



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ
Τηλ: 2421 0 93136 & fax: 2421 0 93114
email: amavromat@agr.uth.gr

Αριθ. πρωτ: 114

Βόλος, 26-04-2007

ΤΕΛΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ

Κατόπιν αιτήσεως της εταιρίας PHARMAPLANT, δια του εκπροσώπου της **Καρυπίδη Λαμπριανού**, διενεργήθηκαν στο εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιτροπή Ερευνών /Κωδ. Έργου : 3185), μοριακές γενετικές αναλύσεις σε δείγματα φυτικού ιστού ακτινιδίου της διαλογής «cv. Tsechelidis». Οι αναλύσεις είχαν ως στόχο την ανάπτυξη του μοριακού profile (DNA-fingerprinting) της εν λόγω διαλογής και τη σύγκριση του με το αντίστοιχο της ποικιλίας Hayward ώστε να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές που είναι ικανές να διαφοροποιήσουν τις συγκρινόμενες ποικιλίες. Επίσης έγινε μελέτη των μορφολογικών γνωρισμάτων του καρπού, του βάρους των καρπών και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους σε σύγκριση με τους καρπούς της εμπορικής ποικιλίας Hayward.

(I) Μοριακή Ανάλυση

Η μοριακή ανάλυση έγινε με βάση την τεχνική PCR και βασίστηκε στην ανάλυση μικροδομοφορικών περιοχών (SSR's), η οποία θεωρείται ως η πλέον αξιόπιστη μέθοδος DNA αναλύσεων στο ακτινίδιο (Huang W.G, Cipriani G., Morgante M. και Testolin R.).

Συγκεκριμένα για την ανάλυση του γενωμικού DNA της ποικιλίας «cv. Tsechelidis» χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φυτικού υλικού από τέσσερις γενότυπους αναφοράς :

- (α) αρσενικός κλώνος που χρησιμοποιείται ως επικονιαστής της ποικιλίας Hayward,
- (β) ποικιλία Hayward
- (γ) αρσενικός γενότυπος που προήλθε από σπορόφυτο της Hayward
- (δ) ποικιλία «cv. Tsechelidis»

Η απομόνωση του DNA έγινε από δείγμα νεαρών φύλλων (*0.3 gr αρχικού ιστού) με τη μέθοδο της τροποποιημένης CTAB. Μετά την εξαγωγή του DNA έγινε ποσοτικός προσδιορισμός του με ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη με πρότυπο μάρτυρα το πλασμίδιο Φx 174. Η ποσότητα του DNA καθώς και η καθαρότητά του κρίθηκαν ικανοποιητικές.

Ακολούθησε μοριακή γενετική ανάλυση με χρήση PCR και ενίσχυση δεικτών μικροδορυφορικού DNA. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 13 εκκινητές που ενίσχυαν μικροδορυφορικές διβασικές αλληλουχίες του τύπου AG/CT και AC/GT.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές: UDK 96-022, UDK 97-402, UDK 99-152, UDK 96-053, UDK 97-411, UDK 96-030, UDK 96-001, UDK 96-037, UDK 96-034, UDK 99-168, UDK 96-092, UDK 97-406, UDK 97-407, οι οποίοι αναπτύχθηκαν στα πλαίσια διακρατικού προγράμματος συνεργασίας INCO-DC (Ιταλία (University of Udine), Κίνας (Chinese Agricultural University of Beijing), Γαλλίας (INRA) και Ελλάδος (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)) και αποτελούν τους πλέον αξιόπιστους δείκτες ανάλυσης σε γενετικό υλικό ακτινιδιάς του είδους *A. chinensis*.

Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR διαχωρίστηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (6%), πάχους 1.5 mm, στην οποία εφαρμόστηκε τάση 180 V για 1 ώρα και 30 λεπτά. Η εμφάνιση των ζωνών έγινε με την μέθοδο του νιτρικού αργύρου (εικ. 1-5).

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο διαχωρισμού των προϊόντων της PCR τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 7 από τους 13 εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν πολυμορφικοί ώστε διακρίνουν διαφορές μεταξύ των ποικιλιών «cv. Tsechelidis» και Hayward επιβεβαιώνοντας την διαφορετικότητα των δύο εξεταζόμενων γενοτύπων.

Στον πίνακα 1 που ακολουθεί φαίνονται οι διαφορές των δύο γενοτύπων σχετικά με την παρουσία ή απουσία αλληλομόρφων ιδίου μοριακού βάρους με βάση τους μοριακούς δείκτες που έδειξαν διαφορές

Στις εικόνες 4 και 5 του παραρτήματος φαίνονται χαρακτηριστικές και μη αμφισβητήσιμες διαφορές στη γενετική σύσταση των δύο γενοτύπων.

Η Σ
Α Γ Ω
σης
τήμης
κης
βέρσα

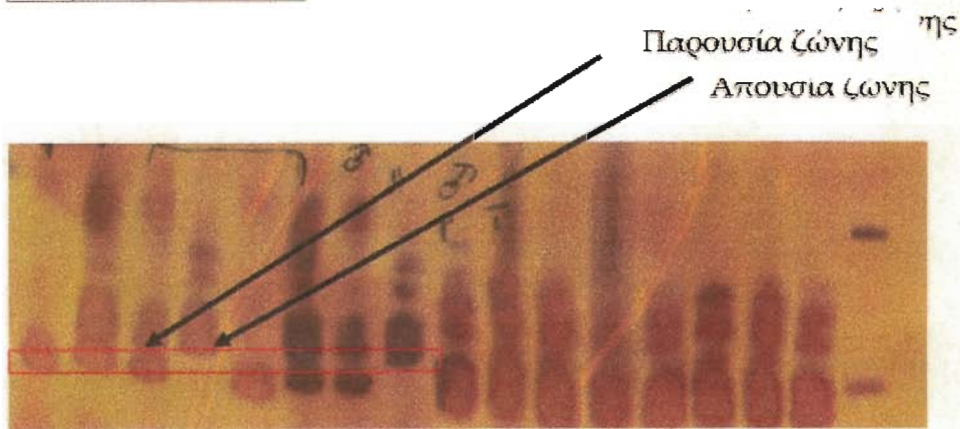
Τα δεδομένα συνηγορούν ότι με βάση την μοριακή γενετική ανάλυση με χρήση δεικτών μικροδορυφορικού DNA (SSR's), οι δύο γενότυποι είναι διαφορετικοί αφού εμφανίζουν πολυμορφισμό σε οκτώ (8) τουλάχιστον αλληλόμορφα όπως φάνηκε με την μεθοδολογία που ακολουθήθηκε και τους μοριακούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 1. Διαφορές των δύο γενότυπων με βάση την παρουσία ή απουσία αλληλομόρφων ιδίου μοριακού βάρους. Η παρουσία συμβολίζεται με (+) και η απουσία με (-).

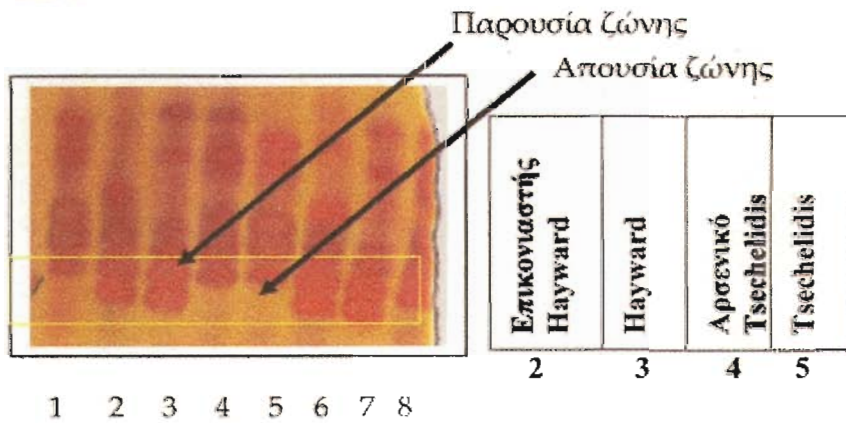
Εκκινητές /αλληλόμορφα	«cv. Tsechelidis»	“cv. Hayward”
99-152	.	.
97-411	+	-
96-030	.	.
96-037 α	-	+
96-037 β	+	-
96-034	+	-
96-092	+	-
97-406	-	+

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Επικονιαστής	Hayward	Αρσενικό Tschelidis	Tschelidis
--------------	---------	------------------------	------------



Εικ 4.



Εικ. 5 . DNA profile με επαναλαμβανόμενα δείγματα και χρήση του μοριακού δείκτη UDK 96 -037

13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ
ΙΤΥΤΟ

(II) Μελέτη μορφολογικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του καρπού

Η μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών των καρπών, του βάρους των καρπών και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, έγινε στους δύο εξεταζόμενους γενότυπους ακτινιδίου για δύο στάδια ωρίμανσης σε δύο συγκομιδές (επαναλήψεις). Συγκεκριμένα, μετρήθηκε το **σχήμα του καρπού** με βάση το μήκος ανά καρπό, το μεγάλο πλάτος ανά καρπό, το μικρό πλάτος ανά καρπό και υπολογίστηκαν η σχέση μεγάλου πλάτους προς μικρό πλάτος, η σχέση μήκους προς μεγάλο πλάτος και η σχέση μήκους προς μικρό πλάτος (**πιν. 1**). Οι ανωτέρω παράμετροι μετρήθηκαν μόνο στα ανώριμα ακτινίδια καθώς αυτές οι παράμετροι ήταν αδύνατο να τροποποιηθούν λόγω της ωρίμανσης.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα ακτινίδια της ποικιλίας «Τσεχελίδης» είχαν υψηλότερες τιμές για όλες τις παραμέτρους που εξετάστηκαν (πλην των παραμέτρων: μεγάλο πλάτος και τη σχέση μεγάλο πλάτος προς μικρό πλάτος, που ήταν παρόμοιες στις δύο ποικιλίες) σε σχέση με τα ακτινίδια Hayward. Οι διαφορές ή ομοιότητες που αναφέρθηκαν ανωτέρω μεταξύ των δύο ποικιλιών, βρέθηκαν και για τις 2 συγκομιδές, ενώ γενικά μπορούμε να πούμε ότι το σχήμα των ακτινιδίων «Τσεχελίδης» είναι διαφορετικό σε σχέση με την Hayward, κύρια λόγω του μεγαλύτερου μήκους των καρπών. Δεν βρέθηκαν διαφορές για όλες τις ανωτέρω παραμέτρους μεταξύ των καρπών της 1^{ης} και 2^{ης} συγκομιδής (**πιν. 1**).

Πίνακας 1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του καρπού των ποικιλιών ακτινιδίου Hayward και Τσεχελίδης

Ποικιλία	Συγκομ.	Μήκος (cm)	Πλάτος Μεγάλο (cm)	Πλάτος μικρό (cm)	Πλάτος Μ/ Πλάτος μ	Μήκος/ Πλάτος Μ	Μήκος/ Πλάτος μ
Hayward	1 ^η	7,40	5,65	4,98	1,137	1,314	1,488
	2 ^η	7,08	5,58	4,86	1,151	1,275	1,459
Τσεχελίδης	1 ^η	7,96	5,71	5,15	1,114	1,397	1,550
	2 ^η	8,15	5,77	5,21	1,109	1,418	1,567
Σημαντικότητα							
Ποικιλία		***	NS	***	NS	***	***
Συγκομιδή		NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΕΣΔ _{0,05}		0,228	0,194	0,180	0,060	0,042	0,042

Το βάρος ~~από~~ καρπό των ακτινιδίων «Τσεχελίδης» ήταν σημαντικά μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των ακτινιδίων Hayward και στις δύο συγκομιδές (κατά μέσο όρο 39%) τόσο σε ανώριμα όσο και στα ώριμα ακτινίδια, ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο συγκομιδών (πιν. 2). Τα ακτινίδια «Τσεχελίδης» είχαν χαμηλότερη σκληρότητα σάρκας (ήταν πιο μαλακά) από τα ακτινίδια Hayward (ένα δείκτη του βαθμού ωρίμανσης των καρπών) και στις δύο συγκομιδές αλλά μόνο στα ανώριμα ακτινίδια. Επίσης, η σκληρότητα της σάρκας ήταν μικρότερη κατά τη 2^η συγκομιδή σε σχέση με την 1^η, μόνο στην ποικιλία Τσεχελίδης (πιν. 2).

Το χρώμα σάρκας έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 συγκομιδών τόσο στους ανώριμους όσο και στους ώριμους καρπούς, ενώ μικρότερες διαφορές βρέθηκαν μεταξύ των 2 ποικιλιών. Συνοπτικά, τα ακτινίδια «Τσεχελίδης» είχαν πιο σκούρο χρώμα και παρόμοιο πράσινο χρώμα και απόχρωση (hue angle) σάρκας σε σύγκριση με τα ακτινίδια Hayward στα δύο στάδια ωρίμανσης και για τις 2 συγκομιδές. Το χρώμα σάρκας στη 2^η συγκομιδή ήταν λίγο πιο σκούρο και λιγότερο πράσινο (βασισμένο στους δείκτες a* και Chroma) σε σχέση με την 1^η συγκομιδή (πιν. 2).

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά βάρους, σκληρότητας και χρώματος σάρκας των καρπών ακτινιδίου, στις ποικιλίες Hayward και Τσεχελίδης

Ποικιλία	Συγκομ.	Ωριμότητα	Βάρος καρπού (g)	Σκληρ. Σάρκας (kgF)	L* σάρκας	a* σάρκας	b* σάρκας	C* σάρκας	Hue σάρκας (°)
Hayward	1 ^η	Ανώρ.	136,5	8,30	65,1	-10,77	41,9	43,3	104,4
		Ωριμα	116,8	0,84	58,1	-8,38	35,9	36,9	103,1
	2 ^η	Ανώρ.	126,2	8,26	63,8	-10,08	41,6	42,8	103,6
		Ωριμα	127,4	0,40	56,2	-7,66	31,9	32,8	103,5
Τσε-χελίδης	1 ^η	Ανώρ.	178,2	6,48	60,4	-10,72	41,9	43,3	104,4
		Ωριμα	166,5	0,48	53,3	-7,61	35,2	36,0	102,2
	2 ^η	Ανώρ.	189,9	5,69	60,6	-10,89	42,2	43,6	104,5
		Ωριμα	169,0	0,32	50,6	-7,03	31,5	32,3	102,6
Σημαντικότητα									
Ποικιλία			***	***	***	NS	NS	NS	*
Συγκομιδή			NS	**	**	***	***	***	NS
Ωριμότητα			***	***	***	***	***	***	***
ΕΣΔ _{0,05}			10,5	0,45	1,93	0,435	0,98	1,01	0,54

Τα ακτινίδια Τσεχελίδης είχαν υψηλότερα διαλυτά στερεά συστατικά από τα ακτινίδια Hayward (και στις δύο συγκομιδές και ωριμότητες). Οι δύο συγκομιδές δεν

Πίνακας 3. Φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ποικιλιών Hayward και Tsechelidis σε 2 στάδια ωρίμανσης και συγκομιδής

Ποικιλία	Συγκομ.	Ωριμότητα	Δ.Σ.Σ. (%)	Οξύτητα (%)	Συνολ. Φαιν/ικά (mg%)	Ολική Αγωγι/ητα (μS)	Ειδική Αγωγιμότητα	Ξηρό Βάρος (%)
Hayward	1 ^η	Ανώρ.	7,18	1,65	2,51	475	0,389	16,79
		Ωριμα	14,34	2,42	1,77	569	0,778	16,72
	2 ^η	Ανώρ.	7,70	2,43	2,56	519	0,412	16,24
		Ωριμα	13,84	2,03	1,68	520	0,766	15,46
Τσεχελίδης	1 ^η	Ανώρ.	8,18	2,16	3,28	559	0,455	17,14
		Ωριμα	15,32	3,02	2,74	563	0,833	16,85
	2 ^η	Ανώρ.	8,30	3,11	3,01	565	0,569	16,70
		Ωριμα	15,56	2,74	2,64	521	0,892	16,32
Σημαντικότητα								
Ποικιλία			***	***	***	**	***	*
Συγκομιδή			NS	***	NS	NS	**	***
Ωριμότητα			***	***	***	NS	***	*
ΕΣΔ _{0,05}			0,694	0,212	0,244	47,0	0,057	0,78

Συνοπτικά μπορούμε να πούμε ότι οι καρποί ποικιλίας Τσεχελίδης ήταν διαφορετικού σχήματος με μεγαλύτερο βάρος ανά καρπό και χαρακτηρίστηκαν από πρωιμότερη ωρίμανση σε σχέση με τους καρπούς της ποικιλίας Hayward. Αντίθετα, είχαν ελάχιστες διαφορές στο χρώμα σάρκας, ωρίμασαν σε θερμοκρασία δωματίου πιο γρήγορα και ήταν και στα δύο στάδια ωρίμανσης, υψηλότερης γευστικής ποιότητας (βασίζόμενοι στα Δ.Σ.Σ και την οξύτητα) σε σχέση με τους καρπούς της ποικιλίας Hayward.



Με τιμή

 Μάυρουλις Αθανάσιος
 Δέκτορας Γενετικής Βελτίωσης φυτών