

ΤΕΙ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΕΓΧΩΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΚΑΙ
ΥΒΡΙΔΙΩΝ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΩΝ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΩΝ ΚΑΙ DNA ΔΕΙΚΤΩΝ



ΚΑΡΑΣΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΑΠΑΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΣ Β. ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

*Η πτυχιακή αυτή εργασία είναι αφιερωμένη
στον πολυαγαπημένο μου πατέρα...*

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	- 4 -
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ	- 5 -
Η ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΩΝ ΦΥΤΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΝΤΟΠΙΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ .	- 19 -
a) Διατήρηση Ex situ	- 20 -
b) Διατήρηση In situ / On farm ή αλλιώς στον αγρό	- 21 -
Συνοπτικά, η διατήρηση στον αγρό:	- 21 -
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ.....	- 22 -
ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ	- 23 -
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	- 24 -
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	- 24 -
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	- 24 -
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	- 29 -
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 30 -
ΔΙΞΑΓΩΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟ	- 30 -
ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΦΥΤΩΝ	- 31 -
ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΛΙΠΑΝΣΗ	- 31 -
ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ	- 32 -
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	- 35 -
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	- 36 -
ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	- 37 -
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	- 37 -
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 43 -
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	- 43 -
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	-52-
ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ.....	- 54 -
ΕΙΚΟΝΕΣ.....	- 54 -

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε από την Βασιλική Καρασούλου. Η εργασία αναφέρεται στη γενετική και μορφολογική μελέτη εγχώριων και εμπορικών ποικιλιών και υβριδίων μελιτζάνας. Η συγκεκριμένη μελέτη έγινε με σκοπό να μελετηθούν οι συγκεκριμένες ποικιλίες και υβρίδια προκειμένου να συγκριθούν ως προς διάφορα χαρακτηριστικά τους καθώς και να αναδειχθούν μορφολογικοί και γενετικοί δείκτες με πιθανή χρήση σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης. Χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι εξαγωγής DNA από σπόρους μελιτζάνας, ενίσχυσης συγκεκριμένων γενετικών δεικτών με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (PCR), ενώ για τη συγκριτική μελέτη εγχώριων και εισαγομένων ποικιλιών και υβριδίων μελιτζάνας έγινε χρήση μορφολογικών χαρακτήρων οι οποίοι επιλέχθηκαν και κωδικοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες που προτείνονται από το διεθνές δίκτυο *EGGNET* (*eggplant genetic resources network*).

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή, του Τμήματος Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας κ. Βασίλη Παπασωτηρόπουλο επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας για τη διδασκαλία της επιστήμης της γενετικής των φυτών, για την ανάθεση αυτού του θέματος, για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπο μου, και για τις χρήσιμες υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο. Αντώνη Αυγουστίνο συνεργάτη του εργαστηρίου για τις εύστοχες υποδείξεις του, για την πολύ καλή συνεργασία και την βοήθεια του. Ακόμη την κα Έλενα Χατζηευστρατίου για τις σημαντικές υποδείξεις της στο θερμοκήπιο και την πολύτιμη βοήθεια της τόσο για τις εργασίες του θερμοκηπίου όσο και του εργαστηρίου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ενθάρρυνση και τη συμπαράστατη τους καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος και την συγγραφή της εργασίας μου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελιτζάνα ανήκει στην οικογένεια των Σολανωδών (*Solanaceae*) και στο γένος *Solanum*, με κυριότερο καλλιεργούμενο είδος το *Solanum melongena*. Εμφανίστηκε στις νότιες περιοχές της Ινδίας τη 2η χιλιετία π.Χ. Οι Ινδοί την χρησιμοποιούσαν τότε στη διατροφή τους χωρίς όμως να τη καλλιεργούν συστηματικά. Η πρώτη συστηματική της καλλιέργεια ξεκίνησε στην Κίνα πέντε αιώνες π.Χ. Πέρασε αρκετός καιρός μέχρι να έρθει η μελιτζάνα στην Ευρώπη και πιο συγκεκριμένα στην Ιταλία. Αυτό έγινε το 14ο αιώνα μ.Χ. όπου ξεκίνησε η καλλιέργεια της στη Γηραιά Ήπειρο για διακοσμητικούς μόνο σκοπούς και όχι για τροφή λόγω της πικρής της γεύσης που απέτρεπε τους Ευρωπαίους να την εντάξουν στο διαιτολόγιό τους.

Περίπου τον 18ο αιώνα άρχισε η μελιτζάνα να χρησιμοποιείται στην Ευρώπη στη διατροφή και από τότε έγινε ένα από τα πιο αγαπημένα καλοκαιρινά λαχανικά. Στη διάδοση της συνέβαλε τα μέγιστα η δημιουργία ποικιλιών που ο καρπός τους δεν είναι τόσο πικρός όσο αυτός του μακρινού προγόνου τους. Η παραδοσιακή ιατρική της προσδίδει αρκετές ιδιότητες. Έχει αντιοξειδωτική δράση και προστατεύει την καρδιά. Έχει διουρητική δράση, διεγείρει τη λειτουργία του εντέρου, του ήπατος και των νεφρών. Βοηθάει στη μείωση της χοληστερίνης στο αίμα. Με τα φύλλα της μπορούμε να κάνουμε καταπλάσματα για εγκαύματα και εξανθήματα.

Τέλος χρησιμοποιείται και στην κοσμετολογία για την παρασκευή κρεμών για μάσκες προσώπου (<http://en.wikipedia.org/wiki/Eggplant>).

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ

Στη διεθνή βιβλιογραφία η μελιτζάνα αναφέρεται κυρίως ως eggplant, aubergine ή brinjal. Ωστόσο, υπάρχει μία πληθώρα τοπικών ονομασιών που έχουν τις ρίζες τους στην αρχαιότητα. Η αγγλική λέξη eggplant οφείλεται στο ωοειδές σχήμα των καρπών μερικών παλαιότερων ινδικών ποικιλιών και χρονολογείται από την εποχή της Βρετανικής κατοχής της Ινδίας, όπου τα λευκά ωοειδές φρούτα ήταν πολύ δημοφιλή σε πολλές περιοχές, αν και στην Μεγάλη Βρετανία τώρα συνήθως αναφέρεται ως *aubergine*. Υπάρχουν και άλλες ευρωπαϊκές ονομασίες που σχετίζονται με την ομοιότητα των καρπών με αυγά όπως για παράδειγμα *Eierfruch* (γερμανικά) και *plante aux oeufs* (γαλλικά). Ένας μεγάλος αριθμός από άλλες ονομασίες προήλθαν από παραφράσεις από τα σανσκριτικά στα περσικά, τα αραβικά, τα τούρκικα και αργότερα σε διάφορες ευρωπαϊκές γλώσσες.

Σύμφωνα με τον *De Candolle* (1883) και μεταγενέστερους συγγραφείς οι λέξεις *vaatingan* (σανσκριτικά) και *babanjan* (ινδικά) είναι οι ρίζες των περσικών *baadangan* και *badenjan*, από τις οποίες προέρχονται και οι *bedengiam*, *baadanjaan* και *melongena*

(αραβικά), *patlidjan* (τουρκικά), *badhjan* (γεωργιανά), *tabendjalts* (βερβερικά), *berenjena* (ισπανικά), *beringela* (πορτογαλικά) και *aubergine* (γαλλικά).

Η πολυπλοκότητα της μελέτης της ονομασίας της μελιτζάνας επεξηγείται από τον *Arveiller* (1969) το οποίο αφιερώνει 20 σελίδες για μια συζήτηση μόνο των Γαλλικών ονομάτων. Η ονομασία *brinjal* που χρησιμοποιείται στην Ινδία, προέρχεται από την πορτογαλική λέξη *beringela* και τοποθετείται χρονολογικά στον 16^ο-17^ο αιώνα, όταν η Πορτογαλία έλεγχε το εμπόριο μεταξύ Ευρώπης και Ινδίας. Κατά την Αναγέννηση οι μελιτζάνες αναφερόταν με δυο κύριες ονομασίες: ως *mala insane* (τρελό μήλο), ονομασία από την οποία προέρχεται η ιταλική *melanzana* και η ελληνική *melitzana* και ως *poma amoris* (μήλο της αγάπης), ένα όνομα κοινό με την τομάτα κατά την διάρκεια του 16^ο αιώνα. (*Daunay & Janick 2007*).

ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η μελιτζάνα ανήκει στην Οικογένεια *Solanaceae*, φυλή *solanaeae*, υποοικογένεια *Solanoideae*, γένος *Solanum* και υπογένος *leptostemonum*.

Από τις τρεις βοτανικές ποικιλίες: *ovigerum Lam.* (καρπός σαρκώδης), *insanum L.* (καρπός μαύρος), και *S. Melongena var. esculentum* (καρπός μωβ ή λευκός), η τελευταία έχει ευρεία προσαρμοστικότητα με αποτέλεσμα να καλλιεργείται περισσότερο στην Ευρώπη. Οι προαναφερθείσες βοτανικές ποικιλίες διακρίνονται από τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- ***S. melongena var. esculentum Dum.*** Με άνθη 6-9μερή, μονήρη, σπανίως δίδυμα και καρπούς κυλινδρικούς επιμήκεις ή σφαιροειδείς, χρώματος ιώδους, λευκού ή κίτρινου.
- ***S. melongena var. insanum L.*** Με άνθη 5-6μερή, φερόμενα ανά 3, από τα οποία ένα γόνιμο και δύο στείρα, καρπός μελανός.
- ***S. melongena var. ovigerum L.*** Με άνθη μονήρη, περιάνθιο 3-6 μέρες και 5-9 στήμονες, καρπός αυγοειδής ή και επιμήκης, ιώδες, κόκκινος ή κίτρινος.

Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων του είδους είναι κανονικά $2n = 24$, υπάρχουν όμως και μορφές πολυπλοειδείς με 36 και 48 χρωμοσώματα.

ΒΟΤΑΝΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ

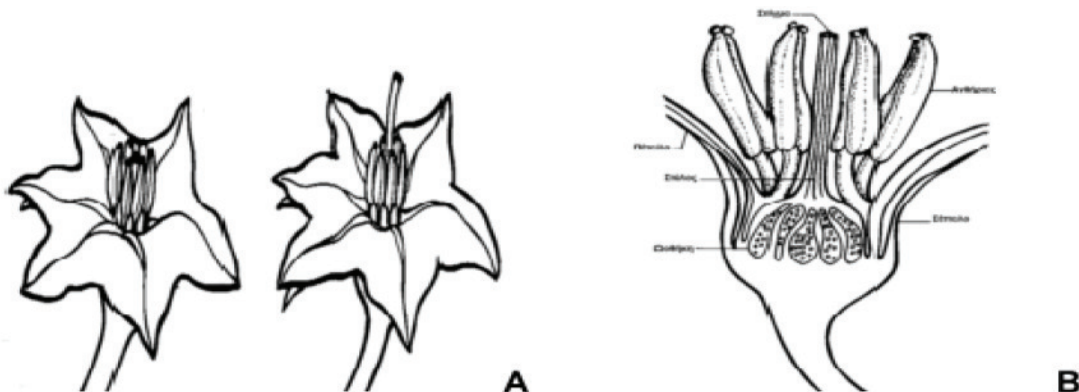
Φυτό ετήσιο ή πολυετές στις τροπικές ζώνες, με όρθια ανάπτυξη που φτάνει σε ύψος τα 60-120 cm. Σχηματίζει έναν κεντρικό βλαστό, ο οποίος με την πάροδο του χρόνου ξυλοποιείται, και πολλούς πλευρικούς βλαστούς από τις βάσεις των φύλλων. Σε αντίθεση με την πιπεριά έχει βλαστανούσα κορυφή.

Ριζικό σύστημα: είναι πασσαλώδες και αναπτύσσεται κυρίως στο βάθος των 60-100 εκ., ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει ακόμη και σε βάθος 120 εκ. Έχει κεντρική ρίζα που αντικαθίσταται από πολλές πλευρικές, αν απολεσθεί κατά τη διάρκεια της μεταφύτευσης.

Βλαστός: στην αρχή είναι ποώδης και στην συνέχεια όταν σταματήσει η ανάπτυξη των φυτών γίνεται ξυλώδης, αλλά είναι εύθραυστος και γι' αυτό χρειάζεται κάποια στήριξη για να αποφευχθούν σπασίματα από το βάρος των καρπών. Φέρει αρκετές πλευρικές δευτερεύουσες διακλαδώσεις, οι οποίες σε καλλιέργεια θερμοκηπίου συνήθως αφαιρούνται και διατηρούνται οι 2-3 αρχικοί κεντρικοί βλαστοί.

Φύλλα: είναι απλά, εναλλασσόμενα και στις περισσότερες ποικιλίες καλύπτονται από πυκνά τριχίδια. Είναι μεγάλα σε μέγεθος και μπορούν να φτάσουν τα 23 εκ. μήκος. Το σχήμα τους είναι ελλειψοειδές και συνήθως έλλοβο, ενώ πάνω στις νευρώσεις τους αναπτύσσονται συχνά αγκάθια.

Άνθη: τα άνθη εμφανίζονται μονήρη ή σε ταξιανθίες, 2-3 μαζί πάνω στους βλαστούς. Στις πρώιμες ποικιλίες τα άνθη εμφανίζονται με την εμφάνιση του έκτου πραγματικού φύλλου, ενώ στις πολύ όψιμες μετά το 14^ο πραγματικό φύλλο. Τα άνθη αυτογονιμοποιούνται και σε πολύ μικρό ποσοστό σταυρογονιμοποιούνται με έντομα. Η στροφή του άνθους προς τα κάτω διευκολύνει την αυτογονιμοποίηση. Η ωρίμανση των ανθών γίνεται ταυτόχρονα με την ωρίμανση του στίγματος κατά το άνοιγμα του άνθους. Το άνθος παραμένει ανοικτό για 2-3 ημέρες. Όταν γίνει γονιμοποίηση, η στεφάνη και οι στήμονες μαραίνονται. Τα άνθη μπορεί να αναπτυχθούν σε καρπούς και παρθενοκαρπικά, χωρίς γονιμοποίηση. Η μελιτζάνα είναι φυτό ουδέτερο στον φωτοπεριοδισμό, που σημαίνει ότι ανεξάρτητα από εποχές δεν συναντά δυσκολίες στην παραγωγή ανθέων, ούτε και επομένως τους χειμερινούς μήνες που μας ενδιαφέρει ιδιαίτερα.



Εικόνα 1 A: Εξωτερικά και B : Εσωτερικά μέρη του άνθους

Στεφάνη: συμπέταλος, ιώδης με 5 ή περισσότερα πέταλα.

Κάλυκας: σαρκώδης, τριχωτός, ακανθώδης που αναπτύσσεται μαζί με τον καρπό και έχει 5 ή περισσότερα σέπαλα.

- Ο ποδίσκος είναι αρκετά ανεπτυγμένος, σαρκώδης, τριχωτός, ξυλώδης, που κατά την άνθιση γυρίζει προς τα κάτω (δηλ. τα άνθη βλέπουν προς τα κάτω).
- Οι στήμονες είναι ενωμένοι στη βάση τους με τα πέταλα, χωρίς να είναι ενωμένοι μεταξύ τους, και σχηματίζουν κώνο γύρω από τον ύπερο.
- Ο στύλος συνήθως είναι πιο μακρύτερος από τους στήμονες, αλλά μπορεί να είναι και μικρότερος. Η μορφολογία των ανθέων της μελιτζάνας επηρεάζεται από την έξωθεν εφαρμογή ρυθμιστών ανάπτυξης (*Nothman & Koller, 1973 b*).

Στη μελιτζάνα παρουσιάζεται έντονα το φαινόμενο της ετεροστυλίας. Ανάλογα με το μήκος του στύλου σε σχέση με τον κώνο των ανθών, τα άνθη της μελιτζάνας διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες:

(α) Μακρόστυλα άνθη: ο στύλος είναι αρκετά μακρύτερος (1,0-1,3 εκ.) και το στίγμα προεξέχει του κώνου των ανθών.

(β) Μεσαία-μακρόστυλα άνθη: ο στύλος είναι μακρύτερος (0,8-1,0 εκ.), αλλά ίσως σε μήκος με αυτό του κώνου των ανθών και επομένως το στίγμα δεν προεξέχει.

(γ) Πραγματικά κοντόστυλα άνθη: ο στύλος έχει μήκος 0,1-0,3 εκ. είναι δηλαδή πολύ μικρός και επίσης η ωοθήκη του άνθους αυτού είναι συνήθως μικρή.



Εικόνα 2: Άνθη μελιτζάνας

Καρπός: Ο καρπός της μελιτζάνας έχει σχήμα που ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία. Έτσι μπορεί να είναι επιμήκης κυλινδρικός με αντιπροσωπευτική την ποικιλία του «Άργους» ή «Τσακωνική». Επίσης ο καρπός μπορεί να έχει σφαιρικό ή απιοειδές σχήμα, γνωστός και ως «φλάσκα», με πιο χαρακτηριστική ποικιλία αυτή της «Σύρου».

Το χρώμα του καρπού είναι και αυτό χαρακτηριστικό της κάθε ποικιλίας και ποικίλει από βαθύ ως ανοικτό ιώδες, ενώ υπάρχουν ποικιλίες με άσπρο ή πράσινο χρώμα. Επίσης το χρώμα μπορεί να έχει ραβδώσεις, ενώ η επιφάνειά του είναι λεία και γυαλιστερή. Η σάρκα

του καρπού είναι λευκή και συμπαγής. Ο κάλυκας του καρπού φέρει αγκάθια γεγονός που απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή κατά την συγκομιδή ώστε να μην προκαλείται τραυματισμός των καρπών. Η μέση σύσταση του καρπού είναι: νερό 93%, πρωτεΐνες 1.2%, υδατάνθρακες 3.5-5.5 %, λίπη 0.2%.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΚΟΣΜΟ ΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Σύμφωνα με τα στατιστικά παραγωγής του FAO η μελιτζάνα είναι η τρίτη σημαντικότερη καλλιέργεια μεταξύ των σολανωδών, μετά την τομάτα και την πατάτα (*FAO 2008*). Η μελιτζάνα θεωρείται εξωτική τροφή στις ΗΠΑ και άλλες αναπτυγμένες χώρες, ωστόσο αποτελεί σημαντικό μέρος του διαιτολογίου στις χώρες του αναπτυσσόμενου κόσμου, ειδικά στην Κίνα (*Doganlar et al. 2002a*). Ενδεικτικό είναι το γεγονός ότι το 2007 στην ασιατική ήπειρο παρήχθη το 92,37% της παγκόσμιας παραγωγής (29.626.454 τόνοι), στην Αφρική το 4,48% (1.437.890 τόνοι), ενώ η Ευρώπη και η Αμερική αθροιστικά παρήγαγαν μόλις το 3,13% (1.004.433 τόνοι) της παγκόσμιας παραγωγής (*FAO 2008*). Σύμφωνα με τον FAO το 2012, η παραγωγή της μελιτζάνας παρουσιάζει υψηλό βαθμό συγκέντρωσης, αφού το 90% της παραγωγής προέρχεται από πέντε χώρες. Η Κίνα είναι η κορυφαία παραγωγός (58% της παγκόσμιας παραγωγής) και η Ινδία είναι η δεύτερη (25%), ακολουθούμενη από το Ιράν, την Αίγυπτο και την Τουρκία (Πίνακας 1)

Οι 10 χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή το 2012
(εκατομύρια tn)

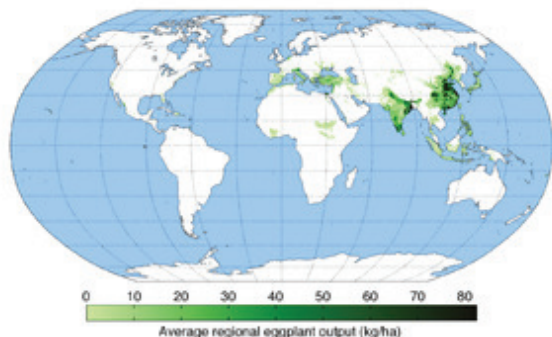
Κατάταξη	Χώρα	Παραγωγή	Κατάταξη	Χώρα	Παραγωγή
1	 China	28,800,000	6	 Indonesia	518,827
2	 India	12.200,000	7	 Iraq	460,000
3	 Iran	1.300,000	8	 Japan	327,400
4	 Egypt	1,193,854	9	 Spain	246,600
5	 Turkey	799.285	10	 Italy	217,690

Πίνακας 1: Στατιστικά στοιχεία παραγωγής μελιτζάνας.

Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία της FAO 2012 οι κορυφαίες δέκα χώρες στην παραγωγή μελιτζάνας είναι οι εξής :

Στην πρώτη θέση βρίσκεται η Κίνα με παραγωγή 28.800.000 τόνους το χρόνο. Στη συνέχεια, στη δεύτερη θέση βρίσκεται η Ινδία με παραγωγή 12.200.000 τόνοι το χρόνο, ακολουθεί το Ιράν με 1.300.000 τόνοι το χρόνο. Η Αίγυπτος με 1.193.854 και η Τουρκία με 799.285 τόνους μελιτζάνας το χρόνο. Με μικρότερη παραγωγικότητα και σειρά αντίστοιχα

έρχεται η Ινδονησία με 515.827 τόνους , το Ιράκ με 460.000 , η Ιαπωνία με 327.400 τόνους. Ακόμη η Ισπανία 246.600 και τελευταία θέση στις δέκα χώρες με υψηλότερη παραγωγικότητα μελιτζάνας το χρόνο, έρχεται η Ιταλία με 217.690 τόνους.



Εικόνα 3 : Μέσος όρος περιφερειακής παραγωγής μελιτζάνας στον κόσμο

Στον παραπάνω χάρτη παρουσιάζεται η παραγωγή μελιτζάνας (κατά το μέσο όρο της απόδοσης σε kg/εκταριο καλλιεργούμενης έκτασης) σε όλο τον τον κόσμο.

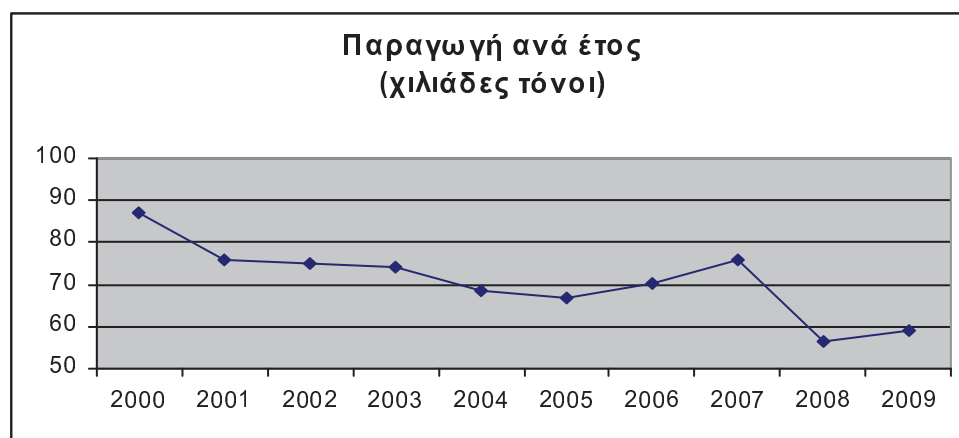
Σε παγκόσμιο επίπεδο η χώρα μας βρέθηκε το 2007 στην 22^η, 25^η και 19^η θέση όσον αφορά την παραγωγή, την καλλιεργούμενη έκταση και τη στρεμματική απόδοση αντίστοιχα, ενώ σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης η Ελλάδα βρέθηκε στην 4^η θέση με 1^η την Ιταλία, 2^η την Ισπανία και 3^η την Ρουμανία. (FAO 2008).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι υψηλότερες στρεμματικές αποδόσεις επιτυγχάνονται σε χώρες που διαθέτουν περιορισμένες καλλιεργούμενες εκτάσεις ή έχουν άνυδρο κλίμα και συνεπώς εφαρμόζουν προηγμένες θερμοκηπιακές ή και υδροπονικές πρακτικές

Στην Ελλάδα η μελιτζάνα καλλιεργείται σε θερμοκήπια και ύπαιθρο (Μπλέτσος 1997). Σύμφωνα με τα στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης η παραγωγή, η καλλιεργούμενη έκταση και η στρεμματική απόδοση ακολούθησαν πτωτική πορεία τα έτη 2000-2009, με εξαίρεση το 2006 και το 2007, κατά τα οποία υπήρχε μια μικρή άνοδο σε σχέση με το 2005. Το 2008 παρατηρήθηκε η χαμηλότερη παραγωγή των τελευταίων ετών (56.639 τόνοι) (Πίν. 2, διάγραμμα 1)

ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ			
ΕΤΟΣ	ΕΚΤΑΣΗ (στρέμματα)	ΠΑΡΑΓΩΓΗ (τόνοι)	ΣΤΡΕΜ. ΑΠΟΔΟΣΗ (κιά/στρεμ.)
1990	30.932	73.698	2.383
1991	27.907	75.194	2.694
1992	29.119	79.954	2.746
1993	28.565	78.113	2.735
1994	29.252	83.187	2.844
1995	30.110	95.523	3.172
1996	26.860	80.020	2.979
1997	30.776	85.382	2.774
1998	28.612	74.266	2.596
1999	28.606	76.650	2.680
2000	29.850	87.184	2.921
2001	27.176	75.934	2.794
2002	28.760	75.160	2.613
2003	27.871	74.193	2.662
2004	27.770	68.415	2.464
2005	28.550	66.980	2.346
2006	25.018	70.380	2.813
2007	28.640	75.965	2.652
2008	22.320	56.639	2.538
2009	22.420	58.934	2.629

Πίνακας 2. Εξέλιξη της καλλιέργειας της μελιτζάνας κατά τα έτη 1990-2009 (πηγή: Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων)



Διάγραμμα 1 : Στοιχεία παραγωγής της μελιτζάνας στην Ελλάδα τα έτη 2000-2009

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ, ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΚΑΙ ΥΒΡΙΔΙΑ

Ένας μεγάλος αριθμός ποικιλιών και υβριδίων μελιτζάνας καλλιεργούνται στην Ελλάδα με επιτυχία. Παρακάτω αναφέρονται ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα και άλλες που είναι ευρέως διαδεδομένες στην καλλιέργεια μελιτζάνας στη χώρα μας.

1) ΛΑΓΚΑΔΑ



Εικόνα 4: Λαγκαδά

Ντόπια μεσοπρώιμη ποικιλία για υπαίθρια καλλιέργεια που διαδόθηκε από την περιοχή της Θεσσαλονίκης. Το ύψος του φυτού είναι 85-90 εκ. και παράγει καρπούς κυλινδρικούς διαστάσεων 20-25 x 4 εκ. περίπου, βάρους γύρω στα 150-200 γρ. και χρώματος σκοτεινού ιώδους. Είναι ανθεκτική στις ασθένειες εδάφους.

2) ΣΚΟΥΤΑΡΙ



Εικόνα 5: Σκούταρι

Μεσοπρώιμη ποικιλία για υπαίθρια καλλιέργεια. Το ύψος του φυτού είναι 75-82 εκ. και παράγει καρπούς διαστάσεων 15 x 6 εκ. και βάρους περίπου 250 γρ. Ο καρπός έχει βιολετί χρώμα με πράσινο αγκαθωτό κάλυκα. Οι καρποί της ωριμάζουν σε 30-35 ημέρες. Είναι μια ποικιλία αρκετά παραγωγική. Καλλιεργείται στην Β. Ελλάδα.

3) ΜΕΛΙΤΩΝ F1

Πρώιμο υβρίδιο για υπαίθρια καλλιέργεια. Το ύψος του φυτού είναι 75-90 εκ. και παράγει καρπούς διαστάσεων 14 x 9 εκ. και βάρους 320-350 γρ. περίπου. Ο καρπός είναι στρογγυλού-οβάλ σχήματος, σκούρου μωβ χρώματος με πρασινο αγκαθωτό κάλυκα. Ωριμάζει σε 35-40 ημέρες και είναι αρκετά παραγωγικό. Καλλιεργείται σε αρκετές περιοχές της Β. Ελλάδας.

4) ΕΜΙ



Εικόνα 6 : Έμι

Μετρίως εύρωστο φυτό κατάλληλο για υπαίθρια καλλιέργεια. Το ύψος του φυτού είναι 90-100 εκ. και παράγει καρπούς μήκους 18-20 εκ. και διαμέτρου 8-10 εκ. Το βάρος είναι περίπου 350-400 γρ. Ο καρπός έχει σκούρο ιώδες χρώμα και σχήμα ωοειδές η σάρκα του είναι συμπαγής και ο κάλυκας αγκαθωτος.

Η ποικιλία Έμι δημιουργήθηκε από διαδοχικές επαναδιασταυρώσεις του υβριδίου *Bonica F1*. Καλλιεργείται σε πολύ μικρή έκταση σε διάφορα μέρη της Ελλάδας.

5) ΛΕΥΚΗ ΣΑΝΤΟΡΙΝΗΣ



Εικόνα 7 : Λευκή Σαντορίνης

Πρώιμη ποικιλία φλάσκας μελιτζάνας κατάλληλη για υπαίθρια καλλιέργεια. Το ύψος του φυτού είναι 120-140 εκ., παράγει καρπούς διαστάσεων 16 x 10 εκ και βάρους περίπου 500 γρ. Ο καρπός έχει άσπρο χρώμα με πράσινο αγκαθωτό κάλυκα, είναι πολύ γευστικός και

γλυκός, έχει λίγους σπόρους και ωριμάζει σε 30-35 ημέρες. Είναι μια αρκετά παραγωγική ποικιλία.

6) ΤΣΑΚΩΝΙΚΗ



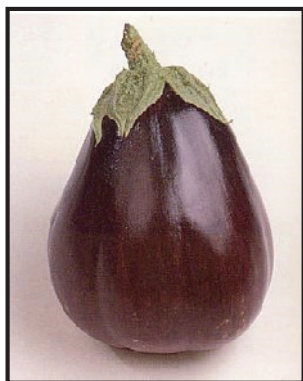
Εικόνα 8: Τσακώνικη

Ντόπια μεσοπρώιμη ποικιλία προερχόμενη από την ποικιλία Άργους με την οποία έχει μεγάλη ομοιότητα. Το ύψος του φυτού είναι 85-90 εκ. και παράγει καρπό επιμήκη διαστάσεων 18-22 x 4 εκ. περίπου, κυλινδρικό, βάρους γύρω στα 170-2000 γρ., χρώματος ανοικτού ιώδους με γραμμές λευκές κατά μήκος. Ο καρπός έχει χαρακτηριστική γλυκιά γεύση. Καλλιεργείται στη Ν. Ελλάδα και ενδείκνυται για ανοικτή και πρώιμη καλλιέργεια.

Η Ευρωπαϊκή Κοινότητα αποφάσισε τον Μάρτιο του 1996 την προστασία 317 αγροτικών προϊόντων των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Μεταξύ των προϊόντων με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης συγκαταλέγεται και η Τσακώνικη Μελιτζάνα Λεωνιδίου. Η συγκεκριμένη απόφαση της Ένωσης κατοχυρώνει στους παραγωγούς του Λεωνιδίου την αποκλειστικότητα καλλιέργειας της συγκεκριμένης ποικιλίας μελιτζάνας, δηλαδή μόνον οι παραγωγοί του Λεωνιδίου που παράγουν τις Τσακώνικες Μελιτζάνες και τηρούν τις αυστηρές προδιαγραφές παραγωγής, δικαιούνται να χρησιμοποιούν την κατοχυρωμένη ονομασία του προϊόντος.

7) BLACK BEAUTY



Εικόνα 9: Black beauty

Μεσοπρώιμη ποικιλία φλάσκας μελιτζάνας κατάλληλη για υπαίθρια και υπό κάλυψη καλλιέργεια. Το ύψος του φυτού είναι 60-75 εκ., παράγει καρπούς διαστάσεων 15×12 και βάρους 200 γρ. Οι καρποί της ωριμάζουν σε 75-80 ημέρες. Έχει καλή ομοιομορφία στους καρπούς οι οποίοι είναι σχεδόν μαύρου χρώματος και κρατά τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της μετά το κόψιμο. Επίσης είναι ανθεκτική στις μεταφορές.

8) ΑΣΠΡΗ ΛΕΡΟΥ

Παραλλαγή της Σαντορίνης κ έχει παρόμοιους καρπούς με τη λευκή Σαντορίνης.

9) LONG PURPLE



Εικόνα 10: Long purple

Γνωστή ποικιλία λόγω της προιμότητας και ομοιομορφίας των καρπών της οι οποίοι έχουν χρώμα βιολετί σκούρο, λαμπερό. Καλλιεργείται σε όλη την Ελλάδα, άνοιξη και καλοκαίρι. Κατάλληλη για υπαίθρια καλλιέργεια. Φυτό ύψους 70-75 cm.

10) DELICA F1



Εικόνα 11: Delica F1

Υβρίδιο κατάλληλο για υπερπρώιμη καλλιέργεια θερμοκηπίου και πρώιμη υπαίθρια με χαρακτηριστική αντοχή στο κρύο. Οι καρποί έχουν χρώμα μαύρο ομοιόμορφο, στιλπνό, είναι εξαιρετικής ποιότητας με λευκή σάρκα και ελάχιστους σπόρους. Καλλιεργείται σε όλη την Ελλάδα, ιδιαίτερος στην Ιεράπετρα.

11) BONICA F1



Εικόνα 12: Bonica

Υβρίδιο φλάσκας - στρογγυλής μελιτζάνας γαλλικής προέλευσης. Είναι μεσοπρώιμο φυτό 75-80 ημερών από την μεταφύτευση, με ύψος φυτού 70-80 cm. Παράγει καρπούς διαστάσεων 15-12 cm μέσου βάρους 300 gr. και χρώματος μαύρου - μελιτζανί. Το Υβρίδιο είναι κατάλληλο και για υπό κάλυψη καλλιέργεια. Έχει ανθεκτικότητα στους ιούς TMV και CMV

12) MADONNA F1



Εικόνα 13: Madona F1

Πρώιμο υβρίδιο κατάλληλο για υπαίθρια και θερμοκηπιακή καλλιέργεια. Το ύψος του φυτού είναι 90-110 εκ. περίπου και παράγει καρπούς διαστάσεων 25 x 12 εκ. και βάρους 300-350 gr περίπου. Το φυτό είναι πολύ εύρωστο και παραγωγικό και δίδει καρπούς χρώματος μωβ μελιτζανί, πολύ καλής ποιότητας. Καλλιεργείται στην Πελοπόννησο και την Κρήτη.

13) BLACK MAGIC



Εικόνα 14: Black Magic

Είναι πρώιμη ποικιλία. Το φυτό έχει την τάση να αναπτύσσεται πλάγια. Ο καρπός έχει σχήμα ωοειδές, χρώμα βαθύ ιώδες και είναι πολύ καλής ποιότητας.

14) GALINE F1



Εικόνα 15: Galine F1

Πρώιμο υβρίδιο, ιταλικής προέλευσης, κατάλληλο για υπαίθρια και θερμοκηπιακή καλλιέργεια. Το ύψος του φυτού είναι 70-80 εκ. περίπου και παράγει καρπούς διαστάσεων 18-20 x 8-10 (διάμετρος) εκ. και βάρους 350 γρ. περίπου. Κατάλληλο για καλλιέργεια κατά τον χειμώνα στα θερμοκήπια διότι έχει την ικανότητα να αναπτύσσει καρπούς παρθενοκαρπικά.

Το φυτό είναι πολύ εύρωστο και παραγωγικό, με ανοικτή πλάγια ανάπτυξη και δίδει καρπούς αποειδούς σχήματος με γυαλιστερό ιώδες χρώμα που ωριμάζουν σε 65-70 ημέρες. Διατηρείται σε καλή κατάσταση αρκετό χρονικό διάστημα μετά την συγκομιδή. Καλλιεργείται σε όλη την Ελλάδα.

ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΧΟΥΣΑΣ ΑΓΡΟΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΕΓΧΩΡΙΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ & ΤΟΠΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ

Οι φυτογενετικοί πόροι αποτέλεσαν επί αιώνες ένα από τα θεμελιώδη στοιχεία για την ανάπτυξη της γεωργίας μιας και είναι η πρώτη ύλη από την οποία δημιουργήθηκαν στη διαδρομή των αιώνων αρχικά οι παραδοσιακές ντόπιες ποικιλίες και πληθυσμοί με επιλογή από τους αγρότες και στην τελευταία περίπου εκατονταετία οι νέες ανταγωνιστικές εμπορικές ποικιλίες από τη σύγχρονη βελτιωτική επιστήμη.

Με την τεχνολογική και οικονομική επανάσταση που επικράτησε μετά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο δόθηκαν τεράστιες δυνατότητες στον άνθρωπο να επηρεάσει τα φυσικά και αγροτικά οικοσυστήματα και το οικονομικό περιβάλλον.

Η γενίκευση της μηχανοκαλλιέργειας έδωσε τη δυνατότητα να καλλιεργηθούν μεγάλες εκτάσεις με λίγες έως και μία καλές παραγωγικές ποικιλίες. Επίσης, η γενίκευση της χρήσης λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων και της άρδευσης αύξησε σημαντικά της αποδόσεις των νέων εκλεκτών ποικιλιών που δημιουργήθηκαν στο πλαίσιο της μεγάλης προόδου της γενετικής και βελτίωσης των φυτών και των βιολογικών επιστημών γενικότερα.

Έτσι, σιγά σιγά οι νέες συνθήκες οδήγησαν στην επικράτηση λίγων εκλεκτών ποικιλιών και υβριδίων με υψηλή ποιότητα και απόδοση. Αποτέλεσμα αυτών των τάσεων ήταν να εκτοπισθεί από την καλλιέργεια και να χαθεί ένα μεγάλο μέρος του γενετικού υλικού που μας κληροδότησαν οι προηγούμενες γενεές. Αυτή η απώλεια γενετικού δυναμικού χαρακτηρίστηκε ως **βαθμός διάβρωσης**.

Ο βαθμός της γενετικής διάβρωσης του εντόπιου αβελτίωτου γενετικού υλικού της χώρας υπήρξε δραματικός. Αν και δεν υπάρχουν ακριβή στατιστικά στοιχεία για όλη τη χώρα, με βάση όσα στοιχεία ήταν διαθέσιμα το 1994, εκτιμήθηκε ότι οι εγχώριες αβελτίωτες ποικιλίες σιτηρών αντιπροσώπευαν μόνο το 2% των καλλιεργούμενων συνολικά σιτηρών στη χώρα. Σήμερα πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 1%.

Το υλικό που ακόμη διασώζεται καλλιεργείται από υπερήλικους γεωργούς σε μειονεκτικές ορεινές περιοχές των νησιών και της ορεινής ενδοχώρας, είτε γιατί αποτελεί στοιχείο της τοπικής παράδοσης, είτε γιατί προσαρμόζεται καλύτερα σε άγονες οριακές αγροτικές περιοχές. Είναι φανερό πάντως ότι εάν δεν ληφθούν μέτρα ολοκληρωμένης προστασίας τόσο του γενετικού υλικού, όσο και του βιοτικού επιπέδου αυτών των περιοχών, αυτό το γενετικό υλικό θα χαθεί οριστικά μαζί με τους παραδοσιακούς γεωργούς και τη γνώση που αυτοί έχουν.

Η έντονη ανησυχία σχετικά με τον ορατό κίνδυνο να χαθεί οριστικά μέσα σε λίγες δεκαετίες ο τεράστιος γενετικός πλούτος που είχε δημιουργηθεί, στη διαδρομή των αιώνων, με τη φυσική και ανθρώπινη επιλογή, οδήγησε στην απόφαση να υποστηριχθεί από τις εθνικές κυβερνήσεις και τους αρμόδιους διεθνείς οργανισμούς (UN, UNDP, CGIAR, FAO

κ.λπ.) η δημιουργία τραπεζών γενετικού υλικού σε στρατηγικά σημεία της υφελίου με υψηλή γενετική ποικιλότητα ειδών. Μια από τις σημαντικές, παγκόσμια, χώρες στον τομέα αυτό είναι και η Ελλάδα.

Η ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΩΝ ΦΥΤΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΝΤΟΠΙΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ

Όπως συνέβη με πολλούς, μη άμεσα χρήσιμους και λιγότερο ανταγωνιστικούς παραδοσιακούς πολιτισμικούς και φυσικούς πόρους, που εκτοπίστηκαν στο πλαίσιο της εμπορευματοποίησης και των κανόνων της ελεύθερης δράσης και του ανταγωνισμού σε όλους τους τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας τη μεταπολεμική περίοδο, έτσι και η γενετική ποικιλότητα των φυτοπαραγωγικών πόρων για τη διατροφή και τη γεωργία, υπέστη σοβαρό πλήγμα. Δυστυχώς, οι αλλαγές που επήλθαν στην αγροβιοποικιλότητα έγιναν αντιληπτές, μόνο αφού ήταν ήδη πολύ αργά για ορισμένα είδη, αφού όσα από αυτά δεν ανταποκρίνονταν στις απαιτήσεις παραγωγικότητας αμελήθηκαν, ξεχάστηκαν και, τελικά, εξαφανίστηκαν (SAVE, 2006).

Δεν είναι τυχαίο, ότι η γεωργία των περισσότερων χωρών βασίζεται, σήμερα, σε εισαγωγές ξενικών ειδών (Fowler & Hodgkin, 2004). Ήδη, από το διάστημα του Μεσοπολέμου, οι Harlan και Martini (1936) και αργότερα ο Frankel (1954), είχαν εγείρει το θέμα της απώλειας των φυτογενετικών πόρων, με αντιδράσεις που οδήγησαν στη δημιουργία της IBPGR (International Board of Plant Genetic Resources), το 1974 (αργότερα, μετονομάστηκε σε IPGRI - International Plant Genetic Resources Institute) (Love & Spaner, 2007).

Ωστόσο, μέχρι τα μέσα του προηγούμενου αιώνα οι κλειστές, αυτοσυντηρούμενες οικονομικά, μικρές αγροτικές κοινωνίες, δεν ελλόχευαν κινδύνους για τις ντόπιες ποικιλίες και τα αγροοικοσυστήματα. Η τεχνολογική και οικονομική επανάσταση που επικράτησε μετά το Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο και η αντικατάσταση της αυτάρκειας των ντόπιων ποικιλιών από την ανάγκη για υπερπαραγωγή, οδήγησε στην επικράτηση (αρχικά σε εθνικό και κατόπιν σε παγκόσμιο επίπεδο), λίγων «εκλεκτών» ποικιλιών, που χαρακτηρίζονταν από υψηλή ποιότητα και απόδοση. Οι περισσότερες από αυτές, δημιουργήθηκαν από επιστημονικά κρατικά ιδρύματα και αργότερα από ιδιωτικές βελτιωτικές εταιρίες. Οι βελτιωμένες, αυτές, ποικιλίες, είχαν μεγάλη αποδοχή από τις πιο ομοιόμορφες γεωργικές περιοχές (π.χ. στους αρδευόμενους ορυζώνες της Νοτιοανατολικής Ασίας) καθιστώντας τις, ωστόσο, σταδιακά, ευάλωτες και, σε πολλές περιπτώσεις, μη βιώσιμες. (Almekinders & de Beuf, 1999).

Σήμερα, είναι ευρέως αποδεκτό, ότι η βελτίωση ποικιλιών και σπόρων έχει οδηγήσει τόσο σε επιτυχία, όσο και σε αποτυχία (Tripp, 1996). Η χρήση λίγων μόνο ποικιλιών για τη δημιουργία νέων βελτιωμένων, είχε ως αποτέλεσμα να συμμετέχει στη γενετική σύσταση των νέων ποικιλιών, μικρό μόνο τμήμα από το μεγάλο γονιδιακό εύρος μίας καλλιέργειας.

Παρόλο που οι σποροπαραγωγοί παίρνουν γενετικό υλικό, ως πρώτη ύλη, από πολλές περιοχές, ο σπόρος που «επιστρέφεται», μέσω πώλησης, στους γεωργούς, χαρακτηρίζεται από ομοιομορφία (Shiva et al, 1991). Η αυξανόμενη, αυτή, γενετική ομοιομορφία, η μείωση της γενετικής βάσης των καλλιεργειών και η καλλιέργεια τεράστιων εκτάσεων με μία μόνο ή πολύ λίγες ποικιλίες, οδήγησε σταδιακά στην αύξηση της γενετικής ευπάθειας (genetic vulnerability) των καλλιεργειών, στα εξελισσόμενα παθογόνα, με εμφανείς τις αρνητικές συνέπειες σε πολλές περιπτώσεις επιδημιών (Σταυρόπουλος Ν., Σαμαράς Σ., Ματθαίου Α.)

ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ

Οι στρατηγικές διατήρησης των φυτογενετικών πόρων και των ντόπιων ποικιλιών μπορεί να είναι είτε *ex situ*, είτε *in situ*. Οι πρώτες, διατηρούν την ποικιλότητα έξω από το φυσικό της περιβάλλον, ενώ οι δεύτερες, εκεί όπου αναπτύχθηκε εξ αρχής (UNCED, 1992).

a) Διατήρηση Ex situ

Πρόκειται για τη διατήρηση σε τράπεζες, σπόρων και γενετικού υλικού και αποτελούσε, μέχρι πρόσφατα, τη βασική στρατηγική διατήρησης (Love & Spaner, 2007). Περιλαμβάνει τη συλλογή, ταξινόμηση, αξιολόγηση και αξιοποίηση της αγροβιοποικιλότητας (Marshall & Brown, 1975) και παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι το υλικό που συγκεντρώνεται, είναι άμεσα διαθέσιμο στους φυτοπαραγωγούς.

Ο χαρακτηρισμός και αξιολόγηση του υλικού και η περαιτέρω αποθήκευση της πληροφορίας σε βάσεις δεδομένων, υποστηρίζουν κατά πολύ τη διαδικασία της φυτοπαραγωγής. Τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα της *ex situ* διατήρησης, είναι ότι οι τράπεζες γενετικού υλικού μπορούν να καλύψουν την αβεβαιότητα του τι θα χρειάζεται στο μέλλον, λόγω του εύρους των υλικών που περιλαμβάνουν (Smale Rubenstein, 2002), ενώ λειτουργούν ως «θησαυροφυλάκια», για περιπτώσεις απώλειας της βιοποικιλότητας στα αγροοικοσυστήματα (Zeven, 1996).

Ωστόσο, η *ex situ* διατήρηση, έχει χαρακτηριστεί αρνητικά ως «στατική» (Bellon et al, 1997) και ιδιαίτερα δαπανηρή, με συχνή δυσκολία χρηματοδότησης (Qualset & Shands, 2005). Επιπλέον, το υλικό που φυλάσσεται στις τράπεζες γενετικού υλικού, δεν είναι γενικά διαθέσιμο στους γεωργούς, για άμεση χρήση στην παραγωγή, ενώ δίνεται κυρίως σε επίσημα ερευνητικά ινστιτούτα και σε δημόσια χρηματοδοτούμενους φυτοπαραγωγούς (Fowler & Hodgkin, 2004).

b) Διατήρηση In situ / On farm ή αλλιώς στον αγρό

Στην περίπτωση της *in situ* διατήρησης, οι πληθυσμοί διατηρούνται στα φυσικά τους περιβάλλοντα, είτε στην άγρια μορφή τους, είτε στον αγρό (on farm) (IPGRI). Στη δεύτερη περίπτωση, πρόκειται για τη συνεχή καλλιέργεια και διαχείριση, από τους γεωργούς, στο φυσικό τους περιβάλλον, ενός πλήθους διαφορετικών ποικιλιών και βασίζεται στην ενεργό συμμετοχή των γεωργών, επειδή εξαρτάται από τα κίνητρα και τους λόγους που έχουν, προκειμένου να διατηρήσουν τη βιοποικιλότητα στον αγρό (Bellon, 2003).

Η *in situ* διατήρηση λειτουργεί συμπληρωματικά της *ex situ* διατήρησης, αφού υποστηρίζει τις διαδικασίες ανάπτυξης και προσαρμογής των φυτών στα περιβάλλοντά τους, διατηρεί τη βιοποικιλότητα σε όλα τα επίπεδα (στα οικοσυστήματα, ανάμεσα στα είδη και μέσα στο ίδιο είδος) και επιτρέπει στους γεωργούς να έχουν πρόσβαση στους φυτογενετικούς πόρους (IPGRI).

Η διατήρηση στον αγρό αποτελεί τον καλύτερο τρόπο προστασίας των ποικιλιών, αφού πρόκειται για ένα συνδυασμό ανθρώπινης επέμβασης και φυσικής διαδικασίας (IPGRI). Επικεντρώνεται κυρίως στη διατήρηση στα κέντρα καταγωγής των ποικιλιών, ωστόσο, ορισμένες πολύτιμες ποικιλίες, διατηρούνται και εκτός αυτών (Brush, 1991). Η ποικιλότητα στον αγρό είναι πολύ σημαντική, για αγρότες που έχουν περιορισμένες δυνατότητες συμμετοχής στην αγορά, λόγω μικρής παραγωγής (Bellon, 2003). Ειδικά στις μη βιομηχανοποιημένες χώρες, αποτελεί το 60 - 80% της παραγωγής σπόρων (Almekinders & de Boef, 1999; Louwaars, 1994).

Συνοπτικά, η διατήρηση στον αγρό:

- Διατηρεί τις εξελικτικές διαδικασίες, που προάγουν τη φυσική επιλογή (Brush, 1994).
- Βοηθά στη διατήρηση «φυσικών εργαστηρίων», σημαντικών για τη βιολογία και τη βιογεωγραφία (Brush, 1994).
- Παρέχει μία συνεχή πηγή πόρων για *ex situ* συλλογές (Brush, 1994) και μπορεί να αποτελέσει δικλείδα ασφαλείας, σε περίπτωση απώλειας υλικού από αυτές (Brush, 1999).
- Είναι, μάλλον, οικονομικότερη από τη διατήρηση *ex situ* (Brush, 1991).
- Συμβάλει στη διατήρηση της παραδοσιακής γνώσης και πρακτικής των γεωργών, καθώς και συναφών μεθόδων μεταποίησης και χρήσης, που αποτελούν σημαντικό κομμάτι της αγροτικής παράδοσης και πολιτισμού ενός τόπου (Κουτής & Χατζητόλιος, 1999).

- Συνεργεί στην ικανοποίηση της ανάγκης για την αναγνώριση των γεωργών, ενθαρρύνει τη συμμετοχή τους σε διεθνείς προσπάθειες και τους εξασφαλίζει έναν πιο δίκαιο ρόλο, στις χώρες που είναι πλούσιες σε αγροβιοποικιλότητα (**Brush, 1994**).

Ωστόσο, σαν μειονεκτήματα της διατήρησης στον αγρό, θεωρούνται:

- Η αναπόφευκτη αντικατάσταση, τελικά, των υπάρχοντων ποικιλιών με νέες (**Brush, 1999**).
- Η αναγκαιότητα της οικονομικής υποστήριξης, ως κίνητρο, των γεωργών που θα αναλάβουν τη διατήρηση στον αγρό (**Brush, 1999**), ώστε να αποφευχθεί η ενδεχόμενη πτώχευσή τους (**Brush, 1991**).

Το σημαντικό, ωστόσο, είναι ότι η έννοια της ποικιλίας, όπως ορίζεται από τους γεωργούς, είναι ένα “ανοιχτό γενετικό σύστημα”, που τροποποιείται δια μέσω του χρόνου. Η ιδέα αυτή, διαφέρει σημαντικά από τη “σταθερή, συγκεκριμένη και ομοιόμορφη” αντίληψη που εφαρμόζεται, τόσο στην αναπαραγωγή φυτών, όσο και στις περισσότερες περιπτώσεις διατήρησης των φυτογενετικών πόρων (**Louette, 1997**).

Δυστυχώς, μόνο ένας πολύ μικρός αριθμός σχετικών προγραμμάτων, υλοποιούνται διεθνώς (**Bretting & Duvick, 1997**). Ένα ευρύ διεθνές πρόγραμμα, το οποίο αφορούσε πολλές μη βιομηχανοποιημένες χώρες, εφαρμόστηκε από το IPGRI κατά την προηγούμενη δεκαετία. Ξεκίνησε το 1995 και ονομάστηκε “Strengthening the scientific basis of in situ conservation of agricultural biodiversity on farm”. Είχε στόχο να διερευνήσει και να κατανοήσει το ποσοστό και τον τρόπο, με τον οποίο διανέμεται η γενετική ποικιλότητα μεταξύ των γεωργών μέσα στο χρόνο και το χώρο, καθώς και ποιες διαδικασίες ακολουθούνται για τη διατήρησή της και ποιοι παράγοντες επηρεάζουν τη διαδικασία λήψης αποφάσεων των γεωργών (**Gauchan et al, 2002**).

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ

Ο όρος γενετική ποικιλότητα αναφέρεται στην διαφοροποίηση του γενετικού υλικού μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους εκφράζοντας τη διαφοροποίηση στις συχνότητες των αλληλομόρφων μεταξύ των πληθυσμών του ίδιου είδους και μεταξύ των ατόμων του ίδιου πληθυσμού. Στα είδη που αναπαράγονται με αμφιγονία η γενετική ποικιλότητα εμπλουτίζεται περισσότερο καθώς οι απόγονοι (φυτικοί ή ζωικοί οργανισμοί) κληρονομούν από τους γονείς τους ένα μοναδικό πρακτικά συνδυασμό γονιδίων. Τα λάθη που γίνονται κατά την αντιγραφή του DNA ή κατά τη διαίρεση των χρωμοσωμάτων καθώς και η επίδραση μεταλλαξιγόνων παραγόντων (χημικές ουσίες, διάφοροι τύποι ιονίζουσων ακτινοβολιών όπως η X και η γ-

ακτινοβολία, καθώς και η κοσμική και η υπεριώδης ακτινοβολία) προκαλούν μεταλλάξεις. Η συσσώρευση μεταλλάξεων προσδίδει στο άτομο τροποποιημένες ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές "αξιολογούνται" και εξαπλώνονται στον πληθυσμό ή εκλείπουν, μαζί με τα άτομα που τις φέρουν, ανάλογα με τα προσαρμοστικά πλεονεκτήματα ή μειονεκτήματα αντίστοιχα που επιφέρουν στους φορείς τους. Ως προσαρμοστικό πλεονέκτημα θεωρείται οποιοδήποτε μορφολογικό, ανατομικό ή φυσιολογικό χαρακτηριστικό που ευνοεί την επιβίωση και αναπαραγωγή του ατόμου σε συγκεκριμένο χώρο (περιβάλλον) και χρόνο.

Το γενετικό υλικό ενός ατόμου (γενότυπος) αλληλεπιδρά με το περιβάλλον και καθορίζει το φαινότυπό του, τα βιοχημικά, φυσιολογικά ή μορφολογικά χαρακτηριστικά του οργανισμού. Η γενετική ποικιλότητα επιτρέπει στα άτομα ενός είδους και κατ' επέκταση στους πληθυσμούς που αυτά συνιστούν να προσαρμόζονται σε αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών. Όταν ο αριθμός των ατόμων ενός είδους μειώνεται σημαντικά, η γενετική του ομοιομορφία αυξάνεται (τα σπανιότερα γονιδιακά αλληλόμορφα πιθανότατα εκλείπουν) και συνεπώς οι προσαρμοστικές δυνατότητες των μελών του ελαττώνονται.

Αν και οι πληθυσμοί όλων των ειδών τείνουν να αυξηθούν από γενιά σε γενιά με γεωμετρική πρόοδο, το μέγεθος τους παραμένει σχεδόν σταθερό σε κάθε γενιά. Η υπέρμετρη αύξηση ενός πληθυσμού εμποδίζεται από την ύπαρξη περιοριστικών παραγόντων. Ειδικότερα, μέσα σε μία βιοκοινότητα, τα άτομα ενός πληθυσμού καθώς και οι πληθυσμοί μεταξύ τους ανταγωνίζονται για συγκεκριμένους κάθε φορά πόρους (χώρο, τροφή, αναπαραγωγικό σύντροφο κ.ά.). Οι ενδοειδικές (ενδοφυλετικές ή ανεξαρτήτως φύλου) και διαειδικές αυτές μορφές ανταγωνισμού ευνοούν τα "ισχυρότερα", τα καλύτερα προσαρμοσμένα άτομα (***Φυσική Επιλογή: Αρχή της διατήρησης και επιβίωσης του καλύτερα προσαρμοσμένου οργανισμού, Charles Darwin, 1859, "Η προέλευση των ειδών"***). Τα καλύτερα προσαρμοσμένα στο περιβάλλον τους άτομα αναπαράγονται με γρηγορότερους ρυθμούς και η γενετική τους σύνθεση επικρατεί διαμορφώνοντας την εξελικτική πορεία του πληθυσμού και έμμεσα του είδους στο χρόνο.

Η ύπαρξη γενετικής ποικιλότητας μέσα σε έναν πληθυσμό παρέχει στα άτομα την δυνατότητα ανάπτυξης προσαρμοστικών πλεονεκτημάτων καθιστώντας τα ανταγωνιστικά αποτελεσματικότερα. Η ανάπτυξη, ωστόσο, παρόμοιων προσαρμογών καθώς και η τροποποίηση τους όταν αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών το επιβάλουν είναι δυνατή εξαιτίας της ύπαρξης ευρείας ενδοειδικής γενετικής ποικιλότητας, μεγάλου και ανομοιογενούς δηλαδή γενετικού αποθέματος μέσα στο είδος.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ

Η ταυτοποίηση, η ταξινόμηση και ο καθορισμός των φυλογενετικών σχέσεων στους φυτικούς οργανισμούς αντιμετωπίζουν συχνά προβλήματα τα οποία μπορούν να επιλυθούν με

τη χρήση διαφόρων ειδών, όπως οι μορφολογικοί δείκτες, οι βιοχημικοί δείκτες και οι μοριακοί δείκτες (Λεσποτάκη, 2010).

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι μορφολογικοί δείκτες είναι πολυμορφικά, κληρονομήσιμα, μορφολογικά χαρακτηριστικά τα οποία χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ ειδών και ποικιλιών. Επιπλέον, αξιοποιούνται για εφαρμογές διαχείρισης γενετικού υλικού. Δεν απαιτούν ειδικό εξοπλισμό, αναλώσιμα ή εξειδικευμένο προσωπικό.

Συνεπώς, η καταγραφή μόνο- ή ολίγο-γονιδιακών χαρακτηριστικών αποτελεί μια γρήγορη και οικονομική μέθοδο. Αντίθετα, η χρήση των μορφολογικών δεικτών για πολυγονιδιακά χαρακτηριστικά δεν είναι εξίσου αποτελεσματική εξαιτίας κυρίως του χαμηλού συντελεστή κληρονομικότητας και της υψηλής επίδρασης που ασκεί το περιβάλλον (Patterson and Weatherup, 1984). Οι μορφολογικοί δείκτες έχουν εφαρμοστεί στην πλειονότητα των φυτών. Συγκεκριμένα, όσοι χρησιμοποιούνται επισήμως στην ταυτοποίηση ποικιλιών ονομάζονται περιγραφητές (descriptors).

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Ως βιοχημικοί δείκτες χρησιμοποιούνται κυρίως οι πρωτεΐνες. Οι πρωτεϊνικοί δείκτες είναι πρωτεΐνες που εξυπηρετούν συγκεκριμένες εφαρμογές διαχείρισης του γενετικού υλικού. Οι πληροφορίες που παρέχουν αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα γονιδίων που κωδικοποιούν πολυπεπτίδια, τα οποία δεν είναι τυχαία διασκορπισμένα στο γονιδίωμα (Bretting and Widrechner, 1995). Οι κυριότεροι από αυτούς είναι οι ορολογικές αναλύσεις, οι πρωτεΐνες αποθήκευσης και τα ισόένζυμα.

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA, που παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των προς μελέτη ατόμων, η ανάδειξη των οποίων χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κληρονομικότητας χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών (Fanourakis et al., 2004). Πλεονεκτούν, σε σχέση με τους φαινοτυπικούς δείκτες, διότι δεν επηρεάζονται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος ενώ είναι ανιχνεύσιμοι σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυτού.

Επιπλέον, είναι απεριόριστοι σε αριθμό και εμφανίζουν υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού. Χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία δένδρων συγγένειας ή εξέλιξης

διαφόρων ποικιλιών ή οικοτύπων. Το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους είναι ότι έχουν υψηλό κόστος και απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και εξοπλισμό.

Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (**Botstein et al., 1980**). Οι δείκτες RFLP κόβουν τα μόρια DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων. Τα θραύσματα DNA που προκύπτουν είναι ποικίλου μεγέθους. Ακολουθεί διαχωρισμός των θραυσμάτων σε πηκτή αгарόζης. Οι δείκτες RFLP χαρακτηρίζονται από επαναληψιμότητα και συνυπεροχή στην κληρονομικότητά τους (**Tanksley et al., 1989**). Μετά την ανακάλυψη της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) αναπτύχθηκαν νέες μέθοδοι μοριακών δεικτών που βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA. Το 1990, οι Williams et al. και Welsh and McClelland, περιέγραψαν μια νέα μέθοδο δημιουργίας μοριακών δεικτών με πολυμορφισμό, τα RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA). Στη συνέχεια, εμφανίστηκαν οι μοριακοί δείκτες δεύτερης γενιάς στους οποίους ανήκουν οι ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) (**Zietkiewicz et al., 1994**), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) και SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) (**Landegren et al. 1998**).

Σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός μοριακών δεικτών, όπως π.χ. οι SSRs (Simple Sequence Repeat) (**Jacob et al., 1991**), SCARs (Sequence Characterize Amplified Regions) (**Yang and Korban, 1996**), SPARs (Simple Primer Amplification Reaction) (Gupta et al., 1994) MAS (Marker Assisted Selection) (**Lande, 1991**) και άλλοι, βρίσκεται στη διάθεση των ερευνητών. (**Δεσποτάκη, 2010**).

Οι μοριακοί δείκτες πλεονεκτούν θεωρητικά απέναντι στους κλασσικούς (κύρια μορφολογικούς) δείκτες για τους εξής λόγους:

- a) Στους μοριακούς δείκτες **οι γονότυποι μπορούν να προσδιοριστούν όχι μόνο σε επίπεδο φυτού αλλά και σε επίπεδο ενός ιστού ή και κυττάρου**. Αντίθετα στους μορφολογικούς δείκτες οι γονότυποι προσδιορίζονται σχεδόν πάντοτε σε επίπεδο φυτού.
- b) Στους περισσότερους μοριακούς δείκτες **απουσιάζει η επίδραση του περιβάλλοντος και η υπεροχή**. Οι αλληλόμορφοι εκδηλώνονται σε ισότιμη βάση (συγκυριαρχία) και είναι εύκολη η διάκριση όλων των γονότυπων. Αντίθετα η σχέση κυριαρχίας και η επίδραση του περιβάλλοντος που επικρατούν στους μορφολογικούς δείκτες εμποδίζουν την διάκριση των γονότυπων και συχνά χρειάζονται πρόσθετα πειράματα για την εξακρίβωσή τους.
- c) Οι περισσότεροι μοριακοί δείκτες **παρουσιάζουν αρκετή ποικιλομορφία** (δηλαδή αρκετούς διαφορετικούς αλληλόμορφους) έτσι ώστε δεν χρειάζεται να τη δημιουργήσουμε τεχνητά όπως συνήθως συμβαίνει με τους μορφολογικούς δείκτες.

- d) Οι μοριακοί δείκτες **δεν προκαλούν ανεπιθύμητες αλλαγές στο φαινότυπο** του φυτού όπως συμβαίνει με αρκετούς μορφολογικούς δείκτες (πλειοτροπισμός).
- e) Οι μοριακοί δείκτες στην πλειονότητά τους **ανιχνεύονται χωρίς επιστατικές αλληλεπιδράσεις**. Έτσι μπορεί να επιλέγονται στον ίδιο πληθυσμό περισσότεροι από ένας μοριακοί δείκτες ταυτόχρονα.

ΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΝΟΣ ΙΔΑΝΙΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ

- Παρουσία πολυμορφισμού (ή δυνατόν η ύπαρξη πολλών αλληλόμορφων για κάθε γενετικό τόπο)
- Απλή κληρονομικότητα, που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχους αλληλόμορφους
- Υψηλός συντελεστής κληρονομικότητας. Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων
- Διασπορά και στην ιδανική περίπτωση ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα
- Ανεξαρτησία της βιωσιμότητας και του φαινότυπου των φυτών
- Η μεθοδολογία αναγνώρισης να μην κοστίζει πολύ, να μην έχει αρνητικές συνέπειες στο φυτό και να είναι εύκολη και δυνατή κατά τα νεαρά στάδια της ανάπτυξης των φυτών κι συγκεκριμένα όταν τα φυτά αναπτυχθούν τόσο, ώστε να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA (**Κόκκινος, 2011**)

ΕΝΔΟ-ΕΝΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΑΠΛΕΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΕΣ- ISSR (Inter-simple Sequence Repeats)

Τα ISSR είναι κομμάτια DNA μεγέθους από 100-3000 bp που βρίσκονται μεταξύ παρακείμενων αντίθετα προσανατολισμένων μικροδορυφόρων. Δημιουργούνται περίπου 10-60 τμήματα από πολλούς γενετικούς τόπους ταυτόχρονα, διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης και καταγράφονται ως παρουσία ή απουσία ζωνών. Τα ISSR βρίσκονται σε αφθονία και διάσπαρτα μέσα στο γονιδίωμα. Για την ενίσχυσή τους με PCR απαιτείται μικρή ποσότητα πρότυπου DNA (5-50 ng ανά αντίδραση), ενώ δεν απαιτείται γνώση της αλληλουχίας για την κατασκευή εκκινητών.

Επειδή αναφέρονται σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους, υπάρχει περίπτωση μη ομολογίας ζωνών παραπλήσιου μεγέθους. Επίσης, μπορεί να έχουν προβλήματα επαναληψιμότητας όπως τα RAPD (**Spooner et al. 2005**). Πρόκειται για μία σχετικά

πρόσφατη τεχνική που μπορεί να διαφοροποιήσει στενά σχετιζόμενους γενοτύπους. Χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση της γενωμικής καταγωγής, της γενετικής ποικιλότητας σε συλλογές γενετικού υλικού και στην ταυτοποίηση των καλλιεργούμενων ποικιλιών.

Οι ISSR δείκτες απεδείχθη ότι είναι χρήσιμοι για τη διάκριση στενά συσχετιζόμενων γενοτύπων και δείχνουν τη γενετική ποικιλότητα που υπάρχει στη γονιδιακή δεξαμενή **(Sonnante and Pignone, 2001)**.

Χρησιμοποιούνται ακόμα για τη διερεύνηση της εξελικτικής προέλευσης και συγγένειας και για την ταυτοποίηση των καλλιεργούμενων ποικιλιών (Prevost και Wilkinson 1999). **(Φανουράκης, 2005)**. Οι ISSR δείκτες εμφανίζουν υψηλό βαθμό παραλλακτικότητας. Ο τρόπος κληρονόμησης τους είναι με υπεροχή με χαμηλό κόστος υψηλή επαναληψιμότητα και πολύ εύκολη ανάλυση δεδομένων **(Πολύδωρος Α., 2010)**

Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΗΝ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Η επιλογή των χαρακτηριστικών στη Βελτίωση φυτών δεν είναι πάντοτε εύκολη υπόθεση. Συχνά το γονίδιο ή τα γονίδια που θέλουμε να διακρίνουμε δεν εκδηλώνεται με ξεκάθαρο φαινότυπο ή εκδηλώνεται καθυστερημένα στη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού ή χρειάζεται ειδικές τεχνικές για την επιλογή του.

Για παράδειγμα, η ανθεκτικότητα σε διάφορες ασθένειες απαιτεί να εφαρμόσουμε ειδικές τεχνικές για τη μόλυνση, την επώαση, τις συνθήκες θερμοκρασίας κ.λπ., ώστε να διακρίνουμε τα ανθεκτικά φυτά από τα ευπαθή. Σε τέτοιες περιπτώσεις η επιλογή είναι δυνατόν να βασιστεί σε άλλο ή άλλα γονίδια στενά συνδεδεμένα με το χαρακτηριστικό που θέλουμε να επιλέξουμε. Η βασική αρχή στην περίπτωση αυτή είναι ότι τέτοια συνδεδεμένα γονίδια εφόσον εκδηλώνονται εύκολα είναι δυνατόν να επιλεγούν, οπότε επιλέγεται έμμεσα και το επιθυμητό χαρακτηριστικό το οποίο διαφορετικά θα ήταν δύσκολο να το επιλέξουμε. Τα γονίδια αυτά τα ονομάζουμε **γενετικούς δείκτες (Genetic markers)**.

Από τις πρώτες δεκαετίες του 20^{ου} αιώνα είχε αρχίσει η μελέτη τέτοιων δεικτών με εύκολη εκδήλωση φαινότυπου, κύρια σε μορφολογικά χαρακτηριστικά. Μέχρι σήμερα έχει γίνει σε πολλά φυτά η γενετική ανάλυση για διάφορα γονίδια-δείκτες που καθορίζουν χαρακτηριστικά όπως το χρώμα ή το σχήμα του άνθους ή του καρπού ή και των φύλλων, η αρρενοστεριότητα, η ανθεκτικότητα σε ορισμένες ασθένειες κ.λπ. Αποτέλεσμα της συσσώρευσης της γνώσης αυτής είναι ο εντοπισμός του χρωμοσώματος ή και της θέσης (**locus**) του γονιδίου πάνω στο χρωμόσωμα και η **σταδιακή κατασκευή του γενετικού χάρτη του είδους**.

Θα πρέπει να υπογραμμίσουμε εδώ ότι η εξακρίβωση ότι ένας δείκτης είναι συνδεδεμένος με το επιθυμητό χαρακτηριστικό δεν είναι αρκετή. Η χρησιμοποίηση του

γενετικού δείκτη στην επιλογή προϋποθέτει ότι είναι πολύ στενά συνδεδεμένος με το επιθυμητό χαρακτηριστικό (π.χ. σε απόσταση μικρότερη από 5 centimorgan) διαφορετικά η επιλογή δεν θα είναι αξιόπιστη λόγω του ανασυνδυασμού που μπορεί να προκύψει από την ύπαρξη crossing-over.

Όμως, ακόμη και ένας δείκτης στενά συνδεδεμένος με το χαρακτηριστικό για να βοηθήσει πρακτικά την επιλογή του πρέπει να έχει και άλλες ιδιότητες όπως:

- **Να είναι εύκολη η αναγνώριση** όλων των φαινοτύπων του.
- **Να εκδηλώνεται πρώιμα** στη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού.
- **Να μην αλληλεπιδρά με άλλα γονίδια-δείκτες** (απουσία επίστασης) έτσι ώστε ένα φυτό να μπορεί να αξιολογείται ταυτόχρονα για πολλούς δείκτες.

Στην πράξη, οι γενετικοί δείκτες σπάνια πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις. Διάφορες εκδηλώσεις όπως κυριαρχία, επίσταση, πλειοτροπισμός ή όψιμη εκδήλωση είναι πολύ συνηθισμένες, με αποτέλεσμα λίγοι μόνο από αυτούς να μπορούν να διευκολύνουν την επιλογή.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η αξιολόγηση και η μελέτη εγχώριων και εμπορικών ποικιλιών και υβριδίων μελιτζάνας με χρήση γενετικών δεικτών και μορφολογικών χαρακτήρων. Η συγκεκριμένη μελέτη έγινε με σκοπό να μελετηθούν οι συγκεκριμένες ποικιλίες και υβρίδια προκειμένου να συγκριθούν ως προς διάφορα χαρακτηριστικά τους καθώς και να αναδειχθούν μορφολογικοί και γενετικοί δείκτες με πιθανή εφαρμογή σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης. Χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι εξαγωγής DNA από σπόρους μελιτζάνας, ενίσχυσης συγκεκριμένων γενετικών δεικτών με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (PCR), ενώ για τη συγκριτική μελέτη εγχώριων και εισαγομένων ποικιλιών και υβριδίων μελιτζάνας έγινε χρήση μορφολογικών χαρακτήρων οι οποίοι επιλέχθηκαν και κωδικοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες που προτείνονται από το διεθνές δίκτυο *EGGNET* (*eggplant genetic resources network*).

Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν οι εξής τοπικές ποικιλίες και υβρίδια μελιτζάνας :

- 1) Τσακόνικη
- 2) Σκούταρι
- 3) Άσπρη Λέρου
- 4) Λαγκαδά
- 5) Έμι
- 6) Σαντορίνη
- 7) Μελίτων F1

Μαζί με τις:

- 8) RNL 566 (προέρχεται από το Τόγκο, Αφρικής)
- 9) Money Maker (Ιαπωνικής προέλευσης)
- 10) Wasesinkuro(Ιαπωνικής προέλευσης,ομοίως)
- 11) Black beauty

που προέρχονται από το εξωτερικό

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τη διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής χρησιμοποιήθηκαν σπόροι από διάφορες ποικιλίες μελιτζάνας. Τους σπόρους τους προμηθευτήκαμε από εταιρείες με σπορόφυτα και το Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικών Ερευνών (ΕΘΙΑΓΕ)-Τράπεζα Γενετικού Υλικού.



Εικόνα 16 : Σπόροι μελιτζάνας

ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟ

Η καλλιέργεια των φυτών πραγματοποιήθηκε στο έδαφος υαλόφρακτου θερμοκηπίου της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του ΤΕΙ Μεσολογγίου, την περίοδο Μαρτίου-Ιουλίου χρησιμοποιώντας συνήθεις καλλιεργητικές τεχνικές και ακολουθώντας το σχέδιο τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων με 3 επαναλήψεις.

Στα φυτά όλων των ποικιλιών και υβριδίων πραγματοποιήθηκε υποστύλωση και κλάδεμα σύμφωνα με το διστέλεχο σύστημα. Μετρήσεις έγιναν σε 2 φυτά από κάθε επανάληψη.

Για την μορφομετρική μελέτη οι χαρακτήρες που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν και κωδικοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες που προτείνονται από το διεθνές δίκτυο *EGGNET* (*eggplant genetic resources network*). Αφορούν χαρακτήρες βλαστικής ανάπτυξης καθώς και μορφολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων και του καρπού.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΛΑΦΟΥΣ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΗ ΛΙΠΑΝΣΗ

Πριν τη μεταφύτευση έγινε προετοιμασία εδάφους, δηλαδή, απομακρύνθηκαν τα υπολείμματα της προηγούμενης καλλιέργειας και έγινε φρεζάρισμα του χώρου με προσθήκη βασικής λίπανσης.

ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΦΥΤΩΝ

Σε κάθε θέση σταλάκτη ανοίχτηκε οπή βάθους 10 cm, στην οποία τοποθετήσαμε λίπασμα και στη συνέχεια έγινε η μεταφύτευση των φυτών με μπάλα χώματος. Τα φυτά βρίσκονταν στο στάδιο των 6-7 πραγματικών φύλλων και είχαν ύψος περίπου 10-15 cm. Η φύτευση έγινε σε διπλές γραμμές που είχαν απόσταση 50 cm και αφέθηκαν διάδρομοι μεταξύ των διπλών γραμμών πλάτους ενός μέτρου. Η απόσταση των φυτών επί των γραμμών ήταν 50 cm. Αμέσως μετά την εγκατάσταση των φυτών στην τελική τους θέση ακολούθησε πότισμα για την καλύτερη επαφή και ανάπτυξη των ριζών στο έδαφος του θερμοκηπίου. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε τυχαία σειρά έτσι ώστε τα αποτελέσματα του πειράματος να είναι αντικειμενικά. Συνολικά είχαμε 18 γραμμές.

ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΛΙΠΑΝΣΗ

Για μία ικανοποιητική παραγωγή, η καλλιέργεια μελιτζάνας πρέπει να έχει στη διάθεσή της, την κατάλληλη χρονική περίοδο, ικανοποιητικές ποσότητες σε μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία. Τα απαιτούμενα θρεπτικά στοιχεία δόθηκαν στην καλλιέργεια με επιφανειακή λίπανση, συνήθως σε συνδυασμό με την άρδευση, και σε αναλογίες που εξαρτήθηκαν από τις συνθήκες αναπτύξεως των φυτών. Καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος λοιπόν γίνονταν λίπανση με χρήση λιπάσματος τύπου 19-19-19 + ιχνοστοιχεία.

ΥΠΟΣΤΥΛΩΣΗ ΚΑΙ ΚΛΑΔΕΜΑ

Μετά την εγκατάσταση των φυτών στο θερμοκήπιο, και αφού τα φυτά είχαν ύψος 30 cm περίπου, δέθηκαν τα κεντρικά στελέχη με σπάγκο και τα «οδηγήσαμε» σε οριζόντια σύρματα που βρίσκονται σε ύψος 2 m από το έδαφος. Την ίδια χρονική περίοδο εκφύονταν τα πρώτα άνθη που σήμαινε και την εμφάνιση των πρώτων δυνατών πλευρικών βλαστών. Έως τα πρώτα 30 cm αφαιρέθηκαν όλα τα γερασμένα, ταλαιπωρημένα φύλλα αλλά και οι πλάγιοι βλαστοί πριν αυτοί ξεπεράσουν τα 5-10 cm.

Το σύστημα κλαδέματος που ακολουθήσαμε ήταν το διστέλεχο σύστημα. Σύμφωνα με αυτό αφήνεται το κεντρικό στέλεχος και ένας δυνατός, εύρωστος, υγιής πλάγιος βλαστός σε ύψος άνω των 30 cm. για να οδηγηθούν στο οριζόντιο σύρμα.



Εικόνα 17 : Φυτά μελιτζάνας ποικιλία Λευκή Σαντορίνης

ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ

Ο χρόνος που μεσολάβησε από την σπορά μέχρι την έναρξη της συγκομιδής ήταν περίπου 3 μήνες. Κριτήρια συλλεκτικής ωριμότητας αποτελούσε το ξεθώριασμα του χρώματος της μύτης των καρπών (απέναντι από το μίσχο) και σταδιακά το ξεθώριασμα προς τον κάλυκα, το γυάλισμα της επιφάνειας των καρπών, η ευκολία συμπίεσης των καρπών και το μέγεθός τους. Η αφαίρεση των καρπών γινόταν με μαχαίρι ή ψαλίδι και μέρος του μίσχου κοβόταν μαζί με τον καρπό. Οι καρποί αμέσως μετά την κοπή τους, τοποθετούνταν στον διάδρομο του θερμοκηπίου και στη συνέχεια ζυγίζονταν και μεταφέρονταν στο εργαστήριο για να παρθούν οι μετρήσεις. Η συχνότητα συγκομιδής ήταν 3-4 φορές την εβδομάδα.

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

Σε κάθε γενότυπο έγιναν οι παρακάτω μετρήσεις:

- Ανάπτυξη φυτού
- Ύψος του φυτού
- Φύλλα μέχρι το 1^ο άνθος
- Αριθμός ανθέων ανά ταξιανθία
- Ημέρες μεταφύτευσης μέχρι δέσιμο 1^ο καρπού
- Ακανθες φύλλου
- Πλάτος φύλλου

- Μήκος φύλλου
- Μήκος μίσχου φύλλου
- Γωνία φύλλου
- Σχήμα φύλλου
- Μήκος καρπού
- Διάμετρος καρπού
- Βάρος καρπού
- Μήκος ποδίσκου
- Ακανθες κάλυκα
- Σχήμα καρπού
- Χρώμα καρπού
- Χρώμα σάρκας
- Καμπυλότητα
- Αναλογία

Ακολούθησε κωδικοποίηση των τιμών σύμφωνα με τις οδηγίες της *Eggnet*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Οι μορφολογικοί χαρακτήρες και οι τιμές με το εύρος τους που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη μετά την κωδικοποίηση.

Χαρακτήρας	Εύρος τιμών (κλίμακα)
Ανάπτυξη φυτού	1-9 [ορθόκλαδη – έρπουσα]
Ύψος φυτού	cm
Αρ. φύλλων μέχρι 1 ^ο άνθος	αριθμός
Ανθη/ταξιανθία	αριθμός
Ημ. Μεταφυτ. δεσ. 1 ^{ου} καρπού	αριθμός
Αρ. ακανθ. φύλλου	0-9 [0- πολλές >20]
Μήκος φύλλου	1-9 [3=10 cm, 5=20 cm, 7=30 cm]
Πλάτος φύλλου	1-9 [3=5 cm, 5=10 cm, 7=15 cm]
Μήκος μίσχου	cm
Γωνία φύλλου	1-9 (οξεία – αμβλεία)
Σχήμα φύλλου	1-9 [επίπεδο-κυρτό]
Διάμετρος καρπού	1-9 [1<1 cm, 9>10 cm]
Μήκος καρπού	1-9 [1<1 cm, 9>20 cm]
Μήκος ποδίσκου	cm
Βάρος καρπού	gr
Ακανθες κάλυκα	0-9 [0, 9=πέρα πολλές>30]
Σχήμα καρπού	1-9 [ευρύτερο μέρος σε σχέση με κορυφή βάση]
Χρώμα καρπού	1-9 [1=λευκό, 9=μαύρο κατά Methuen]
Χρώμα σάρκας	1-9 [3=λευκό, 5=ενδιάμεσο, 7=πράσινο]
Καμπυλότητα	1-9 [1=καμμία, σχήμα U]
Αναλογία μήκους πλάτους	1-9 [1=πολύ ευρύ, 9=στενόμακρο]

Στη συνέχεια η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των μορφολογικών χαρακτήρων έγινε με το στατιστικό πακέτο JMP 8 (<http://www.jmp.com/>).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Μέχρι πριν από λίγα χρόνια η απομόνωση του DNA από φυτικά κύτταρα ήταν μια αρκετά δύσκολη και περίπλοκη διαδικασία. Η δυσκολία εστιαζόταν σε δύο σημεία: α) στην θραύση των φυτικών κυττάρων (λόγω του κυτταρικού τοιχώματος) και β) στην απομόνωση του DNA, η κατακρίμνηση του οποίου παρεμποδιζόταν από διάφορες του φυτού. Σήμερα, η δυσκολία αυτή έχει ξεπεραστεί σε μεγάλο βαθμό και υπάρχουν μέθοδοι απομόνωσης DNA από φυτικά κύτταρα εύκολες και οικονομικές. Η απομόνωση DNA γίνεται από υλικό (φύλλα σπόρους οφθαλμούς) που πρέπει να είναι σε καλή κατάσταση, αποθηκευμένο σε ξηρό μέρος ούτως ώστε να μην επηρεάζεται από εξωτερικούς παράγοντες.

Παρακάτω θα περιγράψουμε μια τέτοια μέθοδο απομόνωσης από σπόρους μελιτζάνας σύμφωνα με τη μέθοδο CTAB.

Τα στάδια που ακολουθήσαμε είναι τα εξής:

1. Οι σπόροι επωάζονται από το προηγούμενο βράδυ στους 50°C μέσα σε σωληνάκι τύπου erpendorf του 1,5ml, σε 200λ διαλύματος CTAB.
2. Ακολουθεί ομογενοποίηση με έμβολο και προσθήκη 1λ proteinase k από στοκ 20mg/ml .
3. Το μίγμα επωάζεται στους 60°C για 30min .
4. Νέα ομογενοποίηση και προσθήκη 300λ προθερμασμένου CTAB.
5. Επώαση στους 60°C για 30min.
6. Προσθήκη ίσου όγκου (500λ) διαλύματος χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1).
7. Αναδευση και φυγοκέντρωση για 10min στις 10.000 rpm .
8. Μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf και προσθήκη ίσου όγκου (450λ) διαλύματος χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1).
9. Ξανά ανάδευση για 5min.
10. Φυγοκέντρωση για 10min στις 10.000 rpm.
11. Μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf και προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης.
12. Ανάδευση 1min σε vortex .
13. Τοποθέτηση στους -20oC για τουλάχιστον 30min. Εναλλακτικά, η αποθήκευση μπορεί να γίνει overnight.
14. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 20min στους 4°C.
15. Το υπερκείμενο αποχύνεται και προστίθεται 1ml αιθανόλης 70%.
16. Φυγοκέντρωση για 20min στους 4°C.
17. Το υπερκείμενο αποχύνεται και κρατάμε το ίζημα.

18. Το ίζημα ξηραίνεται τοποθετώντας τα σωληνάκια σε θερμοκρασία 37°C (τα καπάκια ανοικτά) .
19. Επαναδιάλυση σε 50λ ddH₂O και αποθήκευση στους -20 °C.

ΕΛΕΓΧΟΣ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωθέντος DNA γίνεται με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος που στηρίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα μακρομόρια όπως το DNA, RNA και πρωτεΐνες, διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους καθόσον είναι ηλεκτρικά φορτισμένα. Άρα όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, κινούνται με ταχύτητα που εξαρτάται από τον λόγο του ηλεκτρικού φορτίου προς την μάζα τους.

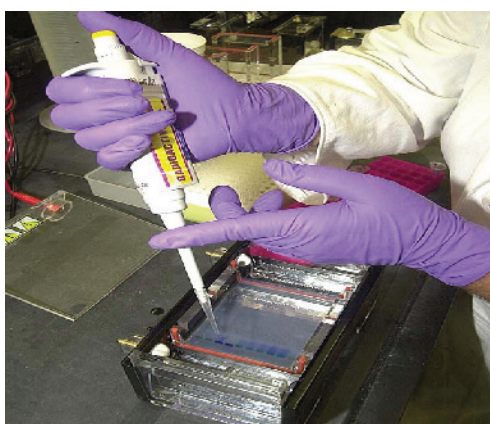
Τα νουκλεϊκά οξέα είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα, λόγω των φωσφορικών τους ομάδων, με αποτέλεσμα να κινούνται προς τον θετικό πόλο κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης, αρχικά αναμιγνύουμε σε ειδική κωνική φιάλη 1,5 gr αγαρόζης με 100 ml διαλύματος TAE 1X . Στη συνέχεια, το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το σημείο βρασμού. Έπειτα για να κρυώσει το διάλυμα, τοποθετείται κάτω από συνεχή ροή νερού βρύσης και αναδεύεται κυκλικά. Αμέσως μετά προσθέτουμε 5ml διαλύματος 1% βρωμιούχου αιθιδίου και αναδεύουμε. Ακολουθεί η έκχυση του διαλύματος σε ειδικό πλαίσιο, και απομακρύνονται οι φυσαλίδες που πιθανόν έχουν δημιουργηθεί. Σε ειδικές εγχοπές του πλαισίου τοποθετούμε μια "χτένα" η οποία δημιουργεί "πηγαδάκια". Αφού πήξει η αγαρόζη, αφαιρείται η χτένα προσεκτικά από τη πηκτή. Με αυτόν τον τρόπο έχουν σχηματιστεί τα πηγαδάκια μέσα στην πηκτή στα οποία τοποθετείται η ποσότητα του DNA που επιθυμούμε να ηλεκτροφορηθεί.



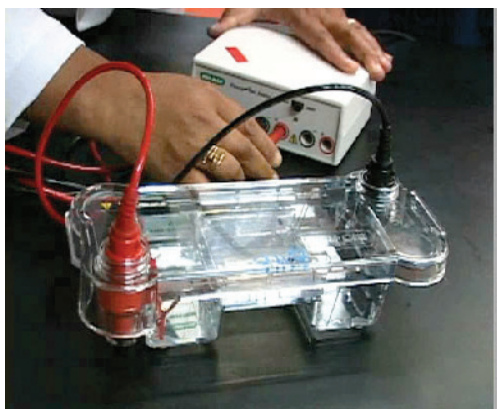
Εικόνα 18 : Δημιουργία πηκτής αγαρόζης



Εικόνα 19 : Φόρτωση δειγμάτων σε πηκτική αγαρόζης

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τοποθετούμε την πηκτική αγαρόζης μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει 700 ml διαλύματος TAE 1X. Για κάθε δείγμα, αναμιγνύουμε πάνω σε ειδική επιφάνεια parafilm 5μl διαλύματος DNA με 1μl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer). Κάθε δείγμα τοποθετείται σε ξεχωριστό πηγαδάκι της πηκτικής, με τη βοήθεια μιας μικροπιπέτας. Μετά το τέλος της διαδικασίας, συνδέουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τροφοδοτικό μηχάνημα και εφαρμόζουμε ηλεκτρικό πεδίο (120 Volts, 90 mAmps). Εφόσον γνωρίζουμε ότι το DNA αρνητικά φορτισμένο λόγω της φωσφορικής του ομάδας, τα μόρια του DNA θα μετακινηθούν προς την άνοδο. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι περίπου 1 ώρα.



Εικόνα 20 : Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης γίνεται ορατό με τη βοήθεια συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV), ώστε να μπορούμε να δούμε με ευκρίνεια τις ζώνες που έχουν δημιουργηθεί εκμεταλλευόμενοι τη δεσμευση του βρωμιούχου αιθιδίου στις φωσφοδιεστερικές ομάδες του DNA. Εάν η απομόνωση είναι επιτυχής, το DNA θα εμφανίζεται σαν μία φωτεινή ζώνη επάνω στην πηκτική αгарόζης. Το μηχάνημα συνδέεται με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μέσω ενός ειδικού λογισμικού προγράμματος, γίνεται η επεξεργασία και η αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 21 : Ειδικό μηχάνημα απεικόνισης DNA

ΑΛΥΣΙΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης επινοήθηκε στα μέσα της δεκαετίας του '80 από τον KaryMullis. Χάρη στη δυνατότητα απομόνωσης καθαρής DNA

πολυμεράσης, καθώς και στη χημική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων, σε μεγάλες ποσότητες, πραγματοποιήθηκε ο πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA χωρίς τη χρήση της τεχνικής της κλωνοποίησης και της μεταφοράς σε βακτηριακούς δείκτες.

Η PCR είναι μια πολύ γρήγορη τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρά τμήματα του DNA. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο γιατί για να γίνει ανάλυση του DNA σε μοριακό επίπεδο, είναι απαραίτητες αρκετά μεγάλες ποσότητες του DNA. Απομονωμένα τμήματα DNA θα ήταν αδύνατο να μελετηθούν επαρκώς χωρίς την μέθοδο της PCR, λόγω του πολύ μικρού τους μεγέθους. Με τον όρο «αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης» (Polymerase Chain Reaction - PCR) αναφερόμαστε στην τεχνική που χρησιμοποιείται για την *in vitro* παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA.

Στα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η ελάχιστη ποσότητα αρχικού DNA, από την οποία είναι εφικτό να παραχθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα και με μικρό κόστος ανιχνεύσιμη ποσότητα συγκεκριμένης αλληλουχίας, όπως επίσης και η μη χρήση ραδιενεργών ισοτόπων για τη σήμανση και την ανίχνευση του DNA (Arnheim και Erlich 1992). Αντίθετα περιορισμό της μεθόδου αποτελεί η ανάγκη για αυστηρή τήρηση συνθηκών αποστείρωσης προς αποφυγή πιθανής μόλυνσης.

Η εφαρμογή της τεχνικής της PCR απαιτεί τα ακόλουθα:

Πρότυπο DNA

Ποσότητα δίκλωνου DNA που περιέχει την αλληλουχία που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε και παίζει το ρόλο μήτρας (template DNA). Δεν είναι απαραίτητο η αλληλουχία αυτή να είναι απομονωμένη, εφόσον το κομμάτι που θα πολλαπλασιαστεί θα καθοριστεί από τα ολιγονουκλεοτίδια έναρξης (primers) που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση.

Ταq πολυμεράση

Ειδική θερμοσταθερή DNA πολυμεράση (Taq), που έχει απομονωθεί από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* από τα αρχικά του οποίου προέρχεται η ονομασία Taq και παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε θερμοκρασίες έως 95°C

Ολιγονουκλεοτίδια έναρξης (primers)

Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων έναρξης (primers), που καθορίζουν το σημείο έναρξης της σύνθεσης DNA και των οποίων το μήκος κυμαίνεται μεταξύ 20-30 ζεύγων βάσεων. Επειδή η δράση της Taq πολυμεράσης ξεκινά από το 3' άκρο του

ολιγονουκλεοτιδίου έναρξης, είναι απαραίτητο να υπάρχει απόλυτη ομολογία του συγκεκριμένου σημείου με το DNA στόχο.

Επίσης είναι σημαντικό τα ολιγονουκλεοτίδια έναρξης να έχουν παρεμφερή σημεία τήξης (T_m), ομοιόμορφη σύσταση (περίπου 50% GC), να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα ώστε να αποτρέπεται ο σχηματισμός ετεροδιμερών μεταξύ τους και σε κανένα από τα δύο να μην υπάρχει η πιθανότητα σχηματισμού δευτεροταγούς δομής.

dNTPs

Διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) σε ίση συγκέντρωση από το κάθε ένα από τα dATP, dCTP, dGTP, dTTP, τα οποία θα αποτελέσουν δομικά συστατικά των νέων αλυσίδων DNA.

MgCl₂

Διάλυμα ιόντων Mg^{2+} που παρέχονται με τη μορφή διαλύματος $MgCl_2$ και τα οποία δρουν ως προσθετική ομάδα, καθώς είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης. Η τελική συγκέντρωση των ιόντων αυτών εξαρτάται από την παρουσία EDTA και την αντίστοιχη των dNTPs.

Ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης

Για να δράσει το ένζυμο απαιτείται η ύπαρξη του κατάλληλου διαλύματος αντίδρασης (reaction buffer). Τα συστατικά που περιέχονται συνήθως στο διάλυμα αντίδρασης είναι : Tris-HCl για τη ρύθμιση του pH, KCl το οποίο διευκολύνει τον υβριδισμό των ολιγονουκλεοτιδίων έναρξης και αυξάνει τον ρυθμό σύνθεσης της συμπληρωματικής αλληλουχίας από την πολυμεράση, BSA ή ζελατίνη που βοηθούν στη σταθεροποίηση της Taq, καθώς και ένα μη ιονικό απορρυπαντικό όπως TritonX-100 ή NP-40 τα οποία βοηθούν στη σταθεροποίηση της δράσης της Tag.

Ο πολλαπλασιασμός της επιθυμητής αλληλουχίας λαμβάνει χώρα σε ειδική συσκευή (θερμοκυκλοποιητή) που ακολουθεί ένα καθορισμένο από το χρήστη πρόγραμμα αυξομειώσεων της θερμοκρασίας με κυκλικές επαναλήψεις

ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ PCR

1° Στάδιο: Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation)

Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 93-95 °C. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, δημιουργώντας μονόκλωνες αλυσίδες πάνω στις οποίες θα υβριδιστούν τα ολιγονουκλεοτίδια έναρξης.

2° Στάδιο: Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου

Πραγματοποιείται ο υβριδισμός του αποδιατεταγμένου πλέον DNA με τα ολιγονουκλεοτίδια έναρξης, σε θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 37°C και 60°C. Η επιλογή της καταλληλότερης θερμοκρασίας εξαρτάται από το σημείο τήξης (T_m) των ολιγονουκλεοτιδίων έναρξης και από την εξειδίκευση που εμφανίζουν αυτά ως προς την αλληλουχία-στόχο. Στο στάδιο αυτό ελέγχονται διάφορες θερμοκρασίες αντίδρασης και χρόνοι ώστε να προσδιοριστούν οι καταλληλότερες συνθήκες για τη δεδομένη αλληλουχία-στόχο.

3° Στάδιο: Επιμήκυνση εκκινητών (extension)

Πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72 °C . Εδώ επιμηκύνεται η αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων έναρξης, προσθέτοντας τα κατάλληλα 5' τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, σύμφωνα με την αλληλουχία της αλυσίδας-μήτρας.

Το τέλος του τρίτου σταδίου σηματοδοτεί και την ολοκλήρωση του πρώτου σταδίου της PCR, με αποτέλεσμα από την αρχική δίκλωνη αλυσίδα να δημιουργούνται de novo νέες θυγατρικές δίκλωνες αλυσίδες.

Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται για n κύκλους, που συνήθως κυμαίνονται μεταξύ 30 και 40 κύκλων. Στο τέλος n τέτοιων κύκλων, η αντίδραση περιέχει θεωρητικά $2n$ δίκλιωνα DNA μόρια που είναι αντίγραφα της αλληλουχίας του DNA που υπάρχει ανάμεσα στους primers. Πιο συγκεκριμένα περιέχονται: $(2n-2n) \times$ μόρια όπου: n =αριθμός κύκλων, $2n$ =δίκλιωνα μόρια με ακαθόριστο μήκος και x =αριθμός αντιγράφων από την αρχική μήτρα. Τέλος για να καλυφθούν τυχόν εναπομείναντες μονόκλωνες περιοχές, το μίγμα αντίδρασης αφήνεται στους 72 °C για 5-10 min, για να προσθέσει νουκλεοτίδια η Taq πολυμεράση.

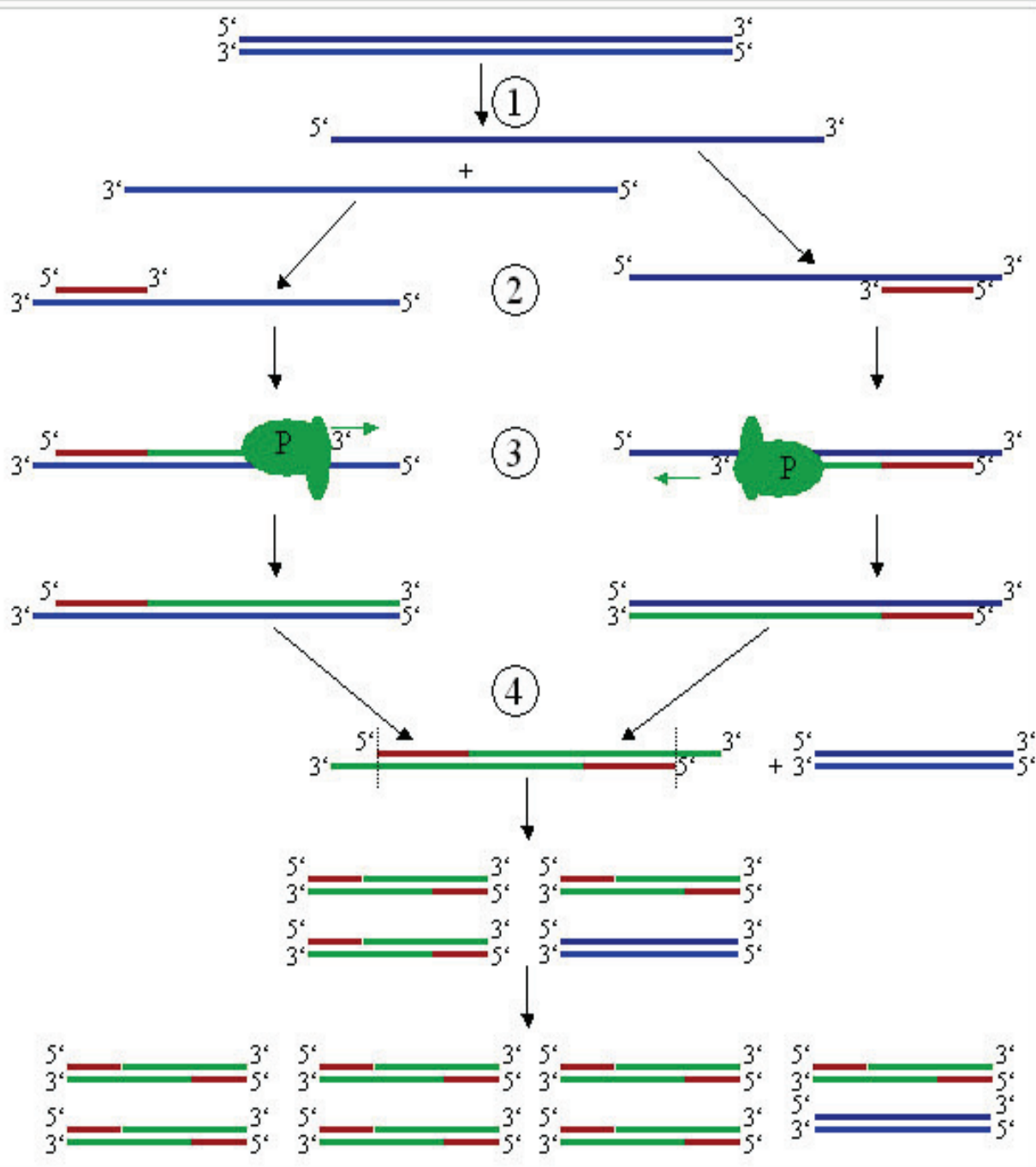


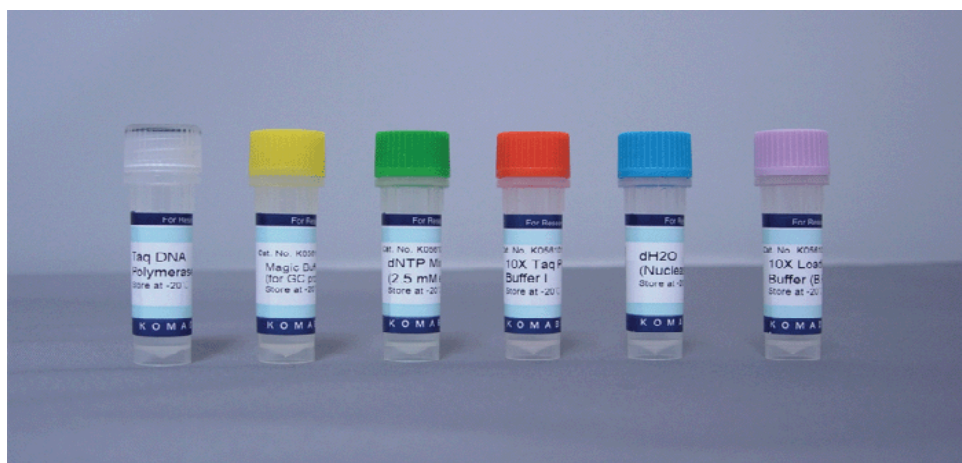
Figure 2: Schematic drawing of the PCR cycle. (1) Denaturing at 94-96°C. (2) Annealing at (eg) 68°C. (3) Elongation at 72°C (P=Polymerase). (4) The first cycle is complete. The two resulting DNA strands make up the template DNA for the next cycle, thus doubling the amount of DNA duplicated for each new cycle.

Εικόνα 22: Βασικά στάδια μεθόδου PCR

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΤΗΣ PCR

Τα υλικά που χρησιμοποιήσαμε ήταν τα εξής:

- 1) PCR Buffer 10x
- 2) DNTP mix
- 3) MgCl₂
- 4) SsDNA
- 5) primer
- 6) H₂O
- 7) Taq



Εικόνα 23 : Αντιδραστήρια της PCR

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε όλα τα φυτά παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα:

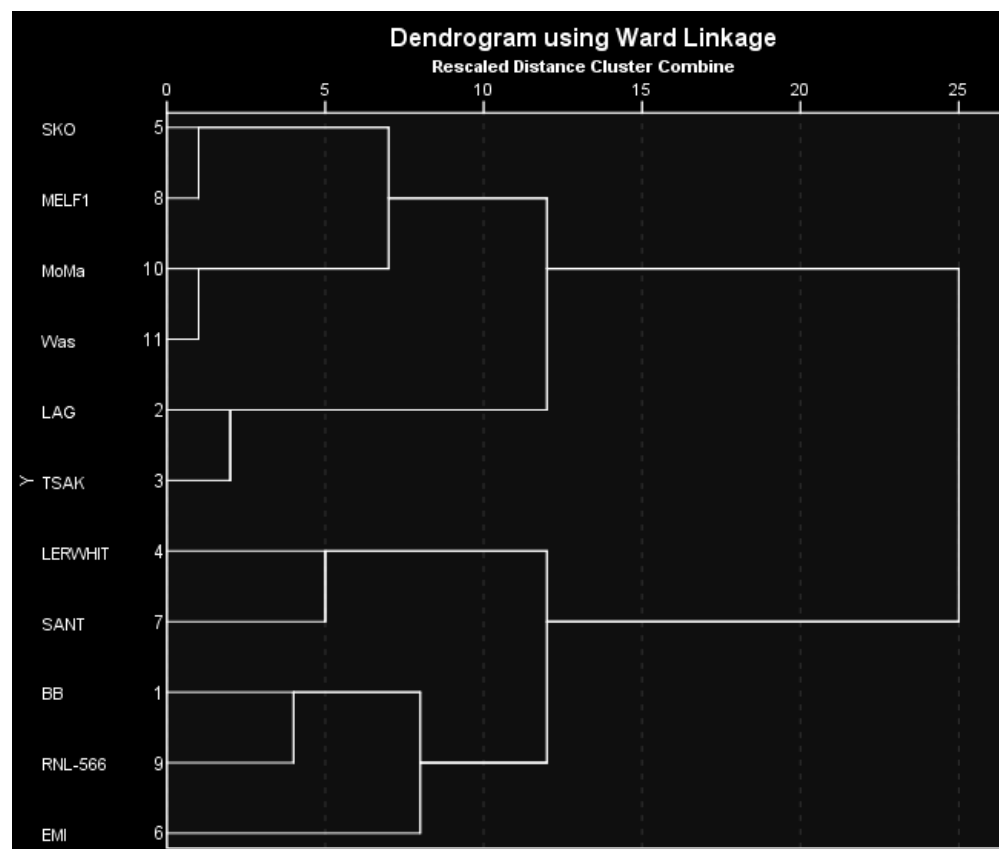
Πίνακας 6: Αποτελέσματα μετρήσεων μορφολογικών χαρακτήρων του πειράματος

Μετά από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το στατιστικό πακέτο JMP 8 τα αποτελέσματα για τις συνεχείς ποσοτικές μεταβλητές (μο και τυπική απόκλιση) συνοψίζονται στον επόμενο πίνακα:

	Mean	Std. Deviation
Ύψος Φυτού	72,27273	17,283305
Αριθμός ανθέων ανα ταξιανθία	1,14764	,182424
Μήκος ελασματος φύλλου	30,64991	3,538757
Πλάτος ελάσματος φύλλου	21,53027	3,525335
Μήκος μίσχου φύλλου	9,63491	1,769728
Πλάτος καρπού	78,71227	15,873730
Μήκος καρπού	15,68482	4,023902
Μήκος ποδίσκου καρπού	5,37564	1,240889
Βάρος καρπού	290,15009	51,353587

Πίνακας 7: Ποσοτικές μεταβλητές

Με βάση τα μορφομετρικά αποτελέσματα κατασκευάστηκε δενδρόγραμμα κατά Ward το οποίο παρουσιάζεται στην επόμενη εικόνα

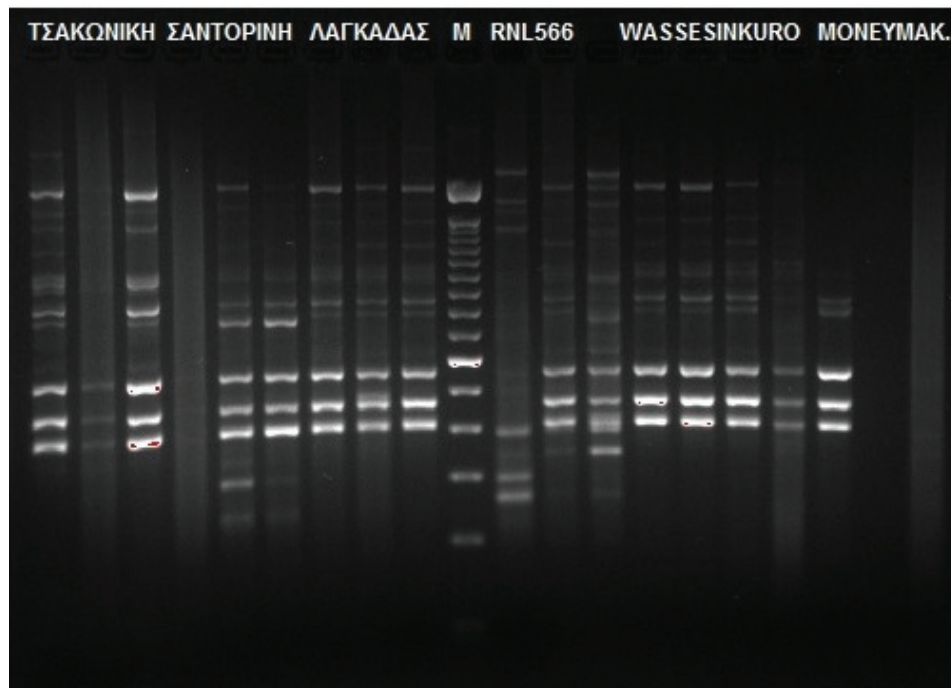


Διαγραμμα 2: Δενδρόγραμμα κατά Ward

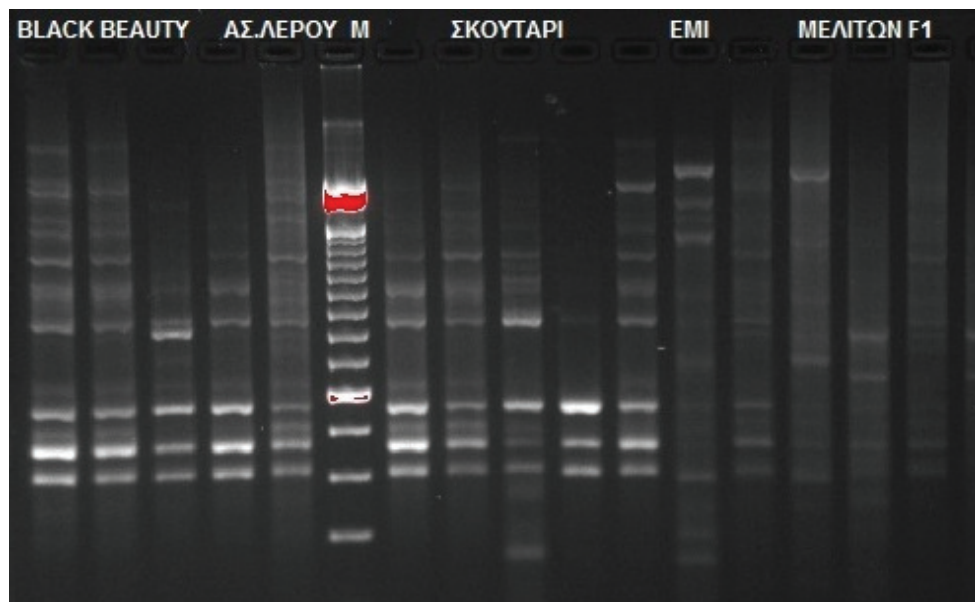
Σύμφωνα με το παραπάνω δένδρόγραμμα οι ποικιλίες που μελετήθηκαν διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες. Η διάκριση αυτή βασίζεται κυρίως σε δυο χαρακτηριστικά το σημαντικότερο των οποίων είναι το σχήμα του καρπού. Όπως παρατηρούμε οι φλάσκες ποικιλίες (Σαντορίνη, ΕΜΙ κλπ) ομαδοποιούνται όπως αντίστοιχα συμβαίνει και με τις επιμήκεις (Τσακωνική, Λαγκαδά). Επιπλέον ομαδοποίηση προκύπτει με βάση το χρώμα στις ποικιλίες Σαντορίνη και Άσπρη Λέρου ενώ αναμενόμενη είναι και η ομαδοποίηση των 2 ιαπωνικών ποικιλιών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR

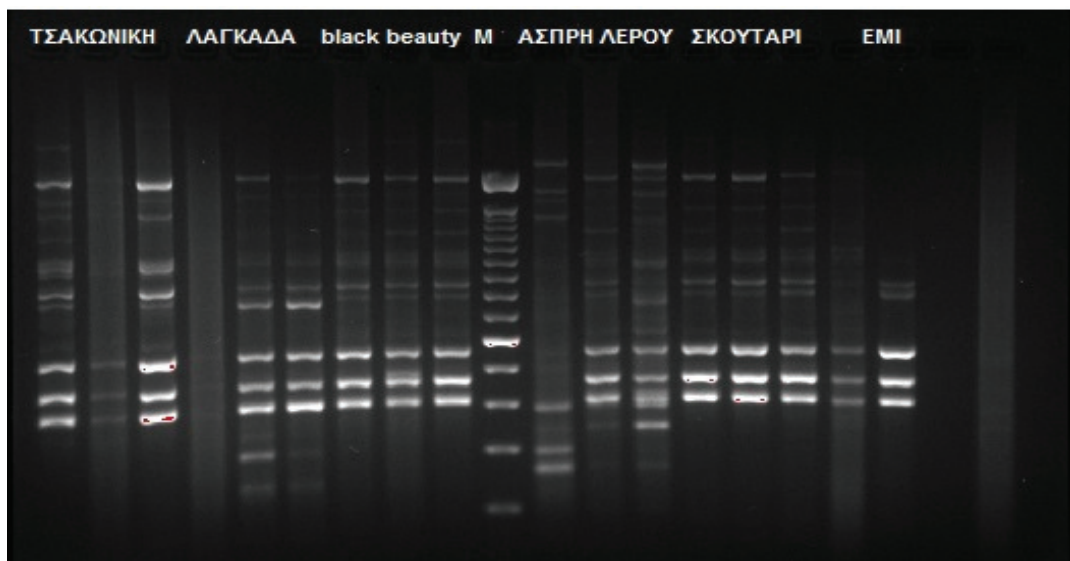
Οι παρακάτω εικόνες προέκυψαν με βάση τις αντιδράσεις ISSR-PCR και τους δείκτες 811, 9900F, 807



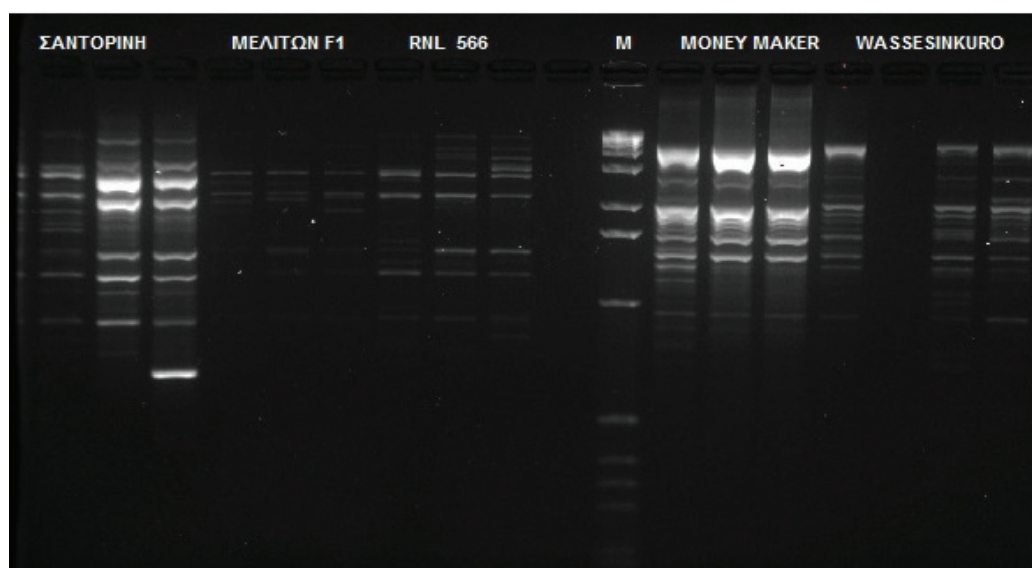
9900F a



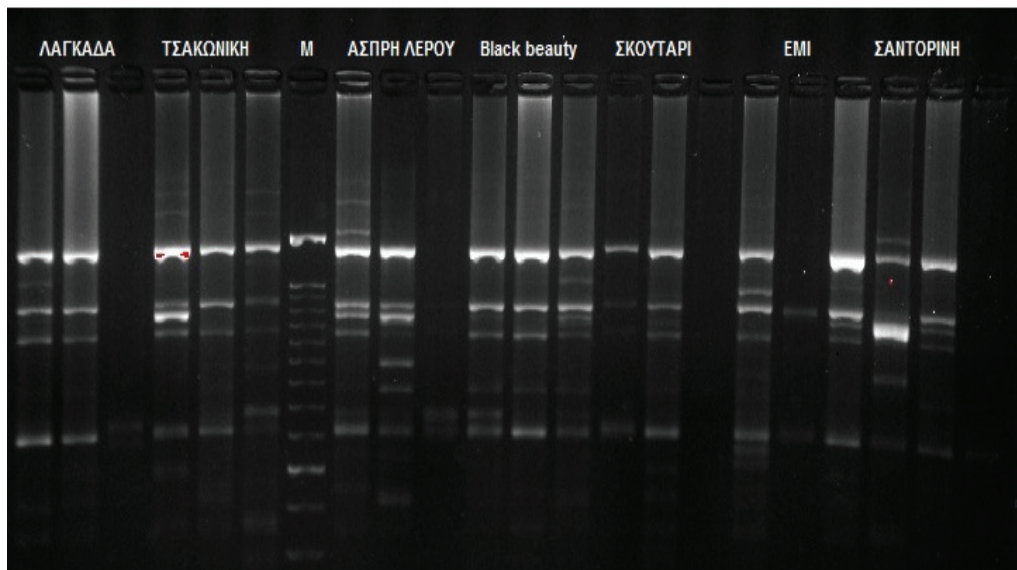
9900F b



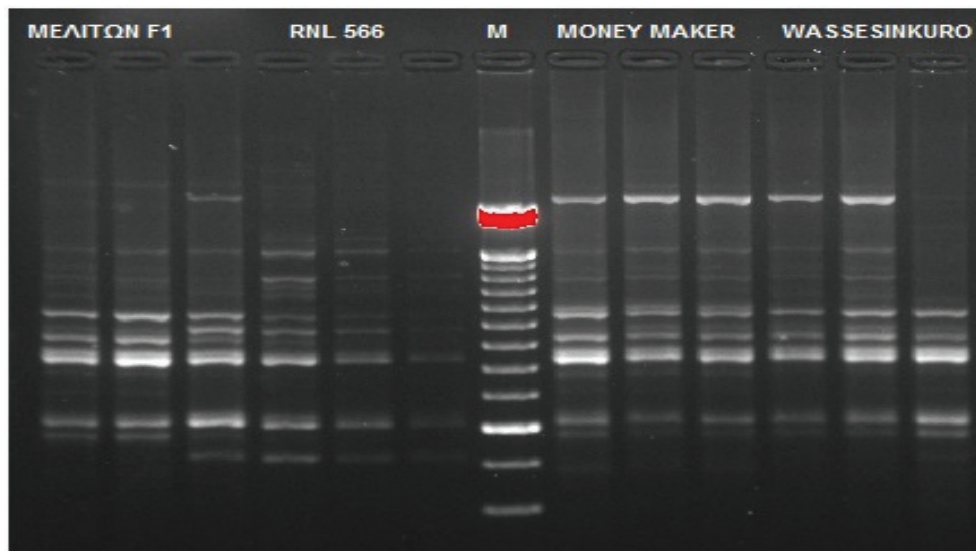
811 a



811 b



807 a



807 b

Η διάκριση μεταξύ των ποικιλιών με βάση τους μοριακούς δείκτες που εξετάσαμε μπορεί να γίνει από τα διαφορετικά ηλεκτροφορητικά πρότυπα που προκύπτουν μεταξύ των ποικιλιών μετά την ενίσχυση με PCR.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε αναφορικά με τα μορφομετρικά στοιχεία μπορούμε να παρατηρήσουμε τα εξής:

Υπάρχει υψηλή παραλλακτικότητα ως προς διάφορα χαρακτηριστικά του φυτού και ιδιαίτερα ως προς το ύψος του φυτού και το βάρος του καρπού.

Συγκεκριμένα οι ποικιλίες με το μεγαλύτερο ύψος ήταν κατά σειρά οι:

- 1) Μελίτων F1
- 2) Σκούταρι
- 3) Money maker
- 4) Λαγκαδά
- 5) Wassesinkuro
- 6) Σαντορίνη
- 7) Black beauty
- 8) RNL 566
- 9) Τσακόνικη
- 10) EMI
- 11) Ασπρη Λέρου

Ενώ αυτές με το μεγαλύτερο βάρος επίσης κατά σειρά οι :

- 1) Μελίτων F1
- 2) EMI
- 3) Money Maker
- 4) Black beauty
- 5) Σαντορίνη
- 6) Wassesinkuro
- 7) Σκούταρι
- 8) Λαγκαδά
- 9) Ασπρη Λέρου
- 10) RNL 566
- 11) Τσακόνικη

Με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά οι ποικιλίες που μελετήθηκαν ομαδοποιήθηκαν σε δύο κύριες ομάδες. Η διάκριση αυτή βασίζεται κυρίως σε δύο χαρακτηριστικά το σημαντικότερο των οποίων είναι το σχήμα του καρπού.

Όπως παρατηρούμε οι φλάσκες ποικιλίες (Σαντορίνη, ΕΜΙ κλπ) ομαδοποιούνται όπως αντίστοιχα συμβαίνει και με τις επιμήκεις (Τσακωνική, Λαγκαδά). Επιπλέον ομαδοποίηση προκύπτει με βάση το χρώμα στις ποικιλίες Σαντορίνη και Άσπρη Λέρου ενώ αναμενόμενη είναι και η ομαδοποίηση των δύο ιαπωνικών ποικιλιών.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση DNA έδειξαν μεγάλη μείωση της γενετικής παραλλακτικότητας εντός των ποικιλιών και μεγάλη γενετική ομοιομορφία. Ταυτόχρονα όμως αποκαλύφθηκε και μικρό ποσοστό γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των ποικιλιών. Ως εκ τούτου αποκαλύφθηκε μικρός αριθμός δεικτών που θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως διαγνωστικοί για τη διάκριση των ποικιλιών ή και για τη συσχέτιση τους με φαινοτυπικούς δείκτες. Για παράδειγμα με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε από την ενίσχυση του εκκινητή 807 διακρίνονται οι Money Maker και Wassesinkuro από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Ομοίως με βάση τα πρότυπα που αποκαλύφθηκαν από την ενίσχυση του εκκινητή 9900F διακρίνονται οι ΕΜΙ και Μελίτων F1.

Είναι προφανές ότι απαιτούνται περισσότεροι και με διαφορετικό τρόπο κληρονόμησης δείκτες πχ μικροδορυφορικοί προκειμένου να αποκαλυφθεί η γενετική ποικιλότητα και να εκτιμηθεί η γενετική διαφοροποίηση των γενοτύπων που μελετήθηκαν ώστε να εξαχθούν διαγνωστικοί δείκτες που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

- Chloroform Isoamyl Alcohol (24:1)
- Isopropanol
- Αιθανόλη 70%
- TAE50x
- TAE1x
- EDTA
- Loading Buffer
- Gel αγαρόζης

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Fanourakis N., H. Pavlikaki and C.P. Navarro, 2004. Genetic relationships different Greek landraces of cucumber. *Euphytica Plant breeding* 136: 143-147
- Fowler, C. & Hodgkin, T. 2004. "Plant Genetic resources for food and agriculture: assessing global availability", *Annual Review of Environment and Resources*, Vol. 29:143-179
- Jacob, H.J., Lindpaintner, K., Lincoln, S. E., Kusumi, K., Bunker, R. K., Mao, Yi-Pei, Ganten, D. Dzau, V.J. and Lander, E.S., 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. *Cell* 67: 213-224
- Lande, R., 1991. Marker assisted selection in relation to traditional methods of plant breeding. In *Plant in the 1990s*. Edited by H. Stalker and J. Murphy. CAB International, Wallingford, U.K. pp. 437-451
- Landegren U., Nilsson M., Kwok P.-Y., 1998. Reading bits of genetic information: Methods for single – nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res.* 8:769-776
- Louette, D., A. Charrier, and J. Bertaud. 1997. In-situ conservation of maize in Mexico: genetic diversity and maize seed management in a traditional community. *Economic Botany* 51:20-38.
- Louwaars, N.P. 1994. Regulatory aspects of breeding for diversity, p. 105-114, In H. D. Cooper, et al., eds. *Broadening the genetic base of crop production*. CABI Publishing co published with Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Plant Genetic Resources Institute, UK.
- Love, B & Spaner, D. 2007. "A review of Agrobiodiversity: Its Value, Measurement, and Conservation (In Situ and Ex-Situ) in the Context of Sustainable Agriculture", *Journal of Sustainable Agriculture*, Vol. 31, Issue 2, 12/03/2007
Mapping of Domestication Traits in eggplant , *Genetics* 161: 1713-1726
- Marshall, D.R. and A.D.H. Brown 1975 Optimum sampling strategies in genetic conservation in crop genetic resources for today and tomorrow , O.H Frankel and J.G. Hawkes (eds) Cambridge: Cambridge University press
- N Arnheim. HA Erlich, 1992 Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annual review of genetics* 26 (1),
- Nothmann, J. and D. Koller. 1973(b). Morphogenetic effects of growth regulators on flowers of eggplants (*Solanum melongena* L.) *Hort. Res.*, 13:105-110
- Patterson H.D. and Weatherap S.T.C., 1984. Statistical criteria for distinctness between varieties of herbage crops. *J. agric. Sci., Camb.*, 102:59-68
- Qualset, C.O., and H.L. Shands. 2005. Safeguarding the future of U.S. agriculture: the need to conserve threatened collections of crop diversity worldwide University of

California, Division of Agriculture and Natural Resources, Genetic Resources Conservation Program, Davis, CA, USA.

- SAVE-Foundation. 2006. "Traditional Agro - Ecosystems", σελ. 2, διαθέσιμο στο <http://www.save-foundation.net/docu/en/TAES.pdf>
- Shiva, et al. 1991. *Biodiversity: Social and Economical Prospectives*, Zed Books Ltd. UK/USA and World Rainforest Movement, Malaysia, 1991
- Smale, M., and K. Day-Rubenstein. 2002. The demand for crop genetic resources: international use of the US national plant germplasm system. *World Development* 30:1639-1655.
- Sonnante G., Pignone D. 2001. Assessment of genetic variation in a collection of lentil using molecular tools. *Euphytica* 120: 301-307
- Spooner D., van Treuen R., de Vicente M.C. 2005. Molecular Markers for Genebank Management, IPGRI
- Tanksley S.D., Young N.D., Paterson A.H. and Bonierbale M.W., 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology* 7: 257-264
- Tripp. 1996. στο Almekinders, C. & de Boef, W., 1999, "The challenge of collaboration in the management of crop genetic diversity", ILEIA Newsletter, December 1999, διαθέσιμο στο www.metafro.be/leisa/1999/05-07.pdf
- UNCED. 1992. Convention on biological diversity United Nations Conference on Environment and Development, Geneva.
- Yang H. and Corban S.S., 1996. Screening apples for OPD20/600 using sequence specific - primers. *Theor. Appl. Genet.* 92: 263-266
- Zeven, A.C. 1996. Results of activities to maintain landraces and other material in some European countries in situ before 1945 and what we may learn from them. *Genetic Resources and Crop Evolution* 43:337-341.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-178

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ, 2^η Έκδοση, Εκδόσεις "ΙΩΝ", Δρ. Νικ. Φανουρακης Καθηγητής ΤΕΙ Ηρακλείου, Αθήνα 2005 (Σελ 271-276)
- ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ, ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΠΟΙΚΙΛΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΕΛΙΑΣ 'ΚΑΛΑΜΩΝ' ΚΑΙ 'ΚΟΡΩΝΕΪΚΗ' ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ, ΔΕΣΠΟΤΑΚΗ ΕΥΘΥΜΙΑ, ΑΘΗΝΑ 2010 ΣΕΛ. (21-23)

- Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑ, ΧΡΗΣΤΟΣ Μ. ΟΛΥΜΠΙΟΣ, ΕΚΔ. ΣΤΑΜΟΥΛΗ Α. Ε. ΑΘΗΝΑ 2001 (ΣΕΛ. 293-337)
- ΚΟΚΚΙΝΟΣ Ε. (2011). ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΦΟΙΝΙΚΟΔΕΝΔΡΩΝ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ.
- ΚΟΥΤΗΣ Κ., ΧΑΤΖΗΤΟΛΙΟΣ Π. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΤΗΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΝΤΟΠΙΟΥ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΛΟΥΤΟΥ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ.
- ΛΑΧΑΝΟΚΟΜΙΑ ΚΗΠΕΥΤΙΚΗ ΓΕΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗ, CIRO CIUFOLINI ΕΚΔ. ΨΥΧΑΛΟΥ 1979
- ΛΑΧΑΝΟΚΟΜΙΑ, Κ.Λ. ΔΗΜΗΤΡΑΚΗΣ, ΕΚΔ. ΑΓΡΟΤΥΠΟΣ Α. Ε. 1998, (ΣΕΛ.179-180)
- ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΣ Ν., ΣΑΜΑΡΑΣ Σ., ΜΑΤΘΑΙΟΥ Α. ΜΗ ΧΡΟΝΟΛΟΓΗΜΕΝΟ. "Η ΓΕΩΡΓΙΚΗ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΙΟΤΗΤΑ", ΔΙΑΘΕΣΙΜΟ ΣΤΟ <http://www.peliti.gr/georgiki%20biopikilotita.htm>
- ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΙΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ, ΑΛΕΞΗΣ ΠΟΛΥΔΩΡΟΣ ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΑΠΘ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2010 (σελ 15, 17)

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

- <http://molbiogen.blogspot.gr/2012/08/polymerase-chain-reaction.html>
- www.kpe-kastorkassch.gr
- www.en.wikipedia.org/wiki/eggplant

ΕΙΚΟΝΕΣ

- **ΕΙΚΟΝΑ 1:** ΑΝΘΟΣ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ. ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ, ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, «ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΠΤΑ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΣΠΡΗΣ “ΘΗΡΑΪΚΗΣ” ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ (SOLANUM MELONGENA L.) ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ IN VITRO», ΤΕΣΣΑΡΟΜΑΘΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007, (ΣΕΛ. 8)

- **ΕΙΚΟΝΑ 2 :** <http://www.panoramio.com/photo/28050432>
- **ΕΙΚΟΝΑ 3 :** <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Eggplantoutput.png>
- **ΕΙΚΟΝΑ 4 :** <http://www.geoponiki.gr>
- **ΕΙΚΟΝΑ 5 :** - Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑ, ΧΡΗΣΤΟΣ Μ. ΟΛΥΜΠΙΟΣ, ΕΚΔ. ΣΤΑΜΟΥΛΗ Α. Ε. ΑΘΗΝΑ 2001 (ΣΕΛ. 333-334 & 338-339)
- **ΕΙΚΟΝΑ 6 :** - Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑ, ΧΡΗΣΤΟΣ Μ. ΟΛΥΜΠΙΟΣ, ΕΚΔ. ΣΤΑΜΟΥΛΗ Α. Ε. ΑΘΗΝΑ 2001 (ΣΕΛ. 333-334 & 338-339)
- **ΕΙΚΟΝΑ 7 :** Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑ, ΧΡΗΣΤΟΣ Μ. ΟΛΥΜΠΙΟΣ, ΕΚΔ. ΣΤΑΜΟΥΛΗ Α. Ε. ΑΘΗΝΑ 2001 (ΣΕΛ. 333-334 & 338-339)
- **ΕΙΚΟΝΑ 8 :** <http://laspistasteria.wordpress.com/2007/07/06/kipos/>
- **ΕΙΚΟΝΑ 9 :**
http://agrena.gr/products/product_info.php?cPath=21_43&products_id=110
- **ΕΙΚΟΝΑ 10 :** Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑ, ΧΡΗΣΤΟΣ Μ. ΟΛΥΜΠΙΟΣ, ΕΚΔ. ΣΤΑΜΟΥΛΗ Α. Ε. ΑΘΗΝΑ 2001 (ΣΕΛ. 333-334 & 338-339)
- **ΕΙΚΟΝΑ 11 :** ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ, ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, «ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΠΤΑ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΣΠΡΗΣ “ΘΗΡΑΪΚΗΣ” ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ (SOLANUM MELONGENA L.) ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ IN VITRO», ΤΕΣΣΑΡΟΜΑΘΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007, (ΣΕΛ. 8)
- **ΕΙΚΟΝΑ 12 :**
http://agrena.gr/products/product_info.php?cPath=21_43&products_id=107
- **ΕΙΚΟΝΑ 13 :**
http://www.agropataki.ro/produse/seminte_de_legume/toate/vinete/2/en
- **ΕΙΚΟΝΑ 14:** :
- **ΕΙΚΟΝΑ 15 :** <http://ukrainemade.com/category/agriculture/9026/>

- **EIKONA 16** : www.eifelgarten.all.biz.com
- **EIKONA 17**: http://klearchosguidetothegalaxy.blogspot.gr/2008/03/blog-post_08.html
- **EIKONA 18**:
http://www.woodrow.org/teachers/esi/2002/biology/projects/lab_skills/ls4/agarose6.jpg
- **EIKONA 19**:
http://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/03bio/background/molecular/media/gel_plate_600.jpg
- **EIKONA 20**: <http://www.wellesley.edu/Biology/Concepts/Images/gel.jpg>
- **EIKONA 21**:
http://weizmanngroup.uchicago.edu/sites/weizmanngroup.uchicago.edu/files/styles/galleryimage/public/uploads/images/image_3.jpeg
- **EIKONA 22**:
http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/pcr.html
- **EIKONA23**:http://www.komabiotech.com/product/product_detail.php?item=K0567100