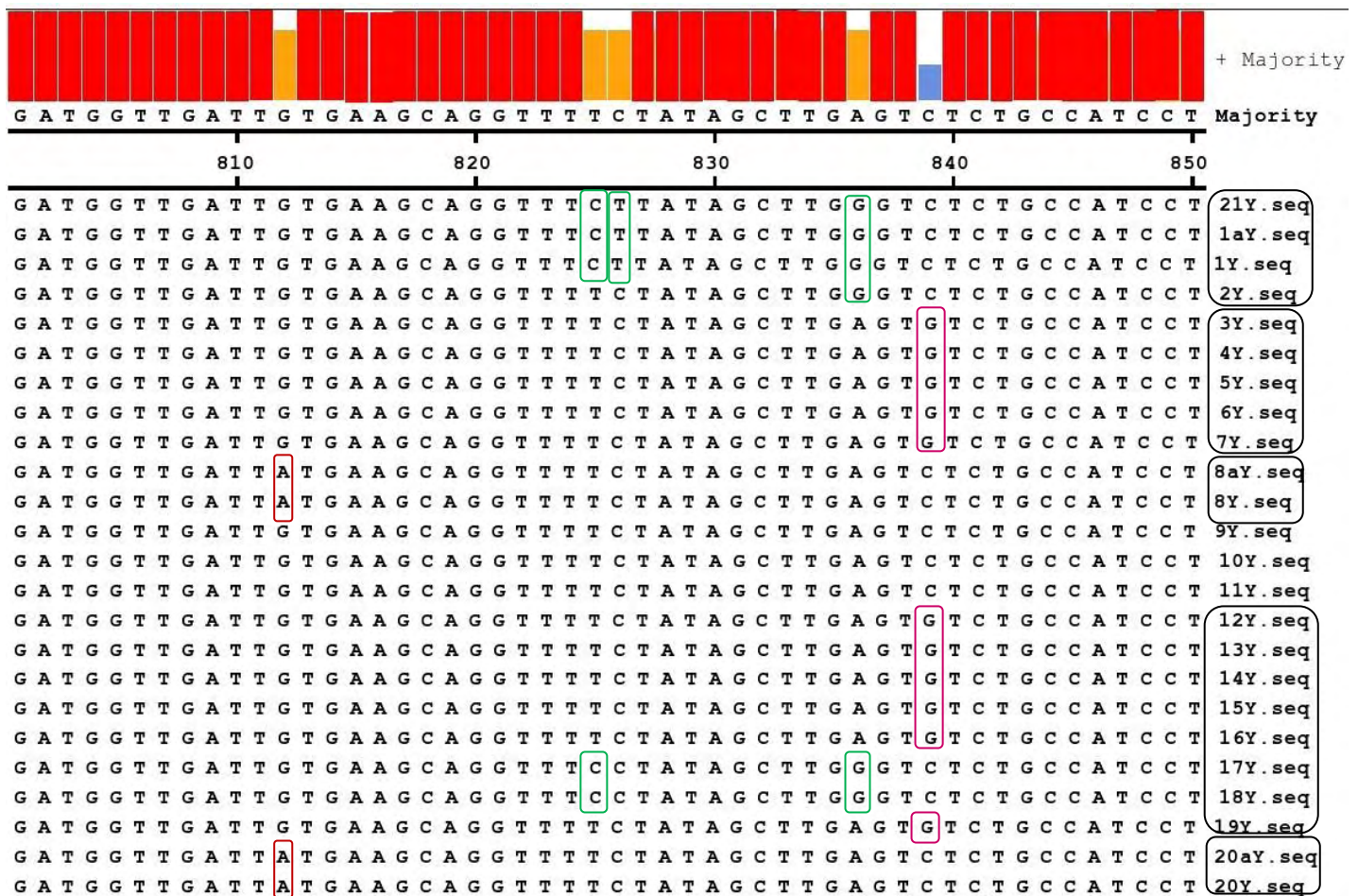
Ειδικά για το πρέμνο 15 του αγρού III (κωδικός μοριακής ανάλυσης 6) αναφέρεται ότι παρουσίασε πολυμορφισμό μεμονωμένης βάσης σε δύο σημεία της αλληλουχίας του, ο οποίος δεν σημειώθηκε σε κανέναν άλλο γενότυπο. Κοινό πολυμορφισμό με τους γενότυπους της ποικιλίας «Matua» εμφάνισαν ενίοτε και τα πρέμνα 5 (αγρός III) και 9 (αγρός II), τα οποία επίσης ανήκουν στην κατηγορία της υψηλής αυτογονιμότητας (Κεφ. Υλικά & Μέθοδοι, § 3. Μοριακές Αναλύσεις, πιν. 2). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τους γενότυπους της ποικιλίας «Hayward» και τους γενότυπους 2, 17 και 18, οι οποίοι αντιστοιχούν στα πρέμνα 12, 14 και 16 της ποικιλίας «Tsechelidis» στον αγρό III. Τα πρέμνα αυτά είχαν χαρακτηριστεί ως χαμηλού βαθμού αυτογόνια. Ωστόσο, υπήρξε και περίπτωση πολυμορφισμού μεμονωμένης νουκλεοτιδικής βάσης, ο οποίος εντοπίστηκε αποκλειστικά στους γενότυπους ποικιλίας «Hayward». Τέλος, σε μια τρίτη, γενικότερη ομάδα, θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν όλοι οι γενότυποι της ποικιλίας «Tsechelidis», οι οποίοι δεν εμφάνισαν κανένα πολυμορφισμό, σε καμία θέση της αλληλουχίας τους.

Αντίστοιχα αλληλουχίστηκε και η μονομορφική ζώνη των 870bp του εκκινητή SmY, τα αποτελέσματα της οποίας εμφανίζονται στο διάγραμμα 2. Στη συγκριτική ανάλυση περιλαμβάνονται και οι 24 επιλεγμένοι γενότυποι. Επισημαίνεται ότι έχουν επιλεγεί για παρουσίαση μόνο τα τμήματα της αλληλουχίας του εκκινητή SmY, στα οποία εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί. Ολόκληρη η ακολουθία του εκκινητή ωστόσο, είναι διαθέσιμη στο Παράρτημα.

Εικόνα 8. Αποτελέσματα αλληλούχισης για τον εκκινητή SmY (ζώνη 870bp)







Όπως φαίνεται και στην εικόνα 8, πολυμορφισμοί μεμονωμένης νουκλεοτιδικής βάσης (SNP) εντοπίστηκαν σε διάφορα σημεία της αλληλουχίας του εκκινήτη SmY. Αρκετοί από αυτούς εντοπίστηκαν αποκλειστικά στους γενότυπους της αρσενικής ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α), όπως για παράδειγμα ο πολυμορφισμός τύπου C/G στο 67^ο ζεύγος βάσεων, ο πολυμορφισμός τύπου C/A στο 239^ο και 302^ο ζεύγος βάσεων, ο πολυμορφισμός τύπου C/T στο 352^ο ζεύγος βάσεων, ο πολυμορφισμός τύπου A/G στο 587^ο ζεύγος βάσεων και ο πολυμορφισμός τύπου G/A στο 812^ο ζεύγος βάσεων. Υπήρξαν ωστόσο και περιπτώσεις όπου οι γενότυποι της ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α) εμφάνισαν κοινούς πολυμορφισμούς με γενότυπους της ποικιλίας «Tschelidis». Συγκεκριμένα, στο 66^ο ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας ο γενότυπος 13 της ποικιλίας «Tschelidis» και οι γενότυποι της ποικιλίας «Matua» εμφάνισαν πολυμορφισμό τύπου G/A. Αντίστοιχα, στο 68^ο ζεύγος εντοπίστηκε κοινός πολυμορφισμός τύπου A/G με τον γενότυπο 6 της ποικιλίας «Tschelidis».

Στο 141° ζεύγος βάσεων σημειώθηκε πολυμορφισμός τύπου C/T και στο 246° τύπου T/C στους γενότυπους της ποικιλίας «Matua» και στους γενότυπους 4 και 9 της ποικιλίας «Tsechelidis». Επιπλέον, μόνο ο γενότυπος 9 εμφάνισε κοινό πολυμορφισμό τύπου A/T με τους αρσενικούς γενότυπους στο 281° ζεύγος βάσεων, στο 347° (τύπου A/G), στο 430° (τύπου T/C) και στο 699° (τύπου C/G) ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας του. Τέλος, κοινό πολυμορφισμό με τους γενότυπους της ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α) εμφάνισαν οι γενότυποι 2, 3, 9, 16 και 17 της ποικιλίας «Tsechelidis» στο 513° ζεύγος βάσεων (τύπου C/G) και οι γενότυποι 9, 13 και 15 στο 621° ζεύγος (τύπου A/G) της αλληλουχίας τους.

Πολυμορφισμοί που αφορούσαν αποκλειστικά τους γενότυπους της ποικιλίας «Hayward» (1, 1α και 21) εντοπίστηκαν στο 175° ζεύγος βάσεων, όπου αντί για κυτοσίνη (C) οι τρεις γενότυποι είχαν γουανίνη (G) στη θέση αυτή (πολυμορφισμός τύπου C/G), και αντίστοιχα στη θέση 826, όπου αντί για κυτοσίνη (C) εντοπίστηκε θυμίνη (T) στην αλληλουχία των γενοτύπων (πολυμορφισμός τύπου C/T). Οι γενότυποι της ποικιλίας «Hayward» (1, 1α και 21) εμφάνισαν κοινό πολυμορφισμό με τους γενότυπους 4 και 9 της ποικιλίας «Tsechelidis» στο 101° (τύπου A/T) και στο 104° (τύπου G/A) ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας τους, με τους γενότυπους «Tsechelidis» 17 και 18 στο 825° ζεύγος βάσεων (τύπου T/C) και με τους γενότυπους «Tsechelidis» 2, 17 και 18 στο 836° ζεύγος βάσεων (τύπου A/G).

Τέλος, υπήρξαν και πολυμορφισμοί, οι οποίοι εντοπίστηκαν αποκλειστικά μεταξύ γενοτύπων της ποικιλίας «Tsechelidis». Συγκεκριμένα, οι γενότυποι 3, 4, 10, 14 και 15 εμφάνισαν πολυμορφισμό τύπου T/G στο 86° ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας τους. Οι γενότυποι 4 και 9 παρουσίασαν κοινό πολυμορφισμό στο 102° (τύπου T/A) και στο 103° ζεύγος βάσεων (τύπου A/G). Στο 278° ζεύγος βάσεων εντοπίστηκε πολυμορφισμός τύπου T/G στους γενότυπους 3, 4 και 9, ενώ στο 307° ζεύγος υπήρξε πολυμορφισμός τύπου C/Tα στους γενότυπους 2 και 3 της ποικιλίας «Tsechelidis».

Μελετώντας συνολικά τους πολυμορφισμούς τύπου SNP των 24 εξεταζόμενων γενοτύπων για τον εκκινήτη SmY, προκύπτει μια γενική ομαδοποίηση, όπως και στην περίπτωση του εκκινήτη SmX. Οι γενότυποι της αρσενικής ποικιλίας «Matua» εμφάνισαν κοινούς πολυμορφισμούς με πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis», τα οποία ανήκουν στην κατηγορία του υψηλού βαθμού αυτογονιμότητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο στην αλληλουχία του εκκινήτη SmY, όσο και στην αλληλουχία του SmX, δεν εντοπίστηκε κανένας κοινός πολυμορφισμός μεταξύ των γενοτύπων της ποικιλίας «Matua» και της ποικιλίας «Hayward». Κατά κύριο λόγο, δεν εντοπίστηκε επίσης κανένας κοινός πολυμορφισμός μεταξύ των γενοτύπων της ποικιλίας «Matua» και των γενοτύπων της ποικιλίας «Tsechelidis», οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία του χαμηλού βαθμού αυτογονιμότητας, καθώς και μεταξύ των γενοτύπων της ποικιλίας «Hayward» και των γενοτύπων της ποικιλίας «Tsechelidis», οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία του υψηλού βαθμού αυτογονιμότητας. Εξαίρεση αποτέλεσε μόνο ο γενότυπος 9 (πρέμνο 1 από τον αγρό II), ο οποίος χαρακτηρίζεται από αυτογονιμότητα υψηλού βαθμού και παρουσίασε κοινούς πολυμορφισμούς στην αλληλουχία του εκκινήτη SmY, τόσο με την ποικιλία «Matua», όσο και με την ποικιλία «Hayward». Όσο αφορά τους πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν αποκλειστικά μεταξύ των γενοτύπων της ποικιλίας «Tsechelidis», σημειώνεται ότι δεν υπήρξαν κοινοί πολυμορφισμοί μεταξύ γενοτύπων, οι οποίοι ανήκαν σε διαφορετική κλάση (χαμηλής – υψηλής αυτογονιμότητας).

Οι πληροφορίες ωστόσο, που μπορεί να προκύψουν από τον εντοπισμό και την ανάλυση των πολυμορφισμών τύπου SNP στην περίπτωση της ακτινιδιάς, παραμένουν πολύ περιορισμένες, καθώς δεν υπάρχει έως σήμερα ολοκληρωμένος γενετικός χάρτης για κανένα είδος του γένους *Actinidia*. Την πιο πρόσφατη και συλλογική προσπάθεια προς την κατεύθυνση αυτή, αποτελεί η έρευνα των Fraser *et al.* (2009), οι οποίοι κατασκεύασαν έναν χάρτη σύνδεσης για το διπλοειδές είδος *A. chinensis* με τη βοήθεια 664 μικροδορυφόρων και των

δύο δεικτών τύπου SCAR (SmX και SmY), οι οποίοι συνδέονται με την έκφραση του φύλου. Ο χάρτης αποτελείται από 29 ομάδες σύνδεσης (αριθμός που αντιστοιχεί στο βασικό χρωμοσωμικό αριθμό $n=29$), χωρίς ωστόσο να έχει αναγνωριστεί ακόμα πόσα και ποια ακριβώς γονίδια εμπεριέχονται σε κάθε ομάδα σύνδεσης. Οι δείκτες που συνδέονται με το φύλο, χαρτογραφήθηκαν μαζί στην ομάδα σύνδεσης 17, στην υποτελομερική περιοχή. Ωστόσο, η γενετική δομή της περιοχής αυτής, η οποία συνδέεται με τον καθορισμό του φύλου, δεν είναι απόλυτα γνωστή, καθώς στην περιοχή χαρτογραφήθηκαν επίσης δείκτες τύπου EST, από εκφραζόμενα γονίδια με άγνωστη έως τώρα λειτουργία. Τα γονίδια αυτά μπορεί να είναι κοινά με άλλα γένη ή να έχουν εξειδικευμένο ρόλο στην ανάπτυξη των ανθέων στο γένος *Actinidia*. Καθίσταται σαφές λοιπόν ότι, εφόσον δεν έχουν αναγνωριστεί και ταυτοποιηθεί τα υπεύθυνα γονίδια για τον καθορισμό του φύλου στην ακτινιδιά, ο χαρακτήρας των πολυμορφισμών τύπου SNP στις αλληλουχίες των δεικτών SmX και SmY, θα μπορούσε να είναι από τυχαίος έως ιδιαίτερα καθοριστικός στην έκφραση του φύλου στο γένος *Actinidia*. Το γεγονός ότι στην ανάλυση των πολυμορφισμών των 24 εξεταζόμενων γενοτύπων, παρατηρήθηκε μια γενικότερη τάση ομαδοποίησης των αρσενικών γενοτύπων με τους γενότυπους της ποικιλίας «Tsechlidis», οι οποίοι χαρακτηρίζονταν από αυτογονιμότητα υψηλού βαθμού, και αντίστοιχα των γενοτύπων της θηλυκής ποικιλίας «Hayward» με τους γενότυπους της ποικιλίας «Tsechlidis» χαμηλού βαθμού αυτογονιμότητας, ίσως αποτελεί μια πρώτη ένδειξη ότι η έκφραση της αυτοσυμβατότητας της ποικιλίας «Tsechlidis» συνδέεται με τον καθορισμό του φύλου. Η εξαγωγή περαιτέρω συμπερασμάτων στο σημείο αυτό κρίνεται επισφαλής, καθώς απαιτείται μεγαλύτερη διερεύνηση του φαινομένου.

4.3 Μοριακή ανάλυση με δείκτες DEG (Differentially Expressed Genes)

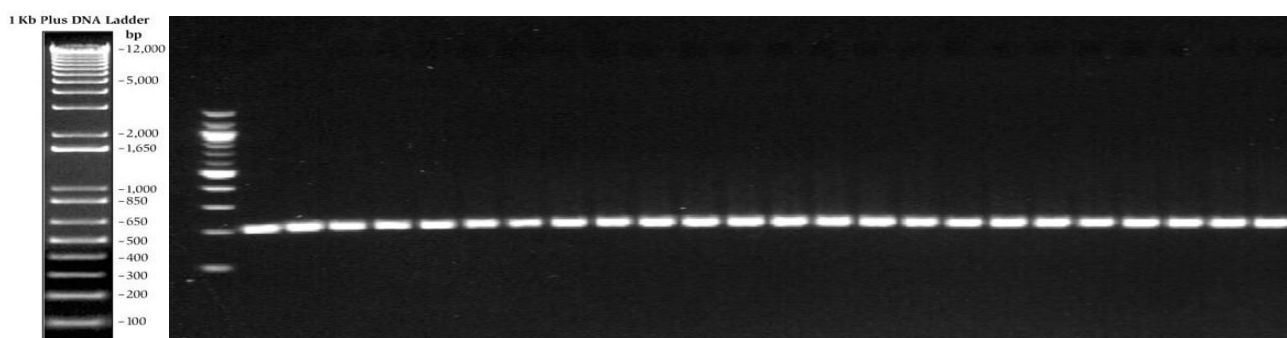
Οι μοριακοί μηχανισμοί διαφοροποίησης και καθορισμού του φύλου στα είδη του γένους *Actinidia*, παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ακόμα αδιευκρίνιστοι, καθώς δεν έχουν αναγνωρισθεί και ταυτοποιηθεί τα γονίδια που ελέγχουν τις λειτουργίες αυτές. Οι Kim *et al.* (2010), σε μια προσπάθεια να κατανοήσουν καλύτερα το μηχανισμό ελέγχου του φύλου στην ακτινιδιά, μελέτησαν τη διαφοροποίηση στην έκφραση γονιδίων, αναλύοντας γενετικό υλικό από αρσενικούς και θηλυκούς οφθαλμούς του είδους *A. chinensis*. Ως αποτέλεσμα, απομονώθηκαν και αλληλουχίστηκαν 15 γονίδια με διαφορετική έκφραση στα θηλυκά και αρσενικά άνθη (Differentially Expressed Genes - DEG).

Για τη μοριακή ανάλυση των 24 επιλεγμένων γενοτύπων, επιλέχθηκαν 5 δείκτες DEG, οι οποίοι βασίζονταν στην αλληλουχία των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων, όπως καθορίζονταν στην εργασία των Kim *et al.* (2010). Η επιλογή έγινε με κριτήριο το βαθμό διαφοροποίησης μεταξύ αρσενικών και θηλυκών γενοτύπων, αλλά και με βάση τη λειτουργία των γονιδίων, όπου κατέστη δυνατό να αναγνωρισθεί. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν οι δείκτες DEG1, DEG3, DEG9, DEG12 και DEG13. Η αλληλουχία των εκκινητών παρουσιάζεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι (§ 3.2, πίνακας 3).

Έπειτα από ανάλυση BLAST που διεξήχθη με τη βάση δεδομένων EST (GenBank) για την ακτινιδιά, βρέθηκε πως η αλληλουχία του δείκτη DEG1 παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την ομάδα γονιδίων που κωδικοποιούν τη σύνθεση της μεθυλεστεράσης πηκτίνης, ένζυμο το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της γύρης, καθώς τροποποιεί το κυτταρικό τοίχωμα. Επιπλέον, βρέθηκε να έχει σημαντικά μεγαλύτερη έκφραση στα αρσενικά άνθη, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι έχει ενεργό ρόλο στην ανάπτυξη της γύρης στην ακτινιδιά.

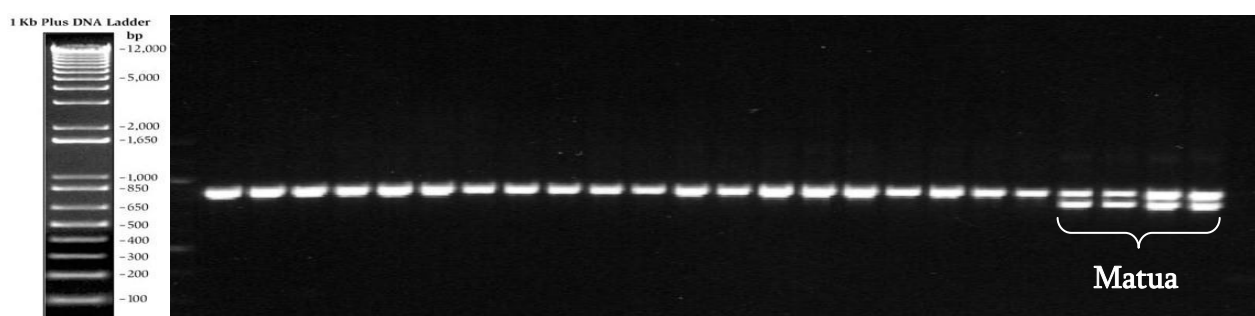
Το χαρακτηριστικό προϊόν ενίσχυσης του εκκινητή DEG1 είναι μια ζώνη 204bp., την οποία εμφάνισαν οι 24 εξεταζόμενοι γενότυποι στο σύνολο τους (Εικ. 9), έπειτα από ανάλυση με την αντίδραση της αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR). Η καταγραφή των ζωνών έγινε σε πηκτή αγαρόζης (2%), με τη βοήθεια

1Kb DNA plus ladder. Το τελικό προϊόν ήταν ιδιαίτερα καθαρό και κρίθηκε κατάλληλο για αλληλούχιση.



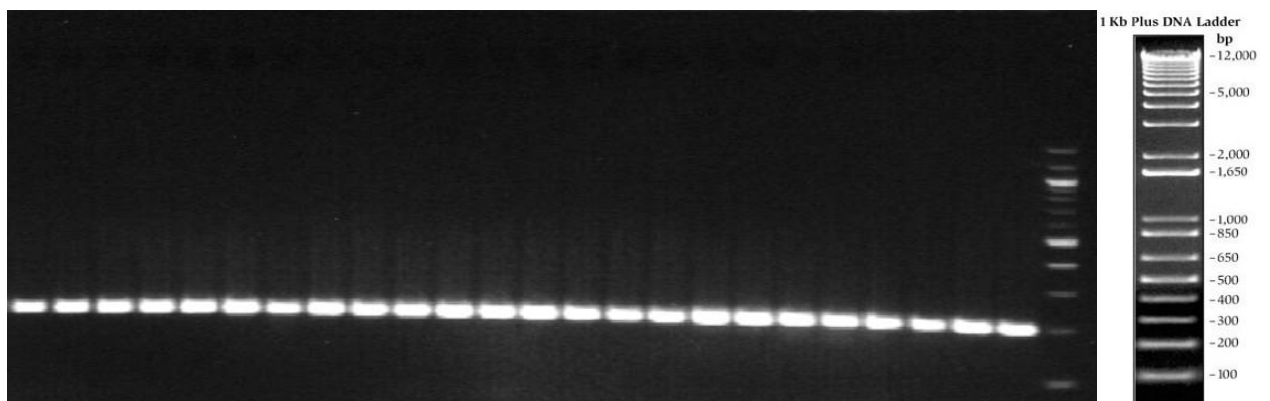
Εικ. 9 Αποτελέσματα PCR για τον εκκινητή DEG1. Χαρακτηριστική ζώνη στα 204bp για το σύνολο των 24 γενοτύπων, χωρίς την παρουσία δευτερευόντων ζωνών

Ο δείκτης DEG9 παρουσίασε επίσης ενισχυμένη έκφραση στους αρσενικούς γενοτύπους και έπειτα από αντιστοίχιση της αλληλουχίας τους με τη βάση δεδομένων EST (GenBank), βρέθηκε ότι κωδικοποιεί έναν παράγοντα ADP-ριβουσλίωσης. Ο εκκινητής δίνει χαρακτηριστικό προϊόν ενίσχυσης 839bp. Ωστόσο, ενδιαφέρον προκάλεσε η ύπαρξη επιπλέον ζώνης (περίπου στα 800bp), την οποία εμφάνισαν μόνο οι αρσενικοί γενότυποι της ποικιλίας «Matua» (Εικ.10), έπειτα από την ανάλυση της αντίδραση της αλυσιδωτής πολυμεράσης. Η δευτερεύουσα ζώνη εμφανίζονταν σταθερά στους 4 αρσενικούς γενότυπους, σε κάθε επανάληψη της αντίδρασης, όμως η συγκέντρωση του προϊόντος ήταν μικρή και δεν επέτρεψε την απομόνωση και την αλληλούχιση του. Το κύριο προϊόν (ζώνη 839bp) απομονώθηκε για το σύνολο των 24 γενοτύπων και στάλθηκε για αλληλούχιση.

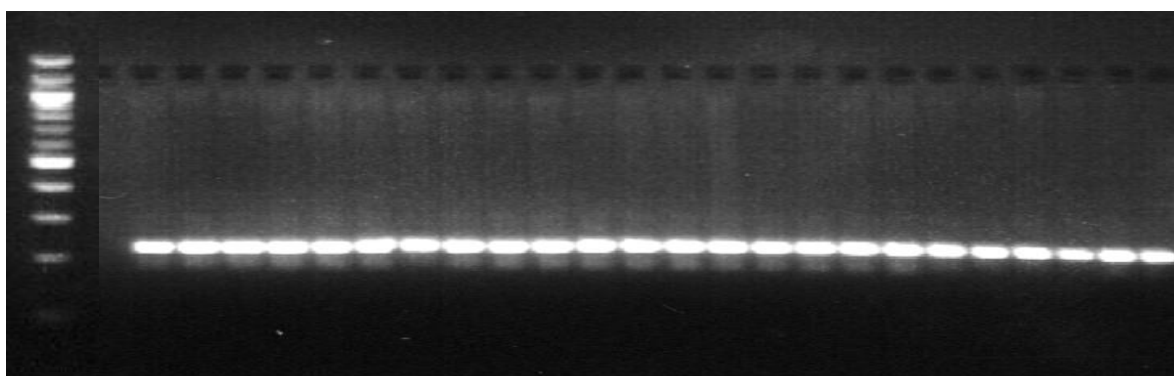


Εικ. 10 Αποτελέσματα PCR για τον εκκινητή DEG9. Χαρακτηριστική ζώνη στα 839bp για το σύνολο των 24 γενοτύπων. Δευτερεύουσα ζώνη (800bp) στους αρσενικούς γενότυπους της ποικιλίας Matua

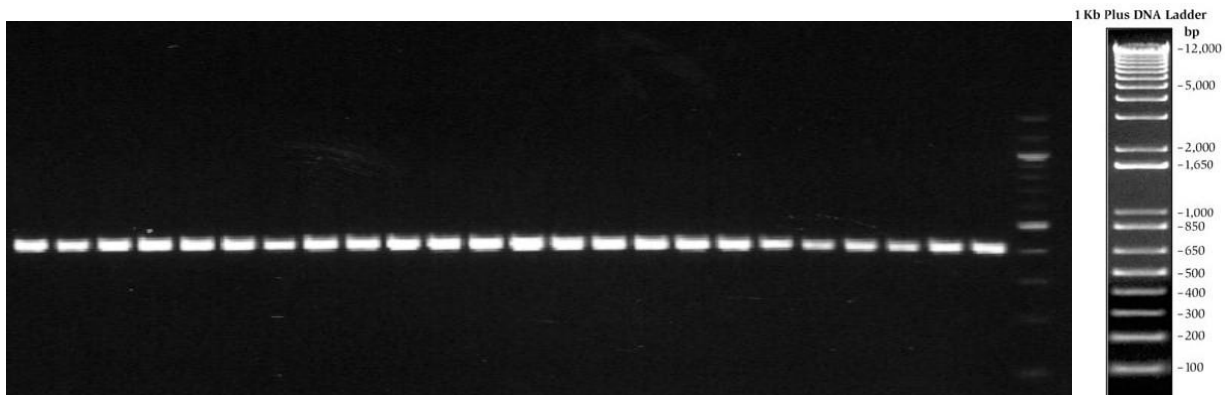
Οι δείκτες DEG3, DEG12 και DEG13 παρουσίασαν αντίστοιχα ενισχυμένη έκφραση στους θηλυκούς γενότυπους. Επιπλέον, βρέθηκε ότι έχουν σημαντική ομοιότητα στην αλληλουχία τους με συγκεκριμένες καταχωρήσεις EST's (GenBank) για την ακτινιδιά, ο ρόλος των οποίων όμως, παραμένει ακόμα άγνωστος. Τα προϊόντα ενίσχυσης για κάθε εκκινητή απομονώθηκαν για το σύνολο των 24 γενοτύπων και στάλθηκαν για αλληλούχιση. Συγκριμένα, ο εκκινητής DEG3 δίνει χαρακτηριστική ζώνη στα 200bp (Εικ.11), ο DEG12 στα 229bp (Εικ.12) και ο DEG13 στα 390bp (Εικ.13), αντίστοιχα.



Εικ. 11 Αποτελέσματα PCR για τον εκκινητή DEG3. Χαρακτηριστική ζώνη στα 200bp για το σύνολο των 24 γενοτύπων, χωρίς την παρουσία δευτερευόντων ζωνών



Εικ. 12 Αποτελέσματα PCR για τον εκκινητή DEG12. Χαρακτηριστική ζώνη στα 229bp για το σύνολο των 24 γενοτύπων, χωρίς την παρουσία δευτερευόντων ζωνών



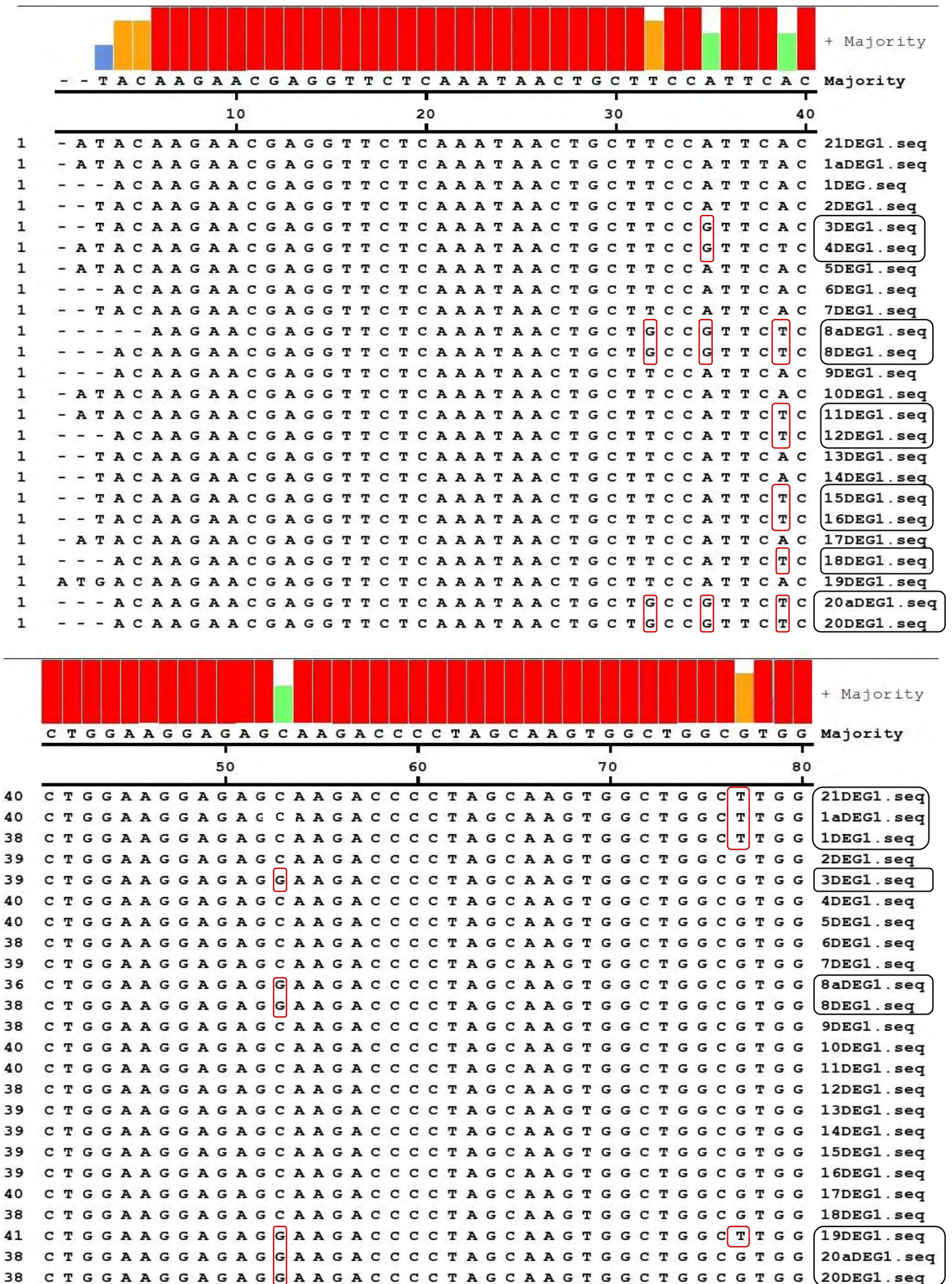
Εικ. 13 Αποτελέσματα PCR για τον εκκινητή DEG13. Χαρακτηριστική ζώνη στα 390bp για το σύνολο των 24 γενοτύπων, χωρίς την παρουσία δευτερευόντων ζωνών

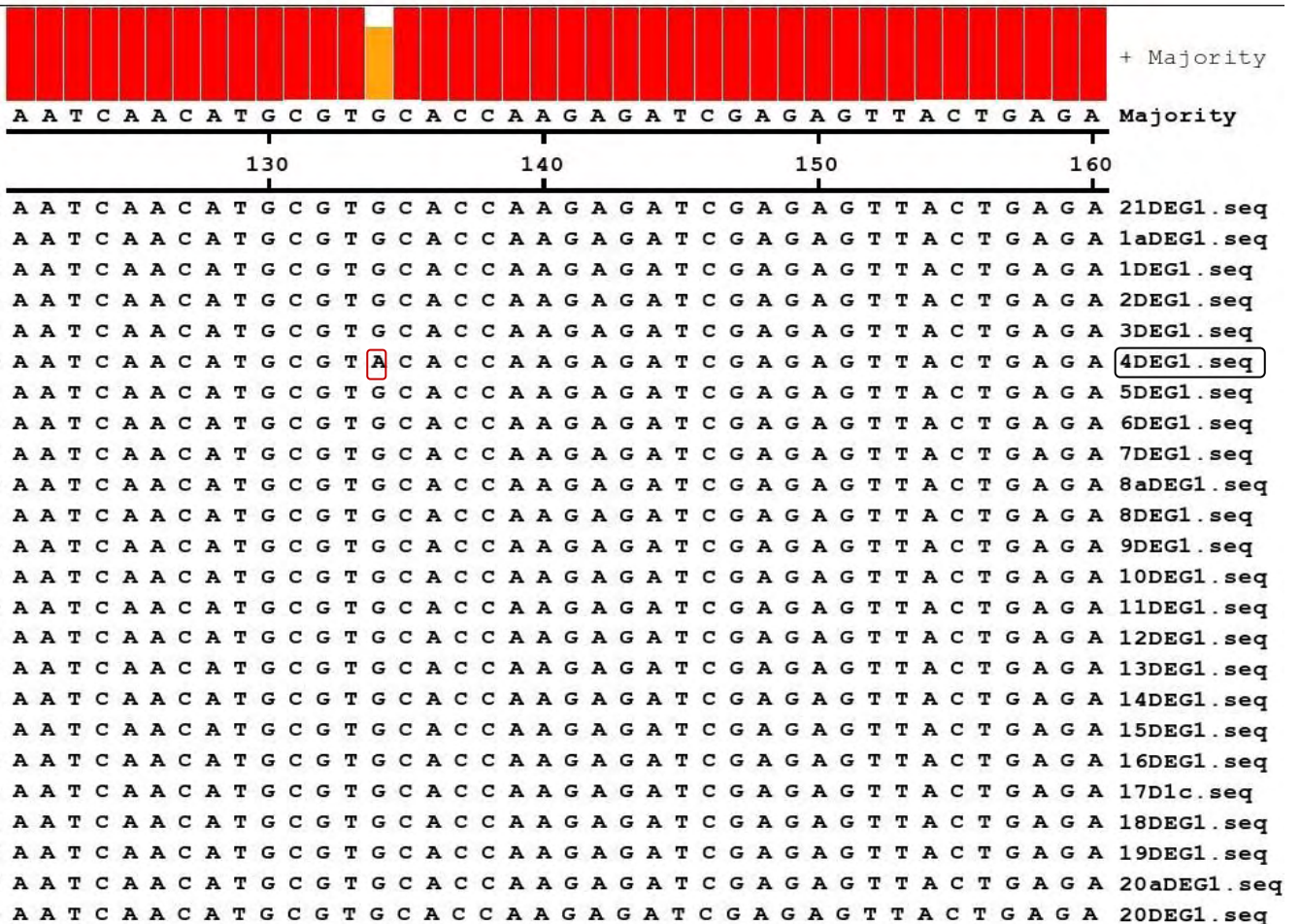
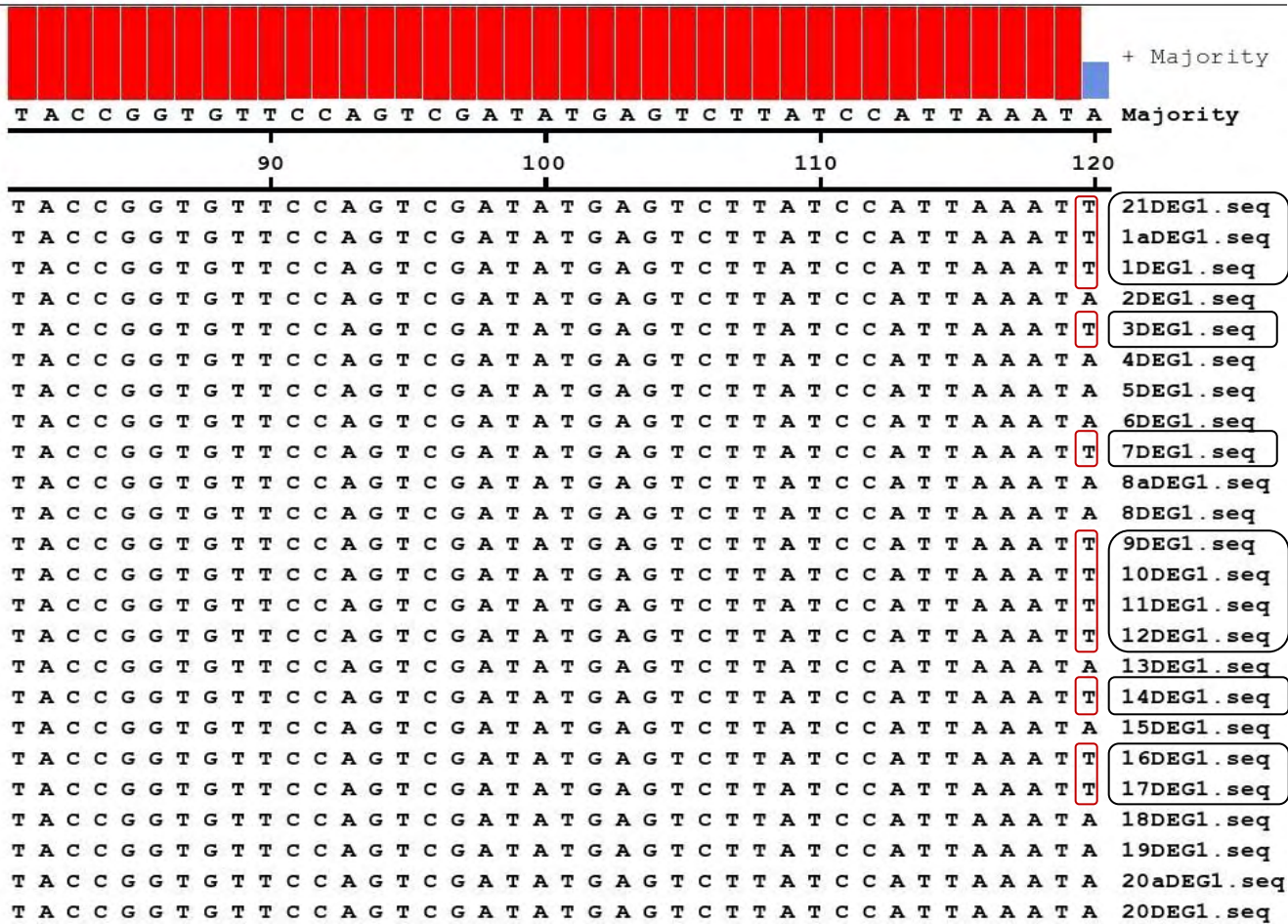
4.4 Αλληλούχιση προϊόντων ενίσχυσης των δεικτών DEG

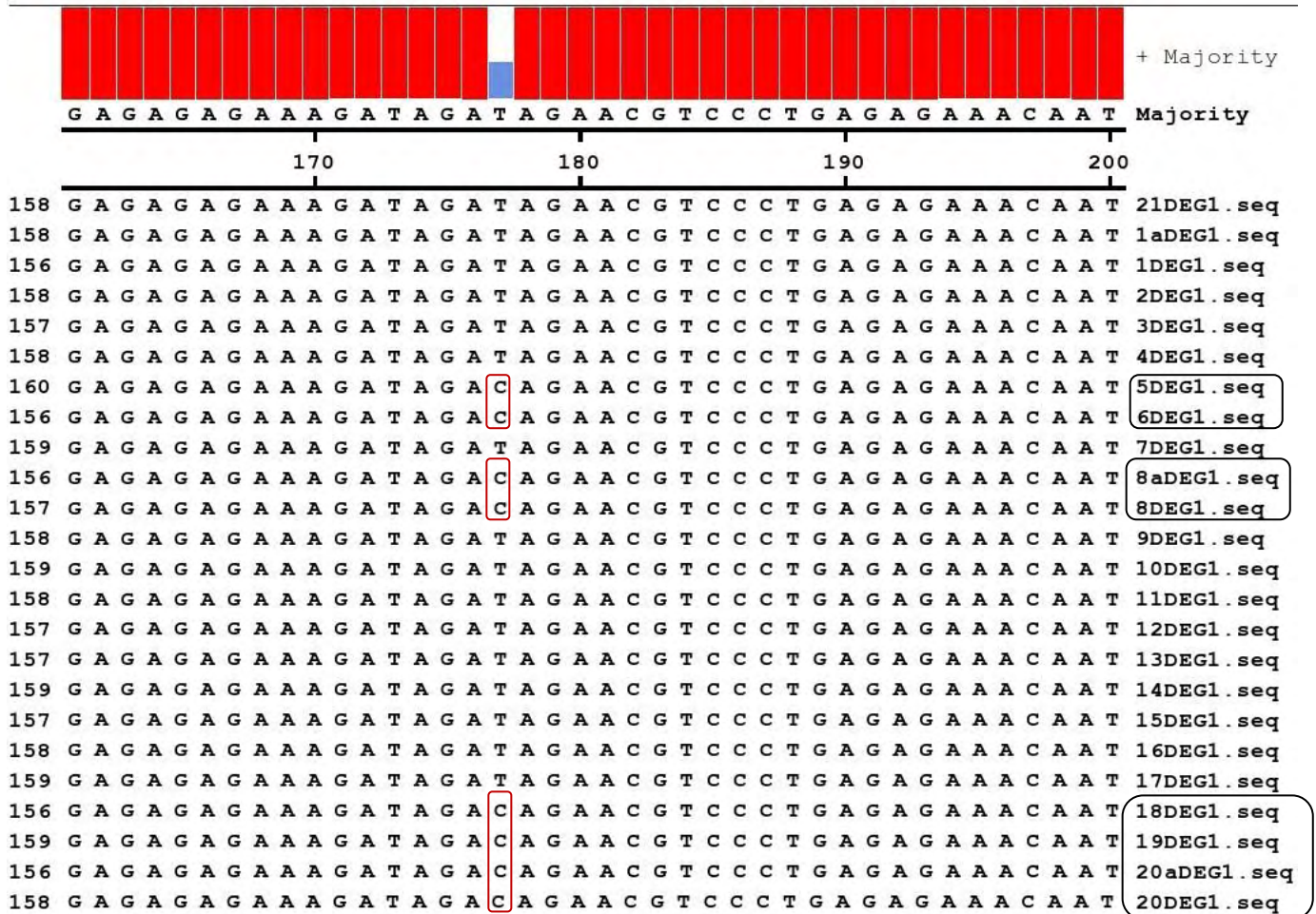
Τα προϊόντα ενίσχυσης, τα οποία προέκυψαν από τη μοριακή ανάλυση των 24 γενοτύπων με τους εκκινητές DEG, αλληλουχίστηκαν με σκοπό τον εντοπισμό πολυμορφισμών μεμονωμένης νουκλεοτιδικής βάσης (SNP) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες που ακολουθούν (Εικ. 14-18). Η αλληλουχία της ζώνης του κάθε εκκινητή προσδιορίστηκε για κάθε ένα από τους 24 εξεταζόμενους γενοτύπους ξεχωριστά και με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού προγράμματος, έγινε η τελική ευθυγράμμιση όλων των αλληλουχιών για τη συγκριτική μελέτη και τον εντοπισμών τυχόν πολυμορφισμών.

Πολυμορφισμοί τύπου SNP μεταξύ των εξεταζόμενων γενοτύπων, εντοπίστηκαν στην ανάλυση της αλληλουχίας και των πέντε εκκινητών DEG. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης της ζώνης 204bp του εκκινητή DEG1 παρουσιάζονται στην εικόνα 14. Επισημαίνεται ότι έχουν επιλεγεί τα τμήματα εκείνα της αλληλουχίας, στα οποία εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί. Ολόκληρη η αλληλουχία του εκκινητή παρατίθεται στο Παράρτημα.

Εικ.14 Αποτελέσματα αλληλούχησης για τον εκκινητή DEG1 (ζώνη 204bp)





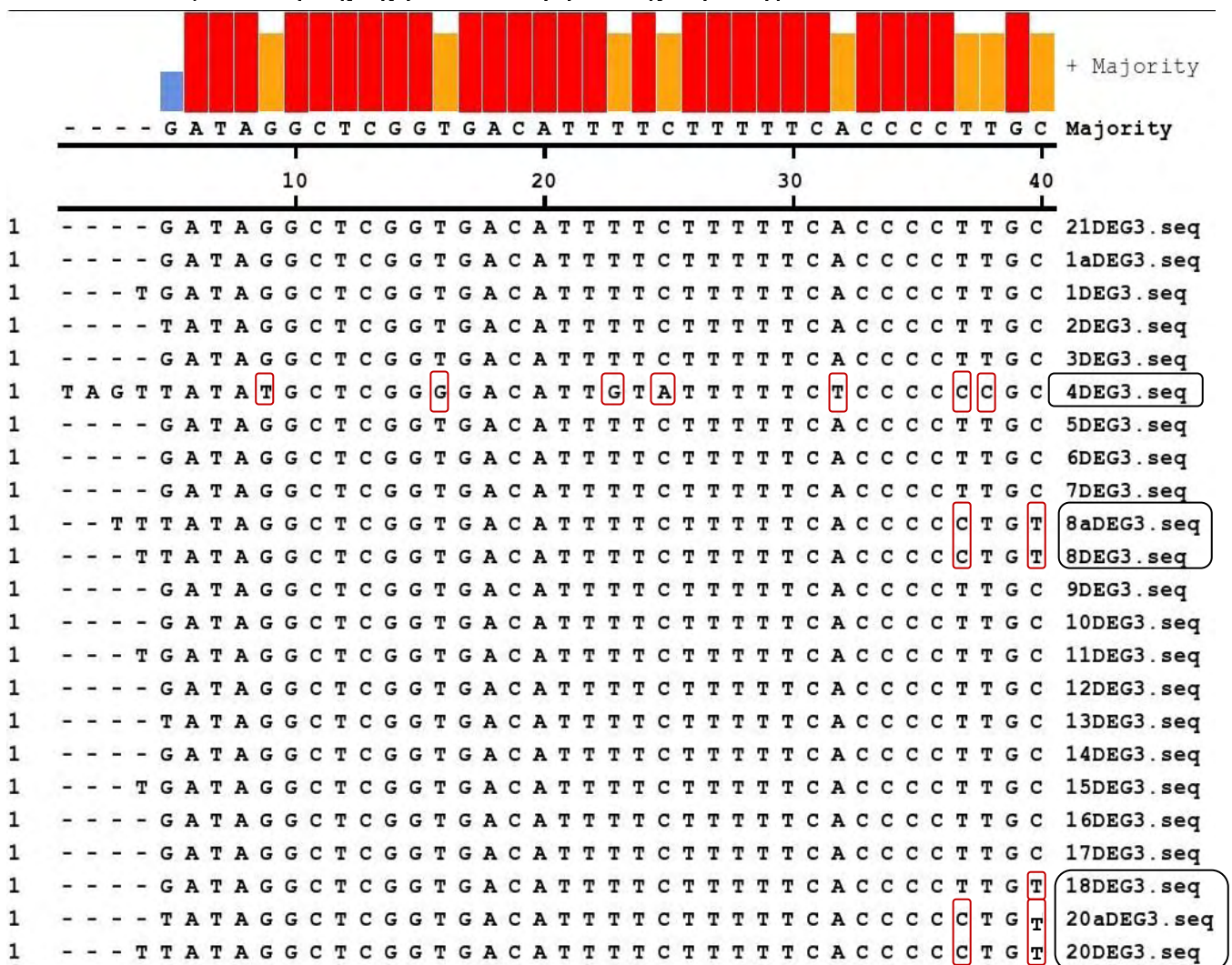


Όπως φαίνεται και στην εικόνα 14, πολυμορφισμοί μεμονωμένης νουκλεοτιδικής βάσης (SNP) εντοπίστηκαν σε διάφορα σημεία της αλληλουχίας του εκκινητή DEG1. Αρκετοί από αυτούς αφορούσαν τους γενότυπους της αρσενικής ποικιλίας «Matua», σε συνδυασμό με κάποιους γενότυπους της ποικιλίας «Tschelidis». Συγκεκριμένα, στο 35^ο ζεύγος βάσεων εντοπίστηκε πολυμορφισμός τύπου A/G μεταξύ των γενοτύπων της ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α) και των γενοτύπων 3 και 4 της ποικιλίας «Tschelidis», στο 39^ο ζεύγος βάσεων κοινός πολυμορφισμός τύπου A/T με τους γενότυπους 11, 12, 15, 16 και 18 της ποικιλίας «Tschelidis», στο 53^ο ζεύγος βάσεων κοινός πολυμορφισμός τύπου C/G με τους γενότυπους 3 και 19 της ποικιλίας «Tschelidis», στο 177^ο ζεύγος βάσεων κοινός πολυμορφισμός τύπου T/C με τους γενότυπους 5, 6, 18 και 19, ενώ στο 32^ο ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας εντοπίστηκε πολυμορφισμός τύπου T/G αποκλειστικά στους γενότυπους της

ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α). Οι γενότυποι της ποικιλίας «Hayward» (1, 1α και 21) εμφάνισαν κοινό πολυμορφισμό τύπου C/G με τον γενότυπο 19 της ποικιλίας «Tsechelidis», στο 77° ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας τους και με τους γενότυπους 3, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 16 και 17, στο 120° ζεύγος βάσεων (τύπου A/T). Τέλος, ο γενότυπος 4 της ποικιλίας «Tsechelidis» παρουσίασε πολυμορφισμό τύπου G/A στο 134° ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας του.

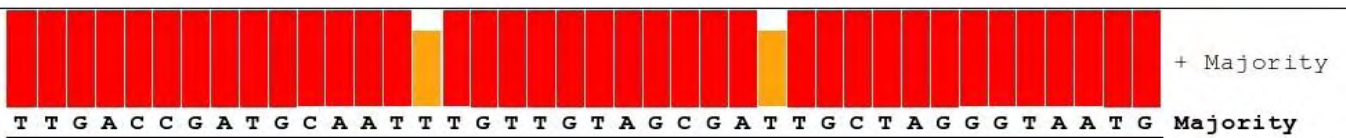
Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης της ζώνης 200bp του εκκινητή DEG3 παρουσιάζονται στην εικόνα 15, και ειδικότερα τα τμήματα εκείνα της αλληλουχίας στα οποία εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί. Ολόκληρη η αλληλουχία του εκκινητή DEG3 παρατίθεται στο Παράρτημα.

Εικ.15 Αποτελέσματα αλληλούχησης για τον εκκινητή DEG3 (ζώνη 200bp)

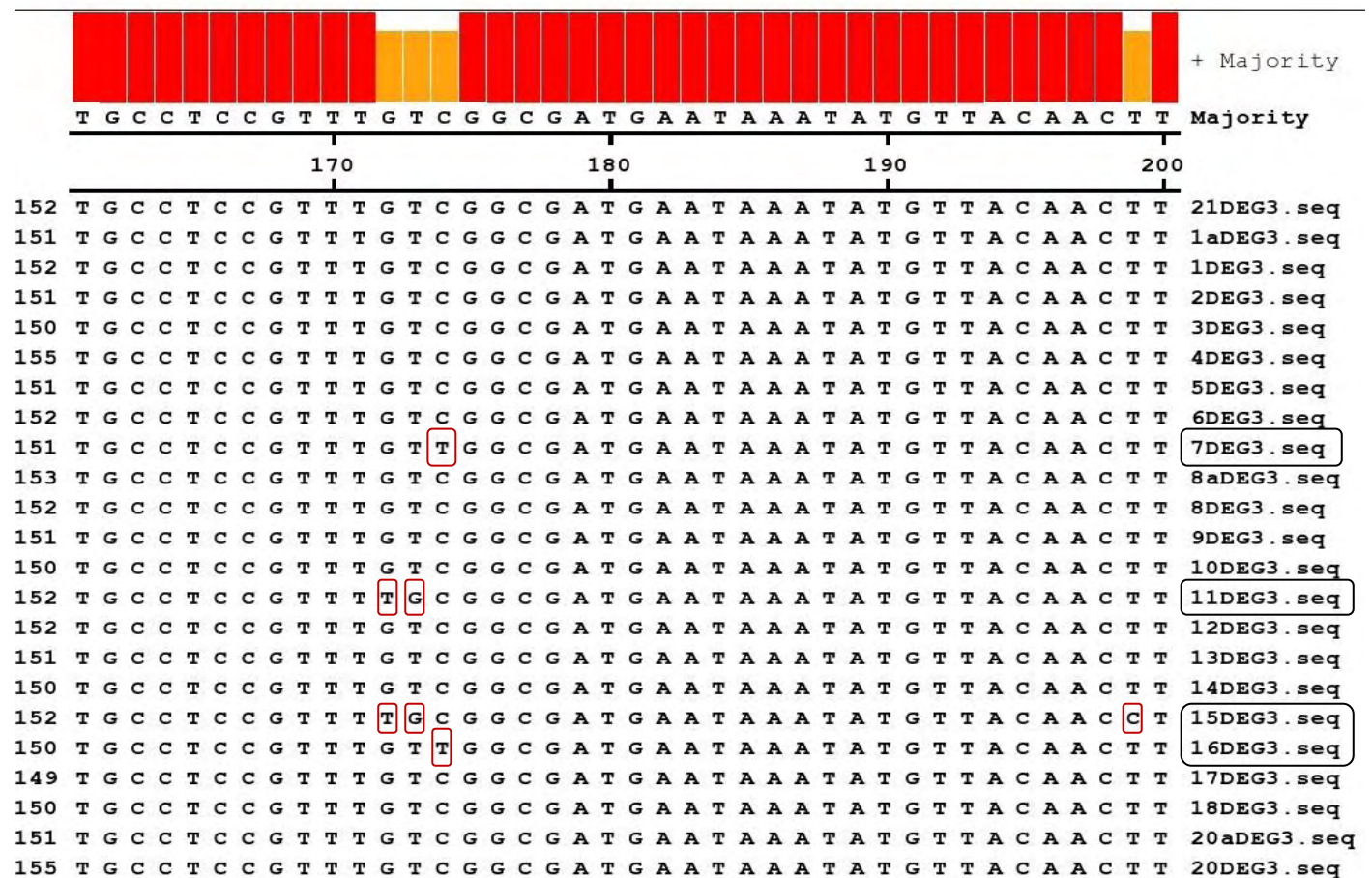
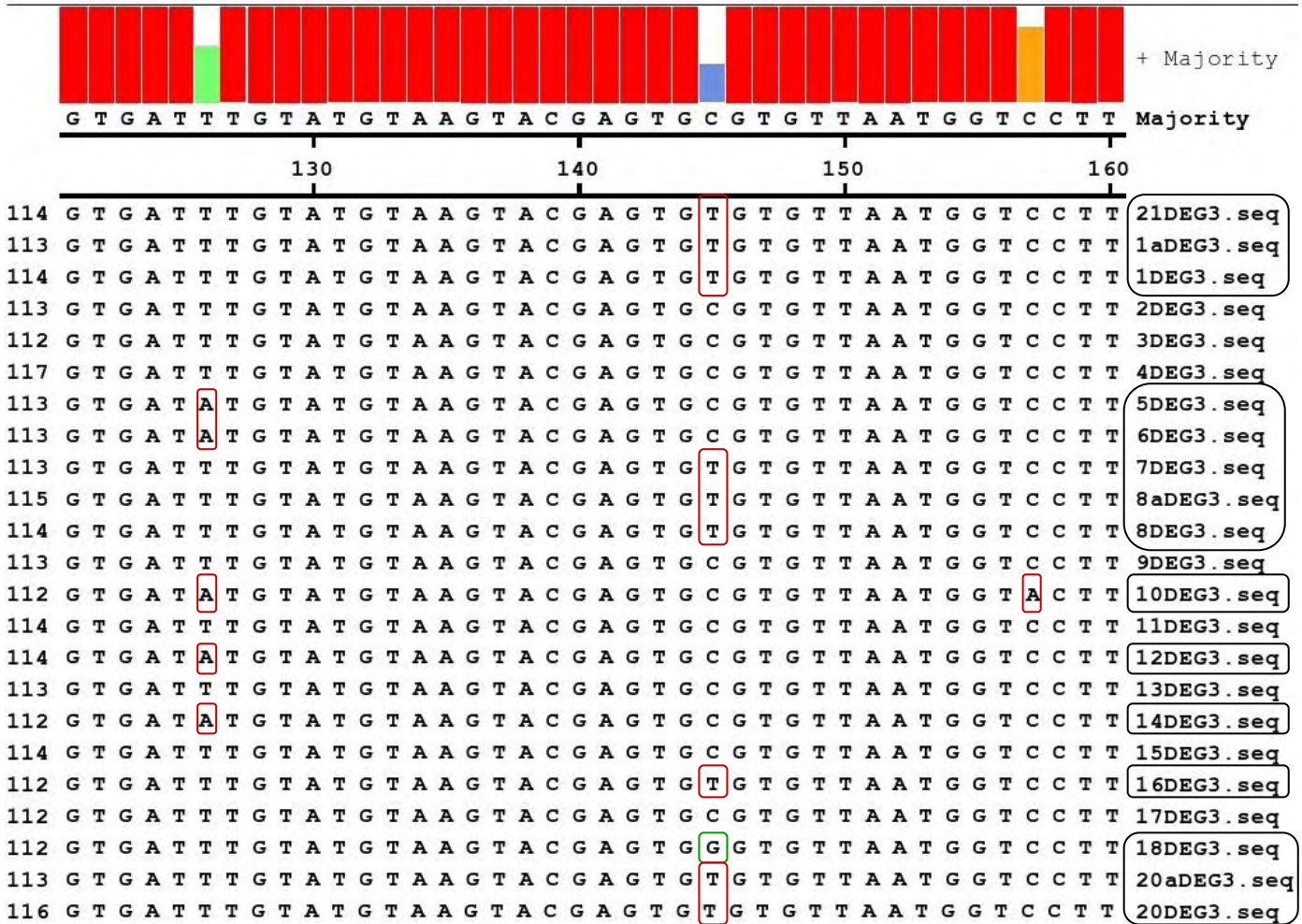




	50	60	70	80	
36	T T G A A T G G A G A T G A G	A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G			21DEG3.seq
37	T T G A A T G G A G A T G A G	A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G			1aDEG3.seq
38	T T G A A T G G A G A T G A G	A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G			1DEG3.seq
37	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				2DEG3.seq
36	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				3DEG3.seq
41	C T G A A T G G A G A G	G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G			4DEG3.seq
36	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G			C T G	5DEG3.seq
37	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G			C T G	6DEG3.seq
37	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				7DEG3.seq
39	C T G A C T G G G A A A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				8aDEG3.seq
38	C T G A C T G G G A A A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				8DEG3.seq
37	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				9DEG3.seq
36	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G			C T G	10DEG3.seq
38	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				11DEG3.seq
37	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G			C T G	12DEG3.seq
37	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				13DEG3.seq
36	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				14DEG3.seq
38	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				15DEG3.seq
36	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				16DEG3.seq
36	T T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				17DEG3.seq
36	C T G A A T G G A G A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				18DEG3.seq
37	C T G A C T G G G A A A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				20aDEG3.seq
38	C T G A C T G G G A A A T G G A A G A A A T G A T C A C T G A T G G A C T T T T G				20DEG3.seq



	90	100	110	120	
75	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				21DEG3.seq
74	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				1aDEG3.seq
75	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				1DEG3.seq
74	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				2DEG3.seq
73	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				3DEG3.seq
78	T T G A C C G A T G C A A T C	T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G			4DEG3.seq
74	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				5DEG3.seq
74	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				6DEG3.seq
74	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				7DEG3.seq
76	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				8aDEG3.seq
75	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				8DEG3.seq
74	T T G A C C G A T G C A A T C	T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G			9DEG3.seq
73	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				10DEG3.seq
75	T T G A C C G A T G C A A T C	T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G			11DEG3.seq
75	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				12DEG3.seq
74	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				13DEG3.seq
73	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				14DEG3.seq
75	T T G A C C G A T G C A A T C	T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G			15DEG3.seq
73	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				16DEG3.seq
73	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				17DEG3.seq
73	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				18DEG3.seq
74	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				20aDEG3.seq
76	T T G A C C G A T G C A A T T T G T T G T A G C G A T T G C T A G G G T A A T G				20DEG3.seq

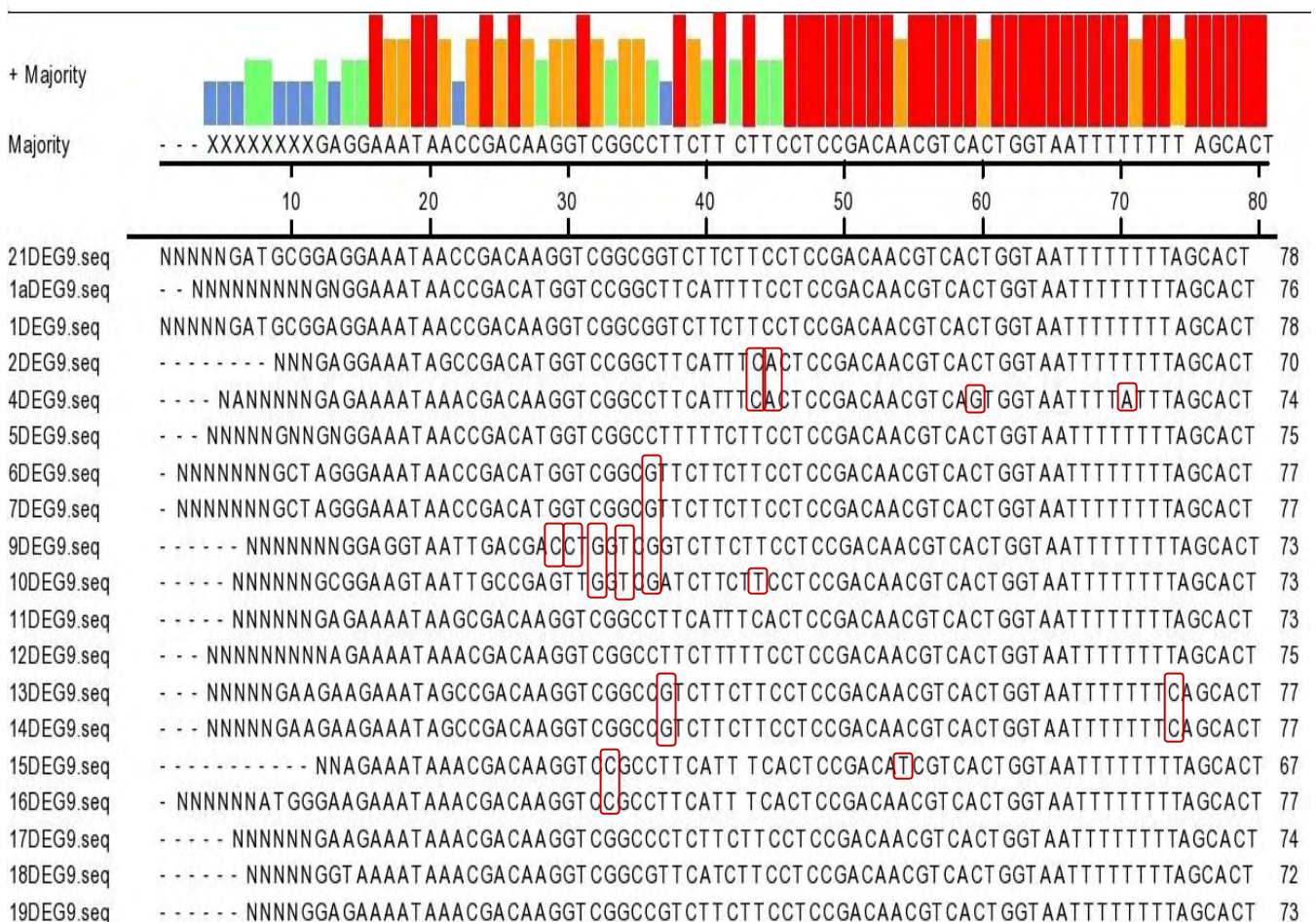


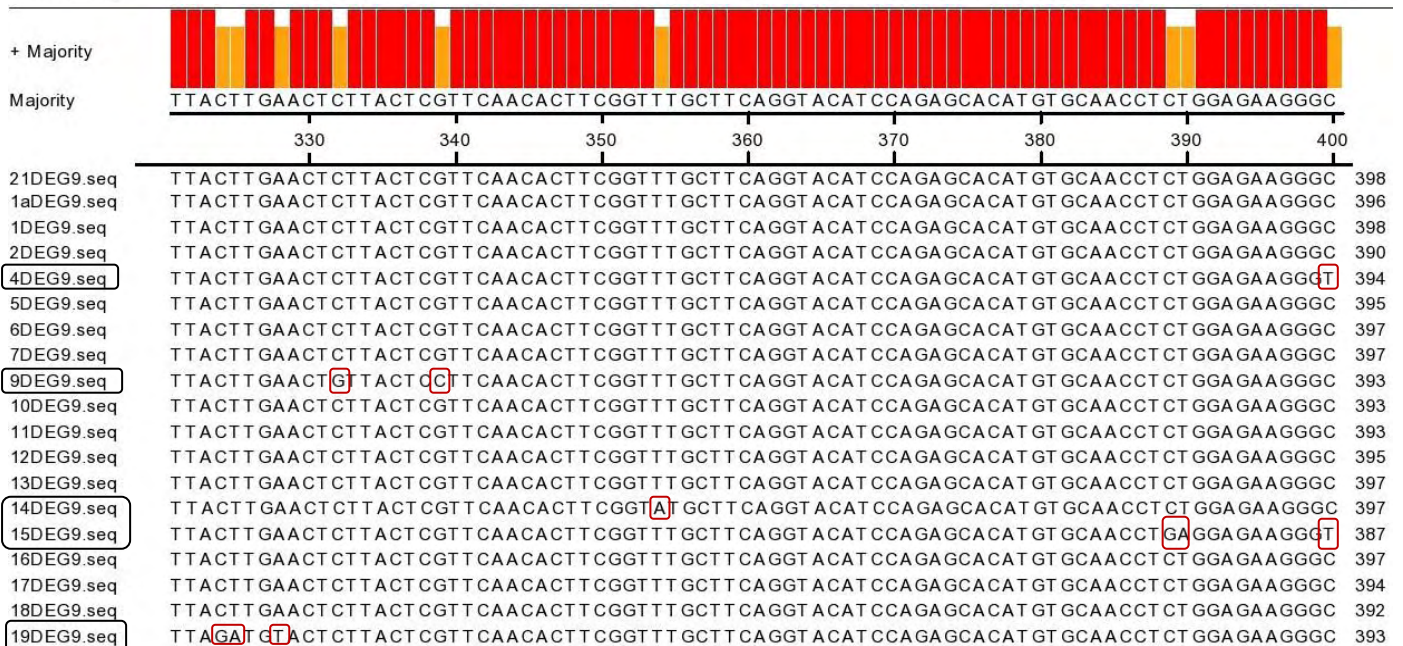
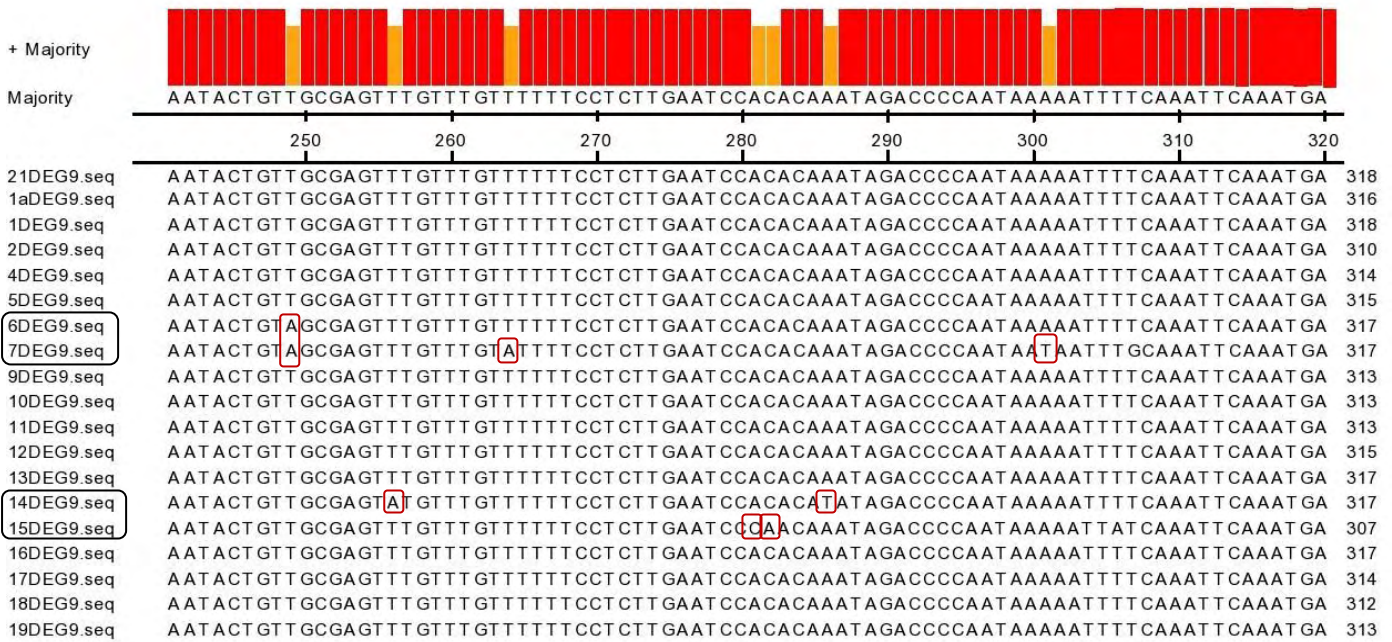
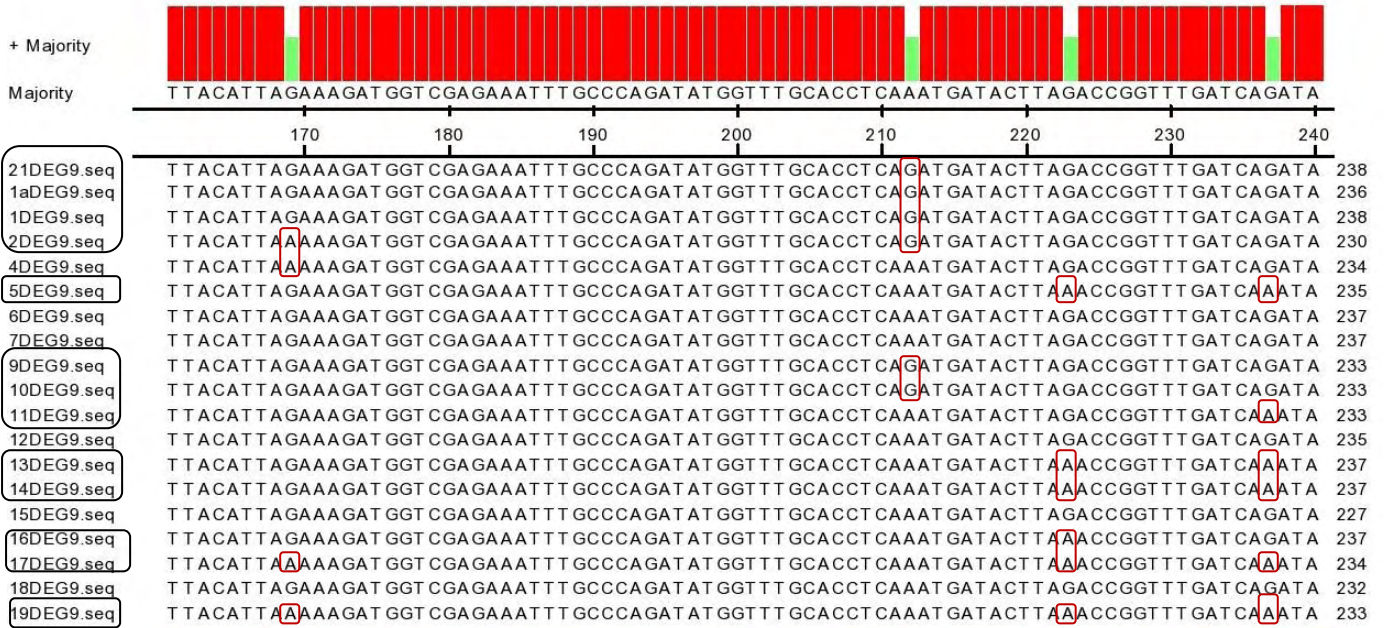
Από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης της ζώνης 200bp του εκκινήτη DEG3, προέκυψαν αρκετοί πολυμορφισμοί μεμονωμένης νουκλεοτιδικής βάσης μεταξύ των 24 γενότυπων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο γενότυπος 4 της ποικιλίας «Tsechelidis», ο οποίος διαφοροποιήθηκε αρκετά από τους υπόλοιπους, καθώς εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί αποκλειστικά σε διάφορα σημεία της αλληλουχίας του. Συγκεκριμένα, στο 16^ο ζεύγος βάσεων εντοπίστηκε πολυμορφισμός τύπου G/T, στο 23^ο ζεύγος βάσεων πολυμορφισμός τύπου T/G, στο 25^ο ζεύγος βάσεων πολυμορφισμός τύπου C/A, στο 32^ο ζεύγος βάσεων πολυμορφισμός τύπου A/T, στο 38^ο ζεύγος βάσεων πολυμορφισμός τύπου T/C και στο 52^ο ζεύγος βάσεων πολυμορφισμός τύπου T/G. Επιπλέον, ο γενότυπος 4 της ποικιλίας «Tsechelidis» εμφάνισε κοινούς πολυμορφισμούς και με άλλους γενότυπους, όπως για παράδειγμα, στο 38^ο ζεύγος βάσεων κοινό πολυμορφισμό τύπου T/C με τους γενότυπους της ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α), στο 41^ο ζεύγος βάσεων κοινό πολυμορφισμό τύπου T/C με τους γενότυπους της ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α) και τον γενότυπο 18 της ποικιλίας «Tsechelidis» και στο 95^ο ζεύγος βάσεων κοινό πολυμορφισμό τύπου T/C με τους γενότυπους 9, 11 και 15 της ποικιλίας «Tsechelidis». Οι γενότυποι της αρσενικής ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α) εμφάνισαν αποκλειστικά πολυμορφισμό τύπου A/C στο 45^ο ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας τους, στο 49^ο (τύπου A/G) και στο 50^ο ζεύγος βάσεων πολυμορφισμό τύπου G/A. Αντίστοιχα, οι γενότυποι της ποικιλίας «Hayward» (1, 1α και 21) εμφάνισαν αποκλειστικά πολυμορφισμό τύπου G/A στο 54^ο ζεύγος βάσεων και τύπου A/G στο 55^ο ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας τους. Αρκετοί γενότυποι της ποικιλίας «Tsechelidis», όπως οι 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, εμφάνισαν πολυμορφισμούς είτε μεμονωμένα, είτε κατά ομάδες, σε διάφορα σημεία της αλληλουχίας τους (Εικ.15). Από τη συγκριτική μελέτη των αλληλουχιών των 24 γενότυπων, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πολυμορφισμός που εντοπίστηκε στο 145^ο ζεύγος βάσεων, για τον οποίο καταγράφηκαν 3 διαφορετικές νουκλεοτιδικές βάσεις (C/T/G) στην ίδια θέση και αφορούσε τους γενότυπους των τριών ποικιλιών «Matua», «Hayward» και

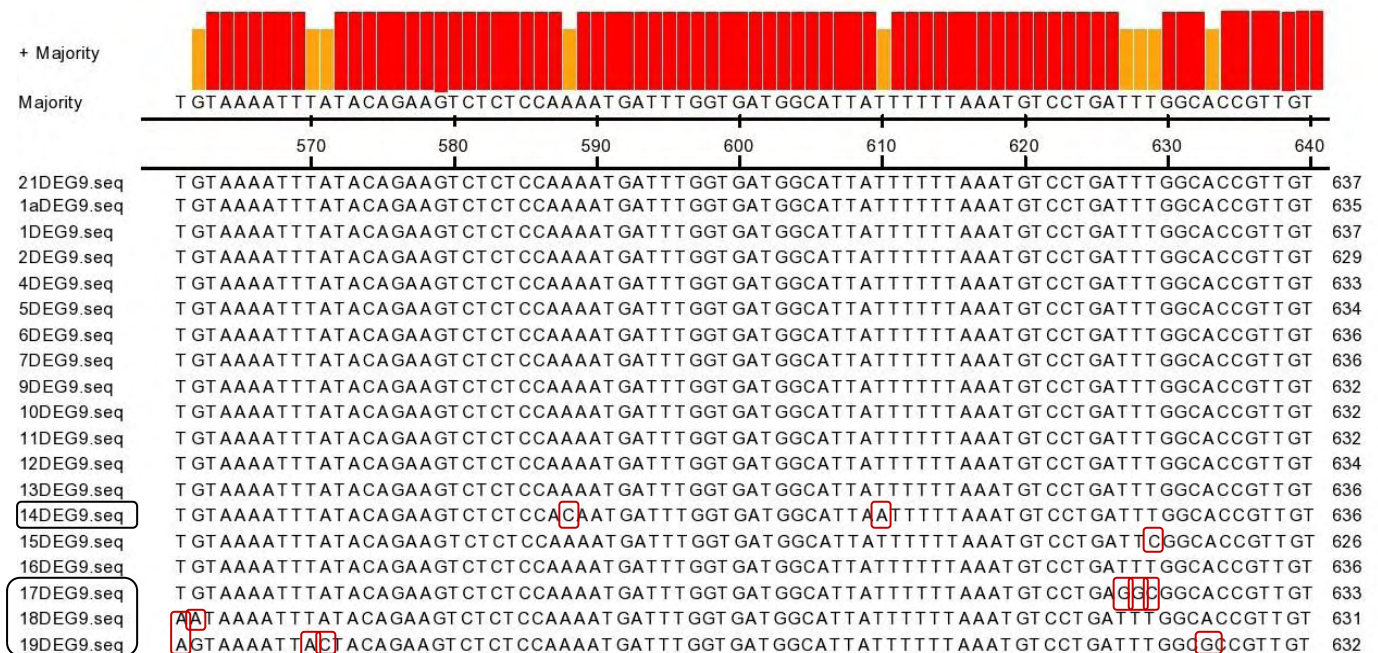
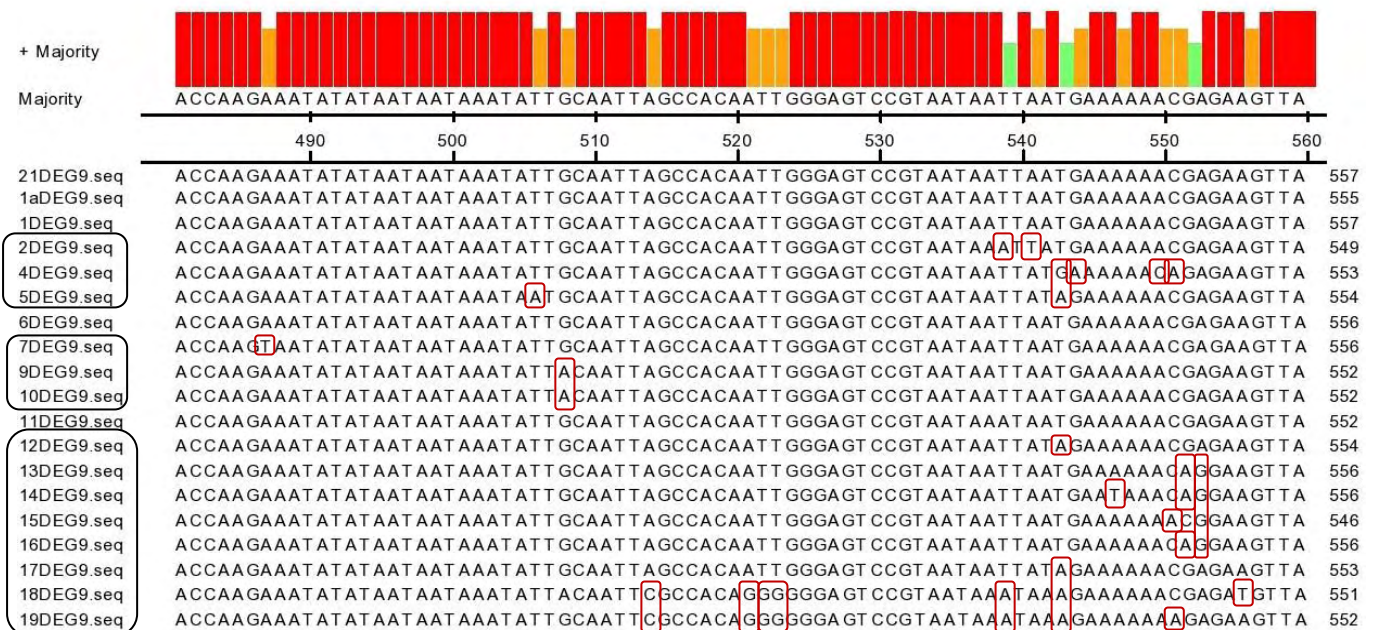
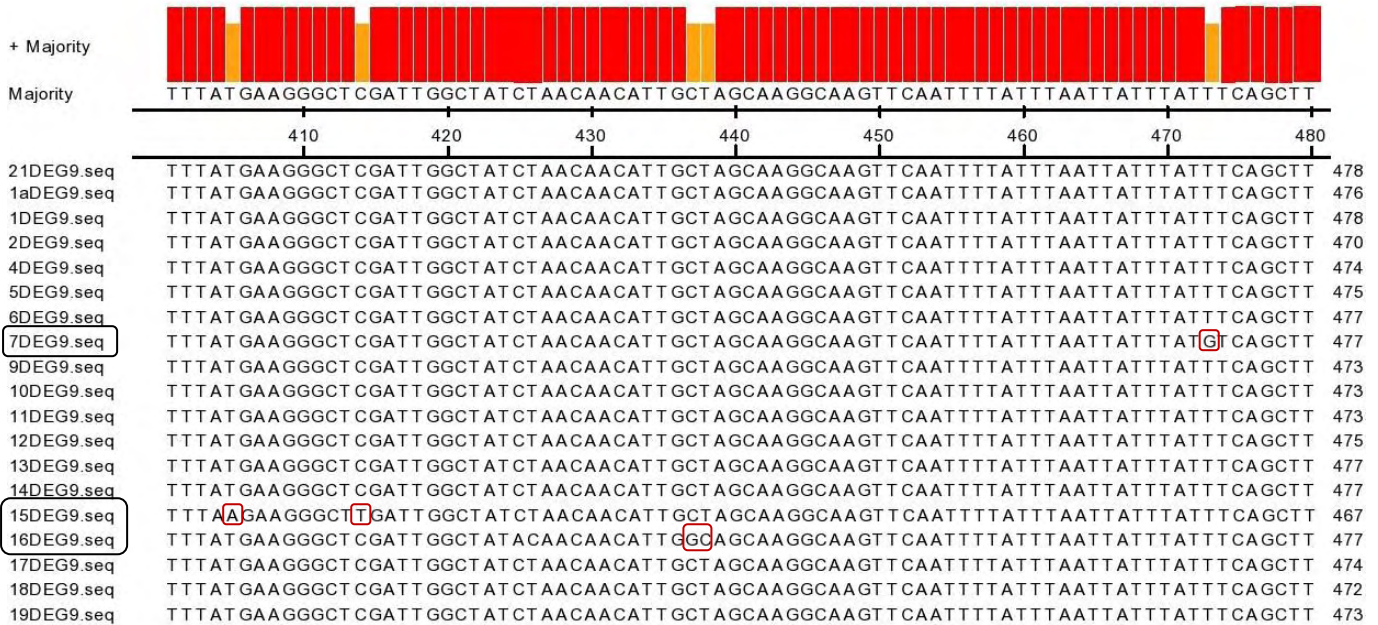
«Tsechelidis» (7, 16, 18). Ο πολυμορφισμός αυτός αποτελεί την πρώτη καταγραφή κοινού πολυμορφισμού μεταξύ των γενοτύπων των ποικιλιών «Matua» και «Hayward», καθώς κάτι ανάλογο δεν είχε προκύψει στην ανάλυση των αλληλουχιών των δεικτών του φύλου (SmX και SmY).

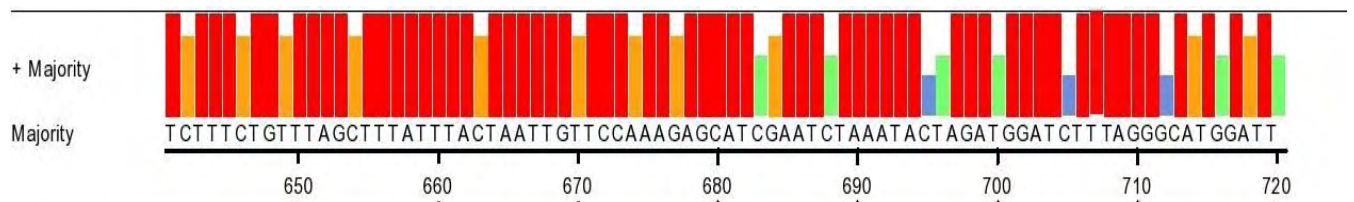
Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης της ζώνης 839bp του εκκινητή DEG9 (Εικ.16). Στην ανάλυση ωστόσο δεν συμπεριλαμβάνονται οι αρσενικοί γενότυποι της ποικιλίας «Matua», καθώς τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των δύο ακολουθιών (Forward/Reverse) για τον συγκεκριμένο εκκινητή, βρέθηκε ότι αποκλίνουν σημαντικά σε κάθε δείγμα, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η δημιουργία της τελικής ευθυγράμμιση της αλληλουχίας, η οποία απαιτείται για τη διεξαγωγή της συγκριτικής μελέτης.

Εικ. 16 Αποτελέσματα αλληλούχισης για τον εκκινητή DEG9 (ζώνη 839bp)

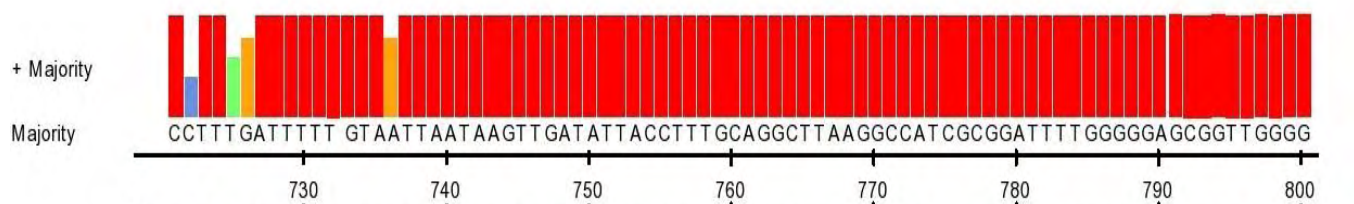








21DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	715
1aDEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	713
1DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	715
2DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	707
4DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	711
5DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	712
6DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	714
7DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	714
9DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	712
10DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	712
11DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	710
12DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	712
13DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	714
14DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	714
15DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	704
16DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	714
17DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	711
18DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	709
19DEG9.seq	TCTTTCTGTTTAGCTTTATTTACTAATTGTTCCAAAGAGCATCGAATCTAAATACTAGATGGATCTTAGGGCATGGATT	710

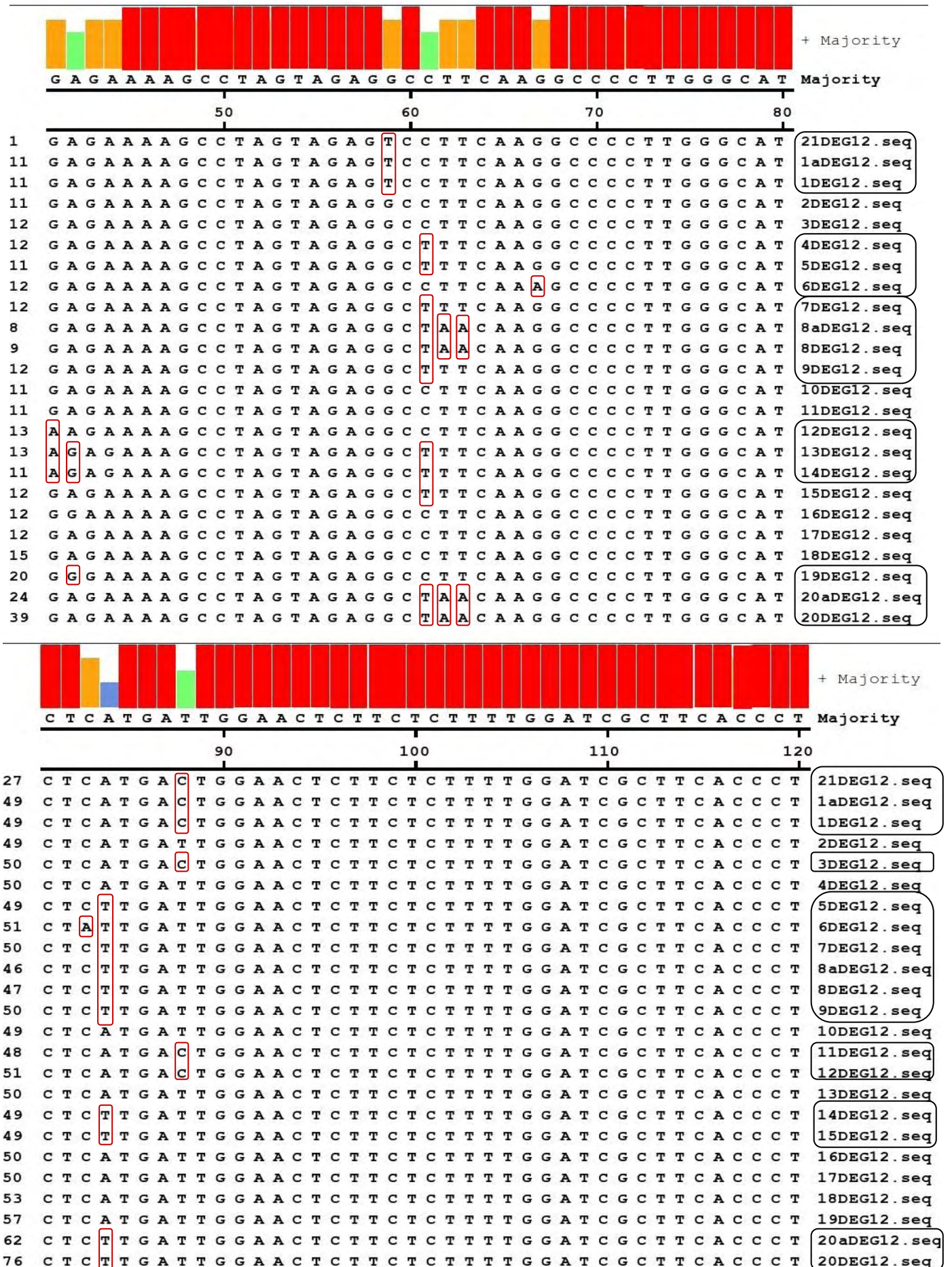


21DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	793
1aDEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	791
1DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	793
2DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	785
4DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	789
5DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	791
6DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	792
7DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	792
9DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	791
10DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	791
11DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	788
12DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	791
13DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	792
14DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	792
15DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	782
16DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	792
17DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	789
18DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	787
19DEG9.seq	CCTTCGATTTTTGTAATTAATAAGTTGATATTACCTTTCAGGCTTAAGGCCATCGCGGATTTGGGGAGCGGTTGGGG	789

Αρκετοί πολυμορφισμοί εντοπίστηκαν και στην ανάλυση της αλληλουχίας του εκκινητή DEG9, οι περισσότεροι εκ των οποίων αφορούσαν μεμονωμένους γενοτύπους της ποικιλίας «Tsechelidis» (Εικ.16). Αυτή η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στο σύνολο των εξεταζόμενων γενοτύπων, ίσως υποδηλώνει ότι πρόκειται για τυχαίες αλλαγές σε διάφορες θέσεις της αλληλουχίας. Ωστόσο, ξεχώρισαν κάποιοι πολυμορφισμοί εξαιτίας της μεγάλης συχνότητας εμφάνισης τους στο σύνολο των γενοτύπων, όπως για παράδειγμα ο πολυμορφισμός τύπου T/A στο 700° ζεύγος βάσεων, ο οποίος εντοπίστηκε σε 7 γενοτύπους της ποικιλίας «Tsechelidis» (13, 14, 15, 16, 17, 18 και 19), ο πολυμορφισμός τύπου G/C στο 712° ζεύγος βάσεων, ο οποίος εντοπίστηκε σε 8 γενοτύπους της ποικιλίας «Tsechelidis» (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 και 19) και ο πολυμορφισμός τύπου C/T, ο οποίος εντοπίστηκε σε 9 γενοτύπους της ποικιλίας «Tsechelidis» (2, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 και 19). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει και ο πολυμορφισμός στο 705° ζεύγος βάσεων, στον οποίο καταγράφηκαν τρεις διαφορετικές νουκλεοτιδικές βάσεις στην ίδια θέση και εντοπίστηκε σε 8 γενοτύπους της ποικιλίας «Tsechelidis» (10, 13, 14, 15, 16, 17, 18 και 19).

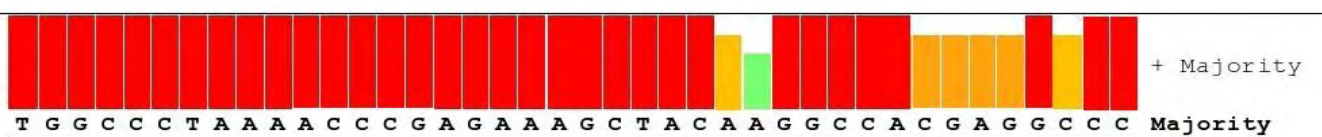
Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης της ζώνης 229bp του εκκινητή DEG12 για το σύνολο των 24 γενοτύπων (Εικ.17). Αρκετοί από τους πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν, αφορούσαν αποκλειστικά τους γενοτύπους της αρσενικής ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α), όπως ο πολυμορφισμός τύπου T/A στο 62° και 63° ζεύγος βάσεων, ο πολυμορφισμός τύπου C/G στο 193° ζεύγος βάσεων, ο πολυμορφισμός τύπου G/C στο 194° ζεύγος βάσεων, ο πολυμορφισμός τύπου A/G στο 195° και ο πολυμορφισμός τύπου G/A στο 196° ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας. Αντίστοιχα, εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί αποκλειστικά στους γενοτύπους της ποικιλίας «Hayward» (1, 1α και 21) και συγκεκριμένα, στο 59° ζεύγος βάσεων (τύπου G/T), στο 140° ζεύγος βάσεων (τύπου G/A), στο 141° ζεύγος βάσεων (τύπου A/C) και στο 143° ζεύγος βάσεων (τύπου C/A).

Εικ.17 Αποτελέσματα αλληλούχισης για τον εκκινητή DEG12 (ζώνη 229bp)

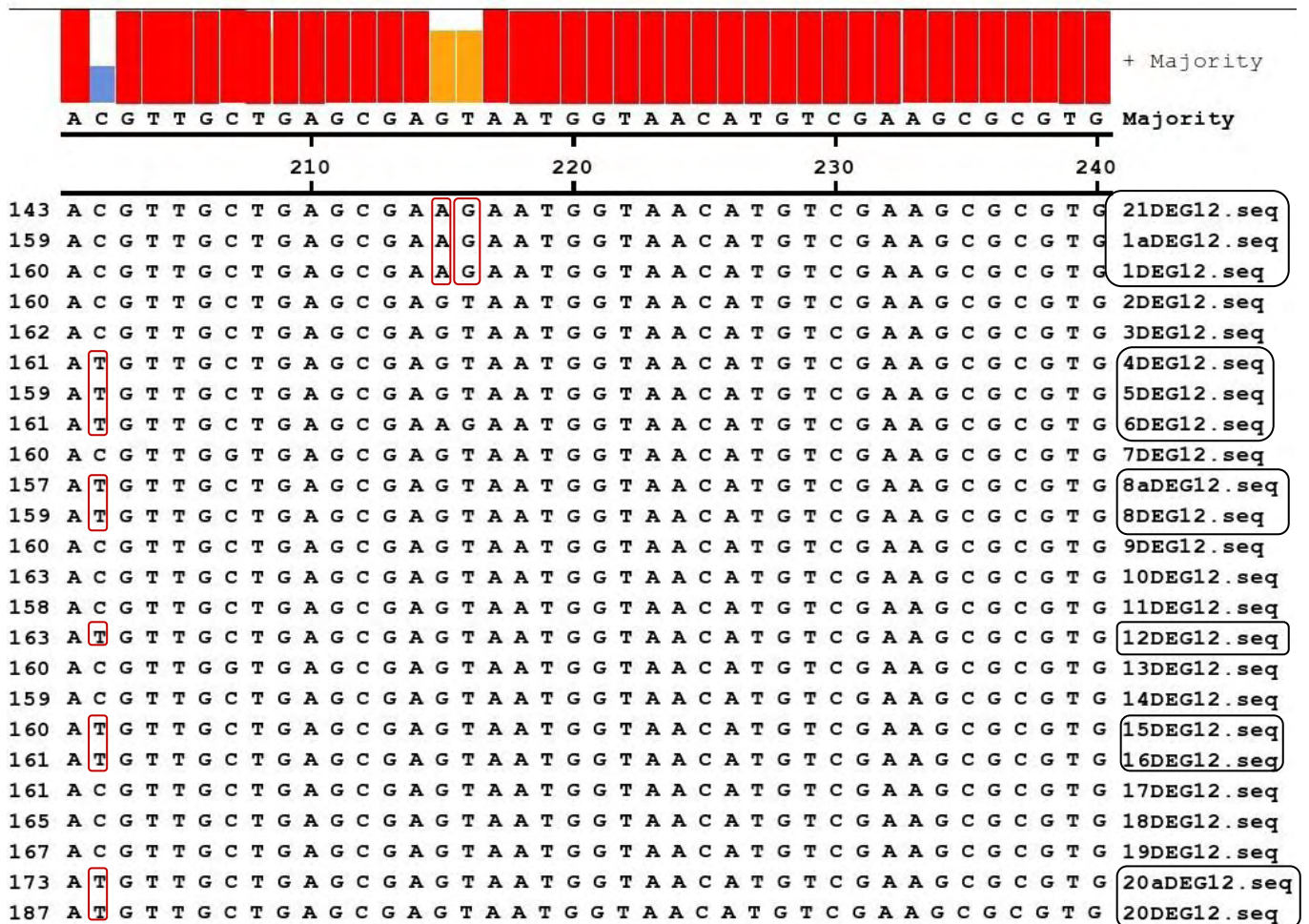




	130	140	150	160		
64	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	ATAAAGT	21DEG12.seq	
86	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	ATAAAGT	1aDEG12.seq	
86	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	ATAAAGT	1DEG12.seq	
86	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	ATAAAGT	2DEG12.seq	
88	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	ATAAAGT	3DEG12.seq	
88	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	ATAAAGT	4DEG12.seq	
86	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	AGAAAGT	5DEG12.seq	
88	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	ATAAAGT	6DEG12.seq	
87	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	AGAAAGT	7DEG12.seq	
83	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	AGAAAGT	8aDEG12.seq	
84	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	AGAAAGT	8DEG12.seq	
87	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	ATAAAGT	9DEG12.seq	
89	GGTGGACCTGCTATTTTT	AGGACC	AAAGTCGAATTT	AGAAAGT	10DEG12.seq	
85	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	ATAAAGT	11DEG12.seq	
89	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	ATAAAGT	12DEG12.seq	
87	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	ATAAAGT	13DEG12.seq	
86	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	ATAAAGT	14DEG12.seq	
86	GGTGGACCTGCTATTTTT	AGGACC	AAAGTCGAATTT	AGAAAGT	15DEG12.seq	
88	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	AGAAAGT	16DEG12.seq	
88	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	AGAAAGT	17DEG12.seq	
91	GGTGGG	CCTGCTATTTTT	AGGACC	AAAGTCGAATTT	AGAAAGT	18DEG12.seq
94	GGTGGG	CCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	AGAAAGT	19DEG12.seq
99	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	AGAAAGT	20aDEG12.seq	
113	GGTGGACCTGCTATTTTTGG	ACCACA	AAAGTCGAATTT	AGAAAGT	20DEG12.seq	



	170	180	190	200	
104	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	21DEG12.seq
123	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	1aDEG12.seq
123	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	1DEG12.seq
123	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	2DEG12.seq
125	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGG	3DEG12.seq
125	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGG	4DEG12.seq
123	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	5DEG12.seq
125	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	6DEG12.seq
124	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	7DEG12.seq
120	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	8aDEG12.seq
121	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	8DEG12.seq
124	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	9DEG12.seq
127	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	10DEG12.seq
122	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	11DEG12.seq
126	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	12DEG12.seq
124	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	13DEG12.seq
123	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	14DEG12.seq
124	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	15DEG12.seq
125	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	16DEG12.seq
125	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	17DEG12.seq
129	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGG	18DEG12.seq
131	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	19DEG12.seq
136	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	20aDEG12.seq
150	TGGCCCTAAAACCCGAGAAAG	CTACA	AGGCCAC	GAGGCC	20DEG12.seq

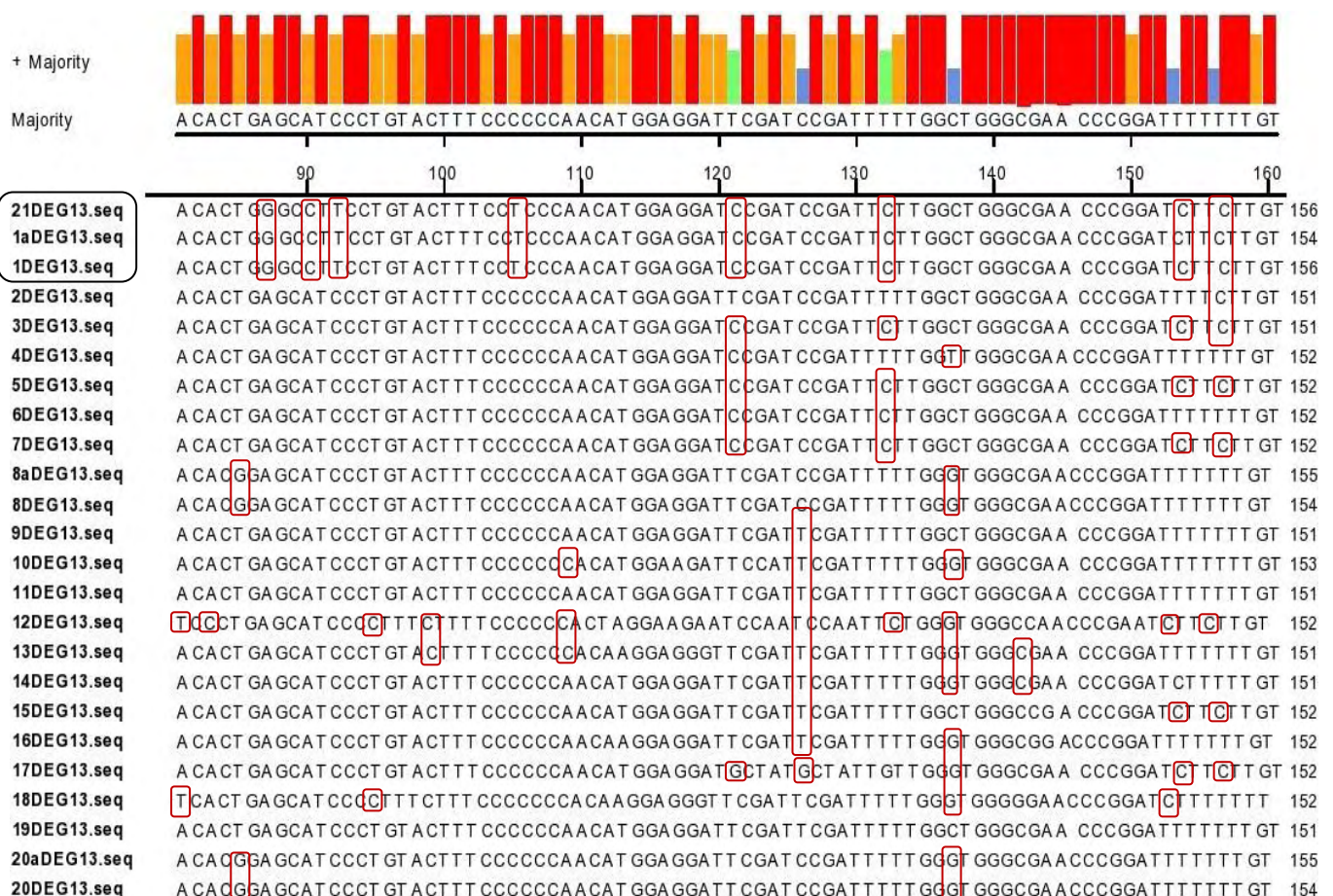


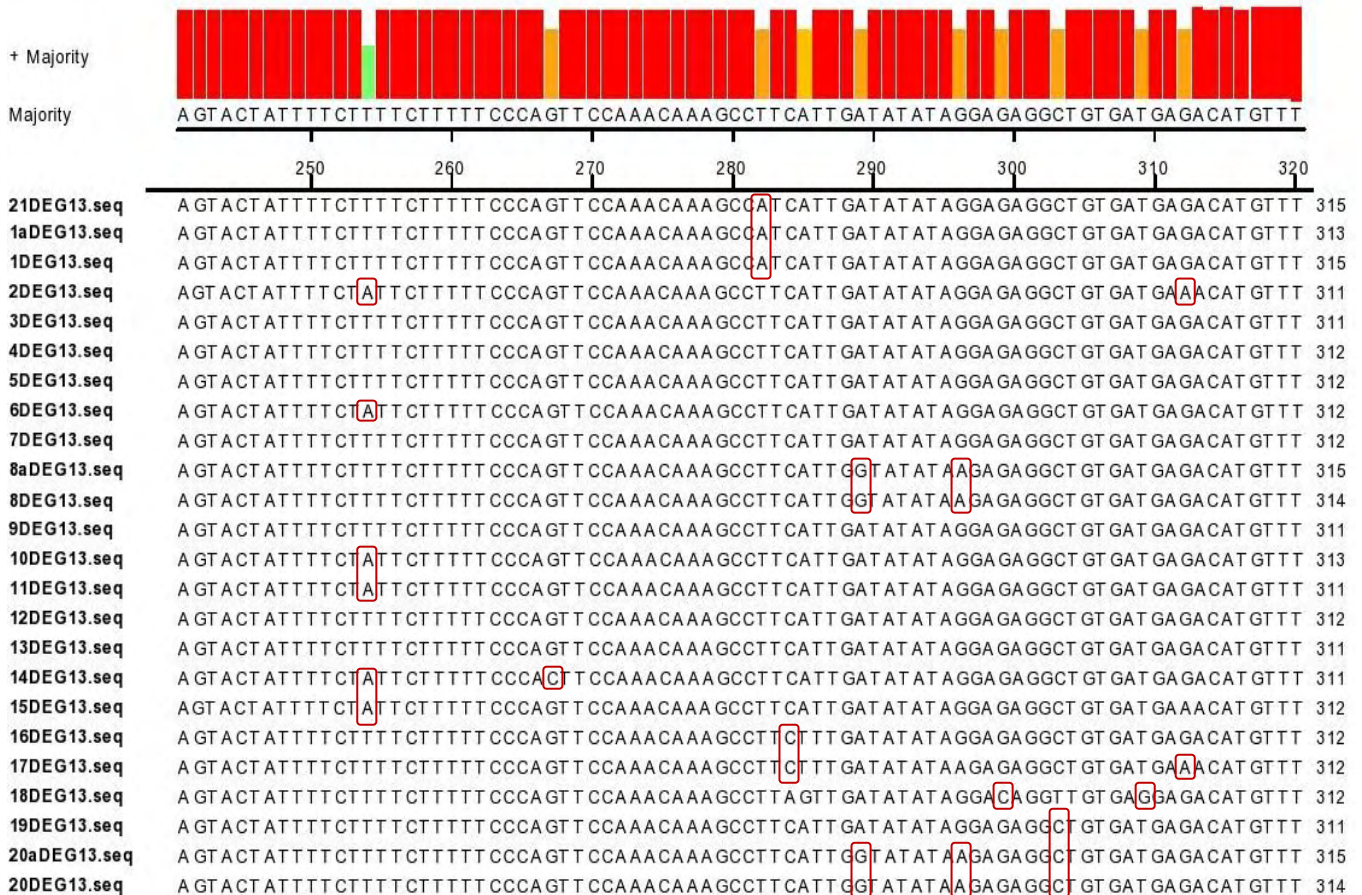
Οι γενότυποι της αρσενικής ποικιλίας «Matua» (8, 8α, 20 και 20α) ωστόσο, εμφάνισαν και κάποιους κοινούς πολυμορφισμούς με ορισμένους γενότυπους της ποικιλίας «Tschelidis». Συγκεκριμένα, στο 61^ο ζεύγος βάσεων εντοπίστηκε κοινός πολυμορφισμός τύπου C/T με τους γενότυπους 4, 5, 7, 9, 12, 13 και 14 της ποικιλίας «Tschelidis», στο 84^ο ζεύγος βάσεων κοινός πολυμορφισμός τύπου A/T με τους γενότυπους 5, 6, 7, 9, 14 και 15, στο 156^ο ζεύγος βάσεων κοινός πολυμορφισμός τύπου A/G με τους γενότυπους 5, 7, 10, 15, 16, 17, 18 και 19, στο 186^ο ζεύγος βάσεων κοινός πολυμορφισμός τύπου A/G με τους γενότυπους 2, 10 και 17, στο 198^ο ζεύγος βάσεων κοινός πολυμορφισμός τύπου C/G με τους γενότυπους 3, 4 και 18 και τέλος, στο 202^ο ζεύγος βάσεων κοινός πολυμορφισμός τύπου C/T με τους γενότυπους 4, 5, 6, 12, 15 και 16 της ποικιλίας «Tschelidis». Οι γενότυποι της ποικιλίας «Hayward» (1, 1α και 21) εμφάνισαν μόνο ένα κοινό πολυμορφισμό, στο 88^ο ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας (τύπου

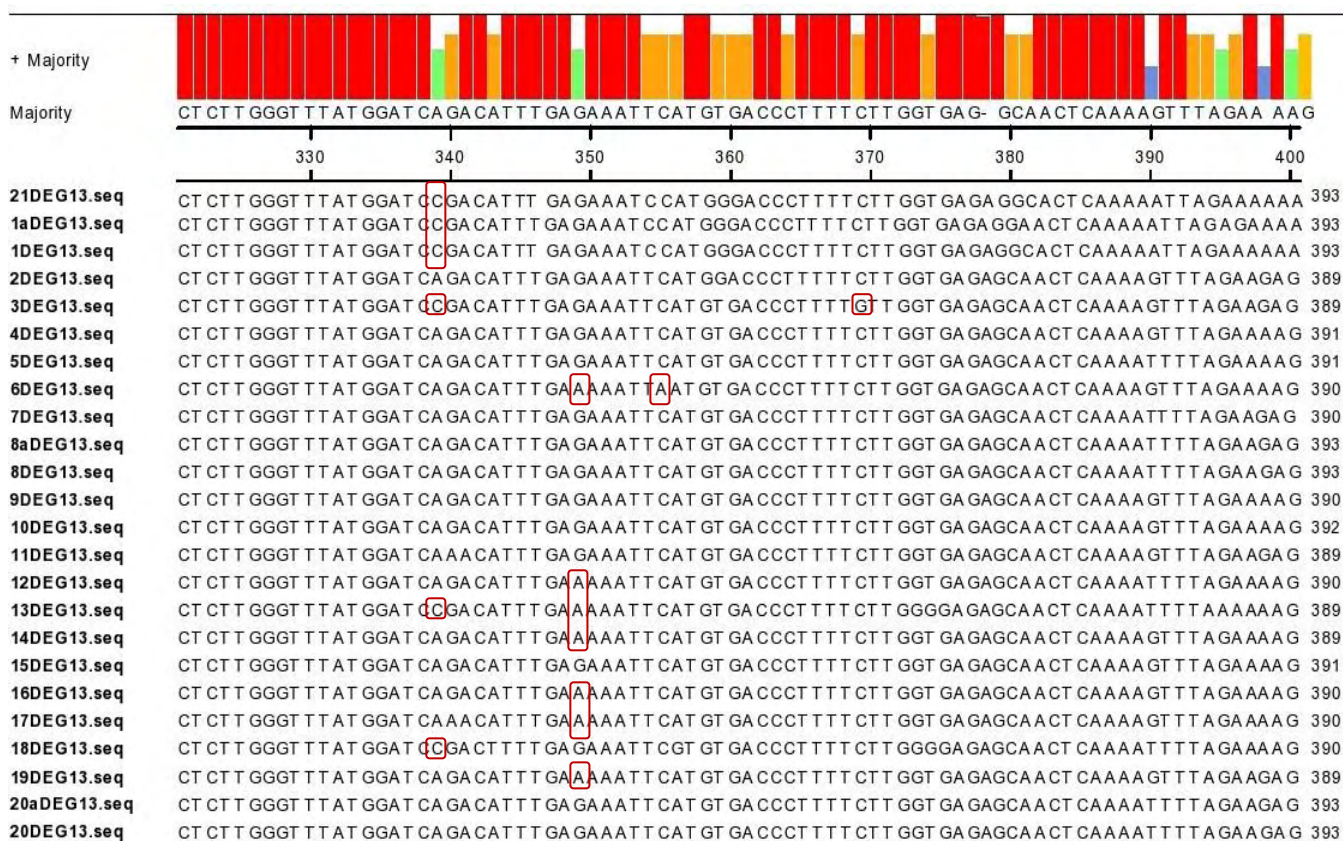
T/C) με τους γενότυπους 3, 11 και 12 της ποικιλίας «Tsechelidis». Αξίζει να σημειωθεί πως δεν προέκυψαν κοινοί πολυμορφισμοί μεταξύ των γενοτύπων των ποικιλιών «Matua» και «Hayward».

Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχησης της ζώνης 390bp του εκκινήτη DEG13 για το σύνολο των 24 γενοτύπων (Εικ.18). Αρκετοί από τους πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν, αφορούσαν αποκλειστικά τους γενότυπους της ποικιλίας «Hayward» (1, 1α και 21), όπως ο πολυμορφισμός τύπου A/G στο 87° ζεύγος βάσεων, ο πολυμορφισμός τύπου A/C στο 90° ζεύγος βάσεων, ο πολυμορφισμός τύπου C/T στο 92° και στο 105° ζεύγος βάσεων, ο πολυμορφισμός τύπου T/C στο 162° ζεύγος βάσεων και ο πολυμορφισμός τύπου T/A στο 282° ζεύγος βάσεων. Επιπλέον, οι γενότυποι της ποικιλίας «Hayward» εμφάνισαν και ορισμένους κοινούς πολυμορφισμούς με γενότυπους της ποικιλίας «Tsechelidis».

Εικ. 18 Αποτελέσματα αλληλούχησης για τον εκκινήτη DEG13 (ζώνη 390bp)







Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν κοινοί πολυμορφισμοί τύπου T/C στο 121^ο ζεύγος βάσεων της αλληλουχίας με τους γενότυπους 3, 4, 5, 6 και 7 της ποικιλίας «Tsechelidis», στο 132^ο ζεύγος βάσεων με τους γενότυπους 3, 5, 6 και 7, στο 153^ο με τους γενότυπους 3, 5, 7, 12, 15, 17 και 18, καθώς και στο 157^ο ζεύγος βάσεων με τους γενότυπους 2, 3, 5, 7, 12, 15 και 17 της ποικιλίας «Tsechelidis». Στο 339^ο ζεύγος βάσεων εντοπίστηκε κοινός πολυμορφισμός τύπου A/C μεταξύ των γενότυπων της ποικιλίας «Hayward» (1, 1a και 21) και τους γενότυπους 3, 13 και 18 της ποικιλίας «Tsechelidis».

5. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, καταλήγουμε στο γενικό συμπέρασμα ότι η ποικιλία ακτινιδίου «Tsechelidis» όντως παρουσιάζει το φαινόμενο της αυτοσυμβατότητας. Τα ευρήματα της εν λόγω έρευνας επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του φαινομένου, καθώς βρέθηκε ότι τα πρέμνα της ποικιλίας «Tsechelidis» φέρουν άνθη με λειτουργικούς ανθήρες, οι οποίοι δύνανται να παράγουν γόνιμη γύρη. Η γύρη που παράγεται είναι αυτοσυμβατή και κατά συνέπεια συμβάλλει στη γονιμοποίηση των ανθέων, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή καρπών ακτινιδίου. Είναι γνωστό ότι η ανάπτυξη ερμαφρόδιτων ποικιλιών αποτελεί πρωταρχικό στόχο των προγραμμάτων βελτίωσης της ακτινιδιάς παγκοσμίως, εξαιτίας μιας πληθώρας παραγόντων, καθώς και ωφελειών που θα προέκυπταν από μια τέτοια προσπάθεια, με κυριότερες τη μείωση του κόστους καλλιέργειας και τον περιορισμό των απωλειών σε απόδοση, λόγω της αναγκαίας εγκατάστασης επικονιαστών στον αγρό. Έως σήμερα, έχουν υπάρξει περιορισμένες αναφορές ερμαφρόδιτων κλώνων ακτινιδιάς (McNeillage 1991a; 1991b, McNeillage and Steinhagen, 1998). Διευκρινίζεται ωστόσο, ότι σε κάθε περίπτωση επρόκειτο για αρσενικούς κλώνους, οι οποίοι έφεραν σε αναλογία αρσενικά και ερμαφρόδιτα άνθη. Από τα ερμαφρόδιτα άνθη αναπτύσσονταν τελικώς μικροί καρποί, οι οποίοι έφεραν μικρό αριθμό σπόρων. Για το χαρακτηρισμό αυτών των κλώνων επικράτησε ο όρος «καρποφόρα αρσενικά» πρέμνα (*fruiting males*). Οι Testolin *et al.* (2004) περιέγραψαν έναν αρσενικό κλώνο, ο οποίος προέκυψε από φυσική μετάλλαξη, και παρήγαγε μόνο τέλεια άνθη, με πλήρως αναπτυγμένη ωοθήκη και στύλο. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος κλώνος παρήγαγε καρπούς μόνο όταν τα άνθη του επικονιάζονταν από ξένη γύρη, προερχόμενη από επικονιαστές, και όχι έπειτα από αυτογονιμοποίηση. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η γύρη που παρήγαγαν τα συγκεκριμένα άνθη δεν ήταν ικανή να γονιμοποιήσει ούτε και τα άνθη άλλων θηλυκών πρέμνων. Με βάση τα παραπάνω, καθίσταται σαφές ότι η ποικιλία

«Tsechelidis» αποτελεί την πρώτη επίσημη αναφορά ερμαφρόδιτης θηλυκής ποικιλίας ακτινιδίου, η γύρη της οποίας είναι αυτοσυμβατή και δύναται να παράγει καρπούς έπειτα από αυτογονιμοποίηση. Οι καρποί που προέκυψαν έπειτα από αυτογονιμοποιησείς ανθέων διέφεραν σημαντικά ως προς το μέγεθος τους, όμως υπήρξαν αρκετές περιπτώσεις τέτοιων καρπών, οι οποίοι ανέπτυξαν μεγάλο βάρος, διατήρησαν το τυπικό σχήμα της ποικιλίας, ενώ παράλληλα χαρακτηρίζονταν από υψηλής ποιότητας φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Από τις συσχετίσεις μεταξύ του νωπού βάρους των καρπών και του αριθμού σπόρων ανά καρπό, βρέθηκε ότι και στην περίπτωση της αυτογονιμοποίησης το βάρος καρπού σχετίζεται θετικά με τον αριθμό σπερμάτων, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι το ιδιαίτερα μεγάλο βάρος ορισμένων καρπών αυτογονιμοποίησης ήταν αποτέλεσμα αποτελεσματικής επικονίασης και γονιμοποίησης ενός μεγάλου αριθμού σπερμοβλαστών από τη γύρη του ίδιου του άνθους, και όχι εξαιτίας της μεγάλης απορρόφησης νερού από τους καρπούς κατά την περίοδο ανάπτυξης τους. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώθηκε και από την υψηλή περιεκτικότητα των καρπών που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση, σε ξηρή ουσία.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής επιβεβαίωσαν την ύπαρξη γόνιμης και αυτοσυμβατής γύρης στα άνθη των πρέμνων της ποικιλίας «Tsechelidis», παράλληλα όμως επισήμαναν και τον ασταθή χαρακτήρα του φαινομένου αυτού, όπως προέκυψε από τη μεγάλη παραλλακτικότητα που εντοπίστηκε στον έλεγχο βιωσιμότητας της γύρης. Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο ότι η παρατηρηθείσα παραλλακτικότητα ήταν σαφώς μεγαλύτερη εντός των τιμών του κάθε πρέμνου και μικρότερη μεταξύ των τιμών διαφορετικών πρέμνων σε κάθε αγρό. Στη μεγάλη αυτή παραλλακτικότητα, ως προς τη γονιμότητα της γύρης των ανθέων του κάθε πρέμνου, αποδίδεται και η παραλλακτικότητα που σημειώθηκε μετέπειτα στο μέγεθος των καρπών αυτογονιμοποίησης του κάθε πρέμνου. Στα άνθη με χαμηλά ποσοστά γόνιμης γύρης, η επικονίαση και ακολούθως η γονιμοποίηση μεγάλου αριθμού σπερμοβλαστών, δεν ήταν εφικτή λόγω του περιορισμού της διαθέσιμης γύρης κατά την αυτογονιμοποίηση, με

αποτέλεσμα να προκύπτουν τελικώς μικροί και κακοσχηματισμένοι καρποί. Η παραλλακτικότητα ωστόσο, ως προς τη γονιμότητα της γύρης του κάθε πρέμνου, δεν ήταν σημαντική από χρονιά σε χρονιά, καθώς τα πρέμνα διατηρούσαν τα υψηλά ή χαμηλά ποσοστά τους αντίστοιχα, χωρίς να μεταβάλλεται σημαντικά η συνολική τους εικόνα. Παρατηρήθηκε μάλιστα, μια τάση για σταθεροποίηση όσο αυξάνονταν η ηλικία των πρέμνων. Οι Biasi *et al.* (2001), μελετώντας την αρρενοστεριότητα των θηλυκών ανθέων του είδους *A. deliciosa*, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο συγκεκριμένος μηχανισμός υπόκειται τόσο σε γαμετοφυτικό, όσο και σποροφυτικό έλεγχο. Συγκεκριμένα παρατήρησαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πολυαμινών (PAs) στους αρρενόστειρους ανθήρες των θηλυκών ανθέων σε σχέση με τους ανθήρες των αρσενικών ανθέων, ιδιαίτερα λίγο πριν το στάδιο της άνθισης. Η υψηλή συγκέντρωση πολυαμινών στους αρρενόστειρους ανθήρες θεωρήθηκε ως πιθανός παράγοντας στρες, ο οποίος πυροδοτεί τον μηχανισμό εξουδετέρωσης των μικροσπορίων στα θηλυκά άνθη. Επιπλέον, σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν και στα επίπεδα υδατανθράκων μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ανθέων, καθώς η συγκέντρωση των υδατανθράκων μειώθηκε σημαντικά τόσο στο κυτόπλασμα, όσο και στο κυτταρικό τοίχωμα των αρρενόστειρων ανθέρων κατά την άνθιση. Ωστόσο, δέκα ημέρες πριν την έναρξη της άνθισης, η συγκέντρωση των υδατανθράκων ήταν παρόμοια και στα δύο είδη ανθέων. Οι διαφορές αυτές αποδίδονται στο γεγονός ότι στην ακτινιδιά, η ανάπτυξη γόνιμης γύρης περιλαμβάνει δύο στάδια αμυλογένεσης, το δεύτερο εκ των οποίων έχει βρεθεί ότι δεν λαμβάνει χώρα στα θηλυκά άνθη, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των υδατανθράκων στους αρρενόστειρους ανθήρες κατά την περίοδο της άνθισης (Messina, 1993). Η τροφοδοσία της γύρης με υδατάνθρακες ελέγχεται από το κυτταρικό τοίχωμα του ανθήρα, το οποίο καθορίζει την ποσότητα των υδατανθράκων που παρέχεται στους γυρεόκοκκους κατά την ανάπτυξη τους. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι υδατάνθρακες δύναται να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων και ότι η

διαφοροποίηση του φύλου επηρεάζεται από παράγοντες θρέψης του φυτού (Koch, 1996). Η παραγωγή γόνιμης γύρης από τα θηλυκά άνθη της ποικιλίας «Tsechelidis» ενδεχομένως να οφείλεται στην ικανότητα των ανθέρων να τροφοδοτούν τους γυρεόκοκκους με υδατάνθρακες κατά την άνθιση, ως αποτέλεσμα ενός διαφοροποιημένου μηχανισμού ανάπτυξης της γύρης, κατά τον οποίο ολοκληρώνεται και το δεύτερο στάδιο αμυλογένεσης, όπως συμβαίνει στα αρσενικά άνθη. Επομένως, θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθούν τόσο τα επίπεδα πολυαμιμών, όσο και τα επίπεδα υδατανθράκων στα άνθη της ποικιλίας «Tsechelidis», σε πρέμνα με υψηλό και χαμηλό βαθμό αυτογονιμότητας. Επιπλέον, η θεωρία ότι η επαρκής τροφοδοσία των ανθέρων με υδατάνθρακες είναι ικανή να ενεργοποιήσει τα γονίδια που ελέγχουν την ωρίμανση των μικροσπορίων στα αρρενόστειρα άνθη, ενισχύεται από το γεγονός ότι οι Biasi *et al.* (2001), καλλιεργώντας ανθήρες από αρρενόστειρα άνθη σε θρεπτικό υπόστρωμα με επαρκή συγκέντρωση υδατανθράκων, κατάφεραν να αναπτύξουν γύρη μέχρι το διπύρρηνο στάδιο.

Τα άνθη της ποικιλίας «Tsechelidis» έχουν την τυπική μορφολογία του θηλυκού άνθους της ακτινιδιάς, όπως προέκυψε από την καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών. Η γενετική ανάλυση με τους μοριακούς δείκτες του φύλου επιβεβαίωσε τη θηλυκή φύση της ποικιλίας «Tsechelidis». Ωστόσο, από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης που ακολούθησε, των προϊόντων της μοριακής ανάλυσης, εντοπίστηκε μια πληθώρα πολυμορφισμών μεμονωμένης νουκλεοτιδικής βάσης (SNP) για το σύνολο των εξεταζόμενων γενοτύπων. Υπενθυμίζεται ότι για τη μοριακή ανάλυση είχαν επιλεγεί γενότυποι των δύο ακραίων κλάσεων (υψηλής και χαμηλής αυτογονιμότητας) της ποικιλίας «Tsechelidis». Πολυμορφισμοί μεμονωμένης νουκλεοτιδικής βάσης (SNP) εντοπίστηκαν τόσο μεταξύ των δύο κλάσεων της ποικιλίας «Tsechelidis», όσο και μεταξύ της ποικιλίας «Tsechelidis» και των ποικιλιών «Hayward» και «Matua», οι οποίες αποτέλεσαν τις ποικιλίες μάρτυρες στη συγκεκριμένη ανάλυση. Εξετάζοντας συνολικά τον αριθμό των πολυμορφισμών που εντοπίστηκαν στην

περιοχή της αλληλουχίας των δεικτών του φύλου SmX και SmY, προέκυψε μια γενικότερη ομαδοποίηση των εξεταζόμενων γενοτύπων. Οι ομάδες διακρίνονταν με βάση τη συχνότητα εμφάνισης κοινών πολυμορφισμών μεταξύ διαφορετικών γενοτύπων. Διαπιστώθηκε λοιπόν, ότι οι γενότυποι της ποικιλίας «Hayward» εμφάνιζαν κατά κύριο λόγο κοινούς πολυμορφισμούς με τους γενότυπους της ποικιλίας «Tsechelidis», οι οποίοι χαρακτηρίζονταν από χαμηλή αυτογονιμότητα και αντίστοιχα, οι γενότυποι της ποικιλίας «Matua» παρουσίαζαν κατά κανόνα κοινούς πολυμορφισμούς με τους γενότυπους της ποικιλίας «Tsechelidis», οι οποίοι χαρακτηρίζονταν από υψηλή αυτογονιμότητα. Εντοπίστηκαν ωστόσο, και πολυμορφισμοί που αφορούσαν αποκλειστικά είτε τους γενότυπους της ποικιλίας «Hayward», είτε τους γενότυπους της ποικιλίας «Matua». Αξίζει να σημειωθεί επίσης, ότι δεν εντοπίστηκε κανένας κοινός πολυμορφισμός μεταξύ των ποικιλιών «Hayward» και «Matua», καθώς και κανένας κοινός πολυμορφισμός μεταξύ των γενοτύπων των δύο διαφορετικών κλάσεων της ποικιλίας «Tsechelidis». Καθώς όμως, η χαρτογράφηση του γονιδιώματος της ακτινιδιάς δεν έχει ολοκληρωθεί, και κατά συνέπεια δεν έχουν εντοπιστεί και ταυτοποιηθεί τα υπεύθυνα γονίδια για το καθορισμό του φύλου, δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε αν και κατά πόσο οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν στην αλληλουχία των δεικτών του φύλου συνδέονται με αντίστοιχα QTL που ελέγχουν λειτουργίες και γνωρίσματα του μηχανισμού καθορισμού του φύλου στην ακτινιδιά, όπως για παράδειγμα την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ανθέων, την ανάπτυξη γόνιμης γύρης, κτλ. Η τάση να εντοπίζονται κοινοί πολυμορφισμοί μεταξύ των αυτογόνιμων γενοτύπων της ποικιλίας «Tsechelidis» και των αρσενικών γενοτύπων της ποικιλίας «Matua», όπως προέκυψε από την παρούσα έρευνα, καθώς αντίστοιχα η κοινή συμπεριφορά των γενοτύπων «Tsechelidis» με χαμηλά ποσοστά αυτογονιμότητας με τους γενότυπους της θηλυκής ποικιλίας «Hayward», γεννά τον προβληματισμό ότι ενδεχομένως κάποιοι από αυτούς τους πολυμορφισμούς, στις συγκεκριμένες γονδιακές θέσεις, να συνδέονται με γνωρίσματα του φύλου και προτρέπει για περαιτέρω

διερεύνηση. Οποιοδήποτε περαιτέρω συμπέρασμα σε αυτό το σημείο κρίνεται επισφαλές, έως ότου να αποκωδικοποιηθούν πλήρως τα γονίδια που ελέγχουν το φύλο στην ακτινιδιά. Μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική προσέγγιση για τη μοριακή ανάλυση θα μπορούσε να αποτελέσει η απομόνωση RNA από ιστό ανθέων για τη σύνθεση cDNA, με σκοπό τη μελέτη γονιδίων με διαφοροποιημένη έκφραση (DEG) στα αρσενικά και θηλυκά άνθη της ακτινιδιάς. Οι Kim *et al.* (2010) απομόνωσαν και αλληλούχισαν 15 μοριακούς δείκτες τύπου DEG, εκ των οποίων οι 11 παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ως προς την έκφραση τους μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ανθέων του είδους *A. chinensis*. Οι Varkonyi-Gasic *et al.* (2011) μελετώντας σε μοριακό επίπεδο τον μηχανισμό ανάπτυξης των ανθέων στα είδη *A. chinensis* και *A. deliciosa*, αναγνώρισαν και χαρακτήρισαν 9 MADS-box γονίδια, τα οποία είναι απαραίτητα για τη διαφοροποίηση του ανθικού μεριστώματος και των ανθικών οργάνων. Θα ήταν επομένως ιδιαίτερα ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί μοριακή ανάλυση με βάση αυτούς τους δείκτες σε γενοτύπους της ποικιλίας «Tsechelidis», ώστε να μελετηθούν τυχόν διαφορές που θα προκύψουν στην έκφραση τους, τόσο μεταξύ των γενοτύπων των δύο κλάσεων (χαμηλής – υψηλής αυτογονιμότητας) της ποικιλίας «Tsechelidis», όσο και μεταξύ της ποικιλίας «Tsechelidis» και των ποικιλιών μαρτύρων «Hayward» και «Matua».

SUMMARY

Kiwifruit is a newly commercialized fruit crop, native to South China. It belongs to the genus “Actinidia”, which includes more than 70 species, with a wide variation in growth habit, morphological traits and fruit characteristics. All members of the Actinidia genus are functionally dioecious and have no distinguishing cytological or morphological features to identify the sex of seedlings. Therefore, identification of male and female vines is only possible at the flowering stage, as staminate (male) vines produce male flowers that contain viable pollen, but they have no functional ovaries, and pistillate (female) vines produce female flowers with a functional ovary and non-viable pollen. The development of stable hermaphrodite varieties of kiwifruit, with a certain degree of self-compatibility as a way to overcome dioecism, is thus a prime objective in breeding programs of Actinidia species. Such an approach would enable a reduction in the number of vines used as pollinators in the orchard and would subsequently lead to significantly reduced cost production through an increase of the number of productive vines and an early elimination of undesirable plants.

“Tsechelidis” is a new kiwifruit cultivar of *Actinidia deliciosa* species developed in North Greece (Episkopi, Imathia) through collaboration between AGROHARA S.A and the laboratory of Genetics and Plant Breeding in University of Thessaly. The agronomical behavior of cv. “Tsechelidis” is rather stable and exceeds in earliness, yield potential, fruit characteristics (size, weight) and physiochemical parameters (vitamin C, phenolics) the widely used cv. “Hayward”. Despite its desirable characteristics, cv. “Tsechelidis” shows a certain degree of self-compatibility, as its female flowers produce viable pollen. The aim of the present research was to investigate the expression and nature of self-compatibility in “Tsechelidis” cultivar, by means of classical breeding and molecular methods.

In order to confirm the existence of self-compatibility in “Tsechelidis” cultivar and to study its expression among years, two basic experimental approaches were chosen. The first approach included controlled self-pollinations of female flowers in the field, while the second involved microscopical study of pollen viability in the 3 kiwi cultivars under investigation (Tsechelidis, Hayward and Matua).

The experiment was designed to assess the effects of parameters such as genotype, age of vines and the role of pollinators on fruit production and quality. The plant materials used were the new kiwifruit cultivar “Tsechelidis” (*Actinidia deliciosa*), cv. “Hayward” and the pollinator cv. “Matua”, organized in 3 different orchards. The first orchard (referred as **field I**) included 12-year-old vines of the 3 different cultivars: “Tsechelidis” (female), “Hayward” (female) and the pollinator “Matua” (male). The second orchard (referred as **field II**) included 6-year-old vines of “Tsechelidis” and “Matua” cultivars, while in the third one (referred as **field III**) there were only young vines of “Tsechelidis” cultivar (4 years old), in total absence of pollinators. A total number of 70 vines, from the three different cultivars tested, were selected in all experimental fields. Controlled self-pollination of flowers was carried out to all selected vines of “Tsechelidis” and “Hayward” cultivar, for two growing seasons. The number of fruits produced from self-pollinations was recorded monthly until harvesting time. At harvest stage, all fruits originated from self-pollinations were collected separately for further physicochemical analyses. In parallel, 5 open-pollinated fruits were collected from each selected vine, to be used as controls. During the flowering period, mature buds and open flowers were collected from all selected vines, of the 3 different kiwifruit cultivars. Morphology was studied in the open flowers, according to UPOV guidelines and 13 morphological traits were recorded. Pollen viability was studied using the staining method of acetocarmine (1%). Rates of viability per flower for every selected vine were estimated separately and summed up to give an average percentage of pollen viability.

Based on the results of the self-pollination scheme and pollen viability test, selected vines of cv. “Tsechelidis” were classified under two main categories. The first one included vines which expressed a significantly high degree of self-compatibility, while the second one included vines of low self-compatibility. Representative vines of the those two main categories were selected for molecular analysis, using sex-linked SCAR and DEG markers. Genotypes of female cv. “Hayward” and pollinator (male) cv. “Matua” were used as controls. In addition, PCR products of the molecular analysis were sequenced, as an attempt to identify

single nucleotide polymorphisms (SNP) between the genotypes of all 3 cultivars (Tsechelidis, Hayward and Matua).

The results of the present study confirmed the expression of self-compatibility in cv. “Tsechelidis”, as it was proven that its female flowers produce viable pollen and vines can set fruit after self-pollination. However, the degree of expression varied significantly among different orchards and among different vines of the same orchard. More precisely, the average carpodesis for cv. “Tsechelidis” (field II) was 34%, ranging from 20% to 60% per vine, while the respective rate for cv. “Hayward” cultivar was only 4% (in the same field). Fruits of cv. “Tsechelidis”, originated from self-pollination, varied in shape and in size, but there were many cases of self-pollinated fruits that reached or even exceeded commercial size. Those fruits had also high quality of basic physicochemical parameters, which was not significantly different from open pollinated fruits, according to the results of the physicochemical analysis. Pollen viability results indicated that the age of vines might be an important factor in the expression of self-compatibility in cv. “Tsechelidis”, as the elder vines (field I) were characterized by higher rates of pollen fertility than the younger ones (fields II and II). However, pollen viability test revealed also a great variance in fertility rates among flowers of the same vine, ranging in some cases from 0% (absolute sterile) to 70% (significantly fertile) per flower. As it was expected, female cv. “Hayward” was found practically sterile.

The sex-linked SCAR primers (SmX, SmY and SmY₁) were proved accurate in identifying the sex of the genotypes tested and confirmed the female nature of cv. “Tsechelidis”. The success of the gender identification test demonstrates that the markers can have considerable practical application and can be used for large-scale screening of seedling populations. The sequencing of PCR products revealed many single nucleotide polymorphisms (SNPs) in both sex-linked markers. By analysing the total number of SNPs detected, a general pattern was noticed, as “low-selfcompatible” genotypes of cv. “Tsechelidis” tended to have the same SNPs with the female genotypes of cv. “Hayward”, while “high-selfcompatible” ones showed common SNPs with the male genotypes of “Matua” cultivar. However, the role and nature of those SNPs remains unknown, as physical mapping in the genus

Actinidia is still in progress and sex genes have not been yet identified and sequenced. Results of present study imply that certain SNPs might be associated with gender differentiation and pollen development processes, as “high-selfcompatible” genotypes of cv. “Tsechelidis”, which produce viable pollen and can set fruit when self-pollinated, were found more or less to follow the SNP pattern of male genotypes. In addition, “low-compatible” genotypes of “Tsechelidis”, which are characterised by low rates of pollen viability, followed the SNP pattern of female “Hayward” genotypes, which are totally male-sterile. However, those are primary results, which require further investigation. Identification of sex genes in genus Actinidia and characterization of QTLs in the gender-linked area, would help to acquire a better understanding of the expression of self-compatibility in “Tsechelidis” cultivar.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

• **ΕΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- An, H.X., Cai, D.R., Mu, X.J., Zheng, B., and Shen, Q.G., 1995. *New germplasm of interspecific hybridization in Actinidia*. Acta Hort. 22: 133-137.
- Atkinson, R.G., Cipriani, G., Whittaker, J.D., and Gardner, R., 1997. *The allopolyploid origin of kiwifruit, Actinidia deliciosa (Actinidiaceae)*. Pl. Syst. Evol. 205: 111-124.
- Atkinson, R.G., and Macrae, E.A., 2007. *Kiwifruit*. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 60: 329-346.
- Biasi, R., Falasca, G., Speranza, A., De Stradis, A., Scoccianti, V., Franceschetti, M., Bagni, N. and Altamura, M., 2001. *Biochemical and ultrastructural features related to male sterility in the dioecious species Actinidia deliciosa*. Plant Physiol. Biochem. 39: 395-406.
- Burdon, J., McLeod, D., Lallu, N., Gamble, J., Petley, M., and Gunson, A., 2004. *Consumer evaluation of "Hayward" kiwifruit of different at-harvest dry matter contents*. Postharvest Biology and Technology. 34: 245-255.
- Chang, M.T. and Neuffer, M.G., 1989. *A simple method for staining nuclei of mature and germinated maize pollen*. Stain Technology. Vol. 4, 4:181-184.
- Charlesworth, D., 2002. *Plant sex determination and sex chromosomes*. Heredity 88: 94-101.
- Charlesworth, D., 2008. *Plant sex chromosomes*. Plant Genomes 4: 83-94.
- Chat, J., Chalak, L., and Petit, R.J., 1999. *Strict paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in intraspecific crosses of kiwifruit*. Theor. Appl. Genet. 99: 314-322.
- Chat, J., Decroocq, S., and Petit, R.J., 2003. *A one-step organelle capture: gynogenetic kiwifruits with paternal chloroplasts*. Proc. Royal Society Lon. B 270: 783-789.
- Chat, J., J, Petit, R.J., and Nadot, S., 2004. *Reticulate evolution in kiwifruit (Actinidia, Actinidiaceae) identified by comparing their maternal and paternal phylogenies*. American Journal of Botany 91(5): 736-747.

- Cheng, C.H., Seal, A.G., Boldingh, H.L., Marsh, K.B., MacRea, E.A., Murphy, S.J., and Ferguson, A.R., 2004. *Inheritance of taste characters and fruit size and number in a diploid Actinidia chinensis (kiwifruit) population*. Euphytica 138: 185-195.
- Cipriani, G., Di Bella, R. and Testolin, R., 1996. *Screening RAPD primers for molecular taxonomy and cultivar fingerprint in the genus Actinidia*. Euphytica 90: 169-174.
- Cipriani, G., Testolin, R. and Gardner, R., 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.
- Coimbra, S., L., Torrao, and Abreu, I., 2004. *Programmed cell death induces male sterility in Actinidia deliciosa female flowers*. Plant Physiology and Biochemistry 42: 537 – 541.
- Crowhurst, R.N., Lints, R., Atkinson, R.G., and Gardner, R.C., 1990. *Restriction fragment length polymorphisms in the genus Actinidia (Actinidiaceae)*. Plant Syst. Evol. 172: 193-203.
- Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., MacRae, E.A., Ampomah-Dwamena, C., Atkinson, R.G., Beuning, L.L., Bulley, S.M., Chagne, D., Marsh, K.B., Matich, A.J., Montefiori, M., Newcomb, R.D., Schaffer, R.J., Usadel, B., Allan, A.C., Boldingh, H. L., Bowen, J.H., Davy, M.W., Eckloff, R., Ferguson, A.R., Fraser, L.G., Gera, E., Hellens, R.P., Janssen, B.J., Klages, K., Lo, K.R., MacDiarmid, R.M., Nain, B., McNeilage, M.A., Rassam, M., Richardson, A.C., Rikkerink, E.H.A., Ross, G.S., Schroder, R., Snowden, K.C., Souleyre, E.J.F., Templeton, M.D., Walton, E.F., Wang, D., Wang, M.Y., Wang, Y.Y., Wood, M., Wu, R., Yauk, Y., and Laing, W.A., 2008. *Analysis of expressed sequence tags from Actinidia: applications of a cross species EST database for gene discovery in the areas of flavor, health, color and ripening*. BMC Genomics 9: 351.
- Doyle, J.J., and Doyle, L.J., 1990. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus 12: 13-15.
- Ferguson, A.R., 1990(a). *Kiwifruit (Actinidia)*. In: Moore JN Ballington JR (eds). Genetic resources of temperate fruit and nut crops, vol. 2, I.S.H.S. Wageningen, The Netherlands: 603-653.

- Ferguson, A.R., and Bollard, B.G., 1990. *Domestication of kiwifruit*. Warrington, J.J., Weston, C.G. (Eds.), *Kiwifruit: Science and Management*. Ray Richards, publisher in association with the New Zealand Society of Horticultural Science, Auckland, pp. 165-246.
- Ferguson, A.R., and Ferguson, L.R., 2003. *Are kiwifruit really good for you?* *Acta Hort.* 610: 131-138.
- Ferguson, A.R., 2007. *The need for characterisation and evaluation of germplasm: kiwifruit as an example*. *Euphytica* 154: 371-382.
- Ferguson, A.R., and Huang, H., 2007. *Genetic resources of kiwifruit: domestication and breeding*. *Hortic. Rev.* 33: 1-121.
- Fraser, L.G., Harvey, C.F., and Gill, G.P., 2001. *Application of microsatellite-based DNA profiling in Actinidia species*. *Acta Hort.* 546: 401-405.
- Fraser, L.G., Harvey, C.F., Crowhurst, R.N., and De Silva, H.N., 2004. *EST-derived microsatellites from Actinidia species and their potential for mapping*. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1010-1016.
- Fraser, L.G., McNeilage, M.A., Tsang, G.K., Harvey, C.F., De Silva, H.N., 2005. *Cross-species amplification of microsatellite loci within the dioecious, polyploidy genus Actinidia (Actinidiaceae)*. *Theor. Appl. Genet.* 112: 149-157.
- Fraser, L.G., Tsang, G.K., Datson, P.M., De Silva, H.N., Harvey, C.F., Gill, G.P., Crowhurst, R.N., and McNeilage, M.A., 2009. A gene-rich linkage map in the dioecious species *Actinidia chinensis* (kiwifruit) reveals putative X/Y sex-determining chromosomes. *BMC Genomics* 10:102.
- Fung, R.W.M., Janssen, B.J., Morris, B.A., and Gardner, R.C., 1998. *Inheritance and expression of transgenes in kiwifruit*. *NZ J. Crop Hortic. Sci* 26: 169-179.
- Gan, L., Xiong, X., Wang, R., Power, J.B., and Davey, M.R., 2003. *Plant regeneration from cell suspension protoplasts of Actinidia deliciosa*. *Acta Hortic.* 610: 197-202.
- Gill, G.P., Harvey, C.F., Gardner, R.C. and Fraser, L.G., 1998. *Development of sex-linked PCR markers for gender identification in Actinidia*. *Theor. Appl. Genet.* 97: 439-445.
- Gonzalez, M.V., Coque, M., and Herrero, M., 1998. *Influence of pollinations systems on fruit set and fruit quality in kiwifruit (Actinidia deliciosa)*. *Ann. Appl. Bio.* 132: 349 -355.

- Guowei, F., Hammer, S., and Grumet, R., 1992. *A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA*. Biotechniques 13: 53-54.
- Harvey, C.F., Fraser, C.F., Kent, J., Steinhagen, S., McNeilage, M.A., and Yan, G., 1995. *Analysis of plants obtained by embryo rescue from an interspecific Actinidia cross*. Sci. Hort. 60: 199-212.
- Harvey, C.F., Gill, G.P., Fraser, L.G., and McNeilage, M.A., 1997. *Sex determination in Actinidia. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid A. chinensis*. Sex Plant Reprod. 10: 149-154.
- He, Z., Zhang, X., Zhong, Y. and Ye, L., 2000. *Phylogenetic relationships of Actinidia and related genera based on micromorphological characters of foliar trichomes*. Genetic Resources and Crop Evolution 47: 627-639.
- Hirsch, A.M., Testolin, R., Brown, S., Chat, J., Fortune, D., Bureau, J.M., and De Nay, D., 2001. *Embryo rescue from interspecific crosses in the genus Actinidia (kiwifruit)*. Plant Cell Rep. 20: 508-516.
- Howpage, D., Vithanage, V., and Spooner-Hart, R., 1998. *Pollen tube distribution in the kiwifruit (Actinidia deliciosa A. Chev. C. F. Liang) pistil in relation to its reproductive process*. Annals of Botany 81: 697-703.
- Huang, H.W., Dane, F., Wang, Z.Z., Jiang, Z.W., Huang, R.H., and Huang, S.M., 1997. *Isozyme inheritance and variation in Actinidia*. Heredity 78: 328-336.
- Huang, W.G., Cipriani, G., Morgante, M., and Testolin, R., 1998. *Microsatellite DNA in Actinidia chinensis: isolation, characterization and homology in related species*. Theor. Appl. Genet. 97: 1269-1278.
- Huang, H.W., Wang, Y., Zhang, H.Z., Jiang, Z.W., and Wang, S.M., 2004. *Actinidia germplasm resources and kiwifruit industry in China*. HortScience 39: 1165-1172.
- Jauhar, P., 2006. *Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: The prospects and challenges*. Crop Science 46: 1841 – 1859.
- Jordan, M.J., Margaria, C.A., Shaw, P.E., and Goodner, K.L., 2002. *Aroma active components in aqueous kiwifruit essence and kiwifruit puree by GC-MS and multidimensional GC/GC-O*. Journal of Agric. Food Chem. 50: 5386-5390.
- Jung, Y.H., Kim, S.C., Kim, M., Kim, K.H., Kwon, H.M., and Oh, M.Y., 2003. *Chloroplast inheritance patterns in Actinidia hybrids determined by single stranded conformation polymorphism analysis*. Mol. Cells Vol. 15 no. 2: 277-282.

- Ke, S.Q., Huang, R.H., Wang, S.M., Xiong, Z.T., Wu, Z.W., 1992. *Studies on interspecific hybrids of Actinidia*. Acta Hort. 297: 133-139.
- Keith, Y.R., Hammett, R.W., and Murray, B.G., 2001. *Hybrid identification in Clivia (Amaryllidaceae) using chromosome banding and Genomic in situ hybridization*. Annals of botany 87: 457-462.
- Kim, H.B., Jun, S.S., Choe, S., Cho, J.Y., Choi, S.B., and Kim, S.C., 2010. *Identification of differentially expressed genes from male and female flowers of kiwifruit*. African Journal of Biotechnology, Vol. 9(40): 6684-6694.
- Kim, Y.K., Kang, H.J., Lee, K.T., Choi, J.G., and Chung, S.H., 2003. *Anti-inflammation activity of Actinidia polygama*. Arch. Pharm. Res. 26: 1061-1066.
- Koch, K.E., 1996. *Carbohydrate-modulated gene expression in plants*. Plant Mol. Biol. 47: 529-540.
- Lescorret, F., Habib, R., Genard, M., Agostini, D., and Chadoeul, J., 1998. *Pollination and fruit growth models for studying the management of kiwifruit orchards. I. Models description*. Agricultural Systems Vol. 56 no.1: 67-89.
- Li, X., Li, J., and Soejarto, D.D., 2009. *Advances in the study of the systematic of Actinidia Lindley*. Front. Biol. China 4(1): 55-61.
- Li, D.W., Zhong, C.H., Liu, Y.F., Huang, H.W., 2010. *Correlation between ploidy level and fruit characters of the main kiwifruit cultivars in China: implication for selection and improvement*. NZ. J. Crop Hortic. 38: 137-145.
- Liu, J.H., Xu, X.Y., and Deng, X.X., 2003. *Protoplast isolation, culture and application to genetic improvement of woody plants*. Food Agri. Environ. 1: 112-120.
- Ma, H., Moore, P.H., Liu, Z., Kim, M.S., Yu, Q., Fitch, M.M., Sekioka, T., Paterson A.H., and Ming, R., 2004. *High-density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in papaya*. Genetics 166: 419-436.
- Marchetti, S., C., Zampa and Chiesa, F., 1992. Sex modification in Actinidia deliciosa var. deliciosa. Euphytica 64: 205 – 213.
- Mavromatis, A.G., Arvanitoyiannis, I., Nanos, G., Sakellariou, M., Ilanidis, C., and Korkovelos, A., 2010. *Molecular fingerprinting of a new kiwifruit cultivar (cv. Tsechelidis) and comparative analysis with cv. Hayward according to physicochemical properties*. Scientia Horticulturae 125: 277-282.

- McGuire, R.G., 1992. *Reporting of objective color measurements*. HortScience 27: 1254-1255.
- McNeilage, M.A., and Considine, J.A., 1989. *Chromosome studies in some Actinidia taxa and implications for breeding*. NZ J. Bot. 27: 71-81.
- McNeilage, M.A., 1991a. *Sex expression in fruiting male vines of kiwifruit*. Sexual Plant Reproduction 4: 274 – 278.
- McNeilage M.A., 1991b. *Gender variation in Actinidia deliciosa, the kiwifruit*. Sexual Plant Reproduction 4: 267 – 273.
- McNeilage, M.A., and Steinhagen, S., 1998. *Flower and fruit characters in a kiwifruit hermaphrodite*. Euphytica 101: 69 – 72.
- McPherson, H.G., Richardson, A.C., Snelgar, W.P., Patterson, K.J., and Currie, M.B., 2001. *Flower quality and fruit size in kiwifruit (Actinidia deliciosa)*. N. Zealand J. Crop and Hort. Science 29: 93 - 101.
- Messina, R., 1993. *Microsporogenesis in male-fertile cv. Matua and male-sterile cv. Hayward of Actinidia deliciosa var. Deliciosa (Kiwifruit)*. Adv. Hortic. Sci. 7: 77-81
- Ming, R., Wang, J., Moore, P.H., and Paterson, A.H., 2007. *Sex chromosomes in flowering plants*. American Journal of Botany 94(2): 141-150.
- Ming, R., Bendahmane, A., and Renner, S.S., 2011. *Sex chromosomes in Land plants*. Annu. Rev. Plant Bio. 62: 485-514.
- Nishiyama, I., 2007. *Fruits of the Actinidia genus*. Advances in Food and Nutrition Research. Vol. 52: 293-324.
- Oliveira, M.M., and Fraser, L.G., 2005. *Actinidia spp. Kiwifruit*. Biotechnology in Agriculture 29: 2-27.
- Oliveira, M.M., and Pais, M.S.S., 1991. *Plant regeneration from protoplasts of long-term callus cultures of Actinidia deliciosa var. deliciosa cv. Hayward (kiwifruit)*. Plant Cell Rep. 9: 643-646.
- Oliveira, M.M., and Pais, M.S.S., 1992. *Somatic embryogenesis in leaves and leaf-derived protoplast of Actinidia deliciosa var. deliciosa cv. Hayward (kiwifruit)*. Plant Cell Rep. 11: 314-317.

- Ollitrault-Sammarcelli, F., Legave, J.M., Michaux-Ferriere, N., and Hirsch, A.M., 1994. *Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus Actinidia*. *Scientia Horticulturae* 57: 303-313.
- Palombi, M.A., and Damiano, C., 2002. *Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (Actinidia deliciosa A. Chev)*. *Plant Cell Rep.* 20: 1061-1066.
- Prado, M.J., Gonzalez, M.V., Romo, S., and Herrera M.T., 2007. *Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 88: 1-10.
- Reamon-Buttner, S.M., and Jung, C., 2000. *AFLP-derived STS markers for the identification of sex in Asparagus officinalis L*. *Theor. Appl. Genet.* 100: 432-438.
- Renner, S.S., and Ricklefs, R.E., 1995. *Dioecy and its correlates in the flowering plants*. *American Journal of Botany* 82: 596-606.
- Rossiter, K.L., Young, H., Walker, S.B., Miller, M., and Dawson, D.M., 2000. *The effects of sugars and acids on consumer acceptability of kiwifruit*. *J. Sens Stud.* 15: 241-250.
- Rugini, E., Pellegrineschi, A., Mencuccini, M., and Mariotti, D., 1991. *Increase of rooting ability in the woody species kiwi (Actinidia deliciosa A. Chev.) by transformation with Agrobacterium rhizogenes rol genes*. *Plant Cell Rep.* 10: 291-295.
- Rugini, E., Caricato, G., Muganu, M., Taratufolo, C., Camili, M., and Camili, C., 1997. *Genetic stability and agronomic evaluation of six-year-old transgenic kiwi plants for rolABC and rolB genes*. *Acta Hort.* 477: 609-610.
- Seal, A.G., 2003. *The plant breeding challenges to making kiwifruit a worldwide mainstream fresh fruit*. *Acta Hort.* 610: 75-80.
- Seefelder, S., Ehrmaier, H., Schweizer, G., and Seigner, E., 2000. *Male and female genetic linkage map of hops (Humulus lupulus)*. *Plant Breeding* 119: 249-255.
- Sharma, D.R., and Shirkot, P., 2004. *Biotechnological interventions for genetic amelioration of Actinidia deliciosa var. deliciosa (kiwifruit) plant*. *Indian J. Biotechnology* 3: 249-257.

- Shirkot, P., D.R., Sharma, and Mohapatra, T., 2002. *Molecular identification of sex in Actinidia deliciosa var. deliciosa by RAPD markers*. Scientia Horticulturae 94: 33 – 39.
- Sotiropoulos, T., Koukourikou – Petridou, M., Petridis, A., Stylianidis, D., Almaliotis, D., Papadakis, I., Therios I., and Molassiotis, A., 2009. “*Tsechelidis*” *kiwifruit*. Hort. Science 44(2): 466-468.
- Testolin, R., G., Cipriani and Costa, G., 1995. *Sex segregation ratio and gender expression in the genus Actinidia*. Sexual Plant Reproduction 8: 129 – 132.
- Testolin, R., and Cipriani, G., 1997. *Paternal inheritance of chloroplast dna and maternal inheritance of mitochondrial dna in the genus Actinidia*. Theor. Appl. Genet. 94: 897-903.
- Testolin, R., Huang, W.G., Lain, O., Messina, R., Vecchione, A., and Cipriani, G., 2001. A kiwifruit (*Actinidia* spp.) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 103: 30-36.
- Testolin, R., Messina, R., Lain, O., Cipriani, G., 2004. *A natural sex mutant in kiwifruit (Actinidia deliciosa)*. N. Z. J. Crop Hortc. Sci. 32: 179-183.
- Tsang, G.K., Fraser, L.G., McNeilage, M.A., De Silva, H.N., and McRae, E.A., 2007. *Genetic markers: their transferability and usefulness across Actinidia*. Acta Hort. 753: 561-566.
- Varkonyi-Gasic, E., Moss, S.M., Voogd, C., Wu, R., Lough, R.H., Wang, Y., and Hellens, R.P., 2011. *Identification and characterization of flowering genes in kiwifruit: sequence conservation and role in kiwifruit flower development*. BMC Plant Biology 11: 72-87.
- Vyskot, B., and Hobza R., 2004. *Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog*. Trends in Genetics Vol. 20 no.9.
- Wang, S.M., Huang, R.H., Wu, X.W., and Ning, K., 1994. *Studies on Actinidia breeding by species hybridization*. J. Fruit Sc. 11: 23-26.
- Wang, S.M., Huang, R.H., Jiang, Z.W., Zhang, Z.H., Zhang, S.R., and Huang, H.Q., 2000. *Studies on Actinidia breeding by species hybridization between A. chinensis and A. eriantha and their hybrid's progenies*. Advances in Hort. Research, China 88: 123-127.

- Wang, T.C., Ran, Y.D., Atkinson, R.G., Gleave, A.P., and Cohen, D., 2006. *Transformation of Actinidia eriantha: a potential species for functional genomics studies in Actinidia*. Plant Cell Rep. 25: 425-431.
- Wang, T.C., Atkinson, R.G., and Janssen, B., 2007. *The choice of Agrobacterium strain for transformation of kiwifruit*. Acta Hort. Vol. 753(1): 227-232.
- Weising, K., Fung, R.W.M., Keeling, D.J., Atkinson, R.G., and Gardner, R.C., 1996. *Characterization of microsatellites from Actinidia chinensis*. Molecular Breeding 2: 117-131.
- White, A., De Silva, H.N., Requero-Tapia, C., Harker, F.R., 2005. *Evaluation of softening characteristics of fruit from 14 species of Actinidia*. Postharvest Biol. Technol. 35: 143-151.
- Williams, M.H., Boyd, L.M., McNeilage, M.A., MacRae, E.A., Ferguson, A.R., Beatson, R.A., and Martin, P.J., 2003. *Development and commercialization of "baby kiwi" (Actinidia arguta Planch.)* Acta Hort. 610: 81-86.
- Xiao, X.G., 1999. *Advances in Actinidia biotechnology and molecular biology*. Acta Hort. 498: 53-64.
- Xiao, Z.A., and Han, B.W., 1997. *Interspecific somatic hybrids in Actinidia*. Acta Bot Sin 39: 1110-1117.
- Xiao, X.G., and Hirsch, A.M., 1996. *Microcallus formation from leaf mesophyll protoplasts in the genus Actinidia Lindl*. Plant Cell Rep 15: 896-899.
- Xiao, X.G., and Hirsch, A.M., 1997. *Isolation, culture and fusion of protoplasts in Actinidia spp*. Acta Hort 444: 119-124.
- Xiao, Z.A., Wan, L.C., and Han, B.W., 2004. *An interspecific somatic hybrid between Actinidia chinensis and Actinidia kolomikta and its chilling tolerance*. Plant Cell Tiss Org Cult 79: 299-306.
- Xu, X.B., Yao, X.H., and Chen, H., 2003. *Application of modern biotechnology on kiwifruit*. Acta Hort. 610: 525-531.
- Yan, G., Ferguson, A.R. and McNeilage, M.A., 1994a. *Ploidy races in Actinidia chinensis*. Euphytica 78: 175-183. Yan, G., Ferguson, A.R., McNeilage, M.A., and Murray, B.G., 1997b. *Numerically unreduced (2n) gametes and sexual polyploidization in Actinidia*. Euphytica 96: 267-272.

- Yan, G., Atkinson, R.G., Ferguson, A.R., McNeilage, M.A., and Murray, B.G., 1997b. *In situ hybridization in Actinidia using repeat DNA and genomic probes*. Theor. Appl. Genet. 94: 507-513.
- Yanan, H., Fenglan, L., and Shumin, G., 2004. *Sex determination and sexual organ differentiation in flowering plants*. Forestry studies in China 6(4): 50-57.
- Young, H., Stec, M., Paterson, V.J., Mcmath, K., and Ball, R., 1995. *Volatile compounds affecting kiwifruit flavor*. ACS Sym. Ser. 596: 59-67.
- Zhang, Y.J., Mu, X.J., Cai, Q.J., Zhou, Y.L, and Qian, Y.Q., 1995. *Plantlet regeneration from leaf protoplasts of seedling leaves of Actinidia eriantha*. Acta Bot Sin 37: 48-52.
- Zhang, Y.J., Qian, Y.Q., Cai, Q.G., Mu, X.J., Wei, X.P., and Zhou, Y.L., 1997. *Somaclonal variation in chromosome number and nuclei transfer of regenerated plants from protoplasts of Actinidia eriantha*. Acta Bot Sin 39: 102-105.

• ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βασιλακάκης, Μ., 1996. Στοιχεία Γενικής & Ειδικής Δενδροκομίας. Εκδόσεις Γραφικές Τέχνες «Γ.Μ. Μεδούσης». Θεσσαλονίκη, 1996.
- Ιλανίδης, Κ., 2006. «Γενετικός έλεγχος και ταυτοποίηση γενοτύπων ακτινιδίου μετά από DNA ανάλυση και προσδιορισμό των φυσικοχημικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους». Μεταπτυχιακή διατριβή.
- Παλούκης, Σ., και Ντινόπουλος, Ο., 1989. *Ακτινιδιά*. Ιδιωτική έκδοση Παπαδιονυσίου – Παλούκη. ISBN: 9608501202. Θεσσαλονίκη, 1989.

• ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

1. <http://www.fao.org>
2. <http://www.kiwi-tsechlidis.com>
3. <http://www.minagric.gr>
4. <http://www.meteo.gr>

Παράρτημα

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΝΘΕΩΝ

	TSECHELIDIS - ΑΓΡΟΣ Ι									
	Πρέμνο 1	Πρέμνο 2	Πρέμνο 3	Πρέμνο 4	Πρέμνο 5	Πρέμνο 6	Πρέμνο 7	Πρέμνο 8	Πρέμνο 9	Πρέμνο 10
Αριθμός σεπάλων (45)	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6
Αριθμός πετάλων (44)	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7	7-8	6-7	7-8	7-8	7
Μήκος μίσχου cm (42)	8-9	8-9	7-8	7-9	8-10	9-10	7-8	9-11	7-9	8-10
Διάμετρος άνθους cm (49)	6-7	6-7	6-7	5-6	7-8	6-7	5-6	6-7	5-6	7-8
Διάταξη πετάλων (όψη από κάτω) (50)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)
Καμύλη κορυφής πετάλων (51)	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία
Χρώμα σεπάλων (46)	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο
Χρώμα πετάλων (53)	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό

Τύπος χρωματισμού πετάλων στη βάση (52)	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία
Παρουσία σκιών στο χρώμα πετάλων (54)	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία
Διαβάθμιση χρώματος πετάλων (55)	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή
Χρώμα ανθήρων (59)	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί
Αριθμός στύλων (60)	40-45	35-38	35	35-38	35-38	35-38	42-45	35-40	35-40	40-45

HAYWARD - ΑΓΡΟΣ Ι

	Πρέμνο 1	Πρέμνο 2	Πρέμνο 3	Πρέμνο 4	Πρέμνο 5	Πρέμνο 6	Πρέμνο 7	Πρέμνο 8	Πρέμνο 9	Πρέμνο 10
Αριθμός σεπάλων (45)	6	6	6	6	6	6	6	5-6	6	6
Αριθμός πετάλων (44)	6-7	6	6	6-7	6-7	6	6-7	6	6	6-7
Μήκος μίσχου cm (42)	6-7	6-7	7-8	7-8	6-7	6-7	7-8	6-7	6-7	6-7
Διάμετρος άνθους cm (49)	6-7	5-6	5-6	5-6	6-7	6-7	5-6	5-6	5	5-6
Διάταξη πετάλων (όψη από κάτω) (50)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)
Καμπύλη κορυφής πετάλων (51)	Έντονη	Έντονη	Έντονη	Έντονη	Έντονη	Έντονη	Έντονη	Έντονη	Έντονη	Έντονη
Χρώμα σεπάλων (46)	Καφέ	Καφέ	Καφέ	Καφέ	Καφέ	Καφέ	Καφέ	Καφέ	Καφέ	Καφέ
Χρώμα πετάλων (53)	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό
Τύπος χρωματισμού πετάλων στη βάση (52)	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία

σΠαρουσία σκιών στο χρώμα πετάλων (54)	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία
Διαβάθμιση χρώματος πετάλων (55)	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	OXI	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	OXI	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή	OXI	OXI	Πιο ανοιχτό προς την κορυφή
Χρώμα ανθήρων (59)	Κίτρινο	Κίτρινο	Κίτρινο	Κίτρινο	Κίτρινο	Κίτρινο	Κίτρινο	Κίτρινο	Κίτρινο	Κίτρινο
Αριθμός στύλων (60)	30-35	35-38	35	35-38	35-38	35-38	32-40	35-40	35-40	38-40

TSECHELIDIS - ΑΓΡΟΣ ΙΙ

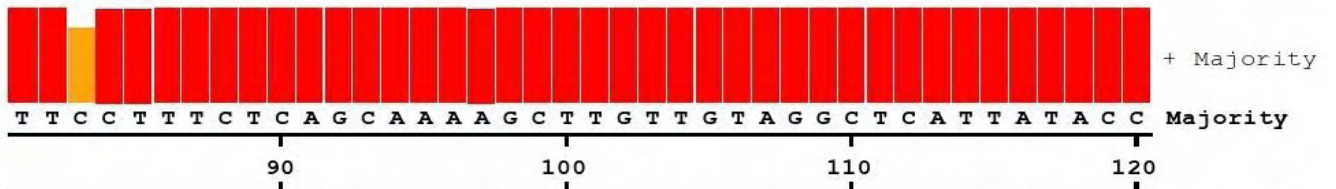
	Πρέμνο 1	Πρέμνο 2	Πρέμνο 3	Πρέμνο 4	Πρέμνο 5	Πρέμνο 6	Πρέμνο 7	Πρέμνο 8	Πρέμνο 9	Πρέμνο 10
Αριθμός σεπάλων (45)	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6
Αριθμός πετάλων (44)	7-8	6-7	7-8	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7
Μήκος μίσχου cm (42)	8-9	7-8	7-9	7-9	8-10	7-9	7-9	9-10	7-9	8-9
Διάμετρος άνθους cm (49)	5-6	5-6	6-7	5-6	5-6	6-7	5-6	6-7	5-6	7-8
Διάταξη πετάλων (όψη από κάτω) (50)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping)	Συμφύονται (touching)
Καμπύλη κορυφής πετάλων (51)	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία
Χρώμα σεπάλων (46)	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο
Χρώμα πετάλων (53)	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό
Τύπος χρωματισμού πετάλων στη βάση (52)	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία

Παρουσία σκιών στο χρώμα πετάλων (54)	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία
Διαβάθμιση χρώματος πετάλων (55)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
Χρώμα ανθών (59)	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί
Αριθμός στύλων (60)	40-45	35-38	40-45	35-38	35-38	35-38	35-38	40-45	35-40	40-45

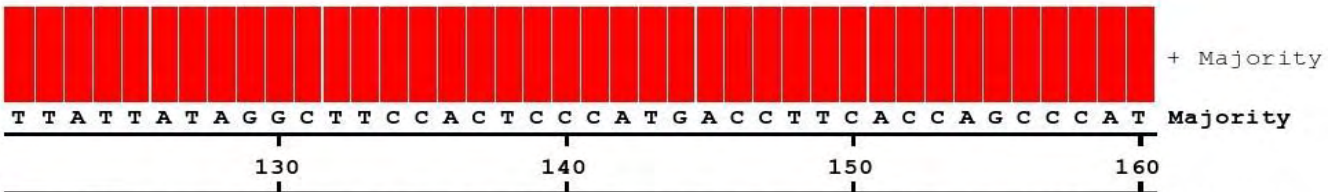
TSECHELIDIS - ΑΓΡΟΣ ΙΙΙ

	Πρέμνο 1	Πρέμνο 2	Πρέμνο 3	Πρέμνο 4	Πρέμνο 5	Πρέμνο 6	Πρέμνο 7	Πρέμνο 8	Πρέμνο 9	Πρέμνο 10
Αριθμός σεπάλων (45)	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6
Αριθμός πετάλων (44)	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7	7-8	6-7	6-7	6-7
Μήκος μίσχου cm (42)	7-8	7-9	8-10	7-9	8-10	7-9	8-10	7-9	7-9	8-9
Διάμετρος άνθους cm (49)	5-6	6-7	5-6	5-6	7-8	6-7	5-6	6-7	5-6	7-8
Διάταξη πετάλων (όψη από κάτω) (50)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)	Συμφύονται (touching)
Καμπύλη κορυφής πετάλων (51)	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία	Απουσία ή πολύ ασθενής παρουσία
Χρώμα σεπάλων (46)	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο	Πράσινο
Χρώμα πετάλων (53)	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Λευκό
Τύπος χρωματισμού πετάλων στη βάση (52)	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία	Μονοχρωμία

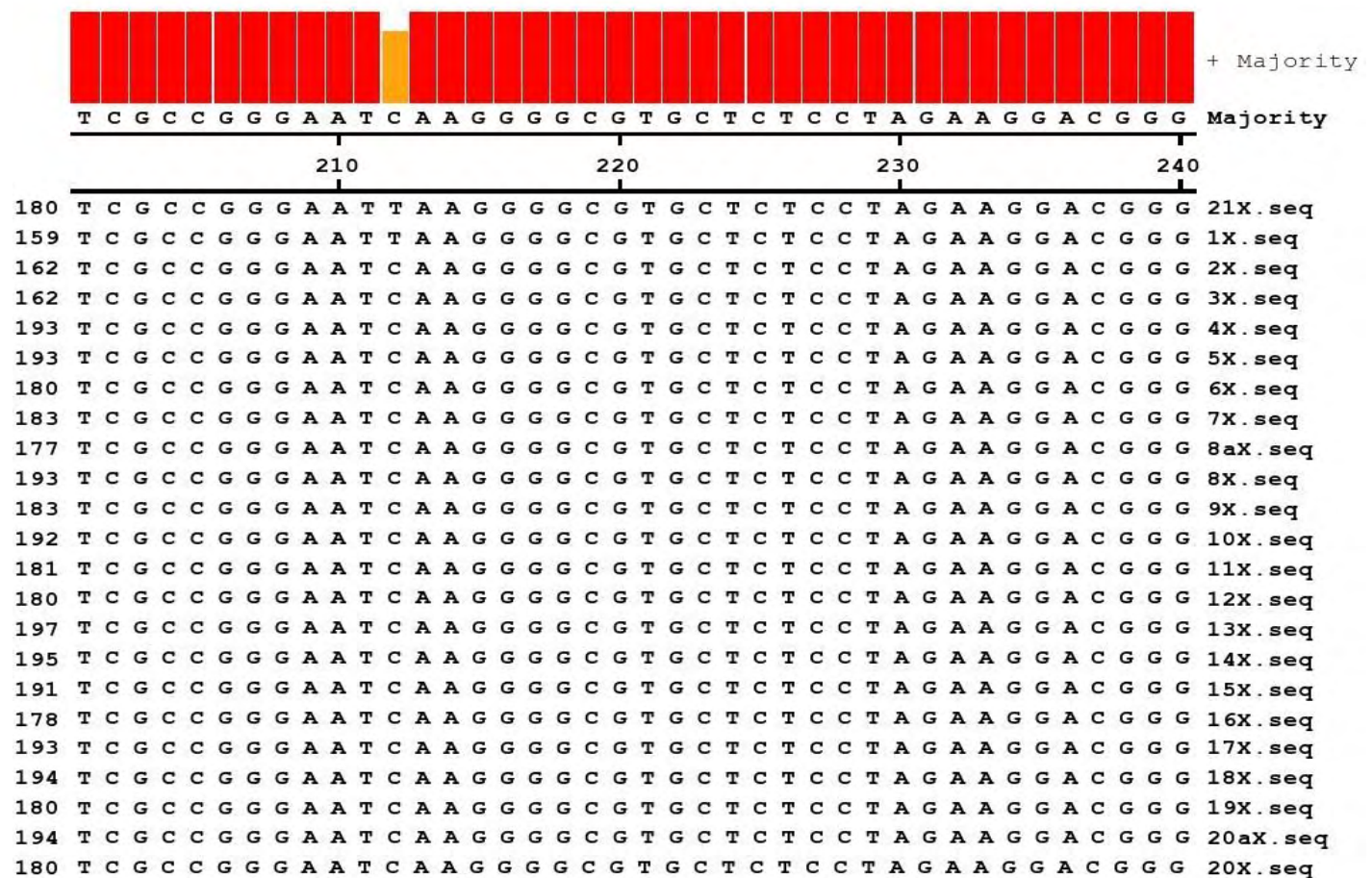
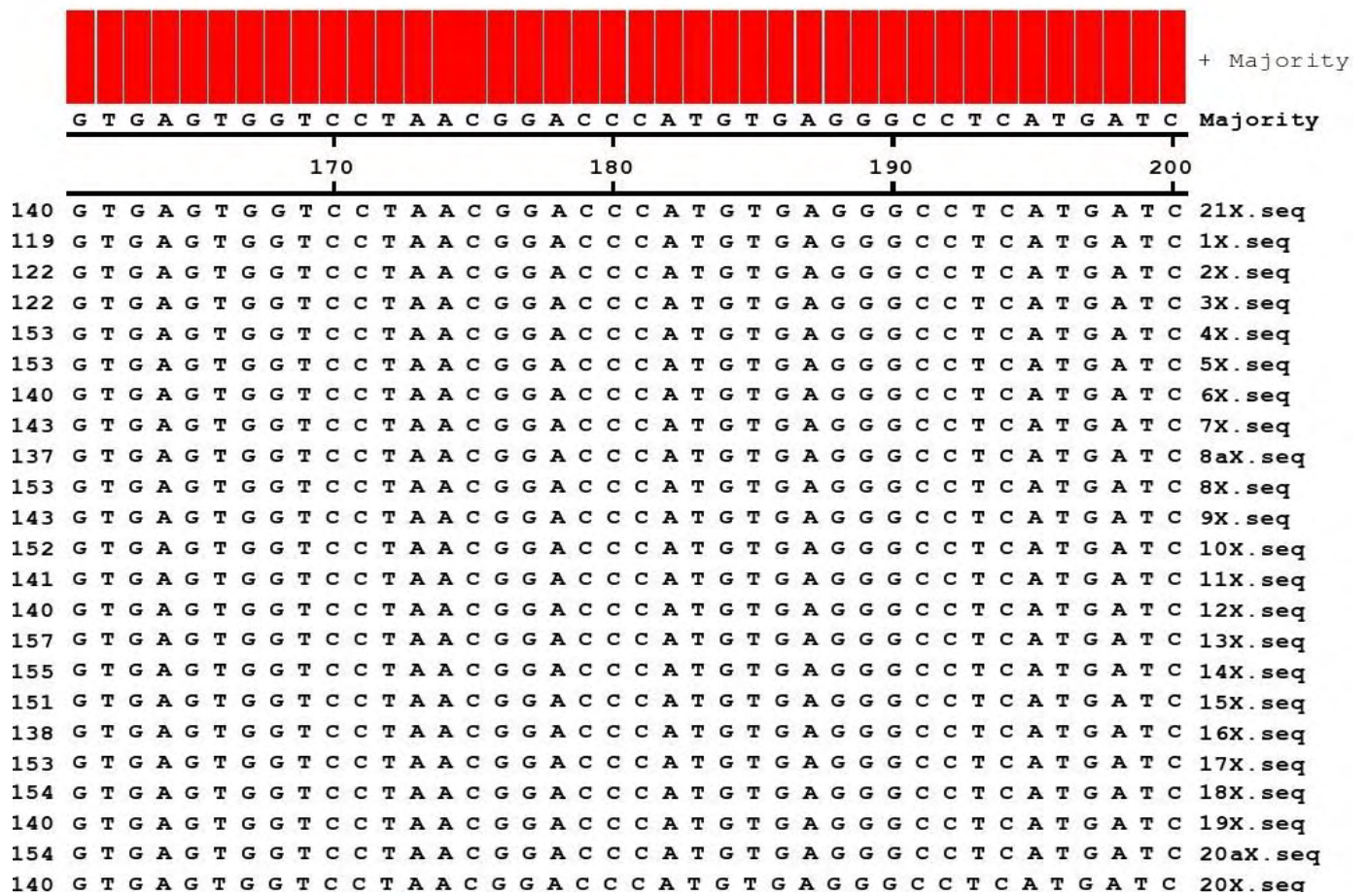
Παρουσία σκιών στο χρώμα πετάλων (54)	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία
Διαβάθμιση χρώματος πετάλων (55)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
Χρώμα ανθήρων (59)	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί	Κίτρινο - πορτοκαλί
Αριθμός στύλων (60)	40-45	35-40	35-40	35-40	35-40	40-45	40-45	35-40	35-40	40-45

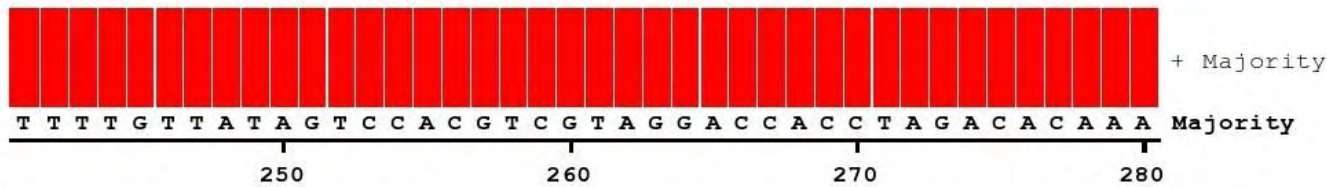


63 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 21X.seq
 42 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 1X.seq
 45 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 2X.seq
 45 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 3X.seq
 76 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 4X.seq
 76 T T T C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 5X.seq
 63 T T T C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 6X.seq
 64 T T T C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 7X.seq
 60 T T T C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 8aX.seq
 76 T T T C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 8X.seq
 66 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 9X.seq
 75 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 10X.seq
 64 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 11X.seq
 62 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 12X.seq
 80 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 13X.seq
 78 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 14X.seq
 74 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 15X.seq
 61 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 16X.seq
 76 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 17X.seq
 77 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 18X.seq
 63 T T C C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 19X.seq
 77 T T T C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 20aX.seq
 63 T T T C T T T C T C A G C A A A A G C T T G T T G T A G G C T C A T T A T A C C 20X.seq

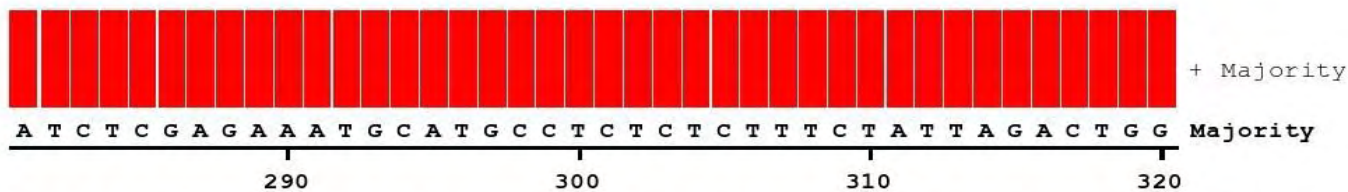


100 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 21X.seq
 79 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 1X.seq
 82 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 2X.seq
 82 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 3X.seq
 113 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 4X.seq
 113 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 5X.seq
 100 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 6X.seq
 103 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 7X.seq
 97 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 8aX.seq
 113 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 8X.seq
 103 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 9X.seq
 112 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 10X.seq
 101 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 11X.seq
 100 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 12X.seq
 117 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 13X.seq
 115 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 14X.seq
 111 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 15X.seq
 98 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 16X.seq
 113 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 17X.seq
 114 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 18X.seq
 100 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 19X.seq
 114 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 20aX.seq
 100 T T A T T A T A G G C T T C C A C T C C C A T G A C C T T C A C C A G C C C A T 20X.seq

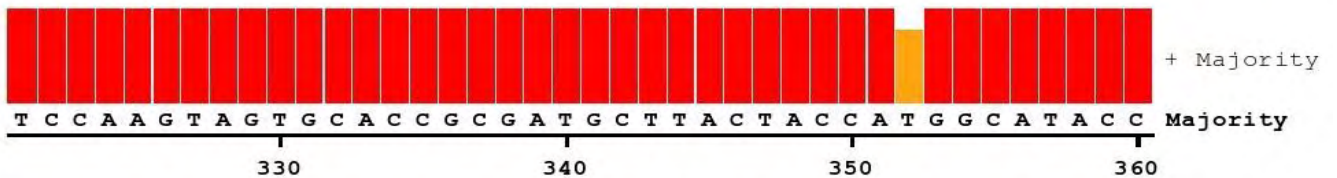




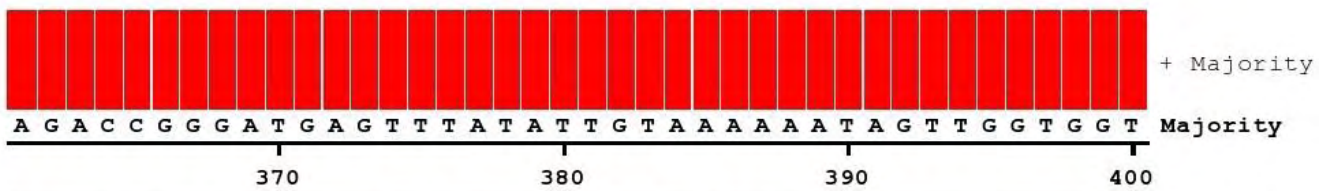
220 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 21X.seq
 199 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 1X.seq
 202 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 2X.seq
 202 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 3X.seq
 233 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 4X.seq
 233 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 5X.seq
 220 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 6X.seq
 223 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 7X.seq
 217 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 8aX.seq
 233 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 8X.seq
 223 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 9X.seq
 232 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 10X.seq
 221 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 11X.seq
 220 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 12X.seq
 237 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 13X.seq
 235 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 14X.seq
 231 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 15X.seq
 218 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 16X.seq
 233 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 17X.seq
 234 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 18X.seq
 220 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 19X.seq
 234 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 20aX.seq
 220 T T T T G T T A T A G T C C A C G T C G T A G G A C C A C C T A G A C A C A A A 20X.seq



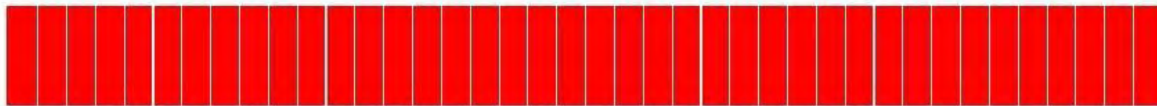
260 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 21X.seq
 239 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 1X.seq
 242 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 2X.seq
 242 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 3X.seq
 273 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 4X.seq
 273 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 5X.seq
 260 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 6X.seq
 263 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 7X.seq
 257 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 8aX.seq
 273 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 8X.seq
 263 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 9X.seq
 272 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 10X.seq
 261 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 11X.seq
 260 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 12X.seq
 277 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 13X.seq
 275 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 14X.seq
 271 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 15X.seq
 258 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 16X.seq
 273 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 17X.seq
 274 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 18X.seq
 260 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 19X.seq
 274 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 20aX.seq
 260 A T C T C G A G A A A T G C A T G C C T C T C T C T T T C T A T T A G A C T G G 20X.seq



298 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 21X.seq
 279 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 1X.seq
 280 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 2X.seq
 280 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 3X.seq
 311 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 4X.seq
 311 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 5X.seq
 298 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 6X.seq
 301 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A C G G C A T A C C 7X.seq
 295 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A C G G C A T A C C 8aX.seq
 311 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A C G G C A T A C C 8X.seq
 301 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 9X.seq
 310 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 10X.seq
 299 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 11X.seq
 298 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 12X.seq
 315 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A C G G C A T A C C 13X.seq
 313 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 14X.seq
 309 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A C G G C A T A C C 15X.seq
 296 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 16X.seq
 311 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 17X.seq
 312 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 18X.seq
 298 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A T G G C A T A C C 19X.seq
 312 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A C G G C A T A C C 20aX.seq
 298 T C C A A G T A G T G C A C C G C G A T G C T T A C T A C C A C G G C A T A C C 20X.seq



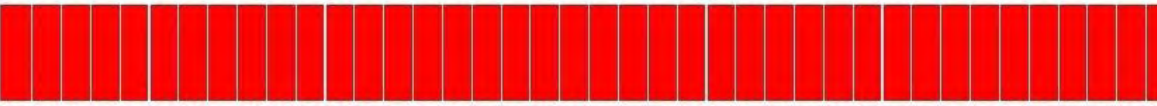
338 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 21X.seq
 319 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 1X.seq
 320 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 2X.seq
 320 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 3X.seq
 351 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 4X.seq
 351 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 5X.seq
 338 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 6X.seq
 341 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 7X.seq
 335 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 8aX.seq
 351 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 8X.seq
 341 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 9X.seq
 350 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 10X.seq
 339 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 11X.seq
 338 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 12X.seq
 355 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 13X.seq
 353 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 14X.seq
 349 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 15X.seq
 336 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 16X.seq
 351 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 17X.seq
 352 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 18X.seq
 338 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 19X.seq
 352 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 20aX.seq
 338 A G A C C G G G A T G A G T T T A T A T T G T A A A A A T A G T T G G T G G T 20X.seq



+ Majority

A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T Majority
 410 420 430 440

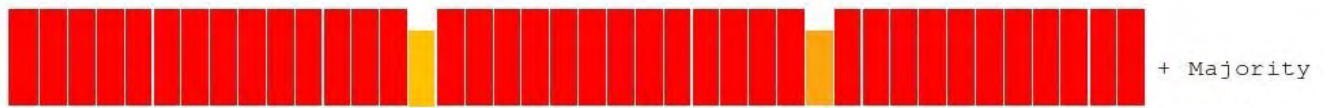
378 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 21X.seq
 359 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 1X.seq
 360 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 2X.seq
 360 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 3X.seq
 391 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 4X.seq
 391 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 5X.seq
 378 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 6X.seq
 381 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 7X.seq
 375 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 8aX.seq
 391 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 8X.seq
 381 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 9X.seq
 390 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 10X.seq
 379 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 11X.seq
 378 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 12X.seq
 395 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 13X.seq
 393 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 14X.seq
 389 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 15X.seq
 376 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 16X.seq
 391 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 17X.seq
 392 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 18X.seq
 378 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 19X.seq
 392 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 20aX.seq
 378 A T G G C G G T G T C T T C A A A T A C G G T A C A C T T C A A G G C G C G T T 20X.seq



+ Majority

A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G Majority
 450 460 470 480

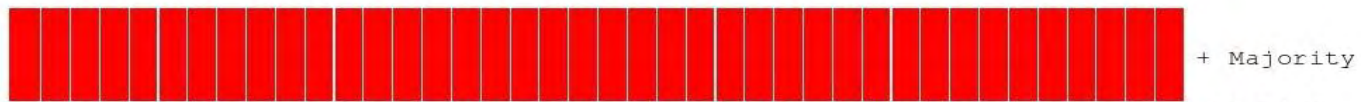
418 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 21X.seq
 399 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 1X.seq
 400 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 2X.seq
 400 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 3X.seq
 431 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 4X.seq
 431 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 5X.seq
 418 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 6X.seq
 421 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 7X.seq
 415 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 8aX.seq
 431 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 8X.seq
 421 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 9X.seq
 430 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 10X.seq
 419 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 11X.seq
 418 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 12X.seq
 435 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 13X.seq
 433 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 14X.seq
 429 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 15X.seq
 416 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 16X.seq
 431 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 17X.seq
 432 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 18X.seq
 418 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 19X.seq
 432 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 20aX.seq
 418 A C T A C G T C G C T T T C A T A A A G A T A G T A T T T G C C C C T A C C A G 20X.seq



A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T Majority

490 500 510 520

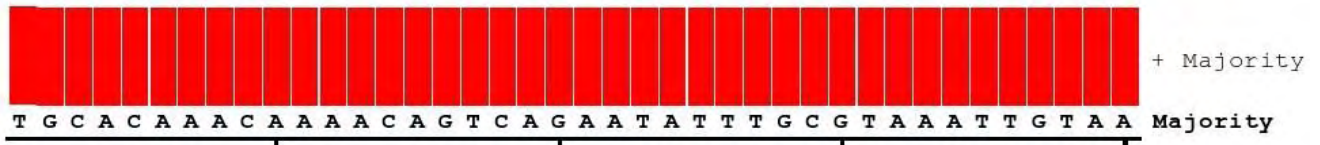
458 A T G G T G T G C A C G G G A T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 21X.seq
 439 A T G G T G T G C A C G G G A T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 1X.seq
 440 A T G G T G T G C A C G G G A T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 2X.seq
 440 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 3X.seq
 471 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 4X.seq
 471 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 5X.seq
 458 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 6X.seq
 461 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T T C C T T C A A G A A T 7X.seq
 455 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T T C C T T C A A G A A T 8aX.seq
 471 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T T C C T T C A A G A A T 8X.seq
 461 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 9X.seq
 470 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 10X.seq
 459 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 11X.seq
 458 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 12X.seq
 475 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T T C C T T C A A G A A T 13X.seq
 473 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 14X.seq
 469 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T T C C T T C A A G A A T 15X.seq
 456 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 16X.seq
 471 A T G G T G T G C A C G G G A T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 17X.seq
 472 A T G G T G T G C A C G G G A T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 18X.seq
 458 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T G C C T T C A A G A A T 19X.seq
 472 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T T C C T T C A A G A A T 20aX.seq
 458 A T G G T G T G C A C G G G G T T A C A G C A A A T C T T C C T T C A A G A A T 20X.seq



A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T Majority

530 540 550 560

496 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 21X.seq
 477 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 1X.seq
 478 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 2X.seq
 478 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 3X.seq
 509 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 4X.seq
 509 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 5X.seq
 498 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 6X.seq
 499 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 7X.seq
 493 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 8aX.seq
 509 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 8X.seq
 499 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 9X.seq
 508 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 10X.seq
 497 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 11X.seq
 496 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 12X.seq
 513 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 13X.seq
 511 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 14X.seq
 507 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 15X.seq
 494 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 16X.seq
 509 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 17X.seq
 510 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 18X.seq
 496 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 19X.seq
 510 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 20aX.seq
 496 A C A A T G A C C C T C G A A C T C T A A G T T C T T A C T G T T C T T A T T T 20X.seq



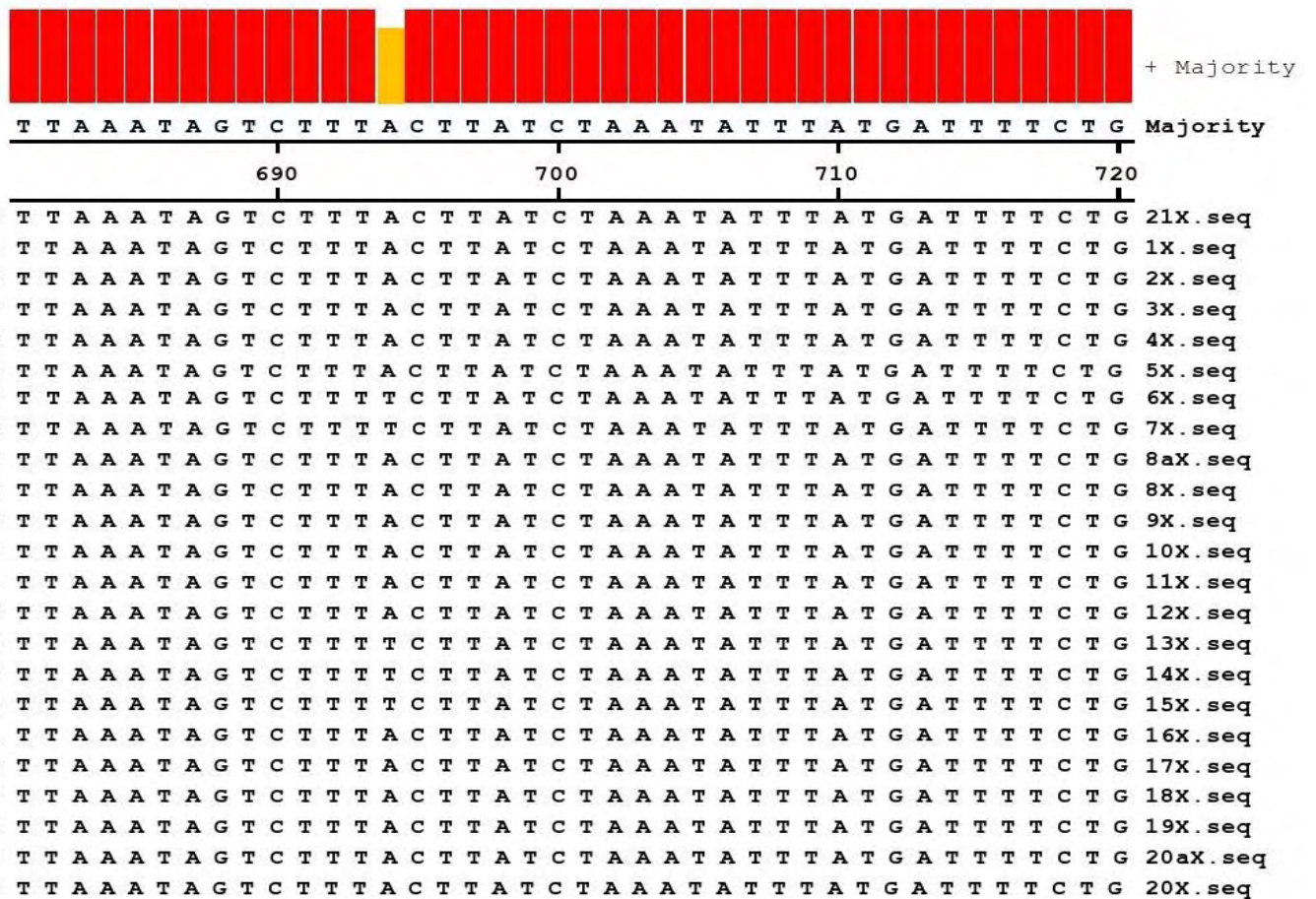
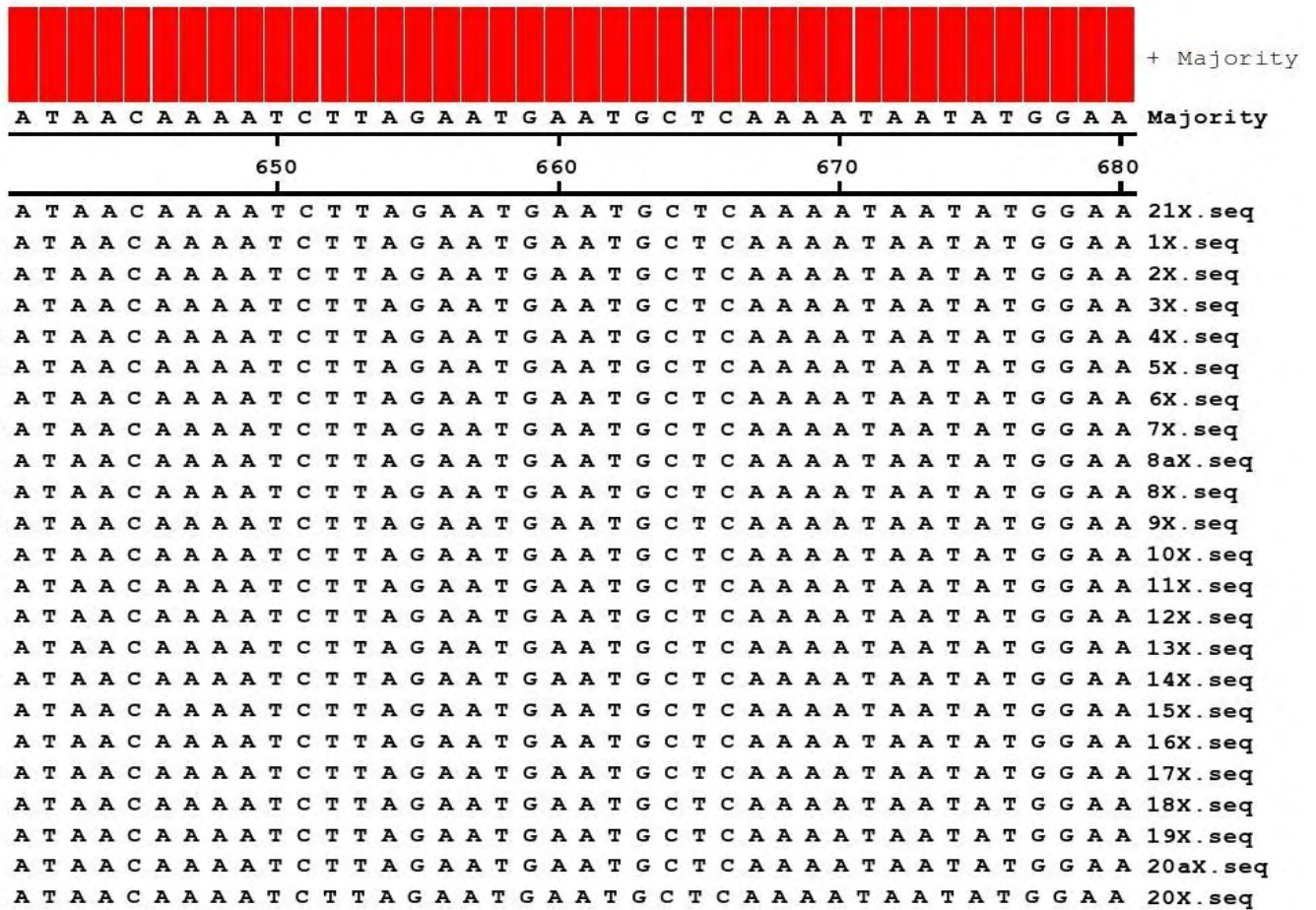
570 580 590 600

536 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 21X.seq
 517 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 1X.seq
 518 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 2X.seq
 518 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 3X.seq
 549 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 4X.seq
 549 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 5X.seq
 538 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 6X.seq
 539 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 7X.seq
 533 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 8aX.seq
 549 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 8X.seq
 539 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 9X.seq
 548 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 10X.seq
 537 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 11X.seq
 536 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 12X.seq
 553 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 13X.seq
 551 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 14X.seq
 547 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 15X.seq
 534 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 16X.seq
 549 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 17X.seq
 550 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 18X.seq
 536 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 19X.seq
 550 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 20aX.seq
 536 T G C A C A A A C A A A A C A G T C A G A A T A T T T G C G T A A A T T G T A A 20X.seq



610 620 630 640

575 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 21X.seq
 556 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 1X.seq
 557 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 2X.seq
 557 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 3X.seq
 588 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 4X.seq
 588 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 5X.seq
 578 C T A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 6X.seq
 578 C T A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 7X.seq
 572 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 8aX.seq
 588 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 8X.seq
 578 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 9X.seq
 587 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 10X.seq
 576 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 11X.seq
 575 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 12X.seq
 592 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 13X.seq
 590 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 14X.seq
 586 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 15X.seq
 573 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 16X.seq
 588 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 17X.seq
 589 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 18X.seq
 575 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 19X.seq
 589 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 20aX.seq
 575 C A A A G A T A A T T G G A A C C T C T A A G A T T T T G T T T T T T G C A G A 20X.seq





A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G Majority

730 740 750 760

692 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 21X.seq
 673 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 1X.seq
 674 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 2X.seq
 674 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 3X.seq
 705 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 4X.seq
 705 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 5X.seq
 698 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 6X.seq
 695 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 7X.seq
 689 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 8aX.seq
 705 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 8X.seq
 695 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 9X.seq
 704 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 10X.seq
 693 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 11X.seq
 692 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 12X.seq
 709 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 13X.seq
 707 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 14X.seq
 703 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 15X.seq
 690 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 16X.seq
 705 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 17X.seq
 706 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 18X.seq
 692 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 19X.seq
 706 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 20aX.seq
 692 A T A T G A A A A A C G T T T C T A A G A G G T G G T G C T A A T T T A T A G G 20X.seq



C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A Majority

770 780 790 800

729 C T A T C A C G C A C C C C A T T C A A T C A C A A C C T T T C T G C G T A A A 21X.seq
 710 C T A T C A C G C A C C C C A T T C A A T C A C A A C C T T T C T G C G T A A A 1X.seq
 711 C T A T C A C G C A C C C C A T T C A A T C A C A A C C T T T C T G C G T A A A 2X.seq
 711 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 3X.seq
 742 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 4X.seq
 742 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 5X.seq
 738 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 6X.seq
 732 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 7X.seq
 726 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 8aX.seq
 742 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 8X.seq
 732 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 9X.seq
 741 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 10X.seq
 730 C T A T C A C G C A C C C C A T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 11X.seq
 729 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 12X.seq
 746 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 13X.seq
 744 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 14X.seq
 740 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 15X.seq
 727 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 16X.seq
 742 C T A T C A C G C A C C C C A T T C A A T C A C A A C C T T T C T G C G T A A A 17X.seq
 743 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C T G C G T A A A 18X.seq
 729 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 19X.seq
 743 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 20aX.seq
 729 C T A T C A C G C A C C C C C T T C A A T C A C A A C C T T T C C G C G T A A A 20X.seq



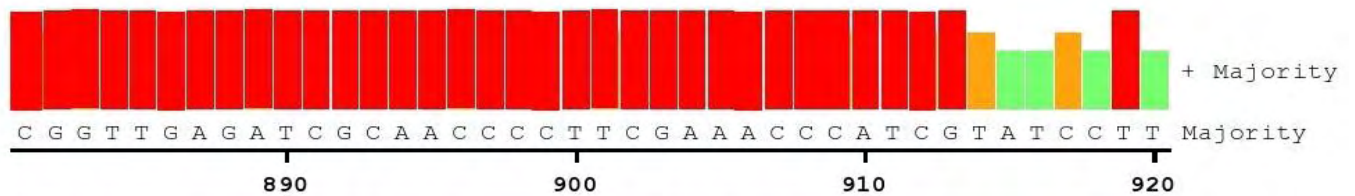
810 820 830 840

767 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 21X.seq
 748 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 1X.seq
 749 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 2X.seq
 749 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 3X.seq
 780 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 4X.seq
 780 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 5X.seq
 778 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 6X.seq
 770 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 7X.seq
 764 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 8aX.seq
 780 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 8X.seq
 770 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 9X.seq
 779 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 10X.seq
 768 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 11X.seq
 767 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 12X.seq
 784 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 13X.seq
 782 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 14X.seq
 778 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 15X.seq
 765 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 16X.seq
 780 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 17X.seq
 781 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 18X.seq
 767 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 19X.seq
 781 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 20aX.seq
 767 G T T G T G A C C T T G G A T C A A T C C G A A T G G T C A C A A C C T T T T G 20X.seq

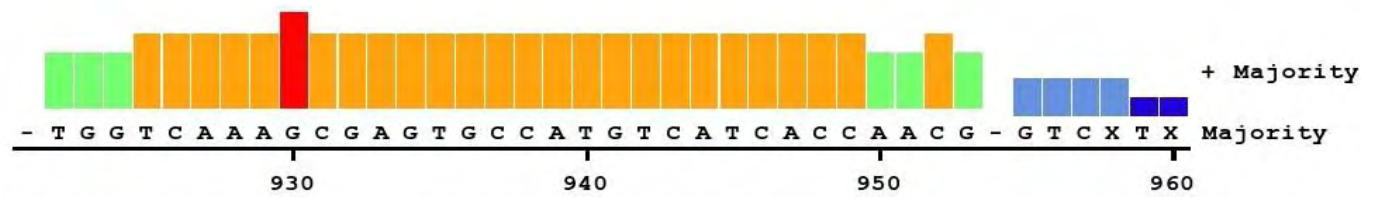


850 860 870 880

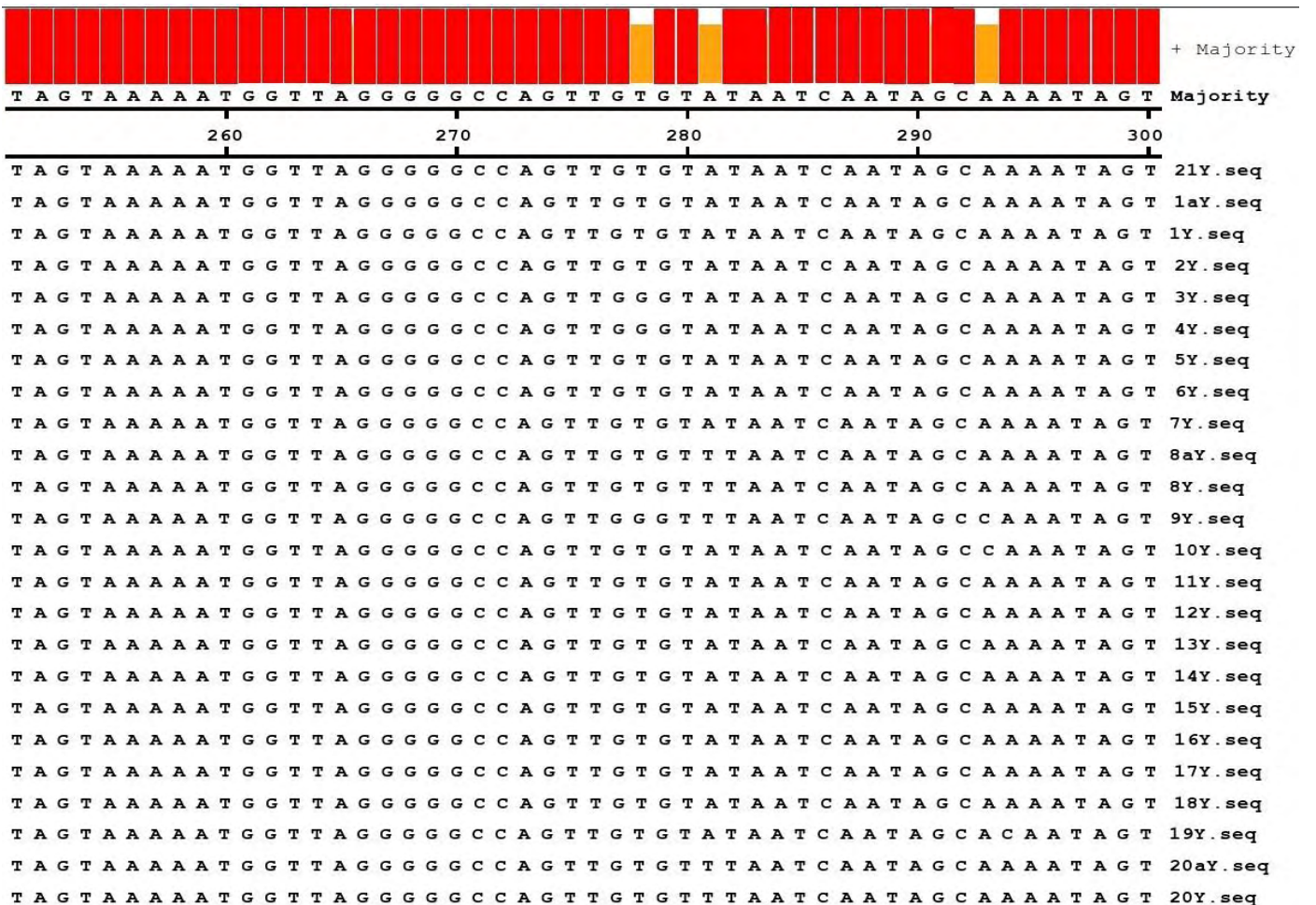
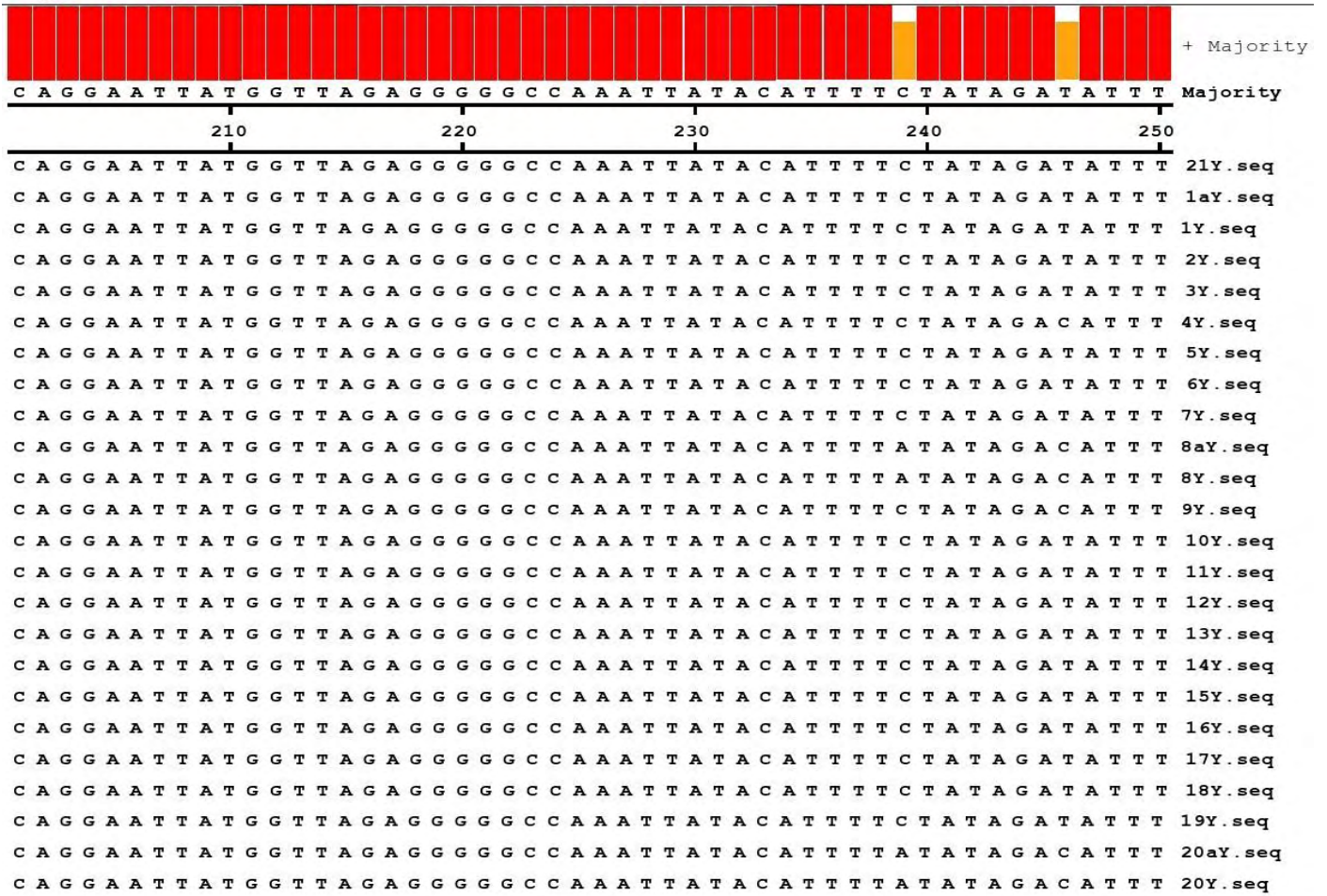
807 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 21X.seq
 788 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 1X.seq
 789 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 2X.seq
 789 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 3X.seq
 820 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 4X.seq
 820 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 5X.seq
 818 G A T T A A A G T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G C T T C G T T C T A 6X.seq
 810 G A T T A A A G T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C T A 7X.seq
 804 G A T T A A A G T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G C T A C G A T C T A 8aX.seq
 820 G A T T A A A G T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G C T A C G A T C T A 8X.seq
 810 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 9X.seq
 819 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 10X.seq
 808 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 11X.seq
 807 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 12X.seq
 824 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 13X.seq
 822 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 14X.seq
 818 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 15X.seq
 805 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 16X.seq
 820 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 17X.seq
 821 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 18X.seq
 807 G A T T A A A T T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G T T A C G A T C A A 19X.seq
 821 G A T T A A A G T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G C T A C G A T C T A 20aX.seq
 807 G A T T A A A G T T C T A T C C A T T G G A T C A C G C T G C T A C G A T C T A 20X.seq

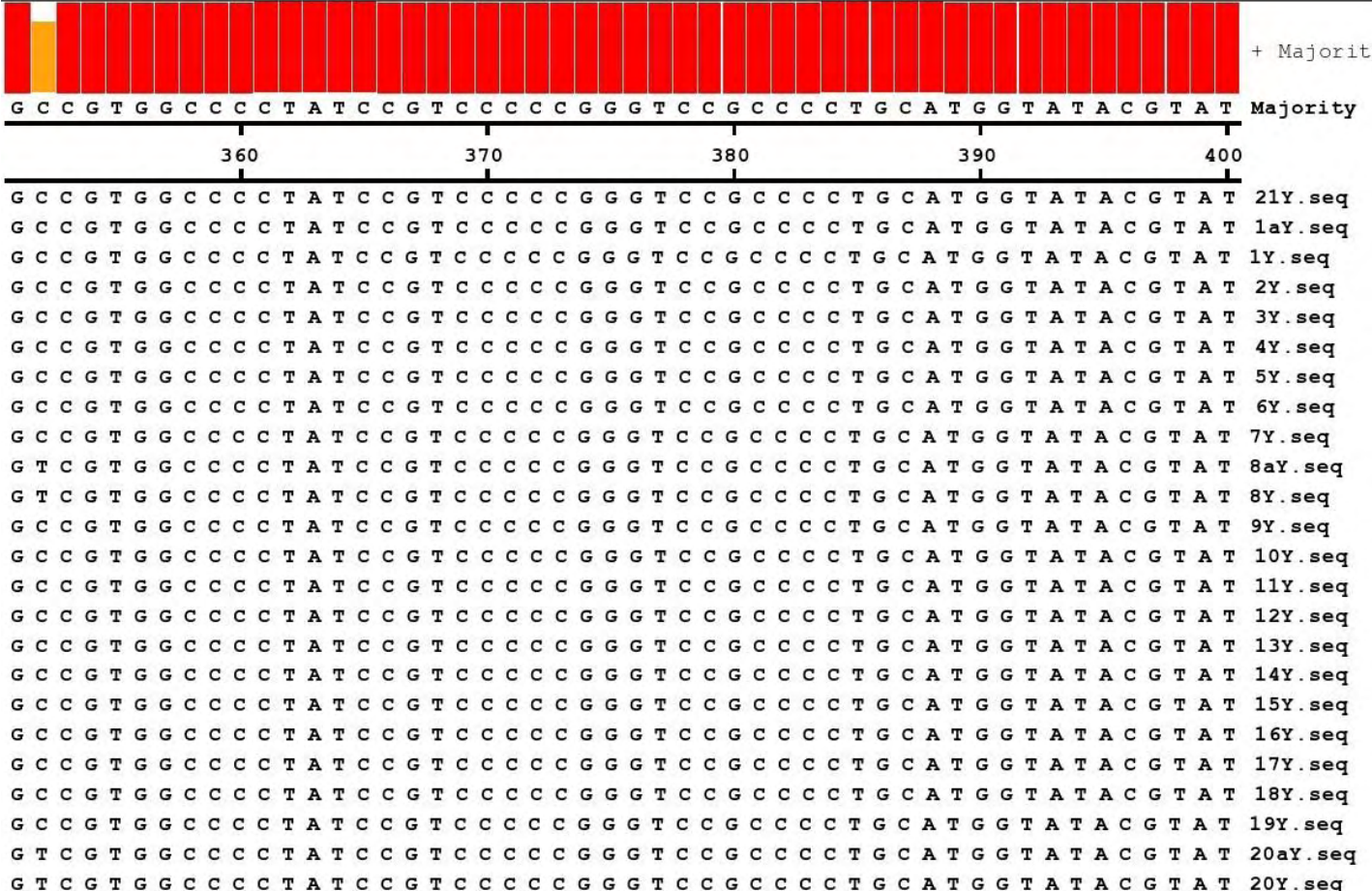
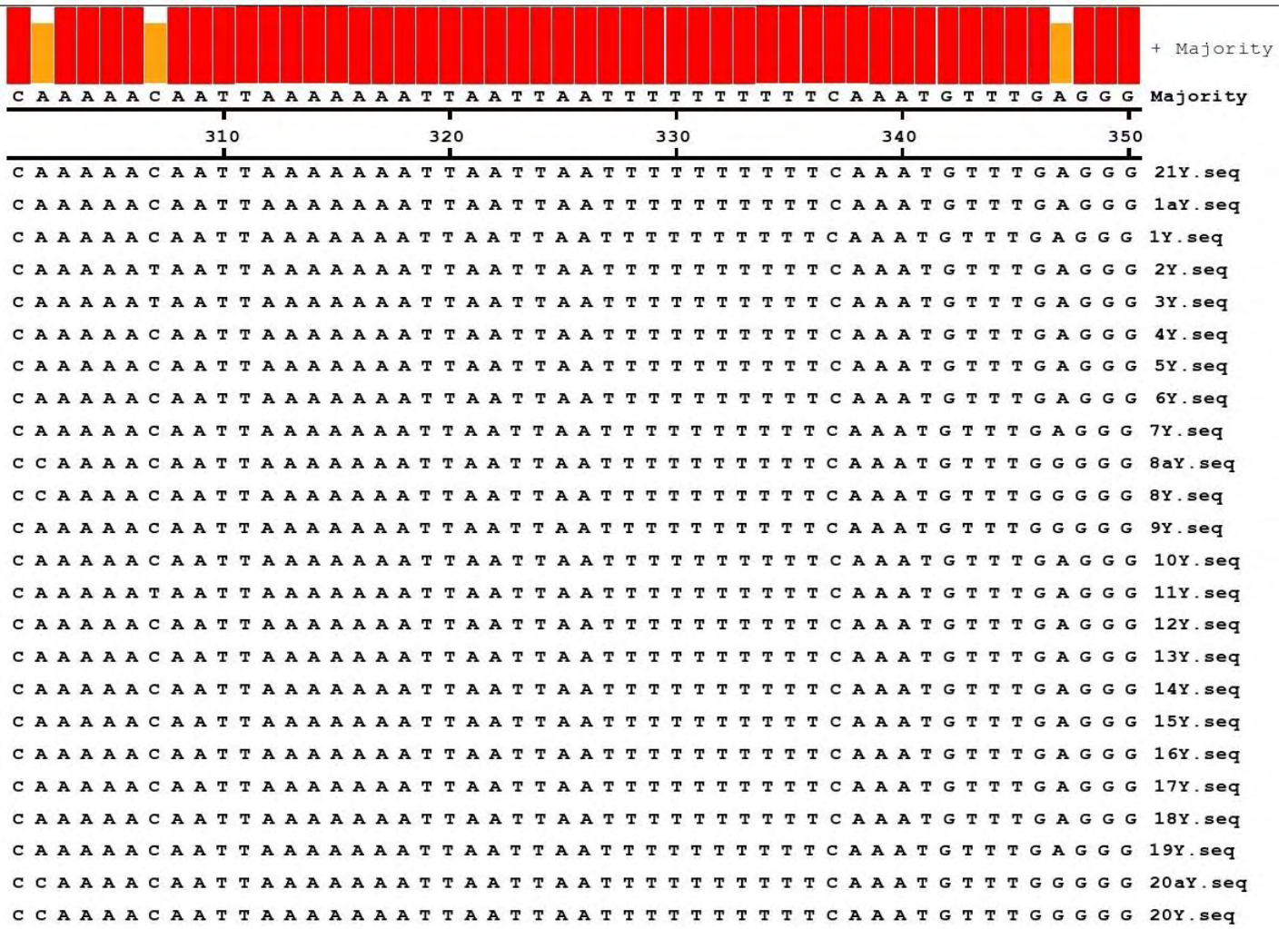


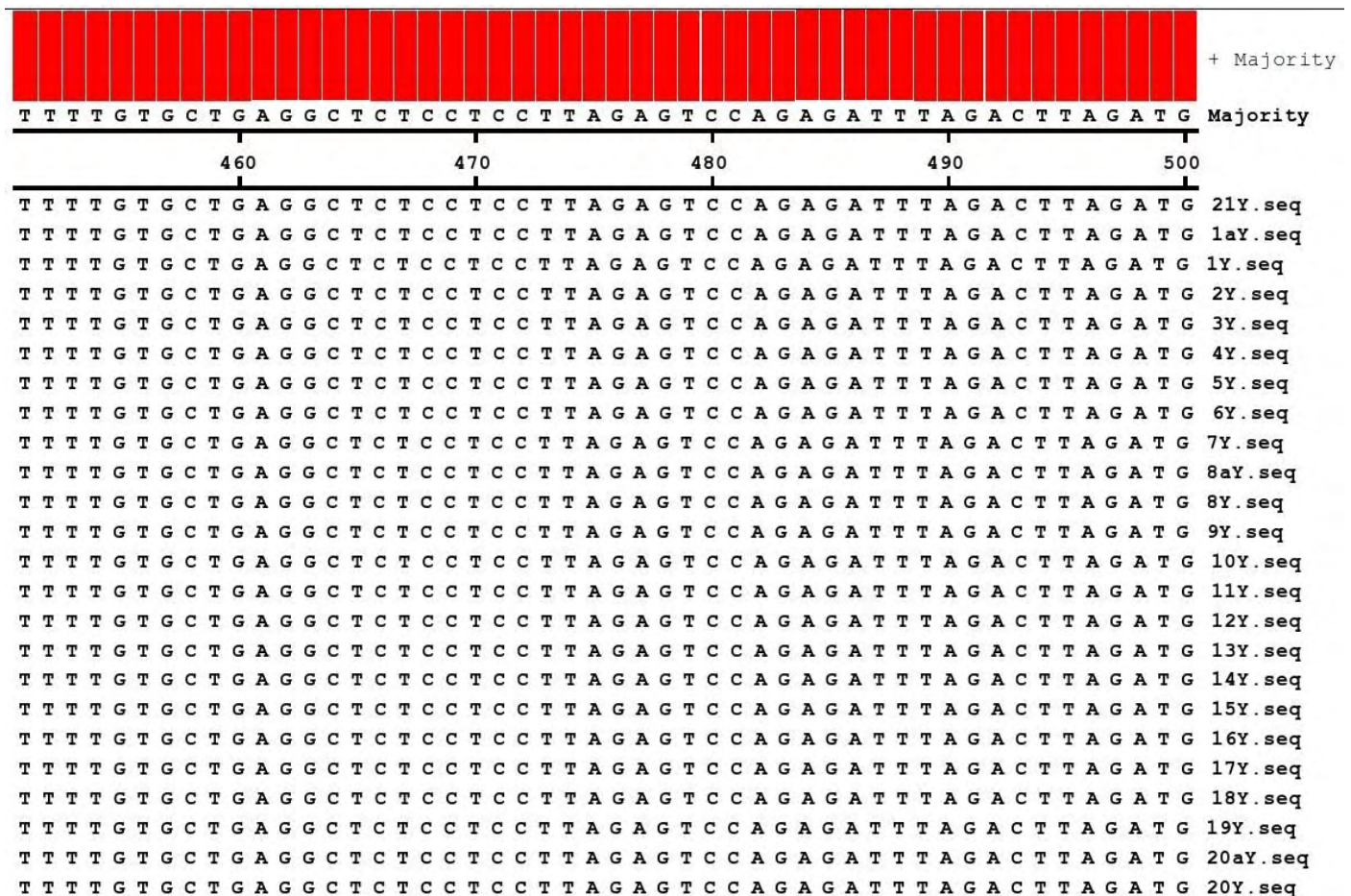
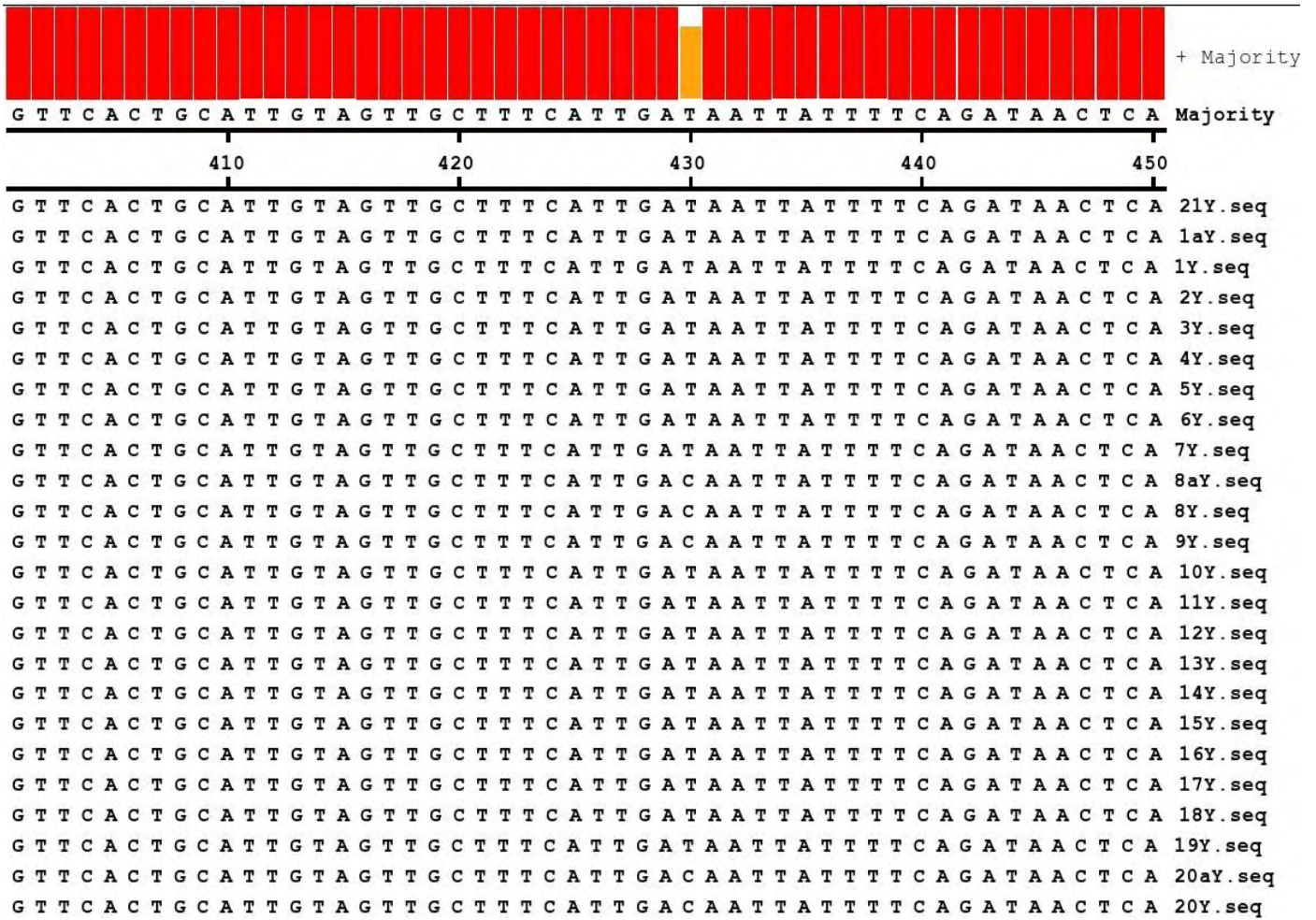
846 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T C C T T 21X.seq
 827 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T C C T T 1X.seq
 828 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T W Y C Y T K 2X.seq
 828 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T W Y C Y T K 3X.seq
 859 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A Y C G T K 4X.seq
 859 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T C C T T 5X.seq
 858 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T T C N A T C 6X.seq
 849 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T C C T T 7X.seq
 843 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T C C T T 8aX.seq
 859 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T W Y C Y T K 8X.seq
 849 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T C C T T 9X.seq
 858 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T W Y C C T T 10X.seq
 847 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G K W T C C T T 11X.seq
 846 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T C C T T 12X.seq
 863 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T C C T T 13X.seq
 861 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T C C T T 14X.seq
 857 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T Y C T T 15X.seq
 844 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T W Y C Y T K 16X.seq
 859 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T W T C C T T 17X.seq
 860 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T C C T T 18X.seq
 846 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T Y C T T 19X.seq
 860 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T W Y C C T K 20aX.seq
 846 C G G T T G A G A T C G C A A C C C C T T C G A A A C C C A T C G T A T C C T T 20X.seq

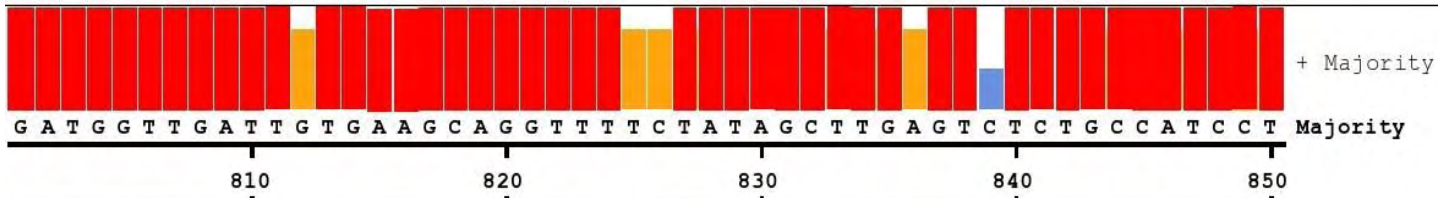


883 G T S G T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G - - T C N N N 21X.seq
 864 G - G G W C A A - G C G A G T G C C - - - C N N 1X.seq
 865 - T G G T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G - G T C A N N 2X.seq
 865 - T G G T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G - G T C N N N 3X.seq
 896 - T G G T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C C A C G - G T C A T - 4X.seq
 896 - T G G T M A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C C A C G - G T C A T N 5X.seq
 895 - - - T N N N A G N - - - - C N T - - - T G N C N A N C G A N N C N T N 6X.seq
 887 - T G G Y C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G T N N N N 7X.seq
 880 - K G G T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G - - G C N N N 8aX.seq
 896 - T G G T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G - G T C A T - 8X.seq
 886 - T G G T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G - G T C A T T 9X.seq
 895 - T G G T C R A M G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G - G T C A T - 10X.seq
 887 - T G G T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G - G T C A T N 11X.seq
 883 K K G - T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A C N N - N N N C C C 12X.seq
 900 - T G G T C A A R G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G - - - - - 13X.seq
 898 - K K S T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G - - T C N N N 14X.seq
 894 - T G K T C A A A G C G A G T G C C A 15X.seq
 881 - T G G W C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C N - G T A T T - 16X.seq
 896 - K K S T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C N - G T C N N N 17X.seq
 897 - T K G T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G - G C N N N C 18X.seq
 883 - T G G T C A A A G C G A N N N N N N N 19X.seq
 897 - T S G T C A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G T C N N N C C 20aX.seq
 883 - T G G T M A A A G C G A G T G C C A T G T C A T C A C C A A C G - C N N N C C 20X.seq



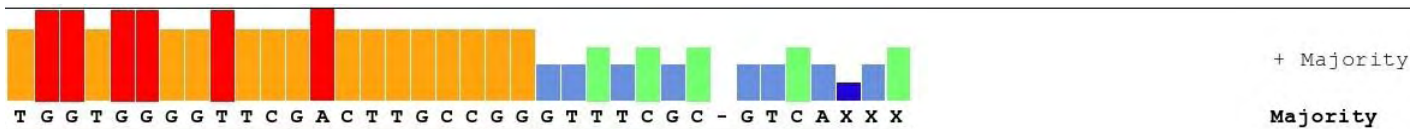






810 820 830 840 850

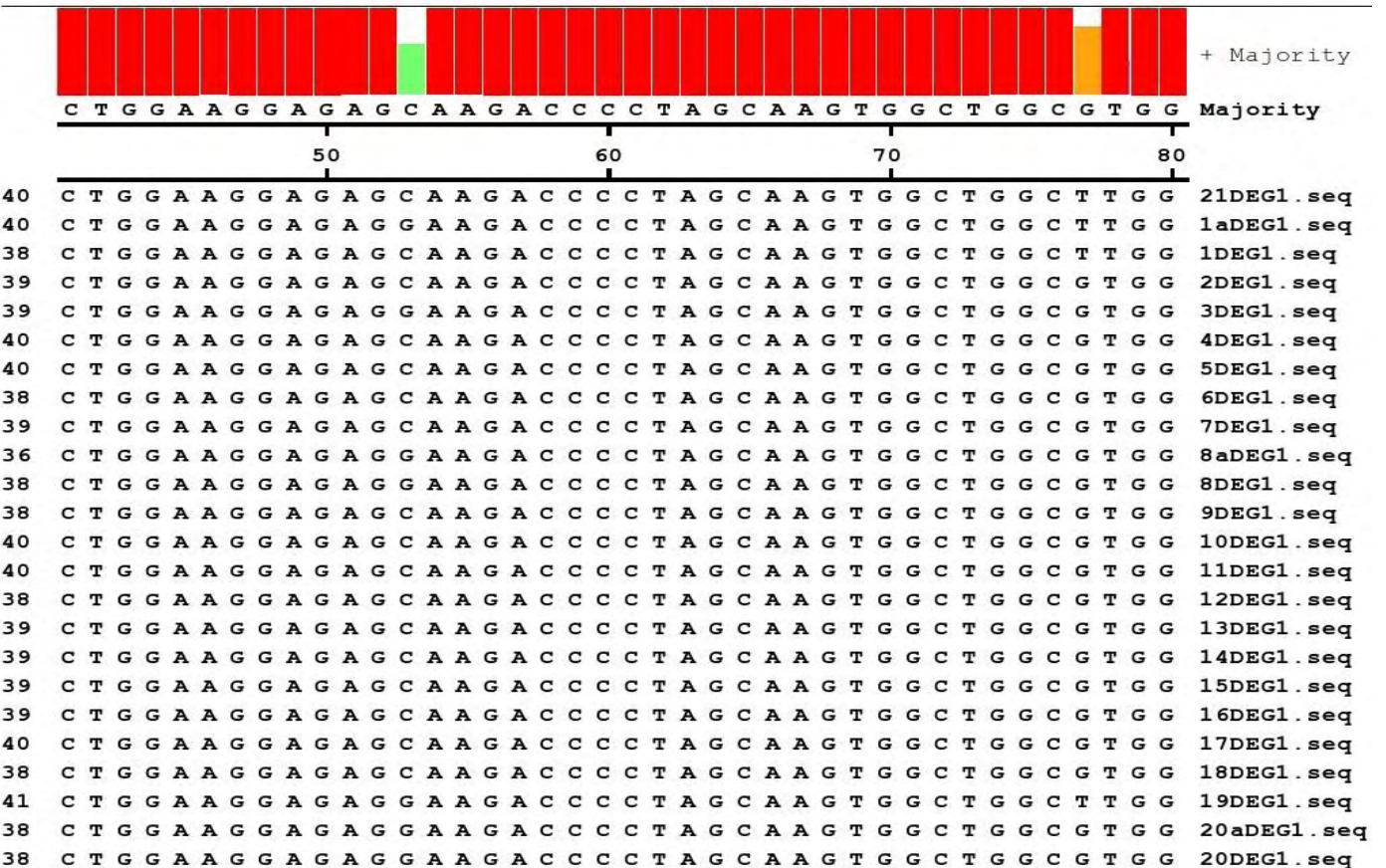
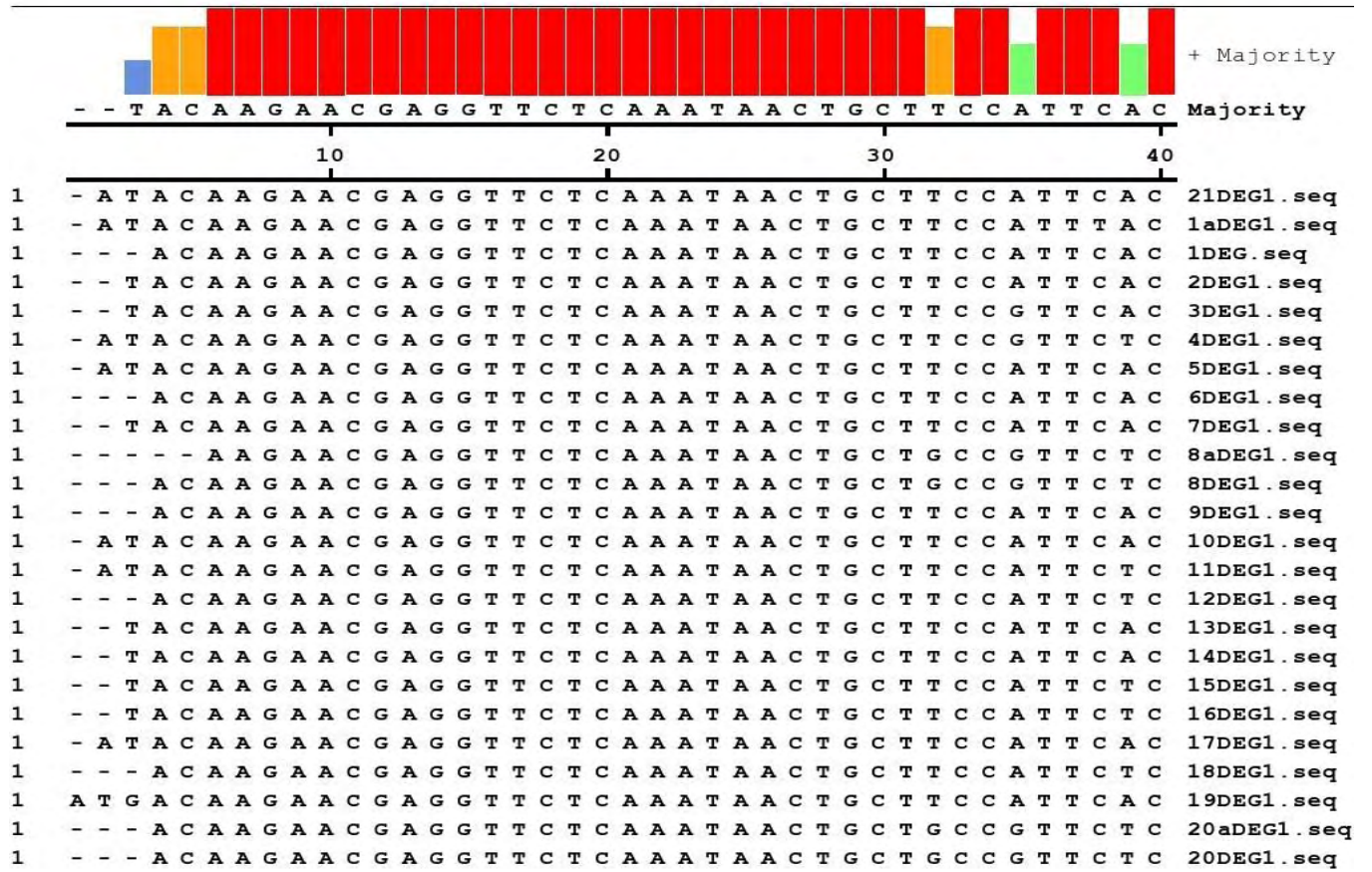
GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 21Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 1aY.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 1Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 2Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 3Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 4Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 5Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 6Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 7Y.seq
 GATGGTTGATTATGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 8aY.seq
 GATGGTTGATTATGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 8Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 9Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 10Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 11Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 12Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 13Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 14Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 15Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 16Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTCCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 17Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 18Y.seq
 GATGGTTGATTGTGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 19Y.seq
 GATGGTTGATTATGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 20aY.seq
 GATGGTTGATTATGAAGCAGGTTTTCTATAGCTTGGGTCTCTGCCATCCT 20Y.seq

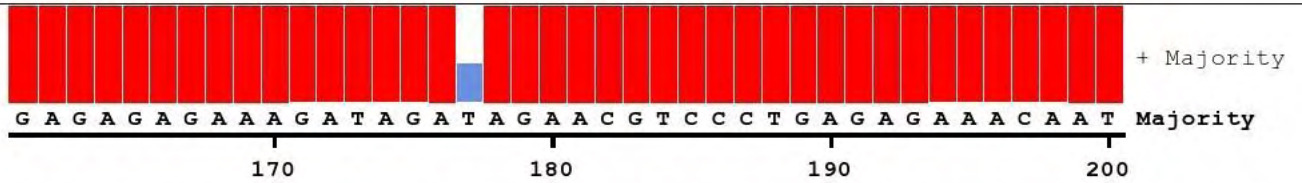


860 870 880

TGGGGGGGTTTCNACTNNGCCGGNTNCN - - - CNTCA 21Y.seq
 TGGGGGGGTTTCNCAATTGCCGGNTTCCNNNN 1aY.seq
 NGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGTTTCGC - - - GNNN 1Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGTTTCNC - GTCA 2Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGTTTCGC - GTN 3Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGTTTC - - CCGTCAAN 4Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGTTTC - - CCGTCAANN 5Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGTTNCNN - - CNNNN 6Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGNTNCCC - NTNAN 7Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCNGGTTTCGC - GTCA 8aY.seq
 TGGTGGGNT - CNACTTGCC - - GNNTNNNCCGTCA 8Y.seq
 TGGNGGNGTNNGACNTGGCCGGGNNNNNCN - TCA - - A 9Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGGTTTCGC CGTCA 10Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGTTTCGC - GTCA 11Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCNGN - TNCGC - - - GTCA 12Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGN - TTCGC - GTCA 13Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGTTTCGC - GTCA 14Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGN 15Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGNTTCGC - GTCA 16Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGG - TTCGC - GTCA 17Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGG - TTCGC - GTCA 18Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGTTN - - - CGCCGTCA 19Y.seq
 TGGTGGGGTTCGACTTGCCGGGNTCN - - - - CGTCA 20aY.seq
 TGGTGGGGTTCNACTTNNCGNNNCNCG - - - - - TCA 20Y.seq

Αλληλουχία Εκκινητή DEG1 (204bp)



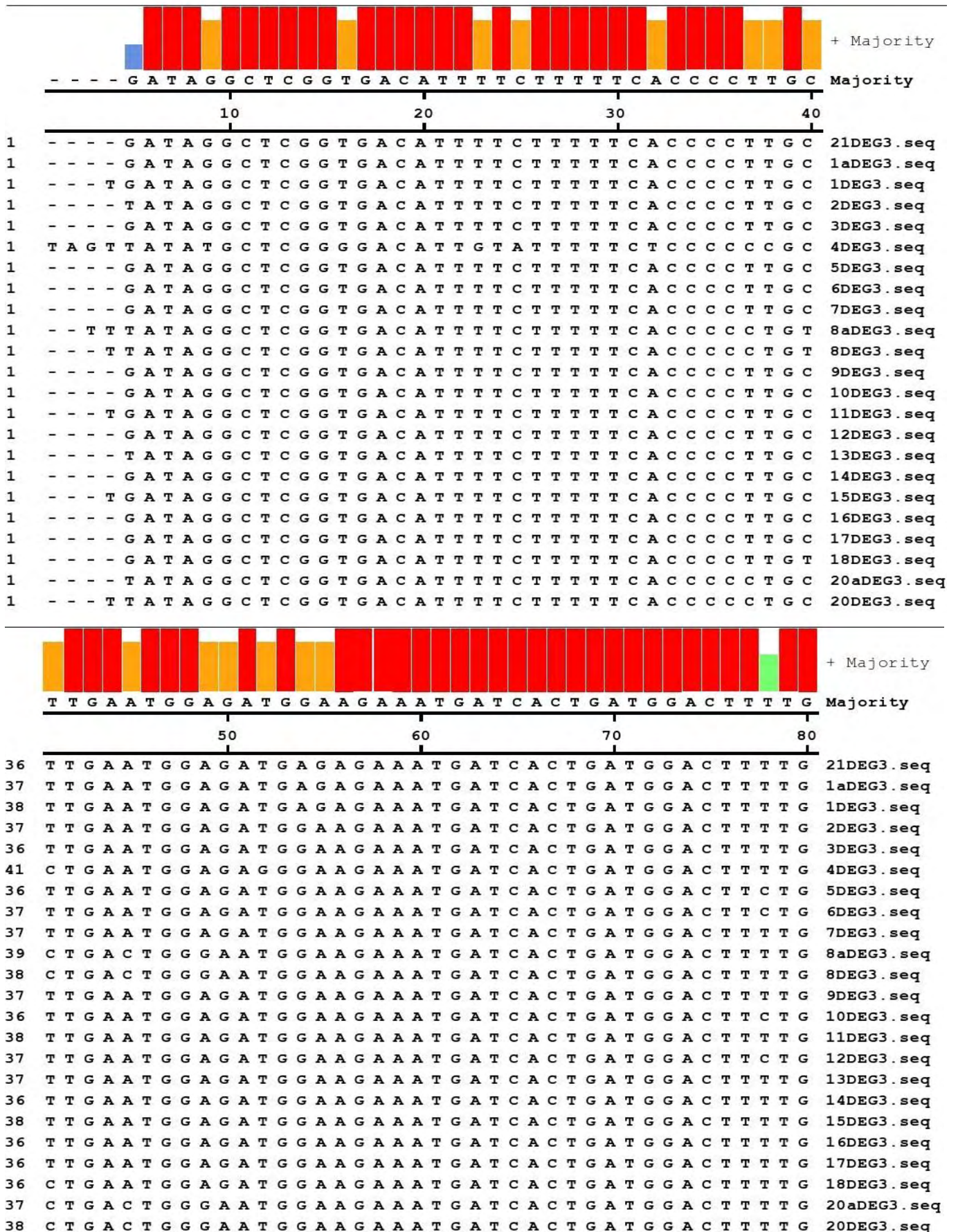


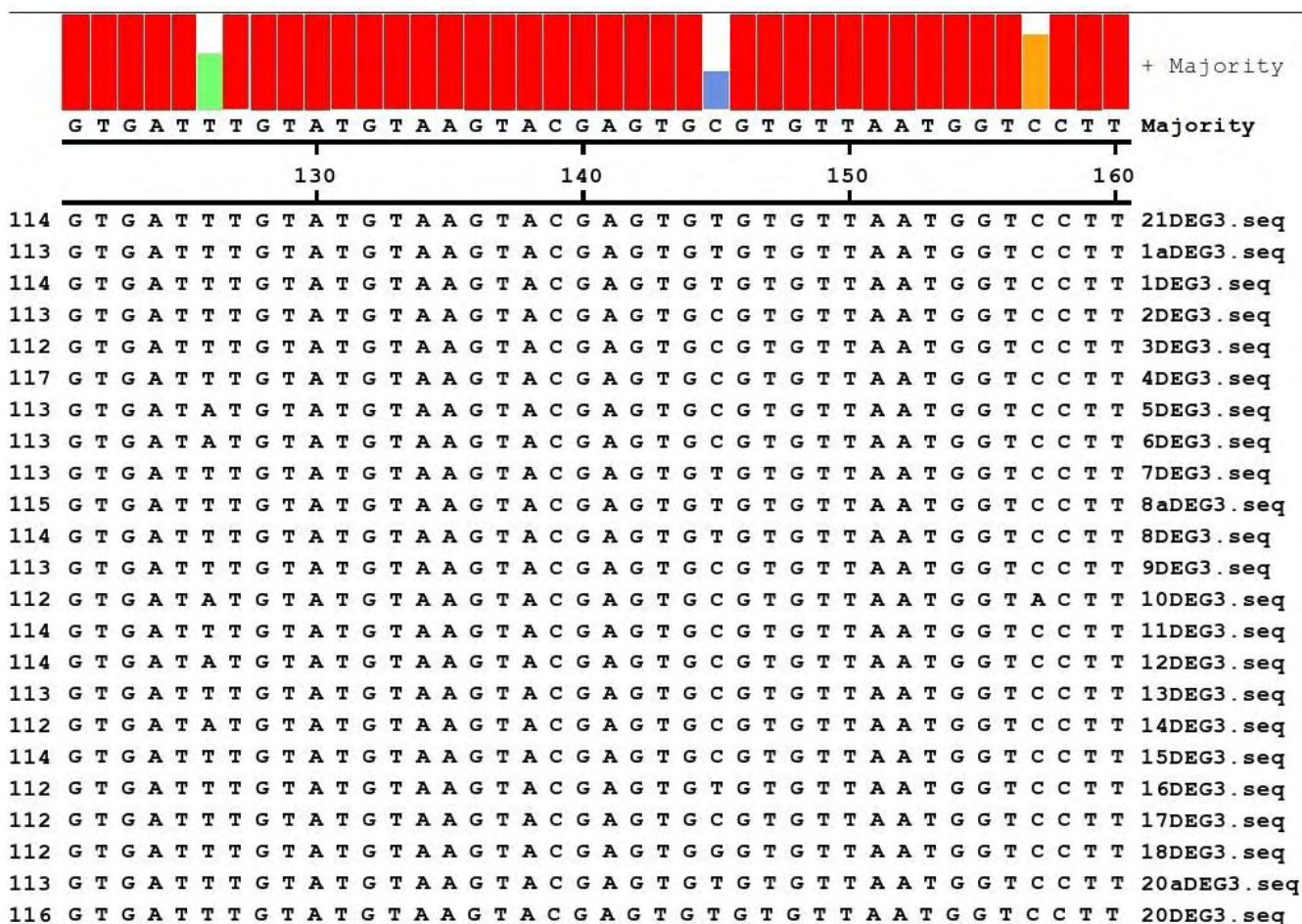
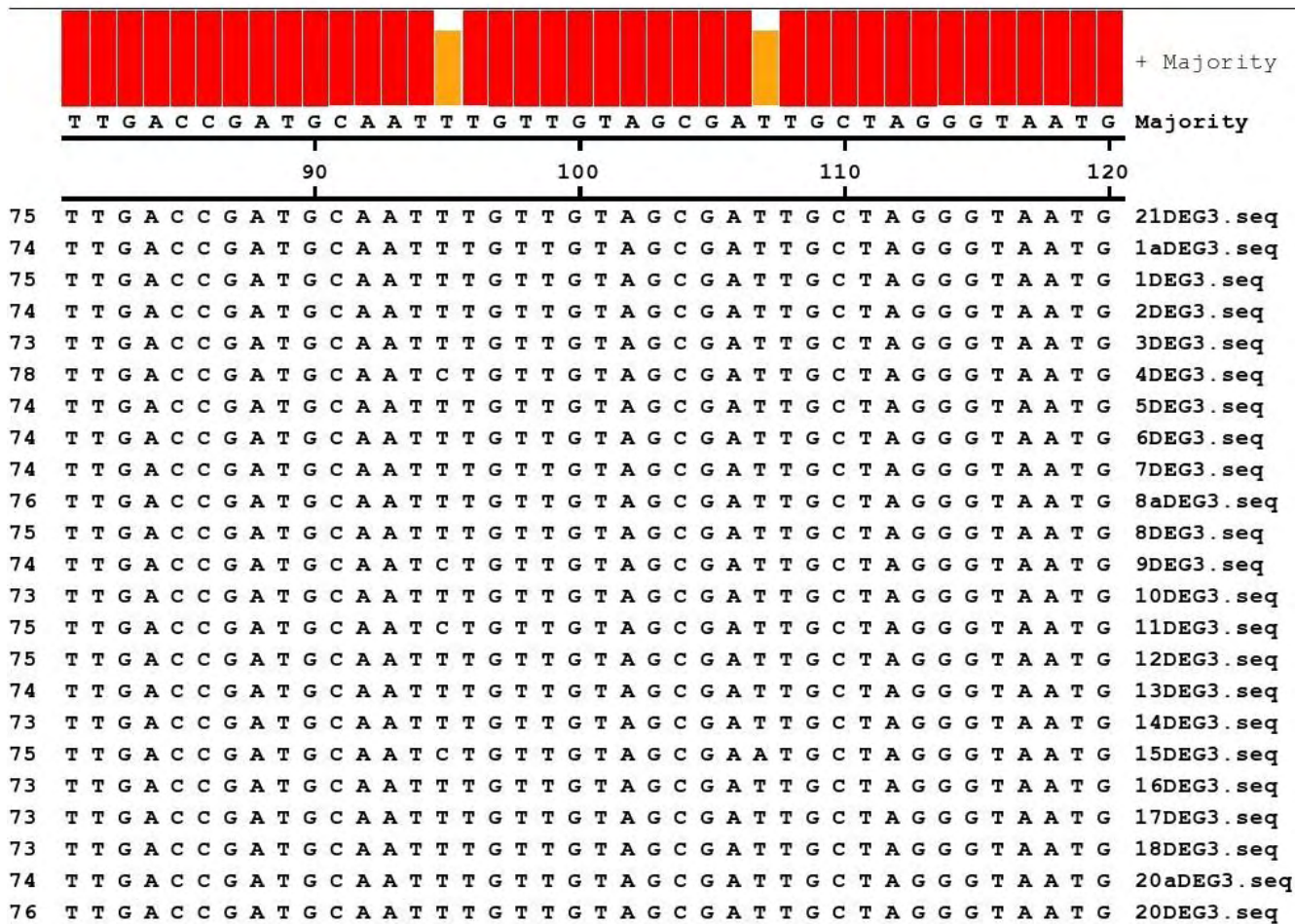
158 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 21DEGl.seq
 158 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 1aDEGl.seq
 156 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 1DEGl.seq
 158 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 2DEGl.seq
 157 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 3DEGl.seq
 158 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 4DEGl.seq
 160 GAGAGAGAGAAAGATAGACAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 5DEGl.seq
 156 GAGAGAGAGAAAGATAGACAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 6DEGl.seq
 159 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 7DEGl.seq
 156 GAGAGAGAGAAAGATAGACAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 8aDEGl.seq
 157 GAGAGAGAGAAAGATAGACAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 8DEGl.seq
 158 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 9DEGl.seq
 159 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 10DEGl.seq
 158 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 11DEGl.seq
 157 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 12DEGl.seq
 157 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 13DEGl.seq
 159 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 14DEGl.seq
 157 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 15DEGl.seq
 158 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 16DEGl.seq
 159 GAGAGAGAGAAAGATAGATAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 17DEGl.seq
 156 GAGAGAGAGAAAGATAGACAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 18DEGl.seq
 159 GAGAGAGAGAAAGATAGACAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 19DEGl.seq
 156 GAGAGAGAGAAAGATAGACAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 20aDEGl.seq
 158 GAGAGAGAGAAAGATAGACAGAAACGTCCCTGAGAGAGAAACAAT 20DEGl.seq

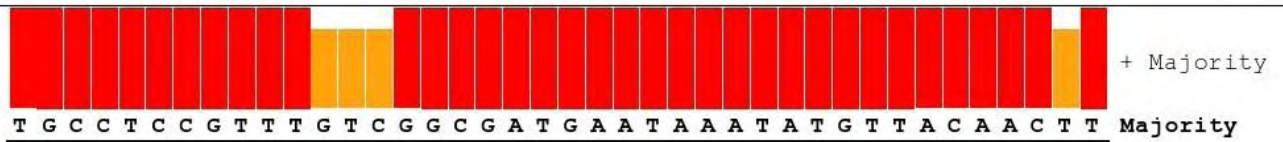


198 CAATT - GTAATAAG 21D1c.seq
 198 CAATT - GTAATAAT 1aD1c.seq
 196 CAATT - GTAATAAT 1Dc.seq
 198 CAATT - GTAATAAT 2D1c.seq
 197 CAATT T GTAATAAT 3D1c.seq
 197 CAATT - GTAATA 4D1c.seq
 200 CAATT - GTAATA 5D1c.seq
 194 CAATT - GTAATAA 6D1c.seq
 199 CAATT - GTAATAAG 7D1c.seq
 196 CAATT - GTAATA 8aD1c.seq
 197 CAATT - GTAATA 8D1c.seq
 198 CAATT - GTAATAAGT 9D1c.seq
 199 CAATT - GTAATAAT 10D1c.seq
 197 CAATT - GTAATAAT 11D1c.seq
 197 CAATT - GTAATAAG 12D1c.seq
 196 CAATT - GTAATAAT 13D1c.seq
 199 CAATT - GTAATAAT 14D1c.seq
 197 CAATT - GTAATA 15D1c.seq
 198 CAATT - GTAATAAT 16D1c.seq
 199 CAATT - GTAATAAT 17D1c.seq
 196 CAATT - GTAATAAG 18D1c.seq
 199 CAATT - GTAATAAG 19D1c.seq
 196 CAATT - GTAATA 20aD1c.seq
 198 CAATT - GTAATA 20D1c.seq

Αλληλουχία Εκκινητή DEG3 (200bp)







170 180 190 200

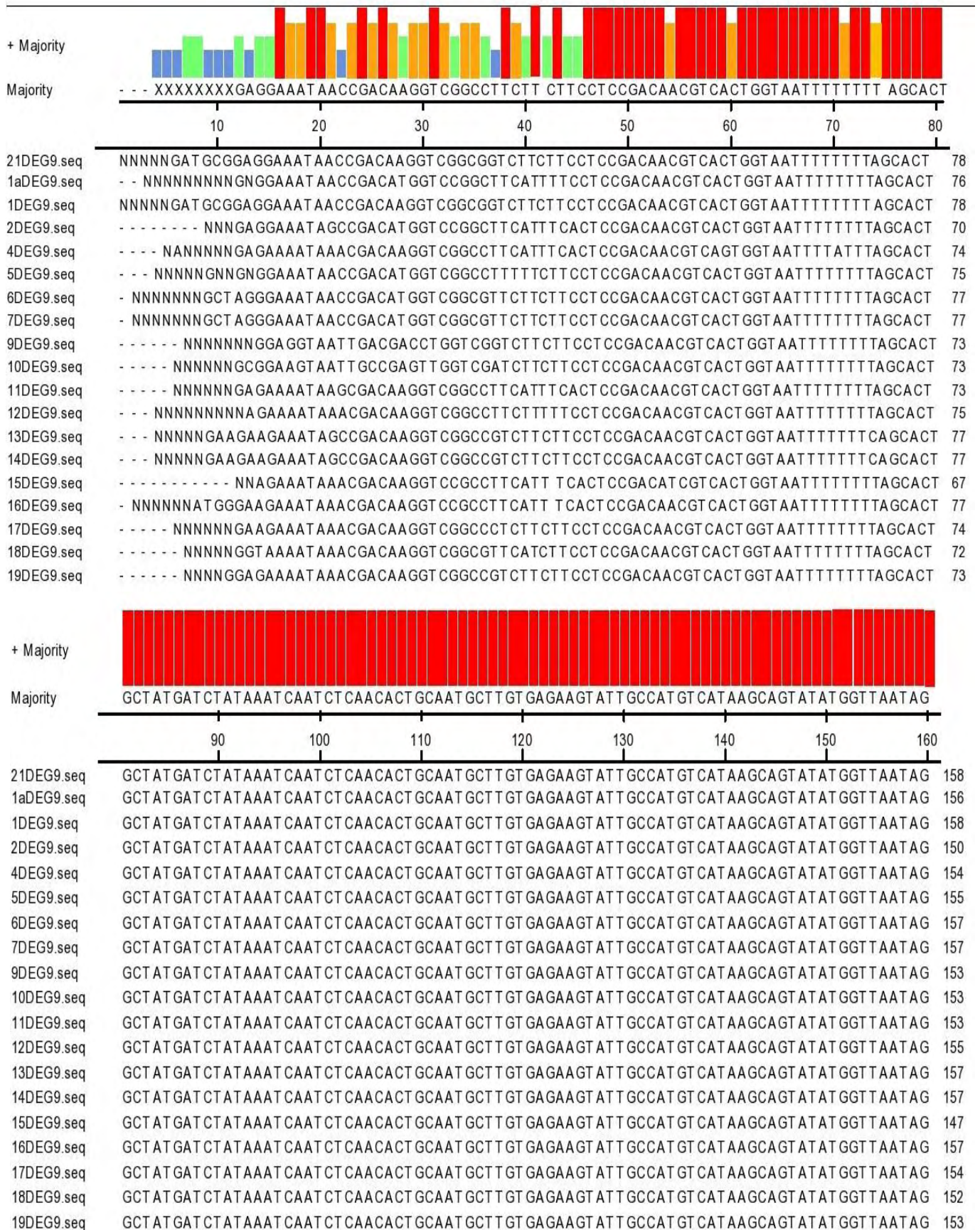
152	T G C C T C C G T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	21DEG3.seq
151	T G C C T C C G T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	1aDEG3.seq
152	T G C C T C C G T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	1DEG3.seq
151	T G C C T C C G T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	2DEG3.seq
150	T G C C T C C G T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	3DEG3.seq
155	T G C C T C C G T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	4DEG3.seq
151	T G C C T C C G T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	5DEG3.seq
152	T G C C T C C G T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	6DEG3.seq
151	T G C C T C C G T T T G T T G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	7DEG3.seq
153	T G C C T C C G T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	8aDEG3.seq
152	T G C C T C C G T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	8DEG3.seq
151	T G C C T C C G T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	9DEG3.seq
150	T G C C T C C G T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	10DEG3.seq
152	T G C C T C C G T T T T G C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	11DEG3.seq
152	T G C C T C C G T T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	12DEG3.seq
151	T G C C T C C G T T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	13DEG3.seq
150	T G C C T C C G T T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	14DEG3.seq
152	T G C C T C C G T T T T G C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C C T	15DEG3.seq
150	T G C C T C C G T T T T G T T G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	16DEG3.seq
149	T G C C T C C G T T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	17DEG3.seq
150	T G C C T C C G T T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	18DEG3.seq
151	T G C C T C C G T T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	20aDEG3.seq
155	T G C C T C C G T T T T G T C G G C G A T G A A T A A A T A T G T T A C A A C T T	20DEG3.seq

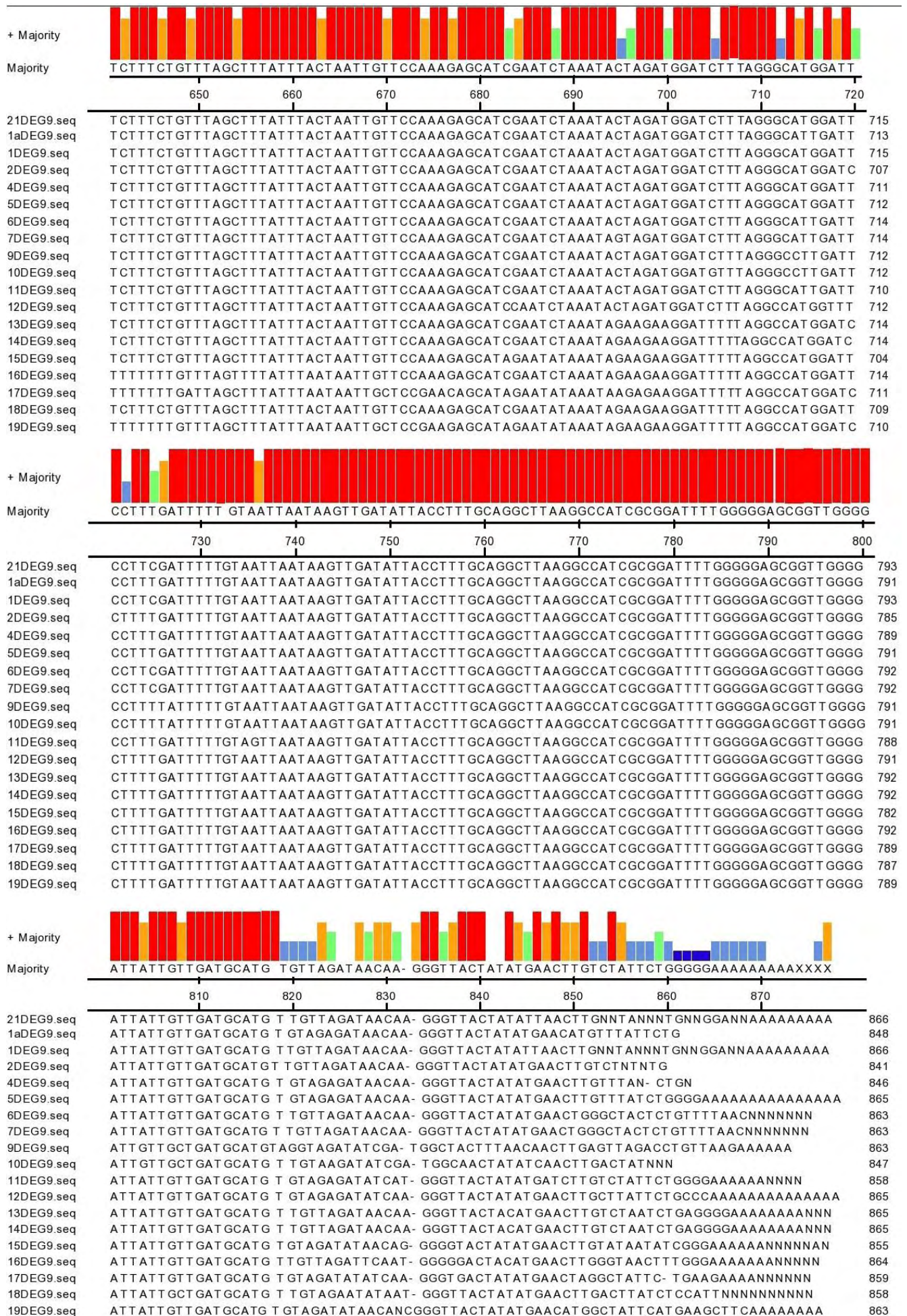


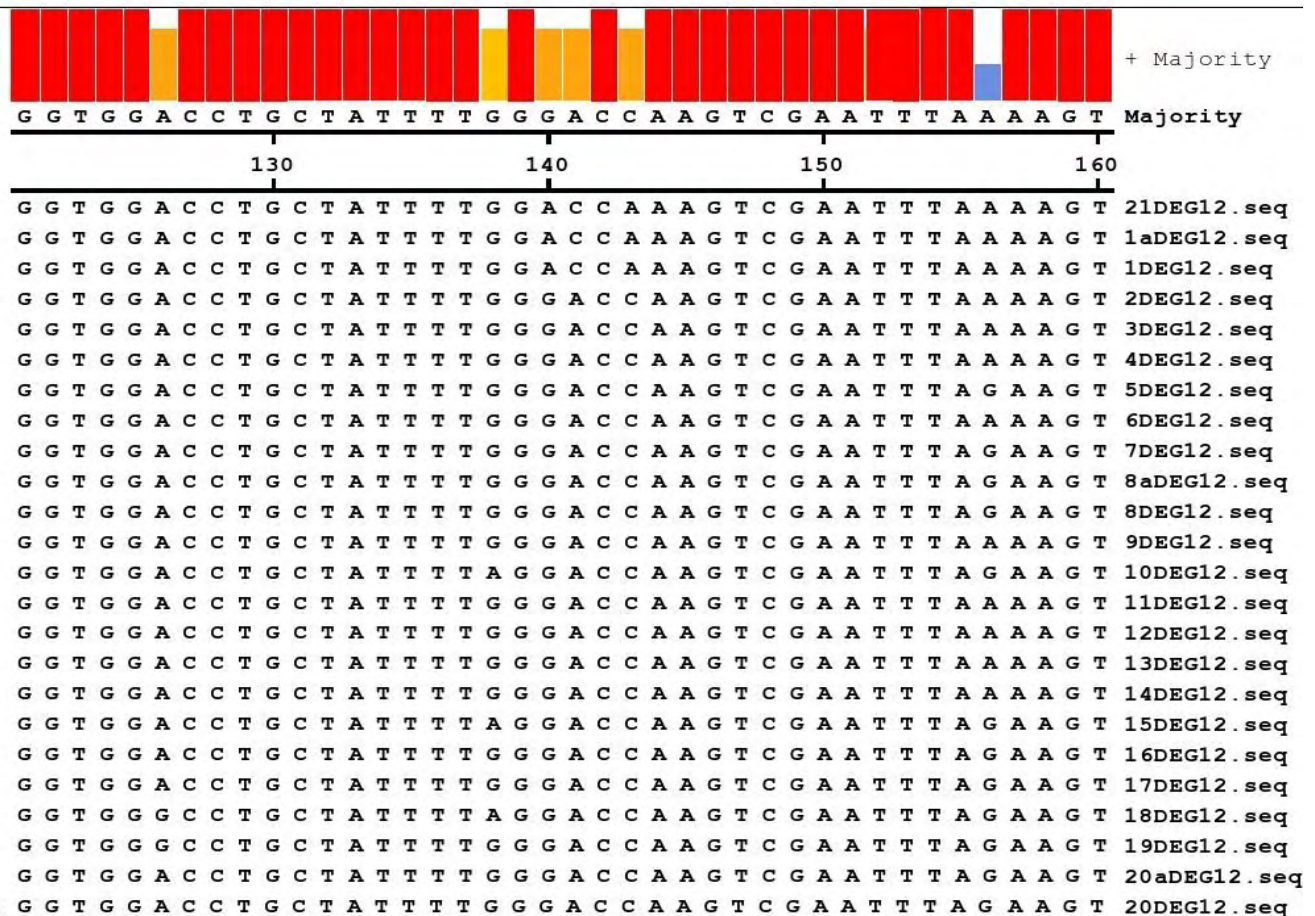
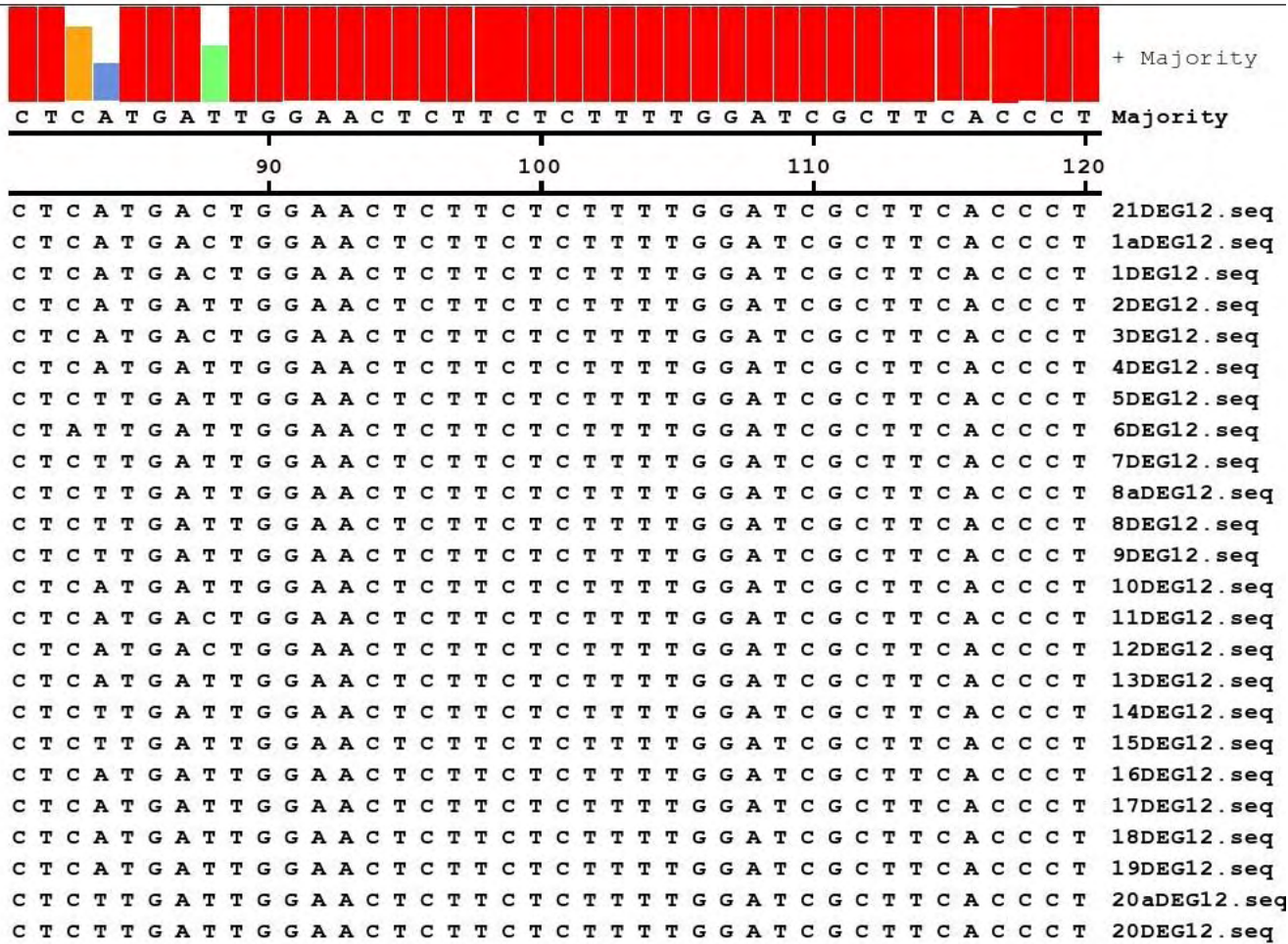
210

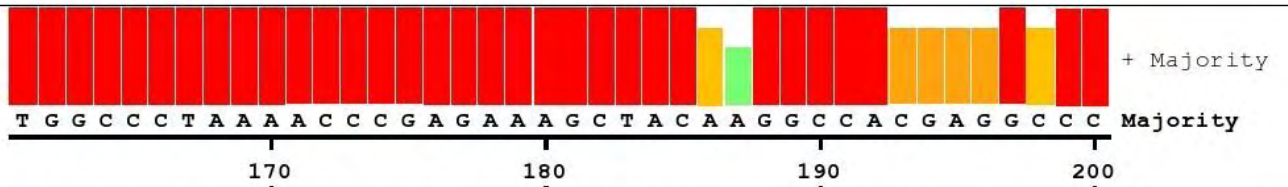
191	T C G T G G G T T T C T	21DEG3.seq
190	T C G T G G G T T T C T	1aDEG3.seq
191	T C G T G G G T T T C T	1DEG3.seq
190	T C G T G G G T T T C T	2DEG3.seq
189	T C G T G G G T T T	3DEG3.seq
194	T C G T G G G T T T C	4DEG3.seq
190	T C G T G G G T T T C T	5DEG3.seq
191	T C G T G G G T T T C T A	6DEG3.seq
190	T C G T G G G T T T C A	7DEG3.seq
192	T C G T G G G T T T C T A	8aDEG3.seq
191	T C G T G G G T T T	8DEG3.seq
190	T C G T G G G T T T C T C A	9DEG3.seq
189	T C G T G G G T T T C	10DEG3.seq
191	T C G T G G G T T T C	11DEG3.seq
191	T C G T G G G T T T C T A	12DEG3.seq
190	T C G T G G G T T T C T	13DEG3.seq
189	T C G T G G G T T T C T	14DEG3.seq
190	T C G T G G G T T T C C	15DEG3.seq
189	T C G T G G G T T T C T	16DEG3.seq
188	T C G T G G G T T T C A	17DEG3.seq
190	T C G T G G G T T T C T	18DEG3.seq
190	T C G T G G G T T T C T A	20aDEG3.seq
194	T C G T G G G T T T C T A	20DEG3.seq

Αλληλουχία Εκκινητή DEG9 (ζώνη 839bp)









104 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAAAGGCCACGAGGCC 21DEG12.seq
 123 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAAAGGCCACGAGGCC 1aDEG12.seq
 123 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAAAGGCCACGAGGCC 1DEG12.seq
 123 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACGAGGCCACGAGGCC 2DEG12.seq
 125 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAAAGGCCACGAGGCC 3DEG12.seq
 125 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAAAGGCCACGAAAGGCC 4DEG12.seq
 123 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAGGGGCCACGAGGCC 5DEG12.seq
 125 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAAAGGCCACGAGGCC 6DEG12.seq
 124 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAAAGGCCACGAGGCC 7DEG12.seq
 120 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACGAGGCCAGCGAGGCC 8aDEG12.seq
 121 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACGAGGCCAGCGAGGCC 8DEG12.seq
 124 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAAAGGCCACGAGGCC 9DEG12.seq
 127 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAGGGGCCACGAGGCC 10DEG12.seq
 122 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACGAGGCCACGAGGCC 11DEG12.seq
 126 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAGGGGCCACGAGGCC 12DEG12.seq
 124 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAGGGGCCACGAGGCC 13DEG12.seq
 123 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAGGGGCCACGAGGCC 14DEG12.seq
 124 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAAAGGCCACGAGGCC 15DEG12.seq
 125 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAGGGGCCAGCAGGCC 16DEG12.seq
 125 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACGAGGCCACGAGGCC 17DEG12.seq
 129 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAAAGGCCACGAGGCC 18DEG12.seq
 131 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACAAAGGCCACGAGGCC 19DEG12.seq
 136 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACGAGGCCAGCGAGGCC 20aDEG12.seq
 150 TGGCCCTAAAACCCGAGAAAGCTACGAGGCCAGCGAGGCC 20DEG12.seq



143 ACGTTGCTGAGCGAAGAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 21DEG12.seq
 159 ACGTTGCTGAGCGAAGAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 1aDEG12.seq
 160 ACGTTGCTGAGCGAAGAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 1DEG12.seq
 160 ACGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 2DEG12.seq
 162 ACGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 3DEG12.seq
 161 ATGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 4DEG12.seq
 159 ATGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 5DEG12.seq
 161 ATGTTGCTGAGCGAAGAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 6DEG12.seq
 160 ACGTTGGTGAAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 7DEG12.seq
 157 ATGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 8aDEG12.seq
 159 ATGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 8DEG12.seq
 160 ACGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 9DEG12.seq
 163 ACGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 10DEG12.seq
 158 ACGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 11DEG12.seq
 163 ATGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 12DEG12.seq
 160 ACGTTGGTGAAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 13DEG12.seq
 159 ACGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 14DEG12.seq
 160 ATGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 15DEG12.seq
 161 ATGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 16DEG12.seq
 161 ACGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 17DEG12.seq
 165 ACGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 18DEG12.seq
 167 ACGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 19DEG12.seq
 173 ATGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 20aDEG12.seq
 187 ATGTTGCTGAGCGAGTAATGGTAACAATGTCGAAGCGCGTG 20DEG12.seq

Αλληλουχία Εκκινητή DEG13 (390bp)

