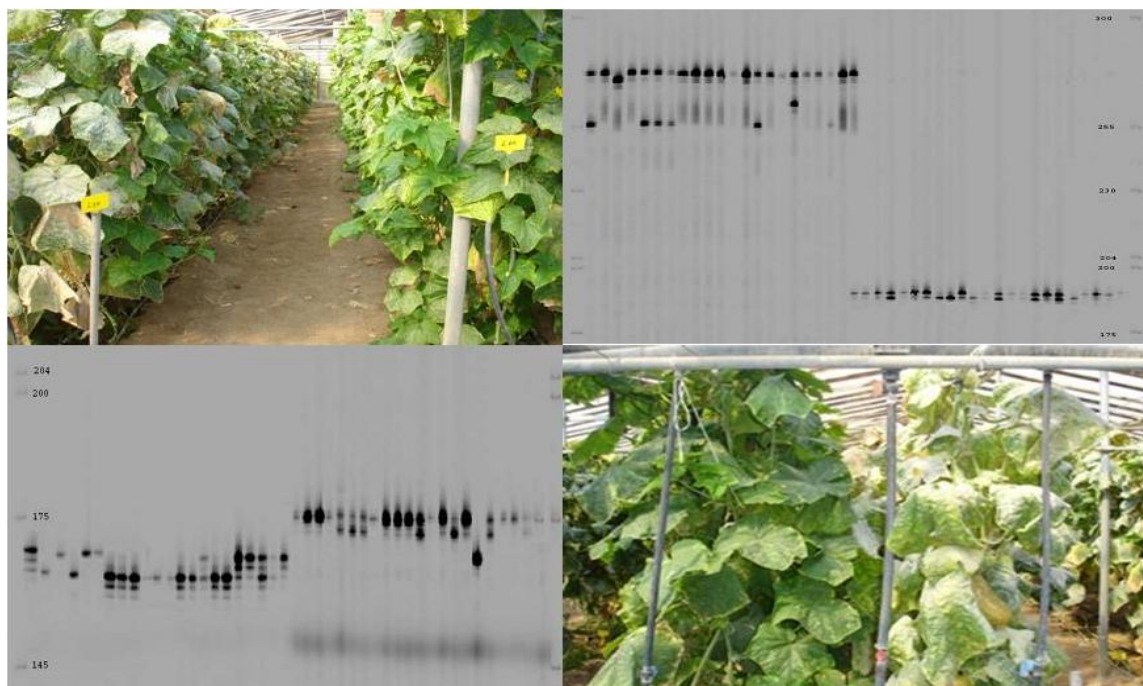


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Διατριβή
Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

«Ανάπτυξη Μοριακών Δεικτών στο *Cucumis sativus*.»



Δεληπαλαδάκης Νικόλαος

Υπεύθυνος Καθηγητής : Νικόλαος Πανόπουλος

Ηράκλειο

Σεπτέμβριος 2007

Εξεταστική Επιτροπή :

Εισηγητής :

Νικόλαος Πανόπουλος
Καθηγητής
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών

Ευθυμία Τσαγρή
Επίκουρος Καθηγήτρια
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών

Στην οικογένεια μου

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Πανόπουλο για την καθοδήγηση και τις πάντα εύστοχες συμβουλές του κατά την διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής, για την γνώση αλλά και τον τρόπο σκέψης που μου μετέφερε και τέλος για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντας μου την παρούσα διατριβή.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ευθυμία Τσαγρή για την καλοσύνη που μου έδειξε δεχόμενη ευγενικά να συμμετάσχει στην εξεταστική μου επιτροπή, καθώς και τις εύστοχες υποδείξεις της.

Δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών, Σπυριδούλα, Μαρίνα, Ρένια, Νικόλα και ιδιαίτερα τον φίλο και συντοπίτη μου Πάνο, για την άψογη συνεργασία και την αρμονική συνύπαρξη που είχαμε.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ για τις συμβουλές τους σε τεχνικά ζητήματα , τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Φυτών, Δάκη, Τίμη και Παναγιώτη, τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Φυτών, Κώστα, Νίκο και Τάσο, καθώς και τις Julia και Luciana από το Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών.

Θα ήμουν αγνώμων αν παρέλειπα να αναφέρω και να ευχαριστήσω τον Δρ. Α. Ντούλη και τους συνεργάτες του Mohamed και Δημήτρη από το ΕΘΙΑΓΕ, για την άψογη συνεργασία μας.

Ευχαριστώ επίσης, τους φίλους και τις φίλες που με ανέχτηκαν για άλλη μια φορά την δύσκολη αυτή περίοδο και ιδιαίτερα την Ελένη για την υπομονή και την κατανόηση που επέδειξε.

Τέλος, ένα ακόμα ευχαριστώ δεν είναι αρκετό για την συνεχή υποστήριξη και αγάπη των γονιών και της αδερφής μου, καθόλη την διάρκεια των σπουδών μου .

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract.....	4
Εισαγωγή	5
1.1 Γενικά για το <i>Cucumis sativus</i>	5
1.2 Βοτανικοί Χαρακτήρες.....	6
1.3 Εξάπλωση και Καλλιέργεια.....	7
1.4 Προοπτικές Κλασσικής Γενετικής Βελτίωσης.....	9
2. Μέθοδοι ταυτοποίησης ποικιλιών και υβριδίων.....	10
2.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	10
2.2 Βιοχημικοί ή Πρωτεϊνικοί Δείκτες.....	11
2.3 Μοριακοί ή DNA δείκτες.....	13
2.3.1 Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA (RFLP).....	13
2.3.2 Τυχαία Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA (RAPD).....	14
2.3.3 Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων(AFLP).....	16
2.3.4 Μοριακοί δείκτες βασισμένοι σε Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες (Simple Sequence Repeats-SSRs).....	19
2.3.4.1 Χλωροπλαστικοί Μικροδορυφόροι (cpSSR).....	24
2.4 Επιθυμητές ιδιότητες ενός ιδανικού Γενετικού δείκτη.....	25
2.5 Η συμβολή των Γενετικών δεικτών στην επιλογή (MAS).....	26
3.1 Η χρήση των RGAs ως μέθοδο γενετικής ταυτοποίησης.....	28
3.2 Γονίδια Ανθεκτικότητας.....	29
3.3 Ανίχνευση Ανάλογων Γονιδίων Ανθεκτικότητας.....	32
4. Σκοπός Μεταπτυχιακής Διατριβής.....	34
Υλικά και Μέθοδοι	35
Φυτικό Υλικό.....	35
Εκκινητές.....	36
Χημικά-Αναλώσιμα.....	36
1. <i>In silico</i> ανίχνευση μικροδορυφορικών αλληλουχιών.....	37
2. Απομόνωση DNA από φυτικό ιστό.....	38
3. Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με Φαινόλη.....	38

4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της Αλκαλικής Λύσης.....	39
5. Απομόνωση mRNA από φυτικό ιστό.....	40
6. Κατεργασία με DNάση.....	41
7. Αντίστροφη Μεταγραφή-RT.....	42
8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-PCR.....	43
9. Ανάλυση SSR σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	44
10. Υβριδισμός Αποικιών(Colony Dot Blot).....	46
11.Υβριδισμός Κατά Southern.....	46
Αποτελέσματα.....	48
A. Μικροδορυφόροι.	
1. Δημιουργία <i>in silico</i> βιβλιοθήκης με SSRs για το <i>C. sativus</i>	48
2. Εύρεση νέων μικροδορυφορικών αλληλουχιών.....	48
3. Εύρεση Πολυμορφισμών.....	56
4. Βιοπληροφορική ανάλυση πολυμορφικών τόπων.....	61
B. Ανάλογα Γονιδίων Ανθεκτικότητας.	
1. Κατασκευή εκφυλισμένων εκκινητών για την NBS περιοχή.....	64
2. Έλεγχος κλωνοποιημένων τμημάτων NBS για την εύρεση πολυμορφισμών.....	66
3. Ενίσχυση του 3' άκρου RGAs (3'-RACE).....	67
4. Ανίχνευση των 3' άκρων μεταγράφων RGAs.....	69
Συζήτηση.....	71
A. Μικροδορυφόροι.	
1. Επιλογή Στρατηγικής.....	71
2. Ανάλυση πολυμορφισμών.....	71
B. Ανάλογα Γονιδίων Ανθεκτικότητας.....	74
Συντμήσεις.....	75
Παράρτημα.....	76
Βιβλιογραφία.....	82

Περίληψη

Η χρήση Μοριακών Δεικτών αποτελεί την πιο σύγχρονη και αποτελεσματική τεχνική για την μέτρηση της γενετικής ποικιλότητας, την γενετική ταυτοποίηση ποικιλιών και την Μοριακή Βελτίωση. Στην παρούσα διατριβή επιχειρείται η γενετική ταυτοποίηση ποικιλιών και υβριδίων του *Cucumis sativus* με δυο διαφορετικές προσεγγίσεις, βασιζόμενες στην χρήση Μοριακών Δεικτών.

Η πρώτη προσέγγιση περιλαμβάνει την εφαρμογή Απλών Επαναλαμβανόμενων Αλληλουχιών (SSRs). Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκε μια *in silico* βιβλιοθήκη, η οποία περιλαμβάνει όλους τους μικροδορυφορικούς τόπους που περιέχονται στις μέχρι τώρα κατατεθειμένες αλληλουχίες του *C. sativus*. Στην *in silico* βιβλιοθήκη αναφέρονται 1149 πυρηνικοί και 182 χλωροπλαστικοί μικροδορυφόροι. Μετά από περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση βρέθηκαν 126 νέοι πυρηνικοί SSRs. Δέκα από αυτούς ελέγχθηκαν για την πολυμορφικότητά τους, σε είκοσι δύο ποικιλίες και υβρίδια αγγουριάς. Παράλληλα, ελέγχθηκαν πέντε κατατεθειμένοι μικροδορυφορικοί τόποι, που εμφάνιζαν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού στο *C. sativus*, προκειμένου να υπάρξει μέτρο σύγκρισης με τους νέους μικροδορυφόρους. Δυο νέοι SSRs έδειξαν διαφοροποίηση στα υπό εξέταση δείγματα, ενώ και οι πέντε κατατεθειμένοι μικροδορυφορικοί τόποι παρουσίασαν πολυμορφισμό. Φαίνεται ότι οι ποικιλίες που ελέγχθηκαν εμφανίζουν στενή γενετική βάση.

Στη δεύτερη προσέγγιση επιχειρείται ο εντοπισμός Ανάλογων Γονιδίων Ανθεκτικότητας (Resistance Genes Analogues - RGAs). Τα RGAs αν και δεν ανήκουν, με την κλασσική έννοια, στους μοριακούς δείκτες, μπορούν να αποτελέσουν την βάση για τη ανάπτυξη γενετικών δεικτών που θα μπορούν να ξεχωρίσουν ευπαθείς από ανθεκτικούς γονοτύπους σε διάφορα μικροβιακά και ιολογικά παθογόνα. Για το σκοπό αυτό κλωνοποιήθηκαν τμήματα της NBS περιοχής από την ποικιλία SMR18, η οποία παρουσιάζει πολλαπλές ανθεκτικότητες σε φυτοπαθογόνους μύκητες, ενώ παράλληλα έγινε προσπάθεια απομόνωσης ευρύτερων τμημάτων της NBS περιοχής R γονιδίων από τις ποικιλίες SMR18 και Κνωσός, προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές διαφορές στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία.

Abstract

Molecular markers are the newest and the most effective method for measuring genetic variation and Molecular Breeding. In this study we attempted to compare different *Cucumis sativus* cultivars by two different strategies based on molecular markers.

The first strategy relies on Simple Sequence Repeats (SSRs). For this purpose an *in silico* SSR library was constructed after screening all cucumber sequences deposited in public sequence database. A total of 1149 nuclear and 182 chloroplast SSRs were identified. Further bioinformating analysis of deposited sequences revealed 126 new nuclear SSRs. Ten of them were tested for polymorphisms by screening twenty two different cucumber cultivars and F1 hybrids. As a control, five highly polymorphic cucumber SSRs previously described in the literature were used. It appeared that the cucumber germplasm examined in this study have a rather narrow genetic base.

The second strategy relied on the use of disease Resistance Gene Analogues (RGAs), as putative molecular markers suitable for discriminating resistant and susceptible genotypes. For this purpose NBS containing regions from tow different genotypes (Knosos; SMR18) were cloned in order to compare nucleotide polymorphisms in putative RGA loci.

Εισαγωγή

1.1 Γενικά για το *Cucumis sativus*.

Η αγγουριά (*Cucumis sativus* L., οικ. *Cucurbitaceae*) διαφέρει από τα άλλα κολοκυνθοειδή, γιατί είναι το μόνο είδος του γένους *Cucumis* με $2n=2x=14$ χρωμοσώματα, ενώ τα άλλα είδη του ίδιου γένους έχουν $2n=2x=24$



χρωμοσώματα. Με βάση την διαφορά στον αριθμό των χρωμοσωμάτων τα είδη του γένους *Cucumis* χωρίζονται σε δυο ομάδες, την Ασιατική που περιλαμβάνει μόνο το *C. sativus* και την Αφρικανική, κυριότερα είδη της οποίας είναι τα *C. humifructuosi*, *C. melo*, *C. hirsuti*, *C. metuliferus*, *C. angurioidei* και *C. myriocarp* (Jeffrey, 1980). Η διαφορά στον αριθμό των χρωμοσωμάτων μεταφέρεται και στο μέγεθος του γονιδιώματος, αφού στο αγγούρι (1C, 376 Mbp) είναι αισθητά μικρότερο από ότι στα άλλα κολοκυνθοειδή, όπως το πεπόνι (450 Mbp), αλλά και από ότι σε άλλα ανώτερα φυτά, όπως για παράδειγμα το ρύζι (450 Mbp), την τομάτα (953 Mbp) και τον αραβόσιτο (2504 Mbp), αλλά μεγαλύτερο από το μέγεθος του γονιδιώματος στο *Arabidopsis* (145 Mbp) (Bennett *et al.*, 1976).

Η αγγουριά, από την οποία καλλιεργούνται κυρίως διπλοειδείς ποικιλίες, έχει μελετηθεί γενετικά, περισσότερο από κάθε άλλο κολοκυνθοειδές, με αποτέλεσμα να έχουν διευκρινιστεί αρκετές θέσεις γονιδίων. Αυτές περιλαμβάνουν γονίδια που ελέγχουν τις αναπτυξιακές συνήθειες του φυτού (growth habits), την έκφραση του φύλου, η οποία συνδέεται με τρεις γενετικούς τόπους, τη γονιμότητα, την καρπόδεση, τον τύπο του καρπού, το άρωμα, καθώς και γονίδια που πιθανόν να συνδέονται με την αντοχή σε φυσικούς εχθρούς και ασθένειες (ιώσεις, κλαδοσπόριο) (Kater *et al.*, 2001).

Ακόμη, από πολύ νωρίς, εντοπίστηκε μια ενδιαφέρουσα κατηγορία γονιδίων, που συχνά υπάρχει στα κολοκυνθοειδή και είναι υπεύθυνη για την παραγωγή κουκουμπριτασινών (cucurbitacins), ουσιών που ανήκουν στην ομάδα των τερπενοειδών και προσδίδουν την πικρή γεύση στα φύλλα, τον

βλαστό και τους καρπούς. Σημαντικό στο θέμα αυτό είναι ότι, η γνώση του τρόπου κληρονόμησης του γονιδίου *Bi*, ο κυρίαρχος αλληλόμορφος του οποίου θεωρείται υπεύθυνος για την παραγωγή cucurbitacins από το φυτό, έδωσε τη δυνατότητα στους γενετιστές να δημιουργήσουν ποικιλίες και υβρίδια με καρπούς χωρίς πικρή γεύση (Rehm *et al.*, 1957). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρουσία κουκουμπριτασινών καθιστά τα φυτά ανθεκτικά σε μερικά έντομα, όπως για παράδειγμα αφίδες (*Aphis gossypii*) και ακάρεα (*Tetranychus urticae*), ενώ κάποια κολεόπτερα (*Diabrotica balteata*), προτιμούν την παρουσία τους (Robinson *et al.*, 1997).

1.2 Βοτανικοί Χαρακτήρες.

Η αγγουριά είναι φυτό θερμής εποχής, ετήσιο, έρπον και έχει συνεχή ανάπτυξη. Οι βλαστοί της είναι ποώδεις, γωνιώδους διατομής και φέρουν τριχίδια. Τα φύλλα της είναι γωνιώδη, τρίλοβα ή πεντάλοβα και έχουν μακρύ μίσχο. Όσον αφορά τα ανθοφόρα όργανα της, σήμερα υπάρχουν δύο μεγάλες ομάδες ποικιλιών και υβριδίων αγγουριάς που διαφέρουν σημαντικά:

(α) Οι καθ' ολοκληρίαν θηλυκές (all female) που δεν παράγουν αρσενικά άνθη, αλλά μόνο θηλυκά και αναπτύσσουν καρπούς παρθενοκαρπικά, χωρίς γονιμοποίηση. Σε αυτή την ομάδα υπάγεται η πλειονότητα των ποικιλιών και υβριδίων αγγουριάς που καλλιεργούνται σήμερα στα θερμοκήπια. Κατά τη συγκομιδή οι καρποί δεν φέρουν σπέρματα, αλλά είναι εμφανείς οι θέσεις των περιβλημάτων των σπόρων.

(β) Οι ανάμικτης άνθησης ποικιλίες (mixed flowering) που παράγουν αρσενικά και θηλυκά άνθη στο ίδιο φυτό. Το φυτό δηλαδή είναι δίκλινο, μόνοικο και σταυρογονιμοποιούμενο. Η επικονίαση επιτυγχάνεται με τα έντομα και κυρίως τις μέλισσες. Τα αρσενικά άνθη εμφανίζονται στις μασχάλες των φύλλων των κατώτερων βλαστών 1ης τάξης και από τις μασχάλες των φύλλων εμφανίζονται επίσης οι βλαστοί 2ης τάξης, που φέρουν τα θηλυκά άνθη. Παρά το γεγονός ότι η αγγουριά είναι ουδέτερο φωτοπεριοδικά φυτό στην άνθηση, εν τούτοις, όταν επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες και μεγάλο

μήκος ημέρας, τα φυτά παράγουν περισσότερα αρσενικά άνθη, αλλά όταν επικρατούν μικρές ημέρες η σχέση θηλυκών προς αρσενικά άνθη αυξάνει (Ολύμπιος, 2001).



Εικόνα 1. Άνθη αγγουριάς. Στα αριστερά αρσενικό ανθός με τον χαρακτηριστικό λεπτό μίσχο και στα δεξιά θηλυκό ανθός με την χαρακτηριστική υποφυή ωοθήκη (Ολύμπιος, 2001).

1.3 Εξάπλωση και Καλλιέργεια.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί η αγγουριά κατάγεται από την Ασία και πιστεύεται ότι είναι ενδογενές φυτό των Ινδιών. Η απόδειξη είναι μάλλον δύσκολη, γιατί η αγγουριά ποτέ δεν βρέθηκε στην άγρια μορφή της. Έχουν βρεθεί στην Ινδία, και άλλες γειτονικές χώρες, φυτά με μεγάλη ποικιλομορφία όσον αφορά τα χαρακτηριστικά βλάστησης, το μέγεθος του καρπού, το σχήμα και το εξωτερικό του χρώμα. Πέραν αυτών, έχει βρεθεί να αυτοφύεται στις παρυφές των Ιμαλαΐων ένα μικρό, πικρό αγγούρι, που φέρει αραιά και σκληρά αγκάθια, το *C. hardwickii*, στενός συγγενής, και πολύ πιθανόν, ο πρόγονος της καλλιεργούμενης αγγουριάς. Εκτιμάτε ότι, το αγγούρι καλλιεργείτο στις Ινδίες από το 3.000 π.Χ. . Εάν αυτό είναι αλήθεια, τότε η αγγουριά είναι ένα από τα πρώτα «εξημερωμένα» λαχανικά, με ηλικία παράλληλη αυτή των δημητριακών (Whitaker *et al.*, 1976). Υπολείμματα του φυτού έχουν βρεθεί και σε αρχαίους αιγυπτιακούς τάφους. Στην

Ελλάδα, αναφέρεται ότι υπήρχε από αρχαιοτάτων χρόνων, μάλιστα ο Θεόφραστος περιγράφει 3 ποικιλίες, με το όνομα «Σίκυος» ή «Σίκυς».

Σήμερα η αγγουριά καλλιεργείται σε όλες τις ηπείρους (Πίνακας 1). Περισσότερο από τα 3/4 (77,3%) της παγκόσμιας παραγωγής παράγεται στην Ασία και το 1/7 περίπου στην Ευρώπη. Οι χώρες της Ε.Ε. παράγουν το 5,87% και η Ελλάδα το 0,7% της παγκόσμιας παραγωγής .

Στην Ελλάδα η αγγουριά καλλιεργείται σε σημαντικές εκτάσεις. Το 1997 καλλιεργήθηκαν συνολικά (υπαίθρια, θερμοκήπια, τούνελ) 19.260 στρ. και παρήχθησαν 161.220 τον. Σε υψηλά θερμοκήπια καλλιεργήθηκαν 11.470 στρ. και η παραγωγή τους ήταν 144.340 τόνοι.

Η καλλιέργεια της αγγουριάς σε υψηλά, πλαστικά κυρίως, θερμοκήπια συναντάτε στην Κρήτη (Τυμπάκι, Ιεράπετρα) και Πελοπόννησο (Μεσσηνία, Ηλεία, Λακωνία). Μικρότερες ποσότητες παράγονται και σε άλλα διαμερίσματα της χώρας (περιοχή Θεσσαλονίκης, νησιά κ.λπ.).

Ένα σημαντικό μέρος της παραγωγής από τα θερμοκήπια εξάγεται σε χώρες της Κεντρικής και Βόρειας Ευρώπης, κυρίως στη Γερμανία, αλλά και σε χώρες όπως η Σαουδική Αραβία και το Μπαχρέιν. Παρά το γεγονός ότι οι ποσότητες που εξήχθησαν ήταν σημαντικές (53.551 τόνοι, 1998), όπως επίσης και το συνάλλαγμα που εισέρρεε στη χώρα, εντούτοις με την πάροδο των ετών οι ποσότητες που εξάγονται μειώνονται συνεχώς (14.500 τόνοι, 1999), αποτέλεσμα του σκληρού ανταγωνισμού με άλλες χώρες, όπως η Ολλανδία και η Ισπανία (Ολύμπιος, 2001).

Πίνακας 1. Η παγκόσμια παραγωγή των τριών κυριότερων ειδών της οικογένειας Cucurbitaceae κατά το 2005 (FAO 2006).

<u>Melon</u>			<u>Cucumber</u>			<u>Watermelon</u>		
Country	Area (ha)	Production (Mt)	Country	Area (ha)	Production (Mt)	Country	Area (ha)	Production (Mt)
China	578,500	15,138,000	China	1,553,100	26,559,600	China	2,014,500	69,315,000
Turkey	103,000	1,700,000	Turkey	60,000	1,725,000	Turkey	137,000	3,800,000
Iran	80,000	1,230,000	Iran	80,000	1,400,000	Iran	100,000	2,150,000
Spain	35,200	1,176,900	US	68,660	969,400	US	57,140	1,669,940
US	45,180	1,150,440	Japan	14,500	680,000	Egypt	62,000	1,500,000
Romania	36,000	755,000	Egypt	28,000	600,000	Mexico	42,979	970,055
Italy	28,254	665,398	Mexico	17,000	475,000	S. Korea	23,000	850,000
India	31,500	645,000	Netherlands	600	435,000	Brazil	75,000	622,000
Egypt	24,000	565,000	Indonesia	50,064	423,333	Syria	25,000	620,000
Mexico	31,500	510,000	S. Korea	6,000	400,000	Kazakhstan	45,000	600,000
World	1,308,018	28,321,159	World	2,488,600	41,743,840	World	3,424,507	95,292,051

1.4 Προοπτικές Κλασσικής Γενετικής Βελτίωσης.

Οι γενετιστές σήμερα έχουν στρέψει την προσοχή τους προς δύο κατευθύνσεις. Η πρώτη επικεντρώνεται στη γενετική μεταχείριση του φύλου, ώστε να εξευρεθούν μέθοδοι παραγωγής σπόρου υβριδίων με χαμηλό κόστος. Στο θέμα αυτό έχει γίνει αρκετή πρόοδος. Έχουν δημιουργηθεί αρρενόστειρες σειρές (θηλυκό άνθος γόνιμο - αρσενικό άνθος στείρο), που χρησιμοποιούνται σαν φυτά -μητέρες. Οι σειρές αυτές φυτεύονται με τους επιθυμητούς επικονιαστές σε απομονωμένο χώρο και παράγουν καρπούς από τους οποίους λαμβάνονται οι F1 σπόροι. Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την επιχειρησιακή καλλιέργεια της αγγουριάς στο θερμοκήπιο.

Η δεύτερη κατεύθυνση αφορά τη δημιουργία ποικιλιών με μικρά μεσογονάτια διαστήματα, ώστε ολόκληρη η παραγωγή να συγκομίζεται μηχανικά μια μόνο φορά. Στην κατεύθυνση αυτή έχει γίνει αρκετή πρόοδος και σήμερα υπάρχουν ποικιλίες που χρησιμοποιούνται για κονσερβοποίηση και που έχουν αυτά τα χαρακτηριστικά (Ολύμπιος, 2001).

2. Μέθοδοι ταυτοποίησης ποικιλιών και υβριδίων

Η Γενετική Ποικιλότητα (Genetic Variation), δηλαδή το μέγεθος που καθορίζει ποσό διαφορετικά είναι τα άτομα δυο πολύ συγγενικών ομάδων, π.χ. δυο καλλιεργουμένων ποικιλιών ή υβριδίων του ίδιου είδους, μπορεί να μετρηθεί τόσο σε Φαινοτυπικό, όσο και σε Γενοτυπικό επίπεδο. Έτσι, οι Γενετικοί Δείκτες (Genetic Markers), που αποτελούν το μετρήσιμο και κληρονομούμενο χαρακτηριστικό με το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί η ποικιλότητα, χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες :

1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά (Morphological traits).
2. Βιοχημικοί ή Πρωτεϊνικοί δείκτες (Biochemical or Protein markers).
3. Μοριακοί ή DNA δείκτες (Molecular or DNA markers).

2.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά (Morphological traits)

Η πιο παραδοσιακή και χρησιμοποιούμενη μέθοδος ταυτοποίησης ποικιλιών και υβριδίων είναι αυτή που στηρίζεται στο διαχωρισμό με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Μέχρι και τις μέρες μας, προκειμένου να εισαχθεί μια νέα ποικιλία ή υβρίδιο στον Εθνικό ή τον Κοινοτικό Κατάλογο Καλλιεργουμένων Φυτών (<http://www.varinst.gr>) θα πρέπει να ελεγχθεί με βάση κάποια συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά, και να συγκριθεί με βάση αυτά, με κάποια άλλη που υπάρχει ήδη στον Κατάλογο. Η ταυτοποίηση ποικιλιών με την χρήση τέτοιου είδους Γενετικών Δεικτών αποτελεί τον αμεσότερο τρόπο μέτρησης της Γενετικής Ποικιλότητας, καθώς δεν απαιτεί την χρήση εξεζητημένων τεχνικών. Όμως, όπως είναι φυσικό για μια μέθοδο που βασίζεται καθαρά σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές επιδράσεις. Επίσης, απαιτεί μεγάλη εμπειρία του αξιολογητή στο πεδίο, μιας και η υποκειμενικότητα των αξιολογήσεων μπορεί να καταστήσει τα αποτελέσματα αναξιόπιστα. Τέλος, η μέθοδος αυτή έχει σχετικά περιορισμένο αριθμό αξιοποιήσιμων Γενετικών Δεικτών.

Παραδείγματα Γενετικών δεικτών αυτής της κατηγορίας για το αγγούρι αποτελούν: η έκφραση του φύλου στο φυτό, το σχήμα και μέγεθος του φύλλου, η ύπαρξη και το μέγεθος των τριχών και των ακανθών στο νεαρό καρπό, το χρώμα και το μέγεθος των γραμμώσεων στον ώριμο καρπό κ.α.

2.2 Βιοχημικοί ή Πρωτεϊνικοί Δείκτες (Biochemical or Protein markers)

Οι Βιοχημικοί ή Πρωτεϊνικοί Δείκτες βασίζονται στην ανάλυση αποθηκευτικών πρωτεϊνών σπόρων (seed storage proteins), καθώς και ισοενζύμων.

Τα ισοένζυμα είναι διαφορετικές μοριακές μορφές ενός ενζύμου που κωδικοποιούνται από περισσότερους του ενός γενετικούς τόπους.

Η ανάλυση των αποθηκευτικών πρωτεϊνών των σπορών είναι μια σχετικά απλή διαδικασία που περιλαμβάνει την ολική εκχύλιση πρωτεϊνών και την ηλεκτροφόρηση τους σε αποδιατακτικό gel πολυακριλαμίδης (SDS-PAGE) (Khan *et al.*, 2007).

Παρόμοια είναι η διαδικασία και στην ισοενζυμική ανάλυση, με την διαφορά ότι απαιτείται η χρήση ενζυμικών συστημάτων, έτσι ώστε τα προς εξέταση ισοένζυμα να αντιδράσουν *in situ* και να αφήσουν κάποιο αποτύπωμα σε gel πολυακριλαμίδης (PAGE) ή αμύλου.

Επειδή η έκφραση των ενζύμων μπορεί να εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού καθώς και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, μόνο συγκεκριμένα ενζυμικά συστήματα τα οποία δεν εμφανίζουν μεταβολές σε διαφορετικές συνθήκες, μπορούν να θεωρηθούν ως χρήσιμοι ισοενζυμικοί δείκτες. Αυτό περιορίζει τον αριθμό των διαθέσιμων δεικτών, και επακόλουθα μειώνει τον βαθμό πολυμορφισμού και διαφοροποίησης που αναδεικνύει η ισοενζυμική ανάλυση (Parfit and Arulsekhar, 1989, Walter *et al.*, 1989). Ως ένα επιπλέον μειονέκτημα της μεθόδου, αναφέρεται και η ανάγκη χρήσης φρέσκου φυτικού υλικού σε ταυτόσημα αναπτυξιακά στάδια. Η χρήση διαφόρων ενζυμικών συστημάτων για ισοενζυμική ανάλυση ποικιλιών αγγουριού έχει πραγματοποιηθεί στο παρελθόν (Πίνακας 2). Η χρήση όμως, αυτής της

κατηγορίας των γενετικών δεικτών, παρέμεινε περιορισμένη εξ αιτίας του σχετικά μικρού βαθμού πολυμορφισμού που έδινε για φυτά με στενή γενετική βάση, όπως η αγγουριά (Staub *et al.*, 1992 ; Feussner *et al.*, 1994).

Πίνακας 2. Ενζυμικά συστήματα για τον έλεγχο γενετικής ποικιλότητας στο *C. sativus* (Staub *et al.*, 1992).

Aconitase	Hexoseaminidase
Acid phosphatase	Isocitrate dehydrogenase
Adenylate kinase	Lactate dehydrogenase
Alanine aminotransferase	Leucine aminopeptidase
Alcohol dehydrogenase	Mannitol dehydrogenase
Aldolase	Malate dehydrogenase
Alkaline phosphatase	Malic enzyme
Aspartate aminotransferase	Manosephosphate isomerase
Catalase	Methylumbelliferyl phosphatase
Diaphorase	Octanol dehydrogenase
Fumarase	Peptidase with glycyl-leucine
Fructose diphosphatase	Peptidase with leucyl-alanine
Fructokinase	Peptidase with leucylglycyl-glycine
Hydroxybutyric dehydrogenase	Peptidase with phenylalanyl-proline
fl-galactosidase	Peroxidase
Galactosaminidase	Phosphoglucomutase
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	6-phosphogluconate dehydrogenase
Glucosephosphate isomerase	3-phosphoglycerate kinase
fl-glucosidase	Pyruvic kinase
Glutamate dehydrogenase	Phosphoglucokinase
Glutathione reductase	Sorbitol dehydrogenase
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Shikimate dehydrogenase
Glycerate dehydrogenase	Superoxide dismutase
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Triosephosphate isomerase
Glucokinase	Xanthine dehydrogenase

Οι παραπάνω μεθοδολογίες ήταν ευρέως χρησιμοποιούμενες κατά το παρελθόν για διαφοροποίηση ποικιλιών, κυρίως φυτών μεγάλης καλλιέργειας. Εξαιτίας όμως των μειονεκτημάτων που παρουσιάζουν, στις μέρες μας έχουν αντικατασταθεί με την χρήση Μοριακών Δεικτών.

2.3 Μοριακοί ή DNA δείκτες (Molecular or DNA markers)

Οι Μοριακοί ή DNA δείκτες ανιχνεύουν διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία του DNA τόσο του πυρήνα, όσο και των οργανιδίων (μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες). Οι διαφοροποιήσεις αυτές οφείλονται σε πολυμορφισμούς στο DNA, οι οποίοι χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες :

- **Πολυμορφισμοί ζεύγους βάσεων:** αλλαγή, προσθήκη ή διαγραφή μιας βάσης.
- **Αναδιάταξη μιας αλληλουχίας DNA:** διαγραφή, ένθεση, αναστροφή ή διπλασιασμός ενός τμήματος DNA.
- **Πολυμορφισμοί επέκτασης:** επαναλήψεις ενός συγκεκριμένου μοτίβου αλληλουχίας, με μία έως λίγες βάσεις για κάθε μονάδα. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλότητα στον αριθμό των επαναλήψεων. Οι αλληλουχίες αυτές καλούνται VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats).

Οι Μοριακοί δείκτες μπορούν να χωριστούν, ανάλογα με την μέθοδο ανάλυσης που χρησιμοποιούν, σε δυο μεγάλες κατηγορίες , σε αυτές που βασίζονται στην χρήση περιοριστικών ένζυμων και τον υβριδισμό, με σημαντικότερο παράδειγμα τα RFLPs (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphisms), καθώς και σε αυτές που βασίζονται στην PCR, όπως τα RAPDs (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA), οι μικροδορυφόροι (SSRs – **S**imple **S**equences **R**epeats), τα ISSRs (**I**nter **S**imple **S**equences **R**epeat) και τα SNPs (**S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphisms). Βεβαίως, υπάρχουν και Μοριακοί δείκτες που βασίζονται σε συνδυασμό των δυο παραπάνω μεθόδων ανάλυσης όπως τα AFLPs (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphisms), τα SCARs (**S**equences **C**haracterized **A**mplified **R**egions) και τα CAPs (**C**leaved **A**mplified **P**olymorphisms).

2.3.1 Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA (RFLP).

Σε μία τυπική RFLP ανάλυση, το γενωμικό DNA επεξεργάζεται με ένα συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο, που κόβει το DNA σε τμήματα διαφόρων μηκών, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, και να μεταφερθούν σε κατάλληλο για υβριδοποίηση φίλτρο. Μετά την υβριδοποίηση, με τη χρήση ειδικού ανιχνευτή, ραδιενεργά σημασμένου ή μη, τα τμήματα του DNA μπορούν να γίνουν ορατά. Στα RFLPs ο πολυμορφισμός οφείλεται σε αλλαγή στην αλληλουχία αναγνώρισης ενός περιοριστικού ενζύμου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας θέσης περιορισμού ή την απώλεια μιας υπάρχουσας, έτσι ώστε να αλλάζουν τα μεγέθη των ζωνών που δίνει η πέψη με αυτό το ένζυμο.

Πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου αναφέρονται η συγκυρίαρχη κληρονομικότητα των δεικτών, το γεγονός ότι δεν απαιτείται γνώση της αλληλουχίας του DNA που ελέγχεται, η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων καθώς επίσης και η απλότητα της. Από την άλλη πλευρά, ένα από τα κυριότερα μειονεκτήματα της είναι το χαμηλό επίπεδο πολυμορφισμού που παρουσιάζει, καθώς οι RFLP δείκτες έχουν δύο αλληλόμορφα (απουσία ή παρουσία της θέσης περιορισμού) και επομένως, δεν είναι αρκετά πολυμορφικοί για γενετική χαρτογράφηση. Σε αυτό μπορεί ακόμα να προστεθεί το γεγονός ότι, η μέθοδος είναι αρκετά χρονοβόρα και απαιτεί πολύ μεγάλες ποσότητες γενετικού υλικού προς ανάλυση.

Αναλύσεις με την χρήση RFLPs που έγιναν στο παρελθόν έδειξαν ότι, ενώ σε κάποια φυτικά είδη όπως το *Zea mays*, το *Brassica napus* και το *Arabidopsis thaliana* παρουσιάζεται υψηλός βαθμός πολυμορφισμού, σε κάποια αλλά όπως το *Lycopersicon esculentum*, το *C. melo* και το *C. sativus* ο βαθμός πολυμορφισμού ανάμεσα σε άτομα διαφορετικών ποικιλιών ή οικοτύπων ήταν σημαντικά χαμηλότερος (Cregan *et al.*, 1996). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την στενή γενετική βάση που παρουσιάζει το *C. sativus*, όπως είχε διαφανεί από προηγούμενες μελέτες με πρωτεϊνικούς δείκτες (Staub *et al.*, 1992) .

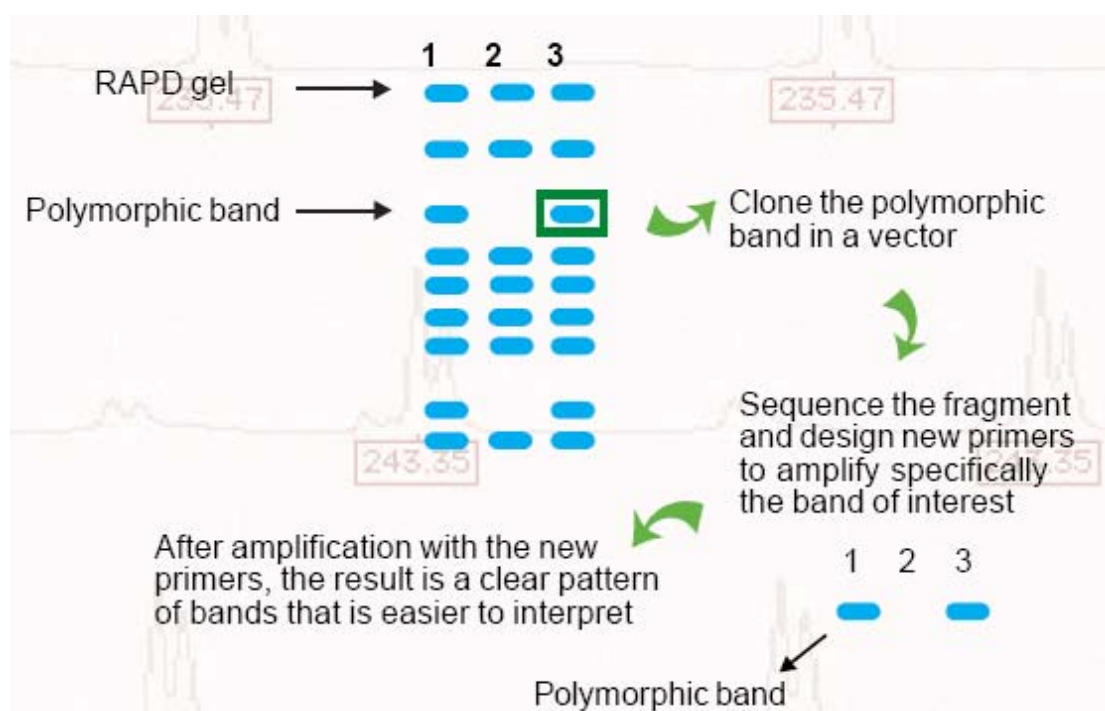
2.3.2 Τυχαία Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA (RAPD).

Η τεχνική RAPD στηρίζεται στον πολλαπλασιασμό με PCR, συγκεκριμένων γενωμικών τμημάτων χρησιμοποιώντας μόνο ένα μικρού μήκους τυχαίο εκκινητή, σε χαμηλή θερμοκρασία υβριδοποίησης. Ο τυχαίος εκκινητής μπορεί να προσδεθεί σε διαφορετικές θέσεις, διασκορπισμένες στο γένωμα, αλλά μοναχά στις θέσεις όπου θα έχει τον κατάλληλο προσανατολισμό και οι οποίες θα απέχουν έως περίπου 4 kb (ανάλογα με το είδος της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται) θα μπορέσει να ενισχυθεί. Τα προϊόντα της ενίσχυσης του πολυμερισμού διαχωρίζονται σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης και γίνονται ορατά με κάποια χρώση, συνήθως με βρωμιούχο αιθίδιο. Οι πολυμορφισμοί RAPD οφείλονται σε αλλαγές στις θέσεις πρόσδεσης του τυχαίου εκκινητή ή στην απόσταση μεταξύ τους.

Ως πλεονεκτήματα της μεθόδου αναφέρονται η απλότητα της, καθώς και ο μεγάλος αριθμός ζωνών, που μπορεί να αποδώσει υψηλό πολυμορφισμό. Όμως, τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι περισσότερα και σημαντικότερα. Σε αυτά συγκαταλέγονται η αδυναμία διαχωρισμού των αλληλομόρφων για ένα τόπο, μιας και τα RAPDs είναι κυρίαρχοι δείκτες, καθώς και η έλλειψη επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Τέλος, ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα, που καθιστά τα αποτελέσματα της μεθόδου αμφισβητήσιμα κάποιες φορές, είναι το γεγονός ότι σε δυο διαφορετικά δείγματα μπορεί να εμφανίζονται ζώνες ίδιου μεγέθους, που όμως δεν αντιστοιχούν στην ενίσχυση της ίδιας περιοχής από τον τυχαίο εκκινητή (co-migration). Όμως, ο υψηλότερος βαθμός πολυμορφισμού που προσέφεραν οι δείκτες αυτής της κατηγορίας είχε ως αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθούν στην γενετική ταυτοποίηση διαφόρων φυτών με οικονομικό ενδιαφέρον, καθώς και στην κατασκευή γενετικών χαρτών. Στα φυτά αυτά συγκαταλέγεται και το αγγούρι (Serquen et al., 1997, Park et al., 2000).

Η μετατροπή των δεικτών RAPDs σε δείκτες SCARs (**S**equence **C**haracterized **A**mplified **R**egion), έτσι ώστε να ενισχύονται συγκεκριμένες ζώνες RAPDs, που έχουν προκύψει κατά τον πολυμερισμό με τον τυχαίο

εκκινήτη, με την χρήση ενός ζεύγους συγκεκριμένων εκκινήτων (Εικόνα 2), αποτέλεσε λύση σε πολλά προβλήματα που παρουσίαζαν οι δείκτες RAPDs, καθιστώντας τους χρησιμότερους τόσο στην γενετική ταυτοποίηση, όσο και στην διαδικασία επιλογής συγκεκριμένων γονοτύπων με την χρήση δεικτών (**Marker Assistant Selection – MAS**).



Εικόνα 2. Μετατροπή δεικτών RAPD σε δείκτες SCAR (Ausubel *et al.*, 1993)

Οι δείκτες SCAR αποδείχτηκαν αρκετά χρήσιμοι στην επιλογή φυτών που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε πολλές σημαντικές ασθένειες του αγγουριού, όπως για παράδειγμα στο ωίδιο (*Podosphaera xanthii*) και στη φουζαρίωση (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*) (Hirai *et al.*, 2006; Doulis *et al.*, unpublished).

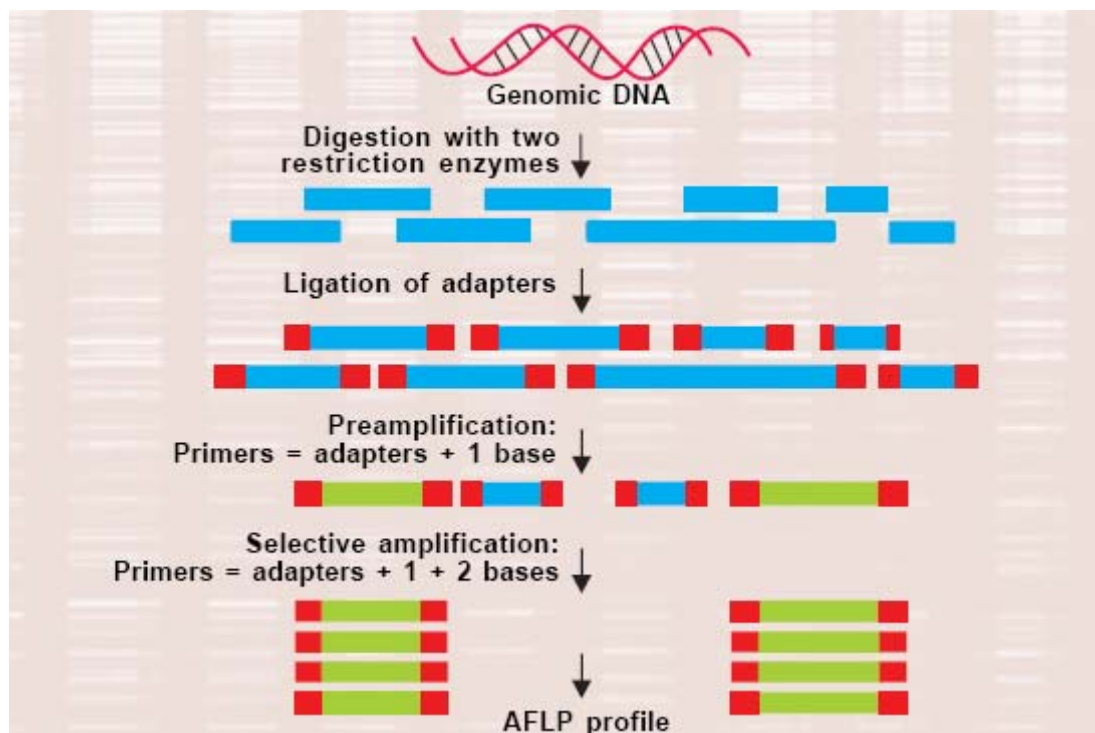
2.3.3 Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων (AFLP).

Οι AFLP δείκτες παρέχουν ένα αρκετά αποτελεσματικό εργαλείο για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση γενετικής ποικιλομορφίας. Η μεθοδολογία βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υποομάδας τμημάτων DNA, τα οποία

έχουν προκύψει μετά από πέψη του γονιδιωματικού DNA με ένζυμα περιορισμού.

Η μεθοδολογία AFLP επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών περιορισμένων τμημάτων DNA σε μία μόνο αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Συνοπτικά, το γονιδιωματικό DNA υφίσταται ταυτόχρονη διπλή πέψη με δύο ένζυμα περιορισμού, εκ των οποίων το ένα αναγνωρίζει θέσεις 4 βάσεων (π.χ. MseI) και το άλλο θέσεις αναγνώρισης 6 βάσεων (π.χ. EcoRI). Τα άκρα των περιορισμένων τμημάτων συράπτονται με ειδικά σχεδιασμένους προσαρμοστές έτσι ώστε να είναι συμβατοί και να συνδέονται στις θέσεις αναγνώρισης των συγκεκριμένων ενζύμων περιορισμού. Καθώς οι θέσεις αναγνώρισης 4 βάσεων από τα περιοριστικά ένζυμα είναι πιο συχνές από αυτές των 6 βάσεων, η πλειονότητα των τμημάτων που θα παραχθούν θα προέρχεται μόνο μετά από τη πέψη του ενζύμου που αναγνωρίζει 4 βάσεις. Μόνο ένας περιορισμένος αλλά ικανοποιητικός αριθμός τμημάτων θα έχουν στα άκρα τους και τις δύο διαφορετικές θέσεις. Αν και η ενίσχυση της μήτρας του DNA με εκκινητές ομόλογους με τους προσαρμοστές και αντίδραση PCR θα δημιουργήσει ένα διακριτό πρότυπο για μικρά γονιδιώματα, για μεγαλύτερα γονιδιώματα το πρότυπο των ζωνών είναι αρκετά πολύπλοκο. Για το λόγο αυτό, μια επιπρόσθετη επιλογή ενίσχυσης μιας υποομάδας τμημάτων DNA επιτρέπει την ελάττωση της πολυπλοκότητας του προτύπου των ζωνών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών, οι οποίοι είναι ομόλογοι με το προσαρμοστή και επιπλέον έχουν «επιλεκτικά νουκλεοτίδια» στο 3' άκρο τους. Τα «επιλεκτικά νουκλεοτίδια» στο 3' άκρο επιτρέπουν στους εκκινητές να ξεκινήσουν το πολυμερισμό μόνο στα τμήματα του DNA που υπάρχει τέλεια ομολογία. Οι ζώνες που ενισχύονται μπορούν να παρατηρηθούν, είτε με ραδιενεργά σημασμένα νουκλεοτίδια κατά τον πολυμερισμό, είτε με ειδικά χρωμοφόρα φθορισμού στις βάσεις ή στους εκκινητές και ανάλυση σε sequencing gel. Ο αριθμός των «επιλεκτικών νουκλεοτιδίων» που χρησιμοποιούνται στο 3' άκρο των εκκινητών στην ουσία μπορεί να ελέγχει και να περιορίσει τον αριθμό των τμημάτων του DNA που

ενισχύονται έτσι ώστε να παρέχεται ένα πρότυπο ζωνών που να δύναται να αναλυθεί (Χατζόπουλος Π., 2001).



Εικόνα 3. Διαγραμματική απεικόνιση της μεθοδολογίας AFLP. Παρουσιάζονται τα 4 στάδια της μεθόδου. Στο 1^ο γίνεται πέψη με 2 ένζυμα περιορισμού. Στο 2^ο λιγοποιούνται οι προσαρμογείς. Στο 3^ο γίνεται PCR με εκκινητές που έχουν μια επιπλέον βάση (επιλεκτικό νουκλεοτίδιο). Στο 4^ο γίνεται ξανά PCR με εκκινητές που έχουν 2 επιπλέον βάσεις. (www.keygen.com).

Οι AFLP δείκτες επιτρέπουν την γρήγορη σάρωση του γονιδιώματος για την ανεύρεση πολυμορφισμών. Εξ αιτίας του μεγάλου αριθμού ζωνών που δημιουργούνται σε μια μονή εφαρμογή, παρέχεται σημαντικός όγκος γενετικής πληροφορίας. Στα πλεονεκτήματα των δεικτών AFLP θα πρέπει να προστεθεί και η υψηλή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγεται το γεγονός ότι τα AFLPs, όπως και τα RAPDs, είναι κυρίαρχοι δείκτες, καθώς επίσης και ότι ο όγκος των δεδομένων απαιτεί ανάλυση με την χρήση εξειδικευμένων προγραμμάτων(π.χ. SAGA).

2.3.4 Μοριακοί δείκτες βασισμένοι σε Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες (Simple Sequence Repeats-SSRs)

Η ύπαρξη απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο φυτικό πυρηνικό DNA, έγινε γνωστή σχετικά νωρίς (Delseny *et al.*, 1983), χωρίς όμως να υπάρχει τότε κάποια εξήγηση τόσο για την προέλευση τους, όσο και για κάποια πιθανή χρησιμότητα τους ως εργαλείο στη Μοριακή Βιολογία. Στην συνέχεια φάνηκε, ότι απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ή μικροδορυφόροι, υπάρχουν στα γονιδιώματα όλων των οργανισμών που έχουν εξεταστεί ως τώρα, ότι αυτές δεν περιορίζονται μόνο στο πυρηνικό DNA αλλά και στο οργανιδιακό (Lagercrantz *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994), και ότι αποτελούν μία σημαντική πηγή γενετικής ποικιλότητας (Tautz *et al.*, 1986), χρήσιμη για την μελέτη της γενετικής των φυτών (Olivieri *et al.*, 1993).

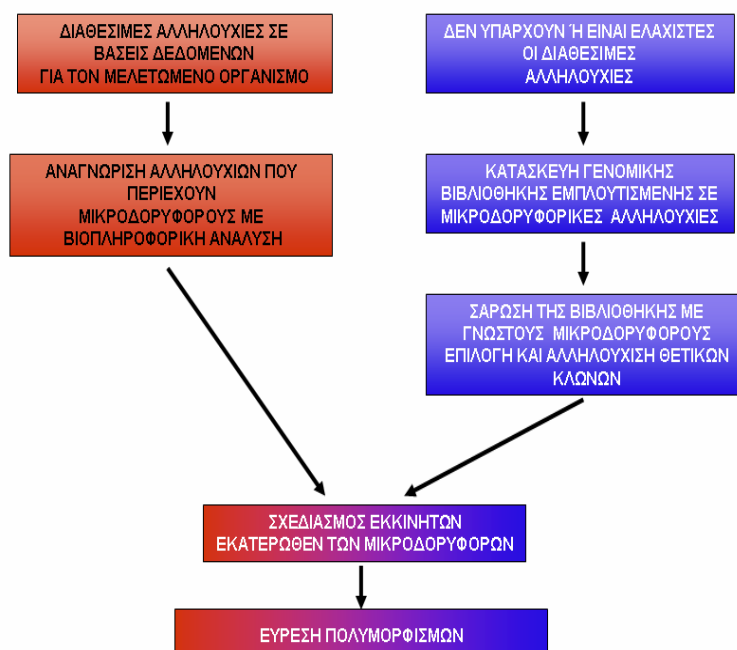
Οι μικροδορυφόροι αποτελούνται από διαδοχικές επαναλήψεις, που χαρακτηρίζονται από βραχεία μοτίβα (1 έως 6 βάσεις) και μικρό βαθμό επαναληψιμότητας (5 έως 100 επαναλήψεις), σε σχέση με τις άλλες ομάδες του επαναληπτικού DNA (satellite DNA, minisatellites). Επίσης, οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες τείνουν να συγκεντρώνονται στα κεντρομερή και τα τελομερή (Beckmann *et al.*, 1992).

Προκειμένου να ανιχνευτούν περιοχές που περιέχουν μικροδορυφορικές αλληλουχίες υπάρχουν δυο βασικές στρατηγικές (Διάγραμμα 1). Οι στρατηγικές αυτές διαφοροποιούνται στο κατά ποσό ο οργανισμός που εξετάζεται έχει μελετηθεί εκτενώς και κατά συνεπεία υπάρχουν δημοσιευμένες αρκετές αλληλουχίες στις διάφορες Βάσεις Δεδομένων.

Στην περίπτωση που ο μελετούμενος οργανισμός δεν έχει αλληλουχηθεί σε μεγάλο βαθμό και ο όγκος των υπαρχόντων αλληλουχιών είναι μικρός ή και μηδενικός απαιτείται η κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης για τον οργανισμό αυτό και η σάρωση της με γνωστές μικροδορυφορικές αλληλουχίες, προκειμένου να εντοπιστούν κλώνοι που πιθανόν να περιέχουν SSRs. Στην συνέχεια οι κλώνοι αυτοί θα πρέπει να αλληλουχηθούν έτσι ώστε

να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των μικροδορυφόρων, αλλά και να βρεθούν οι αλληλουχίες των επάκρων τμημάτων τους (flanking regions). Η στρατηγική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν προκειμένου να εντοπιστούν SSRs σε πολλά φυτά εμπορικής σημασίας, όταν οι διάφορες Βάσεις Δεδομένων δεν περιείχαν μεγάλο αριθμό αλληλουχιών (Liu *et al.*, 1996; Struss and Plieske, 1998; Ramsay *et al.*, 2000). Στις μέρες μας εξακολουθεί να χρησιμοποιείται με διάφορες τροποποιήσεις, όπως για παράδειγμα η δημιουργία βιβλιοθήκης η οποία είναι εμπλουτισμένη σε μικροδορυφορικές αλληλουχίες (Ritschel *et al.*, 2004). Πρέπει να σημειωθεί ότι η παραπάνω στρατηγική, με τις όποιες τροποποιήσεις που πιθανόν να την καθιστούν αποτελεσματικότερη, δεν παύει να είναι χρονοβόρα και ακριβή (Thiel *et al.*, 2003). Όμως, η στρατηγική αυτή αποτελεί μονόδρομο για την εύρεση SSR στους λιγότερο μελετημένους οργανισμούς.

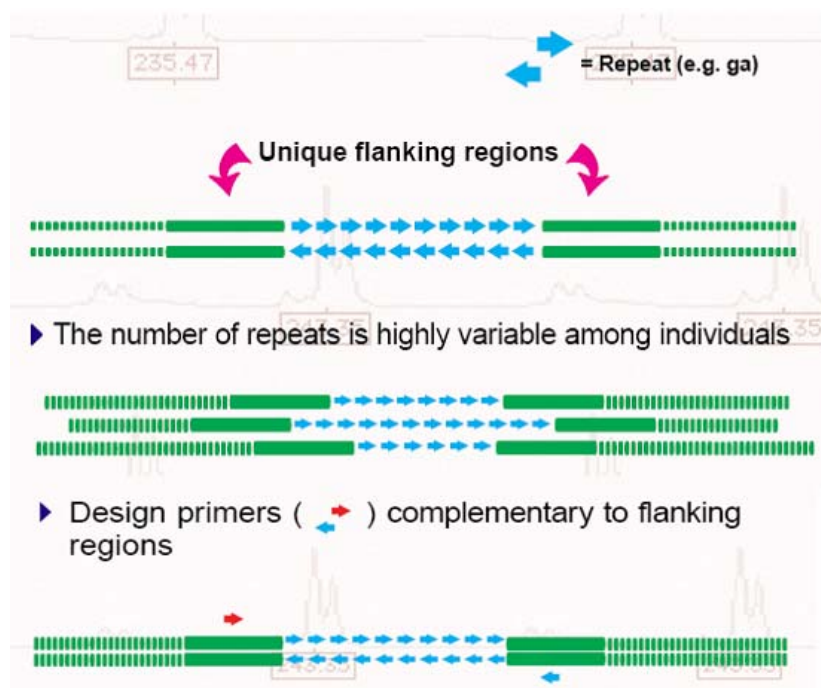
Αντίθετα, εάν υπάρχει μεγάλος όγκος δημοσιευμένων αλληλουχιών υπάρχει η δυνατότητα σάρωσης τους με εξειδικευμένα βιοπληροφορικά προγράμματα (π.χ. **MI**cro**SA**tellite identification tool – MISA, Thiel *et al.*, 2003). Έτσι, εντοπίζονται οι αλληλουχίες που περιέχουν μικροδορυφόρους και στη συνέχεια ακολουθείται κοινή πορεία με την πρώτη στρατηγική (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1. Οι δυο βασικές στρατηγικές για την ανίχνευση μικροδορυφορικών περιοχών.

Η δεύτερη στρατηγική, που προτείνει την *in silico* ανάλυση, έχει εφαρμοστεί σε αρκετά φυτά όπως το αμπέλι (Scott et al. 2000), το ζαχαροκάλαμο (Cordeiro et al., 2001), το σιτάρι (Eujayl et al. 2002) και τη βρώμη (Hackauf and Wehling 2002). Οι περισσότερες προσπάθειες βασιστήκαν στην «αλίευση» μικροδορυφόρων από ESTs (Expressed Sequence Tags), μιας και αυτές οι αλληλουχίες βρίσκονταν σε πληθώρα, όμως η ίδια τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε γνωστή αλληλουχία (Thiel et al., 2003).

Η διαδικασία εύρεσης των πολυμορφισμών ανάμεσα στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες δυο ή περισσότερων ατόμων βασίζεται στον σχεδιασμό συγκεκριμένων εκκινήτων στα άκρα των περιοχών που περιέχουν μικροδορυφορικές επαναλήψεις (Εικόνα 4). Με βάση το γεγονός αυτό μπορεί να υπάρξει και μια τρίτη στρατηγική για την εύρεση πολυμορφισμών με SSRs, η οποία βασίζεται στην «συντήρηση» των περιοχών που περιέχουν μικροδορυφόρους ανάμεσα σε πολύ συγγενικά είδη.



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση εύρεσης πολυμορφισμών σε μικροδορυφορικές αλληλουχίες.

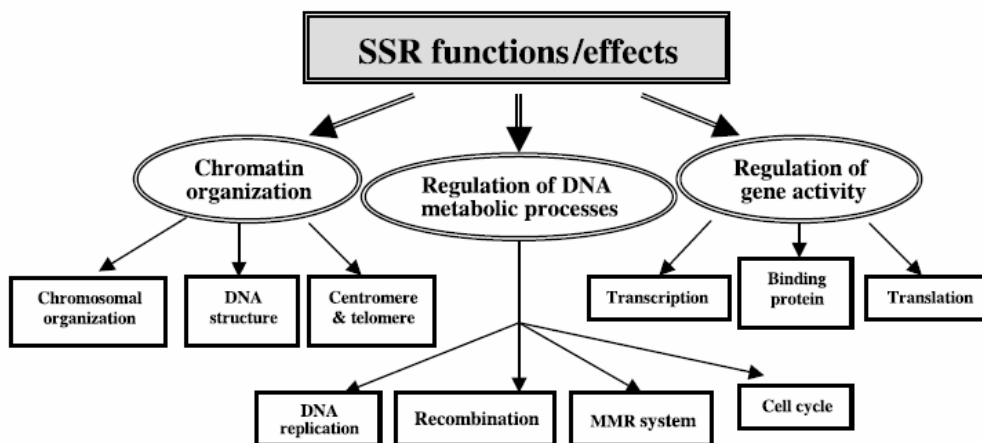
Έτσι, δύναται να χρησιμοποιηθούν ζεύγη εκκινήτων που έχουν σχεδιαστεί για τις επάκριες αλληλουχίες SSRs σε άτομα που ανήκουν στο ίδιο

γένος, χωρίς βέβαια αυτό να είναι πάντα επιτυχές (Chiba *et al.*, 2003). Η αποτυχία της τελευταίας στρατηγικής μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη ομολογίας στις συγκεκριμένες περιοχές ή στην μεγάλη συντήρησή τους, που και στις δυο περιπτώσεις δεν οδηγεί στην εύρεση πολυμορφισμών (Devos and Gale, 1997).

Τα τμήματα που παράγονται μετά την PCR αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (PAGE) και μπορούν να γίνουν ορατά μέσω χρώσης αργύρου, με φθορισμό βρωμιούχου αιθιδίου, με αυτοραδιογραφία, εφόσον έχει χρησιμοποιηθεί ραδιενεργά σημασμένος εκκινητής ή νουκλεοτίδια, ή με μη ραδιενεργή ανίχνευση, εφόσον χρησιμοποιηθούν σημασμένοι με χρωμοφόρα εκκινητές. Η τελευταία τεχνική χρώσης, με την χρήση σημασμένων εκκινητών με φθορίζουσες χρωστικές (π.χ. IR-800, IR-700), απαιτεί την χρήση αυτόματου αναλυτή (sequencer), αλλά θεωρείται η πιο αξιόπιστη για την εύρεση πολύ μικρών διαφορών στο μέγεθος των αλληλουχιών.

Απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες βρίσκονται σε ολόκληρο το γονιδίωμα, τόσο σε κωδικές, όσο και σε μη κωδικές περιοχές (Toth *et al.*, 2000). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι μικροδορυφόροι εμφανίζονται κυρίως στις μη κώδικες περιοχές, γεγονός που δεν συνάγει στην τυχαία κατανομή τους στο γένωμα (Metzgar *et al.*, 2000). Στις κωδικές περιοχές εμφανίζονται σχετικά σπάνια, με αποτέλεσμα μόνο το 7-10% αυτών να βρίσκονται εντός εξωνίων στα ανώτερα φυτά, ενώ το ποσοστό αυτό κυμαίνεται στο 9-15% για τα σπονδυλωτά (Graner *et al.*, 2003 ; Van Zutphen *et al.*, 1996). Το σχετικά χαμηλό ποσοστό των SSRs στις κωδικές περιοχές μπορεί να εξηγηθεί από την αρνητική επιλογή ενάντια στις μεταλλαγές αναγνωστικού πλαισίου, στις μεταφραζόμενες περιοχές (Li *et al.*, 2004).

Παρά το γεγονός ότι οι μικροδορυφόροι θεωρούνται ουδέτεροι μοριακοί δείκτες, η εμπλοκή ενός σημαντικού αριθμού SSRs, σε αρκετά βιολογικά φαινόμενα (Εικόνα 5), έχει προταθεί από πολλούς ερευνητές (Dutreix, 1997; Kashi *et al.*, 1997; Kashi & Soller, 1999; Marcotte *et al.*, 1999; Saito & Tomita, 1999; Gur-Arie *et al.*, 2000; Rocha *et al.* 2002).



Εικόνα 5. Πιθανές λειτουργίες των μικροδορυφόρων (Li *et al.*, 2002).

Πέρα από τις πιθανές λειτουργίες που αποδίδονται στους μικροδορυφόρους, η χρήση τους ως μοριακοί δείκτες για γενετική ταυτοποίηση παραμένει το σημαντικότερο χαρακτηριστικό τους. Το γεγονός αυτό βασίζεται στην πληθώρα των πλεονεκτημάτων τους, όπως για παράδειγμα το ότι είναι συγκυρίαρχοι δείκτες, παρουσιάζουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού, καθώς επίσης πολύ μεγάλη επαναληψιμότητα. Στα πλεονεκτήματα των μικροδορυφόρων προστίθεται το γεγονός ότι η εύρεση πολυμορφισμών είναι σχετικά απλή διαδικασία, εφόσον βέβαια γίνουν γνωστές οι εκατέρωθεν τους αλληλουχίες. Η ανίχνευση τους, μαζί με το υψηλό κόστος εφαρμογής, θεωρούνται ίσως τα σημαντικότερα μειονεκτήματά τους.

Οι δείκτες SSR έχουν προταθεί ως ιδανικοί για την κατασκευή «πυκνών» γενετικών χαρτών (Beckmann *et al.*, 1990) και έχουν μελετηθεί σε ένα μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών, περιλαμβανομένων του *Arabidopsis* (Bell and Ecker 1994), του αραβοσίτου (Senior and Heun 1993), του ρυζιού (Wu and Tanksley 1993) και τη σόγια (Akkaya *et al.*, 1992). Όσον αφορά το γένος *Cucumis*, οι πρώτες μελέτες, τόσο για γενετική χαρτογράφηση, όσο και για την μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας και κατ' επέκταση την γενετική ταυτοποίηση ποικιλιών, με την χρήση μικροδορυφόρων έγινε στο *C. melo* (Katzir *et al.*, 1996). Όμως, η ομολογία του *C. melo* με το *C. sativus* σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, παρά την μεγάλη διαφορά τους στο μέγεθος του γονιδιώματος, φτάνει στο 90% (Pasha *et al.*, 1998), γεγονός που επιτρέπει σε

αρκετές περιπτώσεις την χρήση τους και στα δυο είδη. Έτσι, π.χ. 20 από τα 31 ζεύγη εκκινητών που ενίσχυαν μικροδορυφορικές περιοχές στο *C. melo* χρησιμοποιήθηκαν στο *C. sativus* (Chiba *et al.*, 2003). Η χρήση δεικτών SSR ανάμεσα σε συγγενικά είδη δεν περιορίζεται μονό στο γένος *Cucumis*, αλλά έχει παρατηρηθεί και σε άλλα, όπως για παράδειγμα σε είδη του γένους *Vitis* (Thomas and Scott, 1993), καθώς επίσης και στα ψυχανθή (Peakall *et al.*, 1998). Βέβαια, σε άλλες περιπτώσεις γενών, όπως για παράδειγμα τα *Gramineae*, δεν έχει διαπιστωθεί η δυνατότητα χρήσης κοινών μικροδορυφορικών τόπων (Devos and Gale, 1997), γεγονός που αποδίδεται στη μεγάλη γενετική απόκλιση που έχουν μεταξύ τους.

2.3.4.1 Χλωροπλαστικοί Μικροδορυφόροι (cpSSR).

Πέρα από τους πυρηνικούς μικροδορυφόρους, μικροδορυφόροι βρίσκονται και στο χλωροπλαστικό γονιδίωμα. Οι αλληλουχίες αυτές είναι απλούστερες και βραχύτερες. Οι χλωροπλαστικοί μικροδορυφόροι είναι κατά το πλείστον μονονουκλεοτιδικού τύπου και είναι λιγότερο πολυμορφικοί, σε σχέση με τους πυρηνικούς μικροδορυφόρους. Επίσης, αποδίδουν ένα αλληλόμορφο ανά άτομο, γιατί αν και ο αριθμός των χλωροπλαστών, που βρίσκονται σε ένα κύτταρο, μπορεί να είναι μεγάλος, ανήκουν όλοι στον ίδιο γενετικό τύπο (Provan *et al.*, 1999).

Ο μικρότερος βαθμός πολυμορφισμού των χλωροπλαστικών μικροδορυφόρων μπορεί εύκολα να εξηγηθεί από τον μικρότερο ρυθμό των μεταλλάξεων στους χλωροπλάστες, γιατί σε αυτούς δεν υφίσταται μειωτικός ανασυνδυασμός. Με δεδομένο ότι το γονιδίωμα του χλωροπλάστη εξελίσσεται με διαφορετική ταχύτητα σε σύγκριση με αυτό του πυρήνα, οι cpSSR δείκτες παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τη μελέτη του αποικισμού καθώς και της μεταφοράς γονιδίων σε μεγάλες γεωγραφικές περιοχές (Wolfe *et al.*, 1987).

Ακόμη, πρέπει να σημειωθεί πως, αν και η χρήση χλωροπλαστικών μικροδορυφόρων δεν έχει μεγάλη διαγνωστική αξία στην γενετική ταυτοποίηση, εξαιτίας του μικρού βαθμού πολυμορφισμού που έχουν αυτοί οι δείκτες, μπορεί να φανούν χρήσιμοι σε κάποιες περιπτώσεις, όπως για

παράδειγμα στην ταυτοποίηση υβριδίων, για την εξακρίβωση του φυτού που χρησιμοποιήθηκε ως θηλυκός γονέας, όπως επίσης και στη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας αγενώς πολλαπλασιαζόμενων ειδών.

Χλωροπλαστικοί μικροδορυφόροι έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την γενετική ταυτοποίηση φυτών με ευρεία γενετική βάση, όπως για παράδειγμα το γένος *Vitis* (Lefort *et al.*, 2000). Επίσης, έχουν δημοσιευτεί και «οικουμενικοί» εκκινητές για την ενίσχυση χλωροπλαστικών μικροδορυφόρων στα Αγγειόσπερμα (Πίνακας 3) (Weising and Gardner, 1999). Πρέπει να σημειωθεί πως δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για την χρήση cpSSRs στο γένος *Cucumis*.

Πίνακας 3. Πέντε οικουμενικοί χλωροπλαστικοί μικροδορυφορικοί δείκτες στα Αγγειόσπερμα (Weising and Gardner, 1999).

Primer name	Primer sequence	Length in bases	Exp. Annealing temperature	Allele size
ccmp2 [F]	gatcccgacgtaacctg	19	50	166-234
ccmp2[R]	atcgtaccgagggttcgaat	20	50	
ccmp3 [F]	cagaccaaaaagctgacatag	20	50	89-119
ccmp3[R]	gtttcattcggctcctttat	20	50	
ccmp4 [F]	aatgctgaatcgaygaccta	20	50	115-220
ccmp4[R]	ccaaaatattbgaggactct	21	50	
ccmp6 [F]	cgatgcatatgtagaaagcc	20	50	93-111
ccmp6[R]	cattacgtgcgactatctcc	20	50	
ccmp10[F]	tttttttagtgaacgtgtca	22	50	91-300
ccmp10[R]	ttcgtcgdcgtagtaaataag	20	50	

2.4 Επιθυμητές ιδιότητες ενός ιδανικού Γενετικού δείκτη

Έχοντας παρουσιάσει όλα τα είδη γενετικών δεικτών μπορούμε να συνοψίσουμε όλες τις ιδιότητες που πρέπει να έχει ένας ιδανικός Γενετικός δείκτης:

- Να έχει υψηλό βαθμό πολυμορφισμού.
- Να έχει μεγάλη επαναληψιμότητα.

- Να είναι συγκυρίαρχος, δηλαδή να μπορεί να διαχωρίσει τα ετερόζυγα από τα ομόζυγα άτομα που ελέγχονται για το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό.
- Να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένος στο γονιδίωμα.
- Να διαθέτει μεγάλη διακριτική ικανότητα, δηλαδή να μπορεί να ξεχωρίσει πολύ συγγενικά άτομα.
- Να μην επηρεάζεται από τις περιβαλλοντολογικές συνθήκες.
- Να είναι ουδέτερος, δηλαδή να μην επηρεάζει την βιωσιμότητα του ατόμου που τον φέρει.
- Η διαδικασία ελέγχου να είναι σχετικά γρήγορη και όσο το δυνατόν φτηνή.

Είναι προφανές πως δεν υπάρχει κάποιος Γενετικός δείκτης που να συγκεντρώνει όλες τις παραπάνω ιδιότητες. Έτσι, η επιλογή της μεθοδολογίας και συνεπώς του δείκτη που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να γίνεται με βάση τους αντικειμενικούς στόχους του προγράμματος βελτίωσης ή ταυτοποίησης, την ιδιαιτερότητα της ποικιλομορφίας του προς εξέταση είδους και φυσικά τα τεχνικά χαρακτηριστικά κάθε μεθοδολογίας, δηλαδή τον εξοπλισμό, την εξειδίκευση του προσωπικού και το κόστος.

Πίνακας 4. Συγκριτικός πίνακας ιδιοτήτων των 4 κυριότερων μοριακών δεικτών (Semagn *et al.*, 2006).

	RFLP	RAPD	AFLP	Microsatellites
Γενετική Αφθονία	Υψηλή	Πολύ Υψηλή	Πολύ Υψηλή	Μέτρια
Ποσότητα DNA που απαιτείται	Μεγάλη	Μικρή	Μέτρια	Μικρή
Επίπεδο Πολυμορφισμού	Χαμηλό	Υψηλό	Πολύ Υψηλό	Υψηλό
Κληρονομικότητα	Συγκυρίαρχη	Κυρίαρχη	Κυρίαρχη	Συγκυρίαρχη
Διαχωρισμός Αλληλομόρφων	Ναι	Όχι	Όχι	Ναι
Επαναληψιμότητα	Υψηλή	Μέτρια	Υψηλή	Υψηλή
Ευκολία/Δυνατότητα Αυτοματοποίησης	Μικρή/Χαμηλή	Μεγάλη/Μέτρια	Μικρή/Μέτρια	Μικρή/Μέτρια
Κόστος	Μέτριο	Χαμηλό	Μέτριο	Μέτριο

2.5 Η συμβολή των Γενετικών Δεικτών στην επιλογή (MAS)

Πέρα από την γενετική ταυτοποίηση, μια σημαντική εφαρμογή των δεικτών, η οποία συνδέεται άμεσα με την γενετική βελτίωση των φυτών, είναι η επιλογή βασισμένη σε Μοριακούς δείκτες (**Marker Assistant Selection – MAS**). Η παραπάνω εφαρμογή, η οποία ουσιαστικά είναι η έμμεση επιλογή για ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό, βασίζεται στην παρουσία ή απουσία ενός δείκτη και όχι στην εκδήλωση του επιθυμητού γνωρίσματος.

Για οποιαδήποτε επιλογή θα πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον δυο πληθυσμοί, που διαφέρουν στο επιθυμητό γνώρισμα, το οποίο στην απλούστερη περίπτωση θα είναι μονογονιδιακό (*monogenic trait*). Αν οι δείκτες είναι αρκετά διασκορπισμένοι και καλύπτουν ένα μεγάλο μέρος του γονιδιώματος, τότε τουλάχιστον ένας από αυτούς θα πρέπει να είναι στενά συνδεδεμένος με τον γενετικό τόπο όπου εδράζει το επιθυμητό χαρακτηριστικό. Η αναγνώριση του δείκτη αυτού γίνεται μετά από τον έλεγχο ατελών ισογονιδιακών σειρών (**Near Isogenic Lines-NIL**), οι οποίες διαφέρουν μόνο στον επιθυμητό γενετικό τόπο (Burger *et al.*, 2003). Οι NIL δημιουργούνται με διαδοχικές επαναδιασταυρώσεις της σειράς που φέρει το χαρακτηριστικό με μια που δεν το διαθέτει. Ο πολυμορφισμός του δείκτη στις περιοχές του DNA γύρω από το γνώρισμα θα μπορεί να συνδεθεί άμεσα με την επιλογή του επιθυμητού γονοτύπου. Μειονέκτημα της παραπάνω στρατηγικής αποτελεί η χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία της δημιουργίας NIL.

Προκειμένου να ξεπεραστεί το παραπάνω πρόβλημα, μπορεί να ακολουθηθεί μια εναλλακτική στρατηγική, η μαζική ανάλυση διαχωρισμού (**Bulked Segregant Analysis – BSA**) (Michelmore *et al.*, 1991). Σύμφωνα με αυτή, τα άτομα χωρίζονται σε δυο πληθυσμούς, με βάση το επιθυμητό χαρακτηριστικό. Ταυτόχρονα, πραγματοποιούνται αναλύσεις και των δυο πληθυσμών με την επιλεγμένη τεχνική (π.χ. AFLP, RAPD, κ.τ.λ.), προκειμένου να εντοπιστούν οι κοινοί δείκτες που διαφοροποιούν τους δυο πληθυσμούς, ανεξαρτήτως αν όλοι οι δείκτες δεν συνδέονται μόνο με το επιθυμητό

χαρακτηριστικό, αφού οι πληθυσμοί έχουν διαφορές και σε άλλους γενετικούς τόπους (Thomas *et al.*, 1995 ; Brigneti *et al.*, 1997) .

3.1 Η χρήση των RGAs ως μέθοδο γενετικής ταυτοποίησης.

Τα ανάλογα γονιδίων ανθεκτικότητας (**R**esistance **G**enes **A**nalogs-RGAs), δεν αποτελούν, με την κλασική έννοια, μια κατηγορία γενετικών δεικτών. Αυτό αιτιολογείται από το γεγονός ότι δεν είναι ουδέτερα, αφού κάποια από αυτά είναι γονίδια ανθεκτικότητας, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την επικράτηση ενός πληθυσμού έναντι κάποιου άλλου σε ένα δεδομένο περιβάλλον. Επίσης, τα RGAs δεν χαρακτηρίζονται από μεγάλη διασπορά και τυχαία κατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα, αφού έχουν την τάση να εμφανίζονται σε ομάδες (clusters) (Leister *et al.*, 1998).

Παρ' όλα αυτά, τα ανάλογα γονιδίων ανθεκτικότητας θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση ανάπτυξης μοριακών δεικτών, συνδυάζοντας την γενετική ταυτοποίηση με την επιλογή ανθεκτικών φαινοτύπων (MAS), μονό που στην προκειμένη περίπτωση δεν θα γίνεται προσπάθεια ανεύρεσης ενός δείκτη που να συνδέεται με το φαινότυπο και συνεπώς με τον γενετικό τόπο, αλλά εντοπισμός όλων ή τουλάχιστον των περισσότερων τόπων που μπορεί να σχετίζονται με την ανθεκτικότητα, δηλαδή το ζητούμενο φαινότυπο.

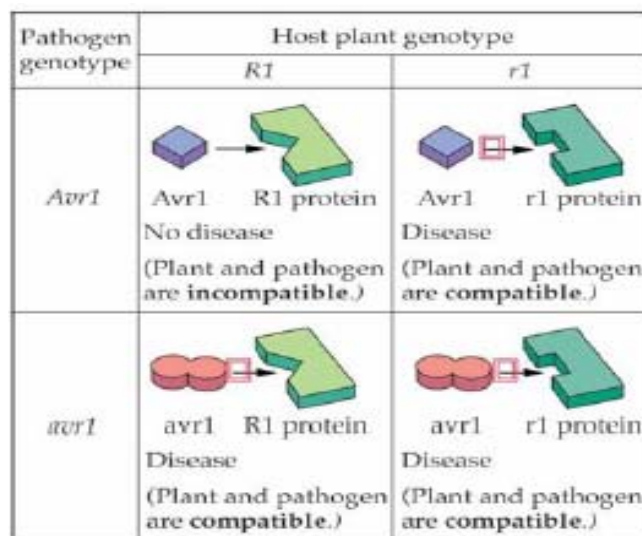
3.2 Γονίδια Ανθεκτικότητας.

Μέχρι τώρα, περισσότερα από 50 γονίδια ανθεκτικότητας (**R**esistance genes-R genes), προερχόμενα από διάφορα φυτικά είδη, έχουν κλωνοποιηθεί. Τα γονίδια αυτά προσφέρουν προστασία στα φυτά, τα οποία βρίσκονται συνεχώς εκτεθειμένα σε ένα εχθρικό περιβάλλον, έχοντας να αντιμετωπίσουν επιθέσεις από βακτήρια, μύκητες, ιούς και ασπόνδυλα, όπως νηματώδης (Whitham *et al.*, 1994, Buschges *et al.*, 1997, Collins *et al.* 1999, Wang *et al.*, 1999, Hulbert *et al.*, 2001).

Τα περισσότερα απομονωμένα γονίδια ανθεκτικότητας επιβεβαιώνουν την καθιερωμένη πλέον θεωρία του Flor «γονίδιο προς γονίδιο» (gene-for-gene hypothesis), βασική αρχή της οποίας είναι ότι «η αλληλεπίδραση φυτού-παθογόνου καθορίζεται γενετικά και από τα δύο» (Flor, 1956) (Εικόνα 6).

Σύμφωνα με την παραπάνω θεωρία μπορούν να συμβούν δυο ενδεχόμενα: να προκληθεί ασθένεια (συμβατή αντίδραση φυτού-παθογόνου) ή να μην προκληθεί ασθένεια (ασύμβατη αντίδραση φυτού-παθογόνου). Στην δεύτερη περίπτωση μιλάμε για εκδήλωση Αντίδρασης Υπερευαισθησίας (HR- **Hypersensitive Response**), (Alfano *et al.*, 1996). Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις του Flor, η γενετική βάση του φυτικού αμυντικού συστήματος περιλαμβάνει τα κυρίαρχα R γονίδια, τα προϊόντα των οποίων (R πρωτεΐνες) αντιλαμβάνονται συγκεκριμένα παθογόνα βακτήρια, εκείνα που φέρουν τα αντίστοιχα *avr* (avirulence) γονίδια.

Τα *avr* γονίδια κωδικοποιούν τις Avr πρωτεΐνες (δράστες, *effectors*) που εκκρίνονται από το TTSS (Εκκριτικό Σύστημα Τύπου III) και αναγνωρίζονται στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου από υποδοχείς που κωδικοποιούνται από τα R γονίδια του, με άμεσο αποτέλεσμα την Αντίδραση Υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response – HR) και την εμφάνιση ανθεκτικότητας (Boucher *et al.*, 2000).



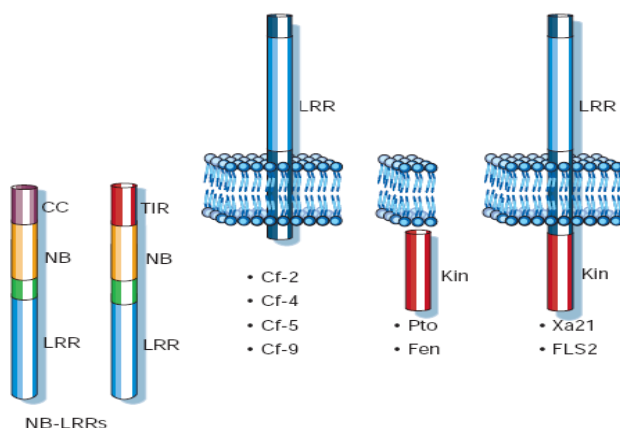
Εικόνα 6. Η αλληλεπίδραση R-Avr σύμφωνα με την υπόθεση «γονίδιο προς γονίδιο» του Flor (Buchanan *et al.*, 2000) .

Φυσικά, υπάρχουν και εξαιρέσεις ως προς την υπόθεση του Flor, όπως για παράδειγμα το κυρίαρχο *Hm1* από τον αραβόσιτο, καθώς και τα υπολειπόμενα *mlo* στη σίκαλη και το *edr1* στο *Arabidopsis* (Johal and Briggs 1992, Buschges *et al.*, 1997, Frye and Innes 1998, Kim *et al.*, 2002).

Η παρουσία συντηρημένων περιοχών στην πρωτεϊνική αλληλουχία των R γονιδίων επιτρέπει την κατάταξη τους σε 4 μεγάλες κατηγορίες (Εικόνα 7).

1. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα R γονίδια που κωδικοποιούν για κινάσες Ser/Thr (π.χ. *Pto*, *Fen*) (Martin *et al.*, 1993).
2. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει R γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, που εκτός από δομικές κινάσες υποδοχής περιέχουν και εξωκυτταρικές περιοχές πλούσιες σε Λευκίνες (**L**eucine **R**ich **R**epeats - LRR) (π.χ. *Xa21* από το ρύζι) (Song *et al.*, 1995).
3. Η τρίτη κατηγορία R γονιδίων περιλαμβάνει εκείνα που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που έχουν μόνο εξωκυτταρικές περιοχές LRR (Jones *et al.*, 1994).
4. Η τέταρτη και μεγαλύτερη κατηγορία γονιδίων ανθεκτικότητας, αφού το 80% των γνωστών R γονιδίων ανήκουν σε αυτή, περιλαμβάνει γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που περιέχουν περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (**N**ucleotide **B**inding **S**ite-NBS) καθώς και περιοχές πλούσιες σε Λευκίνες (LRR). Η NBS-LRR κατηγορία R γονιδίων μπορεί να υποκατηγοριοποιηθεί σε δυο ομάδες (Meyers *et al.*, 1999):
 - a. Στην ομάδα TIR, που κωδικοποιεί για μια περιοχή ομόλογη για τον υποδοχέα TIR (Toll and Interleukin-1) στο N-τελικό άκρο.
 - b. Στην ομάδα non-TIR, η οποία στο N-τελικό της άκρο περιέχει μια **Coiled-Coil** (CC) περιοχή.

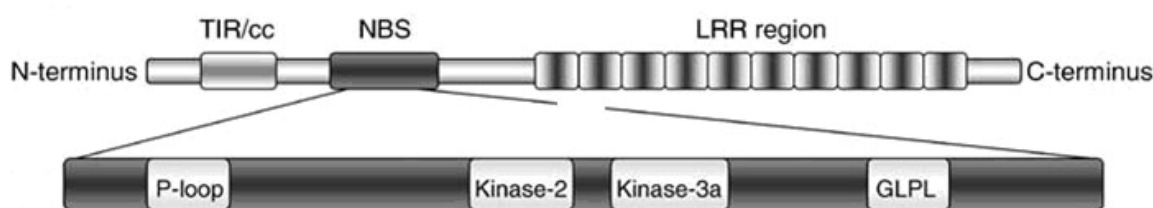
Οι δυο αυτές ομάδες μπορούν να διαχωριστούν από διαφορές εντός της NBS περιοχής, όπως για παράδειγμα το τελευταίο αμινοξύ στην περιοχή kinase-2, που για την ομάδα NBS-LRR-TIR είναι το ασπαρτικό, ενώ για την ομάδα NBS-LRR-CC είναι τρυπτοφάνη. Μέχρι στιγμής, η ομάδα NBS-LRR-TIR εμφανίζεται μόνο στα Δικότυλα, ενώ αντίθετα η NBS-LRR-CC υπάρχει σε όλα τα Αγγειόσπερμα (Meyers *et al.*, 2000).



Εικόνα 7. Οι κατηγορίες των R γονιδίων στα φυτά, καθώς και παραδείγματα αυτών (Dangl *et al.*, 2001).

3.2 Ανίχνευση Ανάλογων Γονιδίων Ανθεκτικότητας.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η μεγαλύτερη ομάδα R γονιδίων ανήκει στην κατηγορία NBS-LRR. Η NBS περιοχή παρουσιάζει υψηλή ομολογία ανάμεσα στα R γονίδια και περιέχει τέσσερα συντηρημένα μοτίβα (Εικόνα 8). Τα μοτίβα P-loop και Kinase-2 έχουν χαρακτηριστεί ως περιοχές πρόσδεσης ATP και GTP. Η P-loop περιοχή αλληλεπιδρά άμεσα με τη φωσφορική ομάδα του νουκλεοτιδίου, ενώ η περιοχή Kinase-2 εμπλέκεται στον προσανατολισμό των ιόντων Mg^{+} , που απαιτούνται για τις αντιδράσεις μεταφοράς φωσφορικών ομάδων (Meyers *et al.*, 1999). Τα μοτίβα Kinase-3a και GLPL αποτελούν περιοχές διεύρυνσης της μεμβράνης (membrane spanning domains) και χαρακτηρίζονται από επαναλαμβανόμενες αμινοξικές αλληλουχίες.



Εικόνα 8. Τα συντηρημένα μοτίβα της NBS περιοχής (Gaspero *et al.*, 2002)

Τα συντηρημένα αυτά μοτίβα εντός της NBS περιοχής έδωσαν την δυνατότητα σχεδιασμού εκφυλισμένων εκκινήτων για την πολυπλυθέστερη κατηγορία R γονιδίων. Η στρατηγική αυτή, η οποία βασίστηκε στην PCR, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση αλληλουχιών που περιείχαν NBS-LRR περιοχές από πολλά φυτά όπως την πατάτα (Leister *et al.*, 1996), την σόγια (Kanazin *et al.*, 1996 και Yu *et al.*, 1996), τον αραβοσιτο (Collins *et al.*, 1998), τη μηδική (Skinner *et al.*, 2000) και το *Arabidopsis*. Πρέπει να σημειωθεί ότι στο *Arabidopsis* οι αλληλουχίες που περιέχουν NBS μοτίβα αριθμούν περί τις 200 και καλύπτουν το 1-1,5% των κωδικών περιοχών του (Mayers *et al.*, 1999).

Η ύπαρξη αυτού του μεγάλου αριθμού αλληλουχιών που μοιάζουν με γονίδια ανθεκτικότητας, χωρίς απαραίτητα να είναι λειτουργικά, υποστηρίζει την θεωρία πως αυτά δημιουργήθηκαν με γενετικές ανακατατάξεις βασισμένες

στον μειωτικό ανασυνδυασμό, στον διπλασιασμό γονιδίων, καθώς και στον άνισο διασκελισμό, δηλαδή στον ανασυνδυασμό μεταξύ μη ομόλογων τμημάτων, προκειμένου να δημιουργηθούν εν δυνάμει γονίδια ανθεκτικότητας, τα οποία θα αποτελούν το οπλοστάσιο του φυτού ενάντια σε κάθε νεοεμφανιζόμενη απειλή. Η θεωρία αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι αλλαγές στη NBS περιοχή ή σε άλλες περιπτώσεις στο μήκος της LRR περιοχής οδηγεί στην δημιουργία διαφορετικών R γονιδίων (Ellis *et al.*, 1999).

Στις περισσότερες από τις παραπάνω αναφορές δεν παρουσιάστηκε μονό ο επιτυχής πολυμερισμός αλληλουχιών με NBS-LRR περιοχές, αλλά βρέθηκε πως η αλληλουχίες αυτές γειτνιάζουν με ήδη εντοπισμένους γενετικούς τόπους που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα. Έτσι, δόθηκε η δυνατότητα χρήσης των αλληλουχιών αυτών, οι οποίες ονομάστηκαν Ανάλογα Γονιδίων Ανθεκτικότητας (RGAs, Resistance Gene Candidates-RGCs, Resistance Gene Like sequences –RGLs), τόσο ως το πρώτο βήμα εντοπισμού νέων γονιδίων ανθεκτικότητας, όσο και ως εργαλείο γενετικής χαρτογράφησης και γενετικής ταυτοποίησης ποικιλιών (Gaspero *et al.*, 2002).

4. Σκοπός Μεταπτυχιακής Διατριβής.

Το *Cucumis sativus* είναι ένα από τα πιο δημοφιλή λαχανικά της οικογένειας των κολοκυνθοειδών και καλλιεργείται σε όλες τις ηπείρους. Στην χώρα μας αποτελεί ένα από τα πλέον καλλιεργούμενα υπό κάλυψη λαχανικά, με μεγάλη συνεισφορά στις εξαγωγές νωπών προϊόντων.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή γίνεται προσπάθεια ανεύρεσης και εφαρμογής σύγχρονων μεθόδων γενετικής ταυτοποίησης, η οποίες στηρίζονται στην χρήση μοριακών δεικτών. Πάνω σε αυτό το πλαίσιο αναπτυχθήκαν δυο διαφορετικές προσεγγίσεις.

Η πρώτη προσέγγιση περιλάμβανε την εφαρμογή Απλών Επαναλαμβανόμενων Αλληλουχιών (SSRs). Αρχικά, δημιουργήθηκε μια *in silico* βιβλιοθήκη με όλους τους SSRs για το αγγούρι, ενώ στη συνέχεια δοκιμάστηκαν δεκαπέντε μικροδορυφορικοί τόποι για την μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας.

Στη δεύτερη προσέγγιση, γίνεται προσπάθεια εντοπισμού νέων υποψήφιων μοριακών δεικτών στο αγγούρι, των Αναλόγων Γονιδίων Ανθεκτικότητας (RGAs), οι οποίοι μπορούν να μεταφέρουν την μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας σε ένα πιο εφαρμοσμένο πεδίο έρευνας, διαχωρίζοντας ανθεκτικούς από ευπαθείς γονοτύπους.

Υλικά και Μέθοδοι

A) Υλικά

Φυτικό Υλικό

Όλα τα εξεταζόμενα δείγματα *C. sativus* που χρησιμοποιηθήκαν εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα, όπου αναγράφεται το όνομα τους, ο γενετικός τους τύπος και η ταξινόμηση τους ανάλογα με το μέγεθος του καρπού τους σε κοντόκαρπα και μακρύκαρπα.

TM11	ποικιλία	κοντόκαρπη
M20	ποικιλία	κοντόκαρπη
M10	ποικιλία	κοντόκαρπη
TM1	ποικιλία	κοντόκαρπη
M4	ποικιλία	κοντόκαρπη
M21	ποικιλία	κοντόκαρπη
F1PS	F1 υβρίδιο	κοντόκαρπη
F1GE	F1 υβρίδιο	κοντόκαρπη
M1	ποικιλία	κοντόκαρπη
L1	ποικιλία	μακρύκαρπη
ZxL12	F1 υβρίδιο	μακρύκαρπη
L20	ποικιλία	μακρύκαρπη
ZxL2	F1 υβρίδιο	μακρύκαρπη
DIAS	F1 υβρίδιο	μακρύκαρπη
L6	ποικιλία	μακρύκαρπη
L25	ποικιλία	μακρύκαρπη
CRETA	F1 υβρίδιο	μακρύκαρπη
VALENTIN	F1 υβρίδιο	μακρύκαρπη
L4	ποικιλία	μακρύκαρπη
L14	ποικιλία	μακρύκαρπη
SMR18	ποικιλία	κοντόκαρπη
ΚΝΩΣΟΥ	ποικιλία	κοντόκαρπη

Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών, με 75% υγρασία, θερμοκρασία 25±2°C και φωτοπερίοδο 16/8 h φώς-σκοτάδι.

Εκκινητές

ONOMA	Fw PRIMER	Rv PRIMER	IR-dye
K: AJ629867	tgtaaaagagagtgccagcaatca	tgcagtggtctaaatgcaagagag	IR-800
F: AJ307	gttaatggcggtttgatgatag	tccaattcgtcttattttctcca	IR-800
C: D594	atccacccatctaacaaaaatg	aacaagagccatgaaagaaacct	IR-800
D: DN316	aacacgtaaaacaaaaacccaaac	tagaagatcaagaagagcaagcaa	IR-800
I: DQ672	gatagcttctgtacctctctcaaa	caaattcttcaccagaaaccaac	IR-700
G: DQ410 nest1	aagatcaagccaaccgcaag	catctcgataaaatcctccac	IR-700
H: DQ410 nest2	ggaggattttatgcgagatgtt	aatgttgaaatggggacaagt	IR-700
J: EI86187	attgcagttggactatgaagagaa	tgagaataaacagtggaaaacgag	IR-700
A: X58542	gcaaaagtcggtgagtagacgtaa	aaaggaacagcacaaccctaaatc	IR-700
B: Z35499	agactgcctattttgaccacag	tggaaactgtctgttatgaggtg	IR-800
E: CK791	ggaggaggtacatggctttg	tgaatctgatctttctaccttaca	IR-800
L: DN910632	ggagtacacagtgggggaaa	ggaggacaagagtggagctg	IR-800
M: CK759477	tctccctctatttatccgtacc	ttgcggattaggtcttccag	IR-800
N: CV004821	cctctgagatgccctttctg	agaaggcaaaggcaaattca	IR-800
O: DN909316ch	tggtggtgggactccactat	gtggaggaagcaggagatga	IR-800

Όλοι οι σημασμένοι εκκινητές κατασκευάστηκαν από τη Metabion, η σήμανση έγινε στο 5' ακρο του Fw εκκινητή. Όλοι οι υπόλοιποι, περιλαμβανομένων και των εκφυλισμένων, κατασκευάστηκαν από το Εργ. Μικροχημείας (ITE).

Χημικά-Αναλώσιμα

Τα χημικά και τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης προήλθαν από τις εταιρίες INVITROGENE, FINZYMES, PROMEGA, SIGMA CHEMICALS, HT Biotechnology, STRATAGENE, MERCK, και LI-COR.

B) Μέθοδοι

1. *In silico* ανίχνευση μικροδορυφορικών αλληλουχιών.

Όλες οι κατατεθειμένες αλληλουχίες στη Βάση Δεδομένων του NCBI για το *C. sativus* ελέγχθηκαν με τον αλγόριθμο του προγράμματος MISA (**MI**cro**SA**ttellite identification tool , Thiel *et al.*, 2002) για την εύρεση απλών όσο και σύνθετων μικροδορυφορικών επαναλήψεων ενός έως και έξι νουκλεοτιδίων. Οι παράμετροι λειτουργίας του προγράμματος ορίστηκαν έτσι ώστε SSR να θεωρείται από το πρόγραμμα οποιαδήποτε αλληλουχία περιέχει τουλάχιστον 10 μονονουκλεοτιδικές και τουλάχιστον 5 δι-, τρι-, τετρα-, πεντα-, εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις. Για την εύρεση και σύνθετων μικροδορυφόρων, δηλαδή αυτών που περιέχουν περισσότερα από ένα είδος επαναλήψεων ή αυτών που χωρίζονται από μη επαναληπτικό DNA, ορίστηκε ως ελάχιστη απόσταση μεταξύ δυο SSR να είναι τα 150 νουκλεοτίδια.

Όσον αφορά τον έλεγχο ESTs, προκειμένου να αποφευχθεί η εύρεση των πολυ-A και πολυ-T επαναλήψεων, που συνήθως υπάρχουν στα άκρα τους, από το πρόγραμμα MISA και να θεωρηθούν υποψήφιοι μικροδορυφόροι, έγινε προ-επεξεργασία των αλληλουχιών EST με το πρόγραμμα EST-trimmer (Thiel *et al.*, 2002), προκειμένου να αφαιρεθούν αυτού του είδους οι επαναλήψεις.

2. Απομόνωση DNA από φυτικό ιστό

Η απομόνωση DNA από φυτικό ιστό πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο Delaporta (Delaporta *et al.*, 1983), το οποίο τροποποιήθηκε για τις ανάγκες του πειράματος.

- ▶ Γνωστή ποσότητα νωπού ή διατηρούμενου στους -80°C φυτικού ιστού λειοτριβείται σε γουδί με τη βοήθεια υγρού αζώτου.

- ▶ Ο ιστός μεταφέρεται σε σωλήνα falcon, όπου προστίθεται 1 ml/gr ιστού Extraction Buffer και PVP 20% w/w ιστού.
- ▶ Προσθήκη 700 μl/gr ιστού 20% SDS (προθερμασμένου στους 65°C) και ανάμιξη με ισχυρή ανάδευση (vortex). Ακολουθεί επώαση του σωλήνα στους 65°C για 10 min.
- ▶ Προσθήκη 350 μl/gr ιστού 5 M οξικού Καλίου και ανάμιξη. Επώαση του σωλήνα στον πάγο για 20 min.
- ▶ Φυγοκέντρηση του σωλήνα στις 13000 rpm για 10 min και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα, ο οποίος περιέχει ίσο όγκο παγωμένης ισοπροπανόλης (1xV) ή 2,5xV παγωμένης αιθανόλης .
- ▶ Το δείγμα ανακινείται ελαφρά και η συλλογή του DNA γίνεται με γυάλινη ράβδο ,η οποία αποστειρώνεται σε φλόγα πριν την διαδικασία (spooling).
- ▶ Το DNA που βρίσκεται συγκεντρωμένο στην άκρη της ράβδου διαλύεται σε erpendorf που περιέχει 0,7 ml TE (pH 8) .
- ▶ Ακολουθεί καθαρισμός του δείγματος με Φαινόλη .

DNA Extraction Buffer :

1. 100mM Tris-HCl (pH 8)
2. 50mM EDTA (pH 8)
3. 500mM NaCl
4. 10mM β-μερκαπτοαιθανόλη

3. Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με Φαινόλη

Ο καθαρισμός των νουκλεϊνικών οξέων προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της Φαινόλης (Sambrook *et al.*, 1989).

- ▶ Σε φιαλίδιο erpendorf με το προς καθαρισμό δείγμα σε υδατικό διάλυμα, προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης και ακολουθεί έντονη ανακίνηση (vortex) για ανάμιξη των δύο φάσεων.
- ▶ Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 13000rpm .

- ▶ Το υπερκείμενο (υδατική φάση) μεταφέρεται, χωρίς να ανακινηθούν οι δύο φάσεις, σε καινούργιο erpendorf και προστίθεται ίσος όγκος μίγματος φαινόλης:χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) .
- ▶ Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 13000rpm .
- ▶ Επαναλαμβάνεται το 3ο και 4ο βήμα μέχρις ότου να εξαφανιστεί η ενδιάμεση φάση που δημιουργείται μετά την φυγοκέντρηση ανάμεσα στην υδατική και την οργανική φάση .
- ▶ Το υπερκείμενο μεταφέρεται και πάλι σε νέο erpendorf, όπου προστίθεται ίσος όγκος μίγματος χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα φαινόλης, αναδεύεται ισχυρά και φυγοκεντρείται για 2 min στις 13000rpm .
- ▶ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο erpendorf και προστίθενται 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa (pH=5.5) και 2,5 όγκοι παγωμένης απόλυτης αιθανόλης. Το δείγμα επωάζεται στους -20°C για 12 ώρες τουλάχιστον, για κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων .
- ▶ Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 13000rpm, στους 4°C .
- ▶ Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει .
- ▶ Το ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα ddH₂O ή TE, στον πάγο .

4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της Αλκαλικής Λύσης

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Αλκαλικής Λύσης (Sambrook *et al.*, 1989).

- ▶ Αναπτύσσεται βακτηριακή καλλιέργεια για 12-14 h (O/N) στο κατάλληλο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα με το κατάλληλο αντιβιοτικό.
- ▶ Εισάγεται σε φιαλίδιο erpendorf 1,5 ml από την καλλιέργεια και φυγοκεντρείται για 5 min στις 13000 rpm .

- ▶ Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.
 - ▶ Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 μl κρύου διαλύματος P1 και ακολουθεί έντονη ανάδευση .
 - ▶ Προστίθενται 250 μl διαλύματος P2, το δείγμα ανακινείται αργά και αφήνεται να ηρεμίσει σε θερμοκρασία δωματίου (όχι για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 5 min, μέχρι το επόμενο βήμα).
 - ▶ Προστίθενται 300 μl κρύου διαλύματος P3 και το δείγμα ανακινείται μέχρι να σχηματιστεί λευκό αιώρημα (σπασμένα κυτταρικά τοιχώματα) στο διάλυμα.
 - ▶ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 15 min.
 - ▶ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο και προστίθενται 2 όγκοι παγωμένης αιθανόλης. Το μίγμα αναμιγνύεται καλά.
 - ▶ Το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min περίπου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 20 min.
 - ▶ Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 20-50 μL ddH₂O.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C, για αρκετό χρόνο.

Διαλύματα :

- **P1**
20μl 0,5M EDTA, 50 μl 10mM Tris-HCl (pH=8.0), 10μl RNase (100ng/ml) και 920 μl ddH₂O, για 1ml.
- **P2**
1 % SDS, 0,2N NaOH, (παρασκευάζεται φρέσκο για κάθε απομόνωση).
- **P3**
60 ml από 3+5 M οξικό Κάλιο (Potassium Acetate), 11,5 ml οξικό οξύ (glacial acetic acid) και 28,5 ml ddH₂O για τελικό όγκο 100ml.

5. Απομόνωση mRNA από φυτικό ιστό.

Η απομόνωση mRNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της όξινης Φαινόλης (Iandolino et al., 2004).

- ▶ Γνωστή ποσότητα νωπού ή διατηρούμενου στους -80°C φυτικού ιστού λειοτριβείται σε γουδί με τη βοήθεια υγρού αζώτου.
- ▶ Ο ιστός μεταφέρεται σε σωλήνα falcon, όπου προστίθεται 5 ml/gr ιστού RNA Extraction Buffer και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση .
- ▶ Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στις 3500 rpm για 30 min στους 4°C .
- ▶ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προστίθεται ίσος όγκος μίγματος Φαινόλης:Χλωροφορμίου:Ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και αναδεύεται ισχυρά.
- ▶ Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα και προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος LiCl 8M.
- ▶ Το δείγμα τοποθετείται στους -20°C για τουλάχιστον 12 h .
- ▶ Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 3500 rpm για 30 min στους 4°C .
- ▶ Το ίζημα διαλύεται σε 300 μl ddH₂O και τοποθετείται σε eppendorf όπου προσθέτονται 2,5 όγκοι απόλυτης παγωμένης αιθανόλης.
- ▶ Το δείγμα τοποθετείται για 30 min στους -20°C .
- ▶ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C , στις 13000 rpm για 30 min.
- ▶ Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται 1 ml αιθανόλη 70%.
- ▶ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C , στις 13000 rpm για 30 min.
- ▶ Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.
- ▶ Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 μl ddH₂O.

6. Κατεργασία με DNάση.

Ο κατεργασία με DNάση πραγματοποιείται μετά την απομόνωση και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA, πριν πραγματοποιηθεί η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, με σκοπό να απομακρυνθούν οποιαδήποτε υπολείμματα DNA που θα αλλοίωναν τα αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR. Η διαδικασία πραγματοποιείται με τη χρήση του ένζυμου RQ1 RNase-Free

DNaseI, το οποίο αποδομεί μόνο- και δι-κλωνα μόρια DNA ενδονουκλεολυτικά, παράγοντας 3'-OH νουκλεοτίδια. Η αντίδραση συνήθως πραγματοποιείται σε όγκους που κυμαίνονται από 30-80μl, ανάλογα με τη συγκέντρωση του RNA που είναι διαθέσιμη. Τα συστατικά της αντίδρασης περιλαμβάνουν:

- a. 10-20μgr ολικό RNA
 - b. πυκνό (10X) ρυθμιστικό διάλυμα RQ1 DNase, σε τελική συγκέντρωση 1X.
 - c. 0,5μl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40u/μl)
 - d. 4-5 units RQ1 RNase-FREE DNaseI (1u/μl)
 - e. ddHB2BO, μέχρι τη συμπλήρωση του τελικού όγκου.
- ▶ Το μίγμα επωάζεται για 45-60 λεπτά στους 37° C.
 - ▶ Ακολουθεί ο καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης με τη μέθοδο της Φαινόλης.
 - ▶ Μετά τον καθαρισμό ακολουθεί εκ νέου προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA στα φιαλίδια.

7. Αντίστροφη Μεταγραφή-RT

Με τη διαδικασία αυτή συντίθεται μονόκλωνο cDNA από ολικό ή πολυ-A RNA. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η Super Reverse Transcriptase. Η αντίδραση που πραγματοποιείται σε δυο στάδια έχει ως εξής:

- 1^ο στάδιο
Σε φιαλίδιο χωρητικότητας 0,5ml προστήθονται:
 - 1-2,5μgr ολικό RNA
 - oligo-dT [ή oligo-dT+APs(Adapter Primer) για 3' RACE] σε τελική συγκέντρωση 25ng/μl ή 2pmol
 - dNTPs σε τελική συγκέντρωση 0,5mM
 - ddHB2BO, μέχρι συμπλήρωσης του όγκουΤο μίγμα αναμιγνύεται και θερμαίνεται 5-7 λεπτά στους 65° C για αποδιάταξη και στη συνέχεια τοποθετείται στον πάγο.
- 2^ο στάδιο
Στο δείγμα προστίθενται:

- ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης σε τελική αναλογία 1X

- DTT (100mM) σε τελική συγκέντρωση 10mM

- 1-1,5μl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor

Το δείγμα αναμιγνύεται και τοποθετείται στους 42° C για 2 λεπτά, προστίθεται 1,5μl SuperRT (200u/μl) και επωάζεται στους 42° C για 1 ώρα.

Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται στους 70° C για 15 λεπτά και τέλος τοποθετείται στους 4° C.

Για την αντίδραση του PCR μπορούν να

χρησιμοποιηθούν όγκοι που αντιστοιχούν στο 1/10 της αντίδρασης του RT

8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-PCR.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις των συστατικών στοιχείων των PCR που πραγματοποιηθήκαν:

REAGENT	C at 25 λ	V (for FV=25)
template	30 ng	1
dNTPs(10mM)	200μM	0,5
primer Fw (50μM)	0,25μM	0,25
primer Rv (50μM)	0,25μM	0,25
EXT(1U/λ)	0,5U	0,5
buffer (10X)(+15mM Mg)*	1X	2,5
Mg(50mM)	1,5-2 mM	0* - 1
ddH2O		20-19

Οι PCR πραγματοποιηθήκαν σε συνολικά 30 κύκλους. Η αρχική αποδιάταξη γινόταν στους 94° C για 4 min (με χρόνο 7 min για γενωμικό DNA ή colony PCR). Σε κάθε κύκλο η αποδιάταξη ήταν στους 94° C για 1 min, ακολουθούσε η θερμοκρασίας υβριδισμού Tm για 1 min και η ενίσχυση του DNA στους 74° C για 1 min. Η τελική ενίσχυση γινόταν στους 74° C για 5 min.

Στον πίνακα που ακολουθεί εμφανίζονται οι συνθήκες της PCR για τους μικροδορυφορικούς εκκινητές.

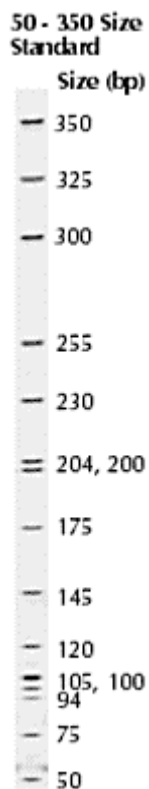
ΟΝΟΜΑ	T _m (°C)	[Mg ⁺²] mM
K: AJ629867	53	2
F: AJ307	48	1,5
C: D594	50	2
D: DN316	50	2
I: DQ672	48	2
G: DQ410 nest1	50	1,5
H: DQ410 nest2	48	1,5
J: EI86187	50	1,5
A: X58542	52	1,5
B: Z35499	52	1,5
E: CK791	50	2
L: DN910632	57	2
M: CK759477	57	2
N: CV004821	53	2
O: DN909316ch	57	2

9. Ανάλυση SSR σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Τα δείγματα DNA υφίστανται την ακόλουθη επεξεργασία πριν την ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αλληλούχισης πολυακρυλαμίδης (sequencing gel):

- Ανάλογα με την ένταση των ζωνών που έδωσαν κατά την ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης, προσαρμόζεται η αναλογία προϊόντος PCR και IR² stop solution buffer (Li-COR), που θα χρησιμοποιηθεί. Συνήθως αναμειγνύονται 1λ δείγματος, 2λ IR² stop solution buffer και 3λ ddH₂O προκειμένου η αναλογία του IR² stop solution buffer να μην είναι μικρότερη από το 1/3 του όγκου που θα φορτωθεί. Πολύ σημαντικό στοιχείο για την επιτυχία της ηλεκτροφόρησης είναι η ισοφόρτωση των δειγμάτων.
- Ακολούθως τα δείγματα αποδιατάσσονται για 5 min στους 96^o C και τοποθετούνται αμέσως σε μίγμα νερού και πάγου, προκειμένου να παραμείνουν «ανοιχτά».

- Παράλληλα προετοιμάζεται το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης KB plus 6,5% (LI-COR) σε τελικό όγκο 18ml. Το διάλυμα που προκύπτει αναμειγνύεται και φιλτράρεται, και σε αυτό προστίθενται 180 μl από 10% APS και 18 μl TEMED. Ακολούθως το μίγμα τοποθετείται στις κατάλληλες γυάλινες πλάκες και αφήνεται να πολυμεριστεί για δύο ώρες.
- Μετά τον πολυμερισμό το πήκτωμα τοποθετείται στον αυτόματο αναλυτή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών Licor 4200(Licor, Lincoln, NE), σε TBE 1X, και ηλεκτροφορεύεται για 50 λεπτά, πριν φορτωθούν σε αυτό τα δείγματα, στα 2000 volt.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στο πήκτωμα, μαζί με έναν δείκτη Μοριακού Βάρους (LI-COR, IRD800, 4000-44B, 50-350bp, Εικ.1) και ηλεκτροφορούνται για 1,5 h.
- Το πρόγραμμα Data Collection χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ηλεκτροφορετικών παραμέτρων (1500 volt) και τη συλλογή των εικόνων.



Εικόνα 1. Δείκτης Μοριακού Βάρους 50-350bp.

10. Υβριδισμός Αποικιών (Colony Dot Blot)

Το colony dot blot βασίζεται στην τοπική μεταφορά του DNA των βακτηριακών κυττάρων στην μεμβράνη και τον υβριδισμό του με τον σημασμένο ανιχνευτή (υβριδισμός κατά Southern). Η μοναδική διαφοροποίηση της τεχνικής από τον υβριδισμό κατά Southern, που αναφέρετε παρακάτω, είναι το γεγονός ότι η λύση των κυττάρων γίνεται πάνω στην μεμβράνη, μετά την αποτύπωση τους από το τρυβλίο, εξαιτίας του ισχυρού αλκαλικού περιβάλλοντος (NaOH).

11. Υβριδισμός Κατά Southern

Μεταφορά και πρόσδεση σε μεμβράνη

- ▶ Το gel μεταφέρεται σε σκεύος (pyrex) και εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0,2N HCl για 15 min.
- ▶ Αφού απορριφθεί το προηγούμενο διάλυμα, στο σκεύος τοποθετείται διάλυμα 0,4N NaOH για 30 min.
- ▶ Παράλληλα η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα SSC 2x (Sodium Sodium Citrate), όπως επίσης και δύο κομμάτια χαρτιού Whatman ίδιου μεγέθους.
- ▶ Στο σκεύος (pyrex) πληρείται με διάλυμα SSC (10x) και στην επιφάνεια του υγρού τοποθετείται ένα τετραγωνισμένο τζαμί το οποίο θα στηρίξει το gel. Γύρω από το τζαμί τοποθετούνται τα δύο φύλλα Whatman, ώστε να βρίσκεται η κάτω επιφάνεια τους στο υγρό.
- ▶ Στην πάνω επιφάνεια, τοποθετείται το gel.
- ▶ Η μεμβράνη τοποθετείται πάνω στο πήκτωμα.
- ▶ Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετούνται φύλλα απορροφητικού χαρτιού και ένα βάρος περίπου 500 gr.
- ▶ Η μεταφορά γίνεται για 24 h.
- ▶ Η μεμβράνη αφαιρείται, αφήνεται να στεγνώσει και ακτινοβολείται σε συσκευή UV σταυρωτής σύνδεσης (Stratagene) στα 254nm με συνολική έκθεση 1,5 j/cm.
- ▶ Η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα προ-υβριδοποίησης (Church buffer) για τουλάχιστον 1 h.

Church buffer:

0.5 M phosphate buffer (pH 7.2)

1 mM EDTA (pH 8)

7% (w/v) SDS

1% (w/v) BSA

Παρασκευή ιχνηλάτη (probe)

Για την παρασκευή του ιχνηλάτη χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα DNA μετά από πέψη του ενθέματος από τον κλώνο SMR_C. Η τεχνική με την οποία έγινε η παρασκευή ήταν εκείνη του τυχαίου εκκινιτή (Random priming). Η αντίδραση ήταν η εξής:

200 ng cDNA 2,5 μl dCTP-a P ³² (0.5mM) 2,5 μl dATP-a P ³² (0.5mM) 5 μl dGTP (0.5mM) 5 μl dTTP (0.5mM) 5 μl Klenow buffer (10x) 4 μl Random primers (150ng/μl) 1 μl Klenow (5u/μl) ddH ₂ O μέχρι την συμπλήρωση του τελικού όγκου αντίδρασης
Vol=50 μl

- ▶ Το δείγμα DNA βράζεται για 5 min προκειμένου να αποδιαταχτεί και αμέσως μετά μεταφέρεται σε πάγο.
- ▶ Προσθέτονται όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, με ιδιαίτερη προσοχή στα ραδιενεργά σημασμένα νουκλεοτίδια.
- ▶ Η αντίδραση επωάζεται για 1,5 h στους 37° C.
- ▶ Παράλληλα παρασκευάζεται κολώνα Sephadex G-25, προκειμένου να καθαριστεί ο ιχνηλάτης. Σε σύριγγα 1 ml τοποθετούνται 100 ml Sephadex G-25. Για το έλεγχο της κολώνας προστίθενται 100 μl TE και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 5 min ώστε να ελεγχθεί ο εκλουόμενος όγκος.
- ▶ Όλη η ποσότητα του ιχνηλάτη και ίσος όγκος ddH₂O τοποθετούνται στην κολώνα, φυγοκεντρώνονται για 5 min στις 5000 rpm και συλλέγονται σε erpendorf.
- ▶ Όλη η ποσότητα που συλλέγεται από την κολώνα χρησιμοποιείται για την υβριδοποίηση της μεμβράνης.
- ▶ Η υβριδοποίηση έγινε στους 59° C για τουλάχιστον 12 h (O/N).

Ξέπλυμα μεμβράνης

- ▶ Το διάλυμα υβριδοποίησης απομακρύνεται.
- ▶ Ακολουθούν διαδοχικά ξεπλύματα με 2X SSC (Sodium Sodium Citrate) και 0,5% SDS για 15 min και 2X SSC, 0,1% SDS για 15 min.
- ▶ Το τελικό ξεπλυμα πραγματοποιείται με 0,1X SSC, 0,1% SDS για 20 min.
- ▶ Η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει και τοποθετείται σε κασέτα μαζί με X-ray film (Kodak).
- ▶ Η κασέτα τοποθετείται στους -80°C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ανάλογα με το μέγεθος του στόχου (1h-24h) και κατόπιν εμφανίστηκε.

Αποτελέσματα

A. Μικροδορυφόροι

1. Δημιουργία *in silico* βιβλιοθήκης με SSRs για το *C. sativus*.

Μετά τον έλεγχο όλων των κατατεθειμένων αλληλουχιών στη Βάση Δεδομένων του NCBI, μέχρι και τις 11/09/2007 για το *Cucumis sativus*, οι οποίες αριθμούσαν 7431 και είχαν συνολικό μέγεθος περίπου 9 Mb, εντοπίστηκαν 1149 απλοί και σύνθετοι πυρηνικοί μικροδορυφόροι, καθώς και 182 χλωροπλαστικοί. Όλες οι παραπάνω μικροδορυφορικές αλληλουχίες βρίσκονται σε ηλεκτρονική μορφή στο επισυναπτόμενο αρχείο (.xls). Στο αρχείο αυτό εμπεριέχονται πληροφορίες όπως ο κωδικός και το όνομα της κατατεθειμένης αλληλουχίας, το είδος του μικροδορυφόρου, το οποίο συμβολίζεται με p (plain) και ένα αριθμητικό δείκτη που δηλώνει το μέγεθος της επανάληψης για τους απλούς μικροδορυφόρους, καθώς και με το γράμμα c (complex) για τους σύνθετους. Επίσης υπάρχει η πλήρης αλληλουχία κάθε μικροδορυφόρου, το μέγεθος του, καθώς και οι συντεταγμένες του μέσα στην αλληλουχία κατάθεσης.

2. Εύρεση νέων μικροδορυφορικών αλληλουχιών.

Η *in silico* βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε, ελέγχθηκε με βιοπληροφορική ανάλυση προκειμένου να ανευρεθούν νέες μικροδορυφορικές αλληλουχίες. Πρακτικά, δημιουργήθηκε μια δεύτερη βιβλιοθήκη στην οποία αναλύονταν μόνο οι αλληλουχίες που είχαν κατατεθεί στη Βάση Δεδομένων του NCBI, από την 12/04/2006, ημερομηνία αποδοχής της τελευταίας σχετικής δημοσίευσης (Kong *et al.*, 2006), όπου αναλύονταν όλες οι υπάρχουσες καταθέσεις ESTs για το *C. sativus*. Συνολικά ελέγχθηκαν 1456 αλληλουχίες (ESTs, Core Nucleotide, GSS), με συνολικό μέγεθος περίπου 1,5 Mb, στις οποίες εντοπιστήκαν 126 απλοί και σύνθετοι μικροδορυφόροι. Οι μικροδορυφόροι αυτοί παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Αποτελέσματα

Locus ID	SSR	size	start	end
AJ629867.2	(CT)7tcctcaattattcccatttttctctattcatttcggtaattcttagggatctctctgcatatttagccactgcaaaaaggggtgagggaaacgccttcgcttctcttttctgattctggtttaactctgcct(CGC)6	173	288	460
AJ870302.1	(CTT)5tctctgaagctttggtttccgcttcttgaatacgcggaaacttaagcttcagaattcaatttcaattccccttccagttcataatctcaaccccacttttg(AT)5	137	1	137
AJ870304.1	(T)11	11	220	230
AJ870306.1	(GCG)8	24	212	235
AJ870306.1	(GCG)8gtcaccaacaaccatattcccgttactgaggttcttcttttcttatga(T)12	88	2524	2611
AJ870307.1	(GA)10	20	1528	1547
AJ870307.1	(GCG)8	24	1948	1971
AJ870307.1	(GCG)8gtcaccaacaaccatattcccgttactgaggttcttcttttcttatga(T)12	88	4715	4802
D78594.1	(AT)5	10	499	508
D78594.1	(CT)6attatataaacactcccacttctcttctccgctgccaacctccattccttttctcacttacta(TTCT)5	101	1065	1165
D78594.1	(T)10	10	2583	2592
D89732.1	(AAT)6	18	79	96
D89732.1	(AT)5	10	1514	1523
DN909316.1	(TTA)5cagaaaaaaaaatgtatttaaaaaacaacgaaaaactctacacaagtagtactcggatcctcacagccaaaagagcagaagtaacttctctc(CTT)6	125	336	460

DQ117525.1	(AAT)5caaattatTTaaataacaaagctgttgaaactatttacaatacaacaaaacataatTTgttatattcataaataagttggTtcattTtgctatatctgaaaa caaaataaaaaacaagTtaattagaagaaaag(A)11	165	716	880
DQ117525.1	(A)13	13	1343	1355
DQ311672.1	(GCA)5	15	672	686
DQ536662.1	(T)13	13	96	108
DQ536765.1	(A)11	11	71	81
DQ641133.1	(AT)5	10	257	266
DQ839406.1	(T)10	10	52	61
DQ839406.1	(TA)7	14	4324	4337
DQ839406.1	(TC)5	10	4544	4553
DQ839406.1	(TA)5gtatatacaaaaaaatcaccattTttatgtTctattaagagctctattactcacc(T)11	76	4870	4945
DQ839406.1	(T)15	15	6383	6397
DQ839406.1	(TC)15taacatcagaatatttaattgaagtatattagaatcgaatgaattTccaacgtggaggattTatgcgagatgttatcatgtTgaaacgataatggTggc catgtgagaagattTattattaatca(ATT)7gtTaatgtatagagaa(AAT)6atagaaagagatggctTgcaaagtgaacggcgccgtTggcgagaata gcggctgaaagacggTggg(T)10	413	6586	6998
DQ839406.1	(T)10	10	7169	7178
DQ839407.1	(T)11	11	121	131
DQ839408.1	(G)10	10	21	30
DQ839408.1	(T)11	11	731	741
DQ839409.1	(T)17	17	1185	1201
DQ839409.1	(TAT)5	15	1508	1522
DQ839409.1	(AT)5	10	2055	2064

Αποτελέσματα

DQ839409.1	(AAT)5aagaacaagaacaacaaaaaggctgtttggatggaaaaactatcttcttattttgggtggtaaacgtagaatattgaataatataatgaattg atcttgaaaatactaccaaccctaaagggaaattag(GT)5	165	2628	2792
DQ839409.1	(TA)7	14	4270	4283
DQ839409.1	(TC)5	10	4490	4499
DQ839409.1	(TA)5tgtatacaaaaaaatcaccattttatgttctattaagagctctattactacc(T)11	76	4816	4891
DQ839409.1	(T)15	15	6329	6343
DQ839409.1	(TC)15taacatcagaatattaattgaagtatattagaatcgaatgaattttccaacgtggaggattttatgcgagatgttatcatgtgtgaaacgataatggtggc catgtgagaagattttattattaatca(ATT)7gtttaatgtatagagaa(AAT)6atagaaagagatggctgcaaagtgaaacggcgccgttgccgagaata gctggctgaaagacggtggg(T)10	413	6532	6944
DQ839409.1	(T)10	10	7115	7124
DQ839410.1	(T)17	17	1185	1201
DQ839410.1	(TAT)5	15	1508	1522
DQ839410.1	(AT)5	10	2055	2064
DQ839410.1	(AAT)5aagaacaagaacaacaaaaaggctgtttggatggaaaaactatcttcttattttgggtggtaaacgtagaatattgaataatataatgaattg atcttgaaaatactaccaaccctaaagggaaattag(GT)5	165	2628	2792
DQ839410.1	(TA)7	14	4270	4283
DQ839410.1	(TC)5	10	4490	4499
DQ839410.1	(TA)5tgtatacaaaaaaatcaccattttatgttctattaagagctctattactacc(T)11	76	4816	4891
DQ839410.1	(T)15	15	6329	6343

DQ839410.1	(TC)15taacatcagaatattaattgaagtatattagaatcgaatgaattttccaacgtggaggatttatgcgagatgtatcatgtgttgaacgataatggtggc catgtgagaagattttattattaatca(ATT)7gtttaatgtatagagaa(AAT)6atagaaagagatggctgcaaagtgaacggcgccgttggcgagaata gcggctgaaagacggtggg(T)10	413	6532	6944
DQ839410.1	(T)10	10	7115	7124
EI184449.1	(AT)10	20	345	364
EI184450.1	(T)11	11	149	159
EI184452.1	(T)12	12	149	160
EI184454.1	(A)13	13	178	190
EI184457.1	(A)14	14	70	83
EI184478.1	(A)10	10	192	201
EI184482.1	(TA)10	20	104	123
EI184486.1	(A)10	10	280	289
EI184495.1	(T)12	12	223	234
EI184500.1	(TA)10	20	104	123
EI184524.1	(T)10	10	72	81
EI184528.1	(A)32	32	220	251
EI184537.1	(AT)7	14	21	34
EI184540.1	(A)10tataaatttagttgatgcaataataataagtggatcaaaagat(A)10	63	192	254
EI186158.1	(AT)5	10	141	150
EI186159.1	(AT)5	10	144	153
EI186173.1	(A)11	11	23	33
EI186181.1	(A)11	11	84	94
EI186187.1	(AGA)5	15	382	396
ES882325.1	(T)13ctg(T)13	29	285	313
ES882361.1	(C)10	10	5	14

Αποτελέσματα

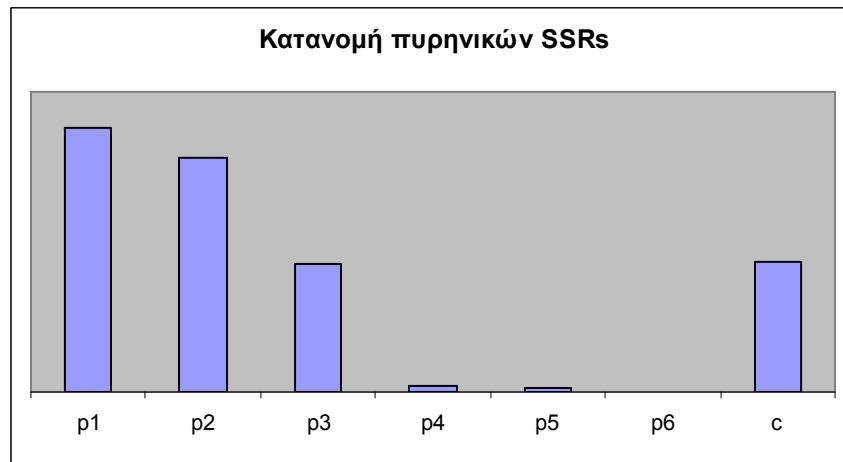
ES882374.1	(AG)10ggagggaggagccttctgcctgccgcccccttggtaactccagtccttggccccatttgaggccaaccccccttcatgtggatataacggtgg cggctccttctcctgcgaagtgttgatttc(T)11	165	89	253
ES882382.1	(TA)5	10	10	19
ES882394.1	(GAA)5	15	109	123
ES882396.1	(T)12	12	553	564
ES882402.1	(GA)5	10	256	265
ES882466.1	(AT)6	12	13	24
ES882470.1	(C)11	11	1	11
ES882475.1	(T)20	20	141	160
ES882484.1	(ACC)6	18	70	87
ES882488.1	(GT)5	10	339	348
ES882496.1	(ACC)5	15	70	84
ES882499.1	(ACC)6	18	70	87
ES882501.1	(ACC)6	18	70	87
ES882513.1	(ACC)6	18	70	87
ES882517.1	(CCT)9	27	50	76
ES882523.1	(TG)7	14	111	124
ES882523.1	(TTC)7	21	613	633
ES882534.1	(T)16	16	324	339
ES882535.1	(TCT)6	18	150	167
ES882538.1	(TC)5	10	300	309
ES882544.1	(CT)8	16	1	16
ES882547.1	(TTC)5	15	69	83
ES882613.1	(AG)11g(AGA)8	47	30	76
ES882652.1	(T)10	10	143	152
ES882652.1	(CT)22	44	15	58
ES882674.1	(CT)22	44	15	58
ES882675.1	(CT)22	44	15	58
ES882681.1	(CA)5	10	153	162

Αποτελέσματα

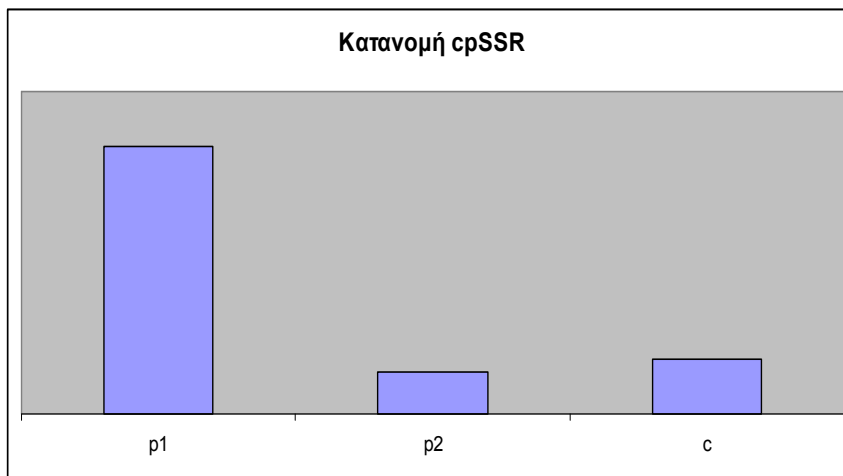
ES882691.1	(TTC)8	24	15	38
ES882691.1	(TC)7	14	248	261
ES882692.1	(T)10	10	466	475
ES882712.1	(AT)6	12	365	376
ES882782.1	(GA)10	20	15	34
ES882913.1	(TC)6	12	81	92
ES882920.1	(A)10	10	646	655
ES882923.1	(G)10	10	177	186
ES882926.1	(G)12	12	88	99
ES882945.1	(G)11	11	174	184
ES882953.1	(G)10	10	102	111
ES882994.1	(T)10	10	571	580
ES883027.1	(ACA)5	15	132	146
ES883030.1	(G)10	10	120	129
ES883155.1	(AG)5	10	90	99
ES883233.1	(G)12	12	548	559
ES883235.1	(T)11	11	634	644
EW968284.1	(AGA)5agcagaagtagggagtcctcaaatggagtaatagaggcaaatttcagctgtgaaagctccaacgattcgtgggatatggggacgattgtgcagcatc aacattatattcacattt(TTC)6	147	76	222
EW968286.1	(CT)5	10	309	318
EW968287.1	(AGA)5agcagaagtagggagtcctcaaatggagtaatagaggcaaatttcagctgtgaaagctccaacgattcgtgggatatggggacgattgtgcagcatc aacattatattcacattt(TTC)6	147	429	575
X58542.1	(TA)7	14	1343	1356
X58542.1	(T)10	10	2344	2353
X58542.1	(AT)7tatttttatttaataaaaagtagagttatgaatgtt(TA)13	76	5420	5495
X58542.1	(A)10	10	6127	6136

Αποτελέσματα

X58542.1	(A)10	10	6374	6383
Z35499.1	(AG)5	10	2328	2337
Z35499.1	(T)12	12	4766	4777



Γράφημα κατανομής των πυρηνικών μικροδορυφορικών τόπων ανάλογα με το είδος τους στην *in silico* βιβλιοθήκη (αρχείο cucumis SSR.xls). Στους συνθέτους SSRs (c) όλα τα είδη απλών (p1- p6).



Γράφημα κατανομής χλωροπλαστικών μικροδορυφορικών τόπων ανάλογα με το είδος τους στην *in silico* βιβλιοθήκη (αρχείο cucumis SSR.xls). Υπάρχουν μονό- και δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις.

3. Εύρεση Πολυμορφισμών.

Προκειμένου να ελεγχθούν οι νέοι πυρηνικοί μικροδορυφορικοί τόποι που βρέθηκαν, για την πολυμορφικότητά τους, δέκα από αυτούς επιλεχθήκαν τυχαία και σχεδιάστηκαν για αυτούς συγκεκριμένοι εκκινητές. Οι εκκινητές αυτοί, εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Δέκα ζεύγη εκκινητών για νέους μικροδορυφόρους.

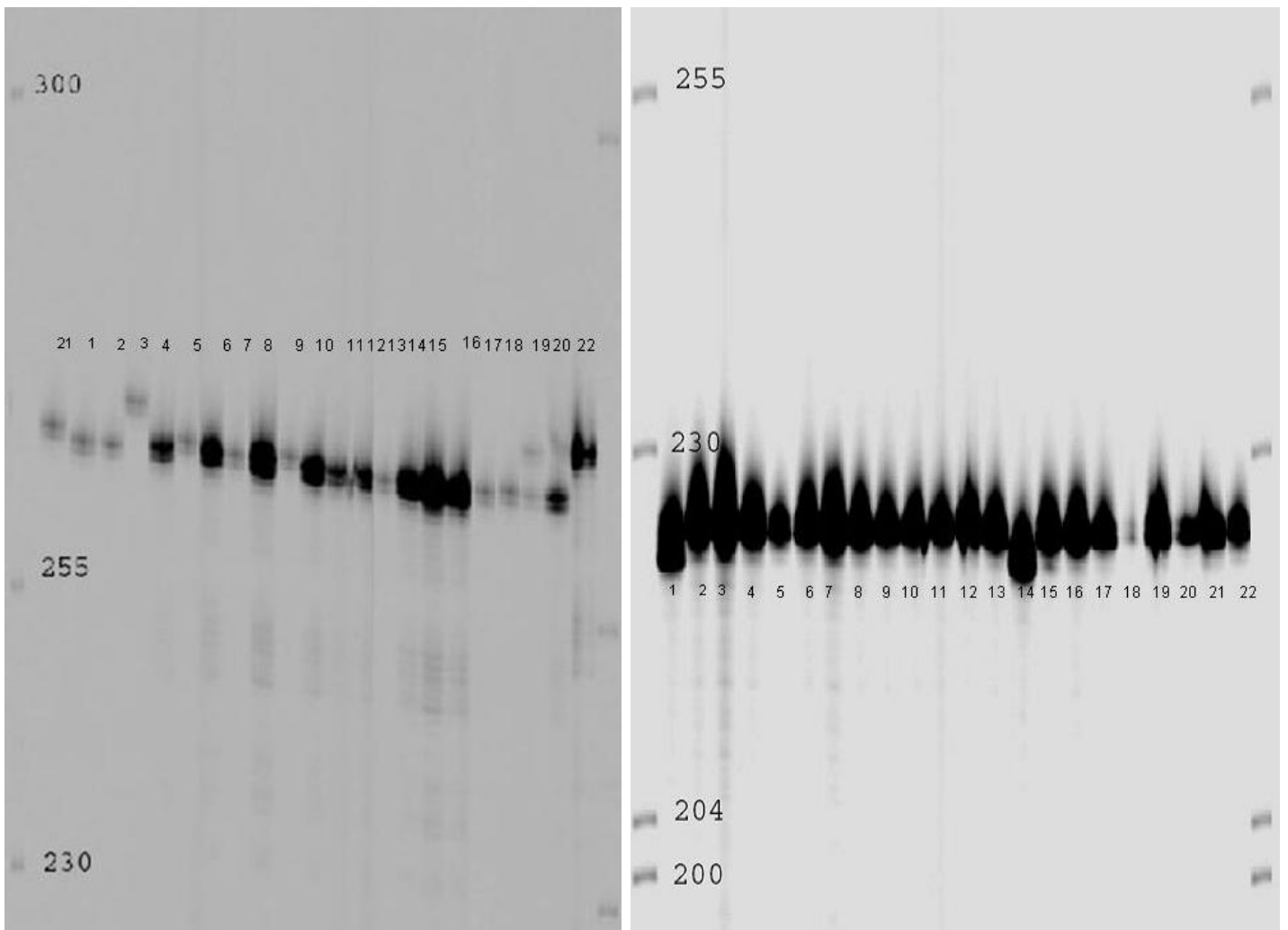
LOCUS ID	SSR TYPE	EXPECTED LENGTH	Fw PRIMER 5'-3'	Rv PRIMER 5'-3'
AJ629867	(CT) _n	182bp	tgtaaaagagagtggcagcaatca	tgcaagtggctaaatgcaagagag
AJ870307	(GCG) _n	282bp	gttaatggcggtttgatgatag	tccaattcgtctattttctcca
D78594	(CTTT) _n	272 bp	atccaccatctaaccaaaatg	aacaagagccatgaaagaaacct
DN909316	(TTA) _n (CTT) _n	324bp	aacacgtaaaacaaaaacccaac	tagaagatcaagaagagcaagcaa
DQ311672	(GCA) _n	380bp	gatagcttcgtaccttctctaaa	caaattctcaccagaaaccaac
DQ839410	(T) _n (TC) _n	350bp	aagatcaagccaaccgcaag	catctcgataaaatcctccac
DQ839410	(ATT) _n (ATT) _n	481bp	ggaggattttatgagagatggt	aaatggtgaaatggggacaaagt
EI186187	(GGA) _n	235bp	attgcagttggactatgaagagaa	tgagaaataacagtggaacacgag
X58542	(TA) _n	227bp	gcaaaagtcggtgagtagacgtaa	aaaggaacagcacaaccctaaatc
Z35499	(AG) _n	227 bp	agactgcctattttgaccacag	tggaaactgtctggtatgaggtg

Εκτός από τα δέκα ζεύγη εκκινητών για τους νέους μικροδορυφόρους, επιλέχθηκαν από τους ήδη υπάρχοντες στην βιβλιογραφία (Kong *et al.*, 2006), άλλα πέντε ζεύγη εκκινητών για SSRs, που εμφάνιζαν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού στο *C. sativus*. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να υπάρξει μέτρο σύγκρισης με αυτούς που σχεδιάστηκαν εκ νέου.

Πίνακας 3. Πέντε ζεύγη εκκινητών δημοσιευμένων SSR (Kong *et al.*, 2006).

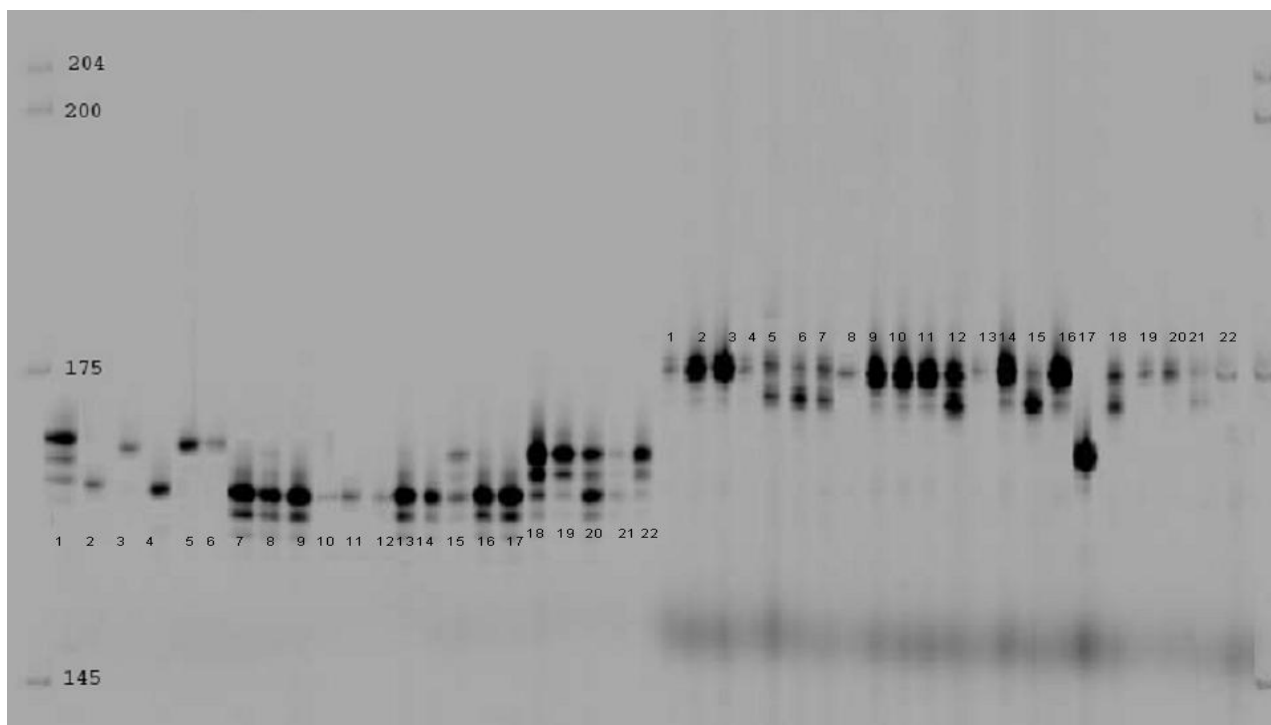
LOCUS ID	SSR TYPE	EXPECTED LENGTH	Fw PRIMER 5'-3'	Rv PRIMER 5'-3'
CK758791	(GAA) _n	147bp	ggaggagggtacatggcttg	tgaatctgatctttctacctcaca
DN910632	(TC) _n	190bp	ggagtacacagtgggggaaa	ggaggacaagagtgagctg
CK759477	(CTT) _n	175bp	tctccctctattatccgtacc	ttgaggattaggtctccag
CV004821	(CTT) _n	276bp	cctctgagatgccctttctg	agaaggcaaaggcaaattca
DN909316	(TC) _n	166bp	tggtggtgggactccactat	gtggaggaagcaggagatga

Με τους συνολικά δεκαπέντε (15) μικροδορυφορικούς τόπους ελέγχθηκαν είκοσι δύο (22) ποικιλίες και υβρίδια αγγουριού. Για αυτά τα είκοσι δύο δείγματα, επτά (7) SSRs έδειξαν πολυμορφισμό. Από τους επτά πολυμορφικούς μικροδορυφορικούς τόπους, οι δυο (2) ανήκουν στους υπό έλεγχο μικροδορυφόρους (Πίνακας 2), ενώ και οι πέντε δημοσιευμένοι SSRs έδωσαν πολυμορφικές ζώνες.

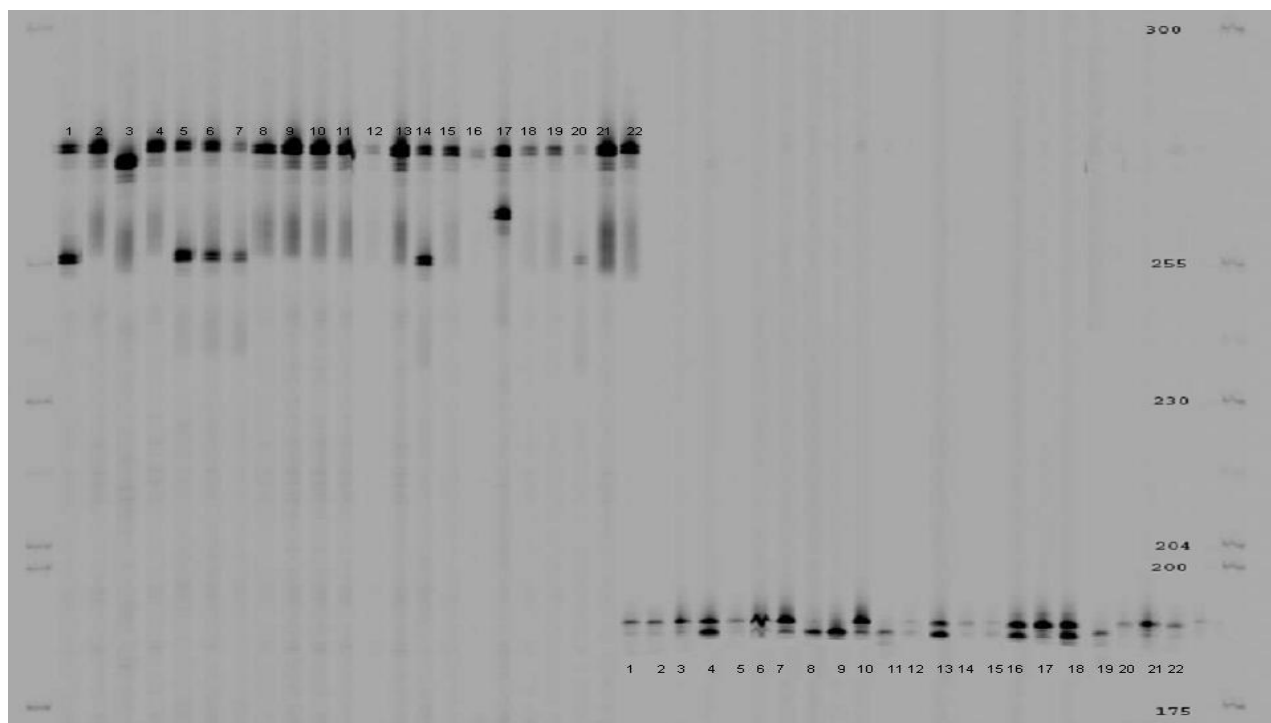


Εικόνα 1. Πηκτώματα πολυακρυλαμίδης (6,5%) με τα 22 υπό εξέταση προϊόντα PCR από τα αντίστοιχα δείγματα *C. sativus* (Πίνακας 3), στις άκρες έχουν φορτωθεί οι δείκτες μεγεθών. Παρουσιάζονται οι SSRs D78594 (δεξιά) με επανάληψη (CTTT)_n και Z35499 (αριστερά) με επανάληψη (AG)_n.

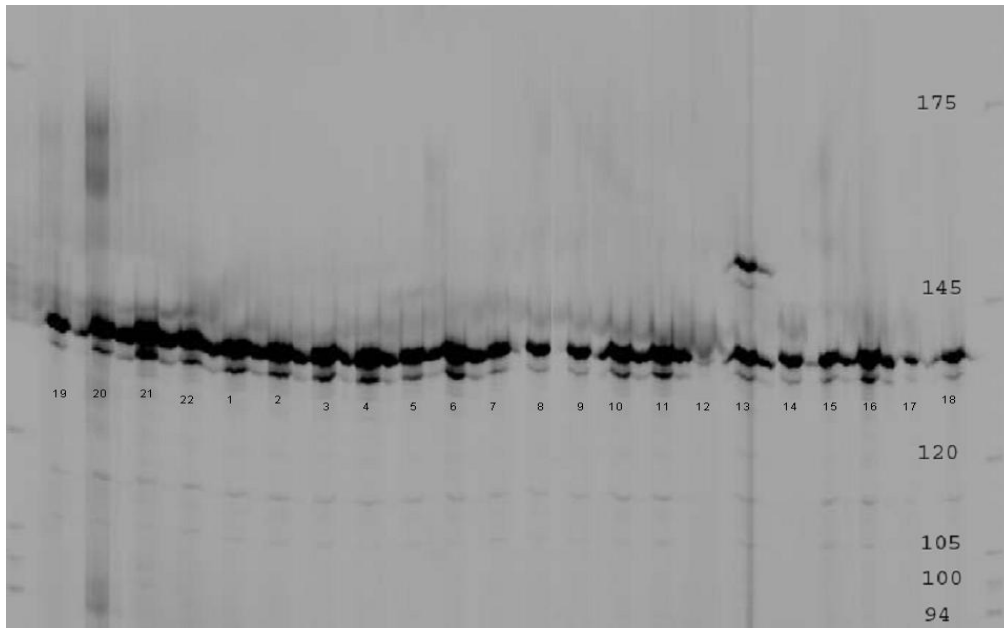
Αποτελέσματα



Εικόνα 2. Οι SSRs DN909316 (αριστερά) με επανάληψη (TC) n και CK759477 (δεξιά) με επανάληψη (CTT) n .



Εικόνα 3. Οι SSRs CV004821 (αριστερά) με επανάληψη (CTT) n και DN910632 (δεξιά) με επανάληψη (TC) n .



Εικόνα 4. Ο SSR CK758791 με επανάληψη (GAA)_n.

Τα μεγέθη των αλληλομόρφων κάθε πολυμορφικού μικροδορυφορικού τύπου, για κάθε ένα από τα δείγματα βρίσκονται συγκεντρωμένα στο πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3). Σε κάθε μικροδορυφορικό τύπο για κάθε δείγμα είναι δυνατόν να υπάρχουν το πολύ δυο διαφορετικοί αλληλόμορφοι, οι οποίοι εμφανίζονται ως δύο ζώνες με την ίδια ένταση, σε διαφορετικά ύψη. Αυτό συμβαίνει σε ετερόζυγα, για τον συγκεκριμένο τύπο, άτομα. Αν ένα άτομο είναι ομόζυγο για τον συγκεκριμένο τύπο εμφανίζεται μοναχά μια ζώνη. Επίσης υπάρχει η πιθανότητα να θεωρηθεί ένα άτομο ομόζυγο επειδή εμφανίζει μόνο έναν αλληλόμορφο, αλλά στην πραγματικότητα να έχει χάσει με κάποια εξελικτική διαδικασία, τον γενετικό τύπο από το ομόλογο χρωμόσωμα. Η πιθανότητα αυτή (τιμή r) θα είχε υπόσταση σε δείγματα με ευρεία γενετική βάση και θα εμφανιζόταν από την απουσία ζώνης για ένα τύπο σε ένα δείγμα.

Οποιαδήποτε άλλη ζώνη μικρότερης έντασης εμφανίζεται κοντά στο αναμενόμενο μέγεθος της μικροδορυφορικής περιοχής, δεν αποτελεί παραπροϊόν της PCR, ούτε διαφορετικό αλληλόμορφο, αλλά είναι ίδια με το κύριο προϊόν, στο οποίο όμως, το DNA έχει υποστεί μερική επαναδιάταξη κατά την διαδικασία «φορτώματος» του sequencing gel. Πρέπει να υπενθυμιστεί ότι τα δείγματα αποδιατάσσονται στους 96° C και διατηρούνται έτσι στον πάγο πριν φορτωθούν.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ		SSR LOCUS													
		D78594	D78594	Z35499	Z35499	CK759477	CK759477	DN909316	DN909316	CV004821	CV004822	DN910632	DN910633	CK758791	CK758791
1	TM11	268	268	225	225	175	175	166	166	277	256	190	190	135	135
2	ZxL12	268	268	227	227	175	175	160	160	277	277	190	190	135	135
3	SMR18	274	274	227	227	175	175	166	166	274	274	190	190	135	135
4	L20	268	268	227	227	175	175	160	160	277	277	190	188	135	135
5	M20	268	268	227	227	175	169	166	166	277	256	190	190	135	135
6	M10	268	268	227	227	175	169	166	166	277	256	190	188	135	135
7	ZxL2	268	268	227	227	175	169	160	160	277	256	190	188	135	135
8	DIAS	268	268	227	227	175	175	160	160	277	277	188	188	135	135
9	L6	268	268	227	227	175	175	160	160	277	277	188	188	135	135
10	L25	268	268	227	227	175	175	160	160	277	277	190	188	135	135
11	CRETA	268	268	227	227	175	175	160	160	277	277	190	188	135	135
12	VALENTIN	268	268	227	227	175	169	160	160	277	277	190	188	135	135
13	L4	268	268	227	227	175	175	160	160	277	277	190	188	135	150
14	TM1	268	268	225	225	175	175	160	160	277	256	190	188	135	135
15	M4	268	268	227	227	169	169	166	160	277	277	190	188	135	135
16	L14	268	268	227	227	175	175	160	160	277	277	190	188	135	135
17	L1	268	268	227	227	166	166	160	160	277	265	190	188	135	135
18	M1	268	268	227	227	175	169	166	166	277	277	190	188	135	135
19	M21	268	274	227	227	175	175	166	166	277	277	190	190	135	135
20	F1PS	268	268	227	227	175	169	166	160	277	256	190	188	135	135
21	F1GE	268	268	227	227	175	169	166	160	277	277	190	190	135	135
22	ΚΝΩΣΣΟΥ	274	274	227	227	175	175	166	166	277	277	190	190	135	135

Πίνακας 3. Τα μεγέθη των αλληλομόρφων για κάθε δείγμα σε bp. Για κάθε τόπο δίνονται δύο τιμές, στις περιπτώσεις που εμφανίζεται μόνο ένας αλληλόμορφος δίνεται δύο φορές η ίδια τιμή.

4. Βιοπληροφορική ανάλυση πολυμορφικών τόπων.

Τα δεδομένα του Πίνακα 3 επεξεργαστήκαν με το πρόγραμμα Identity v.1 (Sefc *et al.*, 2000), προκειμένου να υπολογιστούν :

- Ο αριθμός των αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο.
- Οι συχνότητες των αλληλομόρφων.
- Η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (H_o - observed Heterozygosity), σύμφωνα με τον τύπο :

$$H_o = \frac{\sum_{i=1}^n (1 \text{ if } a_{i1} \neq a_{i2})}{n}$$

Όπου n ο αριθμός των εξεταζόμενων δειγμάτων και a_{i1}, a_{i2} οι αλληλόμορφοι του ατόμου i σε ένα γενετικό τόπο.

- Η αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e - expected Heterozygosity) (Nei, 1973) σύμφωνα με τον τύπο :

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^m (f_i)^2$$

Όπου m ο αριθμός των αλληλομόρφων σε ένα γενετικό τόπο και f_i η συχνότητα του i αλληλομόρφου.

- Η τιμή PI (Probability of identity), [$PI = Sp_i^4 + SS(2p_i p_j)^2$] (Paetkau *et al.*, 1995). Η τιμή αυτή εκφράζει την πιθανότητα να βρεθούν δυο διαφορετικά δείγματα (ποικιλίες ή υβρίδια) με τον ίδιο γονότυπο για ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο.
- Η τιμή r (probability of null alleles), [$r = (H_e - H_o) / (1 + H_e) \times H_e$] (Brookfield, 1996). Η τιμή αυτή εκφράζει την πιθανότητα εμφάνισης null αλληλομόρφου, δηλαδή την πιθανότητα να υπάρχει ο συγκεκριμένος τόπος στο δείγμα αλλά να μην εμφανίζεται για κάποιο λόγο προϊόν κατά την ενίσχυση, καθώς και την περίπτωση ο αλληλόμορφος να υπάρχει μια φορά και το δείγμα να θεωρείται ομόζυγο.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα των υπολογισμών εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4), ενώ όλο το αρχείο αποτελεσμάτων του Identity υπάρχει στο Παράρτημα.

Πίνακας 4. Για κάθε τόπο εμφανίζεται ο αριθμός των αλληλομόρφων, η συχνότητα κάθε αλληλομόρφου, η αναμενόμενη και η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, η πιθανότητα ομοιότητας (PI), καθώς και η ολική πιθανότητα ομοιότητας για όλους τους τόπους.

Locus	Number of Alleles	Allele Frequency			He	Ho	PI
D78594	2	0,88636		0,11364	0,201446	0,045455	0,698559
Z35499	2	0,09091		0,90909	0,165289	0,010000	0,737723
CK759477	3	0,04545	0,20455	0,75000	0,393595	0,318182	0,516425
DN909316	2	0,61364		0,38636	0,474174	0,136364	0,613754
CV004821	4	0,13636	0,02273	0,04545	0,79545	0,318182	0,508314
DN910632	2	0,38636		0,61364	0,474174	0,590909	0,613754
CK758791	2	0,97727		0,02273	0,044421	0,045455	0,916090
Total Probability of Identity (PI)							4,668345e ⁻⁰⁰²

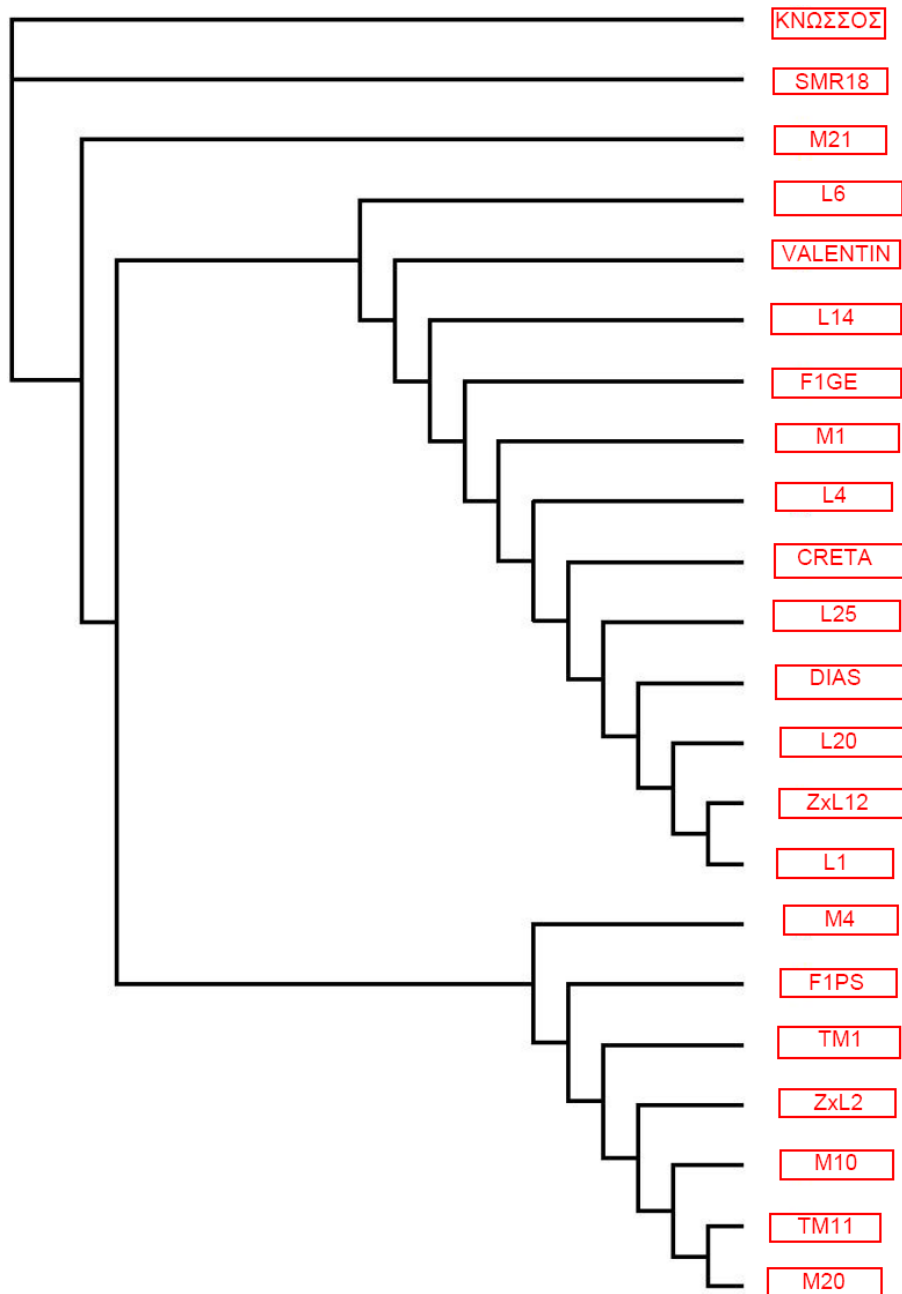
Τα αποτελέσματα του προγράμματος Identity (microsat.dat) επεξεργαστήκαν με τον αλγόριθμο **Dps**: $-\ln(\text{proportion of shared alleles})$ του προγράμματος MSat2 (Minch et al., 1997) προκειμένου να δημιουργηθεί ο πίνακας των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των εξεταζόμενων ατόμων, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο (Jin and Chakraborty, 1993).

$$D_{SAI} = 1 - P_{SAI} \quad P_{SAI} = \frac{\sum_j S}{2r}$$

Όπου S, ο αριθμός των κοινών αλληλομόρφων και r, όλοι οι τόποι.

Ο πίνακας γενετικών αποστάσεων, ο οποίος παρουσιάζεται στο Παράρτημα, επεξεργάστηκε με τον αλγόριθμο Neighbor-Joining (phylip), προκειμένου να ομαδοποιηθούν οι γονότυποι, ορίζοντας ως πιο απομακρυσμένο (outgroup), το δείγμα SMR18.


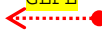
Με την βοήθεια του προγράμματος Treeview δημιουργήθηκε το παρακάτω φαινόγραμμα.



B. Ανάλογα Γονιδίων Ανθεκτικότητας

1. Κατασκευή εκφυλισμένων εκκινήτων για την NBS περιοχή .

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, τα γονίδια ανθεκτικότητας που περιέχουν NBS περιοχή παρουσιάζουν ομοιότητες στην αμινοξική τους αλληλουχία. Οι περισσότερες αναφορές επικεντρώνονται σε δυο συντηρημένα μοτίβα, το P-loop και το GLPL (ή υδροφοβη περιοχή- HD), μιας και αυτές οι δυο ακραίες περιοχές του NBS ενδείκνυνται για τον σχεδιασμό εκφυλισμένων εκκινήτων που θα ενισχύουν ολόκληρη την NBS περιοχή. Έτσι, κατασκευαστήκαν εκφυλισμένοι εκκινήτες που ενισχύουν ολόκληρη την NBS περιοχή, υβριδίζοντας στις περιοχές P-loop και GLPL (Aarts *et al* , 1998). Επίσης, έγινε προσπάθεια σχεδιασμού νέων εκφυλισμένων εκκινήτων που υβριδίζουν εσωτερικά των παραπάνω περιοχών (Πίνακας 5) .

			
RGA6	GGVGKTTLAKMVFNHDAIKGHFDKTVWVC-VSKPFI-----VMKILEAIFQGLTN-TSSG	53	
RGA8	GGVGKTTLAKAVFNHDLVIAHFDETIWVC-VTATFD-----EKKILRAILESLTN-FPSG	53	
RGA7	GGVGKTTLC-----DKTVWVC-VSEPF-----VNKILLDILQNLKGTISNG	41	
RGA9	GGVGKTTLAKTIFNHEEIKRHFDETIWIC-VSEPF-----INKILGAILQMIKG-VSSG	53	
RGA2	GGVGKTTIARVCYER--IRDEFEAHCFLSNVRENYIRTLGNLSCLQTKLLSSMFLKNNH	58	
RGA5	GGVGKTTIARVCYER--IRDEFEAHCFLSNVRENYIRTLGNLSCLQTKLLSSMFLKNNH	58	
RGA4	GGVGKTTIARVCYER--IRGEFEAHCFLSNVRENYIRTLGNLSCLQTKLLSSMFLKNNH	58	
	P-Loop		
RGA6	LNSREALNRLREEMQGKRYFLVLDVV-----	81	
RGA8	LDSKDAILRRLQKELEGKRYFLVLDVV-----	81	
RGA7	GDSKEVLLRELQKMHGQRYFLVLDVV-----	69	
RGA9	LDNKEVLLQELQKVMRGKRYFLVLDVV-----	81	
RGA2	IMDVEEGTAMINKAIFRKKTLVLDVVDSSDQIKGLIPDNNSFGNGSKVIVTTR-----	112	
RGA5	IMDVGEGTAMINKAIFRKKTLVLDVVDSSDQIKGLIPDNNSFGNGSRVITTRNADFLS	118	
RGA4	IMDVEEGTAMINKAIFRKKTLVLDVV-----	86	
		Kinase-2	
RGA6	-----		
RGA8	-----		
RGA7	-----		
RGA9	-----		
RGA2	-----		
RGA5	NEFGVKRIFEMDELKYEALQLLSLSAFMKTCPKEGYLEHSSKIVKVVGGGLPLAI	173	
RGA4	-----		
		GLPL	

Στις παραπάνω αλληλουχίες κατατεθειμένων αλληλουχιών RGAs για το *C. sativus* εμφανίζονται σε γκρι φόντο τα συντηρημένα μοτίβα, με κόκκινο βέλος εμφανίζονται οι θέσεις υβριδισμού των εκκινητών STDFw,Rv (Aarts *et al* , 1998), ενώ με πράσινο βέλος οι θέσεις υβριδισμού των νέων εκκινητών (NBSFw,Rv).

→

```

G G V G K T T I A R V C Y E R I R G E F
RGA4 GGA GGA GTG GGA AAG ACC ACA ATA GCT AGG GTC TGT TAT GAG CGA ATT CGT GGC GAA TTT 60
RGA5 GGG GGA GTG GGG AAG ACG ACA ATA GCT AGG GTC TGT TAT GAG CGA ATT CGT GAC GAA TTT 60
RGA2 GGG GGT GTT GGG AAG ACT ACA ATA GCT AGG GTC TGT TAT GAG CGA ATT CGT GAC GAA TTT 60

E A H C F L S N V R E N Y I R T L G N L
RGA4 GAA GCT CAT TGC TTC CTC TCC AAC GTT CGA GAG AAT TAT ATC AGA ACC CTT GGG AAC CTT 120
RGA5 GAA GCT CAT TGC TTC CTC TCC AAC GTT CGA GAG AAT TAT ATC AGA ACC CTT GGG AAC CTT 120
RGA2 GAA GCT CAT TGC TTC CTC TCC AAC GTT CGA GAG AAT TAT ATC AGA ACC CTT GGG AAC CTT 120

S C L Q T K L L S S M F S L K N N H I M
RGA4 TCA TGT TTA CAA ACC AAA CTC CTT TCA AGC ATG TTT TCG CTT AAA AAC AAT CAC ATA ATG 180
RGA5 TCA TGT TTA CAA ACC AAA CTC CTT TCA AGC ATG TTT TCG CTT AAA AAC AAT CAC ATA ATG 180
RGA2 TCA TGT TTA CAA ACC AAA CTC CTT TCA AGC ATG TTT TCA CTT AAA AAC AAT CAC ATA ATG 180

D V E E G T A M I N K A I F R K K T L L
RGA4 GAT GTT GAA GAA GGT ACC GCT ATG ATC AAT AAA GCC ATT TTT CGA AAA AAG ACA CTT CTC 240
RGA5 GAT GTT GGA GAA GGT ACC GCT ATG ATC AAT AAA GCC ATT TTT CGA AAA AAG ACA CTC CTC 240
RGA2 GAT GTT GAA GAA GGT ACC GCT ATG ATC AAT AAA GCC ATT TTT CGA AAA AAG ACA CTT CTC 240

```

←

Οι νέοι εκφυλισμένοι εκκινητές (πράσινα βέλη) σχεδιάστηκαν με βάση τις πιο συντηρημένες αλληλουχίες RGAs, και περιείχαν ινοσίνες (I) καθώς και συνδυασμό νουκλεοτιδίων στη θέση του 3^{ου} νουκλεοτιδίου του κωδικωνίου, έτσι ώστε θεωρητικά να ενισχύσουν όσο το δυνατόν περισσότερα διαφορετικά RGAs .

Πίνακας 5. Εκφυλισμένοι εκκινητές για την NBS περιοχή.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Πηγή
NBS Fw	acaatagctagr ^g titgytatgai	Παρούσα εργασία
NBS Rv	gctttattgatcatagcgg ^t tacc	Παρούσα εργασία
STD Fw	ggatgggtgg ^t gttgtaaraci	(Aarts <i>et al</i> , 1998)
STD Rv	ccwratgg ^t ratcgrat ^t ttcatgatcc	(Aarts <i>et al</i> , 1998)

Με την χρήση των παραπάνω εκκινητών πραγματοποιήθηκαν touch down PCR (58° C έως 52° C για το ζεύγος STD, 58° C έως 50° C για το ζεύγος NBS, δηλαδή για τους πρώτους κύκλους η θερμοκρασία υβριδισμού μειωνόταν κατά 1° C/κύκλο) σε DNA που απομονώθηκε από τα δείγματα SMR18 και Κνωσός. Πρέπει να σημειωθεί ότι επιλέχθηκαν τα δυο αυτά δείγματα γιατί διαφέρουν φαινοτυπικά στην ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν έναντι ασθενειών, με το

Αποτελέσματα

SMR18 να εμφανίζεται ανθεκτικότερο. Τα αποτελέσματα της PCR εμφανίζονται στην παρακάτω εικόνα .



Εικόνα 5. Ενίσχυση τμήματος της NBS περιοχής (NBSFw/Rv) και ολόκληρης της NBS περιοχής (STDFw/Rv) σε γενωμικό DNA από τα SMR18 και Κνωσός. Μόνο οι NBSFw/Rv εκκινητές έδωσαν προϊόν (200 bp).

2. Έλεγχος κλωνοποιημένων τμημάτων NBS για την εύρεση πολυμορφισμών.

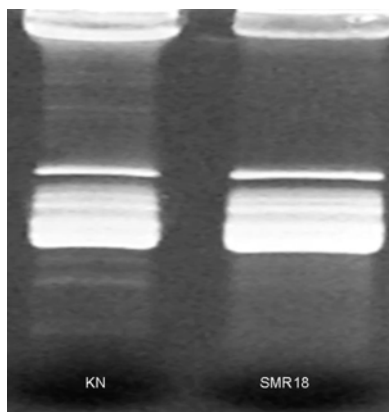
Τα προϊόντα των παραπάνω αντιδράσεων πολυμερισμού κλωνοποιήθηκαν σε TA φορέα (pGEM-T easy, PROMEGA) και ένας από τους κλώνους (SMR_C) αλληλουχήθηκε προκειμένου να διαπιστωθεί ότι περιέχει το αναμενόμενο τμήμα της NBS περιοχής. Αφού επιβεβαιώθηκε ότι όντως ο κλώνος ήταν τμήμα της NBS περιοχής RGAs στο *C. sativus*, μετά από έρευνα στη βάση δεδομένων του NCBI (Blast), διαπιστώθηκε ότι ο συγκεκριμένος κλώνος περιείχε μια θέση αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού StyI, την οποία περιείχαν μόνο τα 3 από τα συνολικά 8 κατατεθειμένα RGAs στο *C. sativus*. Έτσι, οι κλώνοι θα μπορούσαν να ελεγχθούν με πέψεις με το συγκεκριμένο ένζυμο προκειμένου να ελεγχθεί αν επρόκειτο για διαφορετικά RGAs. Όμως, οι πέψεις των κλώνων με το StyI δεν έδειξαν καμία διαφοροποίηση στο προφίλ περιορισμού (restriction pattern).

Έτσι θεωρήθηκε πως οι συγκεκριμένοι κλώνοι με τμήματα των 200 bp ήταν μικροί σε μέγεθος, προκειμένου να εντοπιστούν διαφορετικά RGAs.

3. Ενίσχυση του 3' άκρου RGAs (3'-RACE).

Το γεγονός ότι οι κατατεθειμένοι εκφυλισμένοι εκκινητές STDFw/Rn δεν είχαν δώσει προϊόν με μήτρα (template) γενωμικό DNA θα μπορούσε να οφείλεται στην ύπαρξη ιντρονίου εντός της NBS περιοχής. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι μεγαλύτερα τμήματα της περιοχής αυτής θα μπορούσαν να έχουν αρκετά μεγάλη διαφοροποίηση επέβαλαν την προσπάθεια ενίσχυσης ολόκληρου του 3' άκρου, δηλαδή από την NBS περιοχή έως την πολύ-A ουρά του μεταγράφου.

Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε ολικό RNA από φύλλα των ποικιλιών Κνωσός και SMR18 (Εικόνα 6). Προκειμένου να αποφευχθεί πιθανός μη ομόλογος υβριδισμός των εκκινητών σε ριβοσωμικό RNA, έγινε απομόνωση πολύ-A RNA από το ολικό, με την χρήση σφαιριδίων κυτταρίνης επικαλυμμένων με πολύ-T (poly-A RNA extraction kit, Amersam). Το πολύ-A RNA που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την αντίδραση της Αντιστροφής Μεταγραφής (RT). Σε αυτή χρησιμοποιήθηκε μονό ένας εκκινητής (oligo-dT+APs), ο οποίος εκτός από τις πολύ-T είχε και μια επιπλέον γνωστή αλληλουχία που δεν θα υβριδίζει με την πολύ-A ουρά του μεταγράφου στο 3' ακρο.

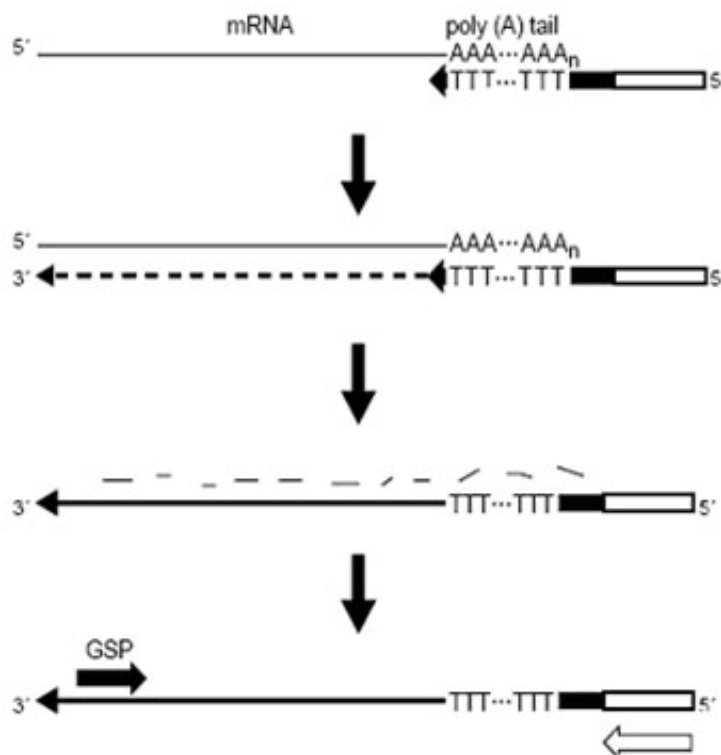


Εικόνα 6. Ολικό RNA από τα δείγματα SMR18 και Κνωσός.

Στη φωτογραφία διακρίνονται οι ριβοσωμικές υπομονάδες, γεγονός που δείχνει πως τα RNA δεν έχει υποστεί αποδόμηση. Επίσης διακρίνεται μικρή ποσότητα DNA η οποία πρέπει να απομακρυνθεί πριν την Αντίστροφη Μεταγραφή.

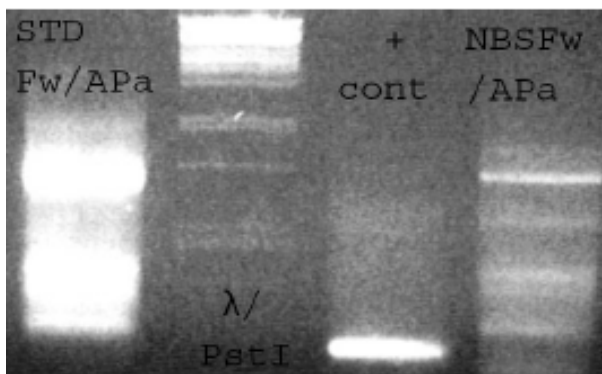
Αποτελέσματα

Η αντίδραση ενίσχυσης του 3' άκρου του μεταγράφου (3' RACE) έγινε σε δυο στάδια (Εικόνα 7). Αρχικά, συντέθηκε το cDNA με την βοήθεια του ένζυμου super RT (HT Biotechnology) και τη χρήση του oligo-dT+APsense εκκινητή και στη συνέχεια, αφού αποδιατάχτηκε το RNA, το μονόκλωνο cDNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε διαφορετικές αντιδράσεις PCR (Εικόνα 8), με τον ανάστροφο εκκινητή (APa) να υβριδίζει στο γνωστό πλέον τμήμα της πολύ-A ουράς (APsense).



Εικόνα 7.

Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ενίσχυσης του 3' άκρου.

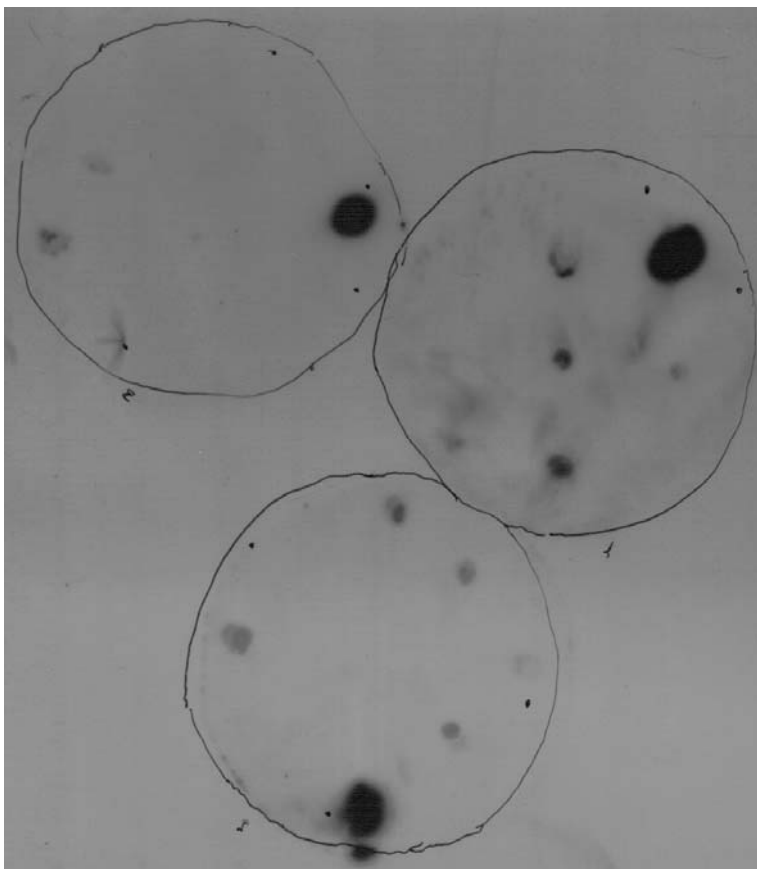


Εικόνα 8. PCR σε μήτρα cDNA της ποικιλίας Κνωσός. Ως +control χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος NBSFw/Rv σε cDNA,.

4. Ανίχνευση των 3' άκρων μεταγράφων RGAs.

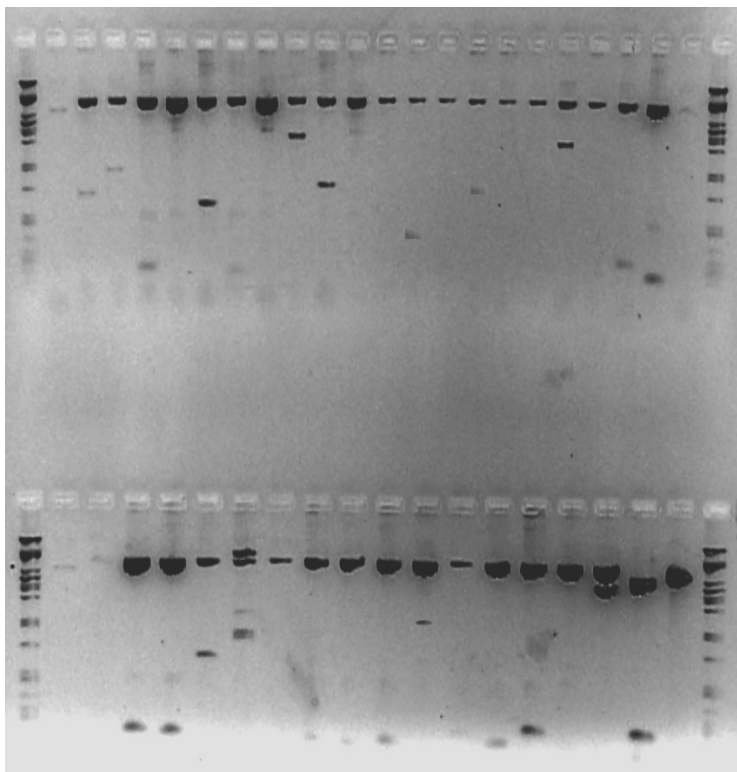
Όλα τα παραπάνω τμήματα μεταγράφων που ενισχύθηκαν κατά τις αντιδράσεις πολυμερισμού με εκκινητές STDFw/APa, τα οποία και θεωρήθηκαν διαφόρων μεγεθών εναλλακτικά μετάγραφα RGAs, κλωνοποιήθηκαν σε TA φορέα (pCRII-TOPO, Invitrogene) και οι υποψήφιοι θετικοί κλώνοι, που θα περιείχαν τμήματα RGAs, εντοπίστηκαν με την χρήση ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή. Ο ραδιενεργά σημασμένος (P^{32}) ανιχνευτής κατασκευάστηκε με μήτρα το μικρότερο τμήμα της NBS περιοχής που είχε ήδη κλωνοποιηθεί και ταυτοποιηθεί (SMR_C).

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο παραπάνω έλεγχος χρησιμοποιήθηκαν δυο τεχνικές, ο υβριδισμός αποικιών (colony dot blot) (Εικόνα 9) και ο υβριδισμός κατά Southern (Εικόνες 10, 11).

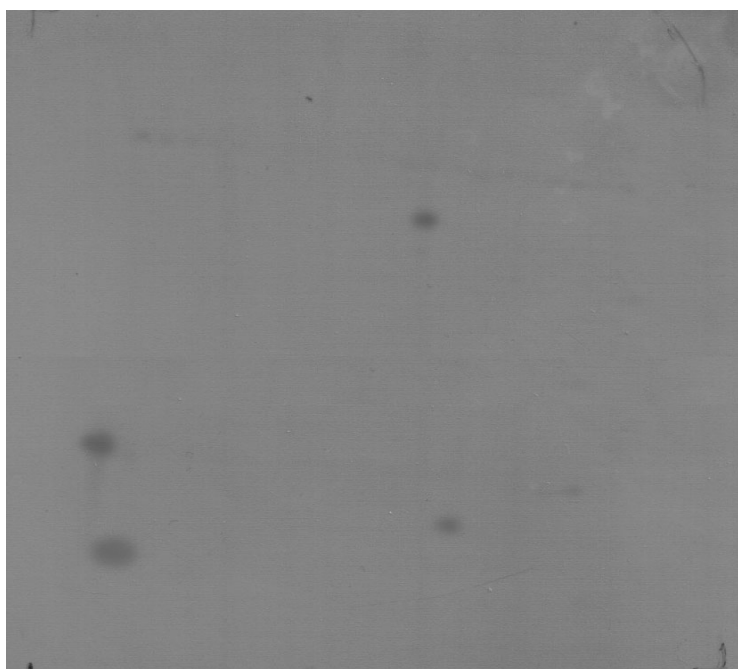


Εικόνα 9. Το αποτύπωμα κλώνων που υπάρχουν σε τρυβλία μεταφέρεται σε μεμβράνη. Μετά την σχετική επεξεργασία η μεμβράνη υβριδοποιείται με ανιχνευτή το SMR_C. Εδώ εμφανίζεται το film αυτοραδιογραφίας μετά από 1,5 h έκθεση στους -80° C. Τα 3 έντονα σήματα είναι τα + control ενώ τα υπόλοιπα υποψήφιοι θετικοί κλώνοι.

Αποτελέσματα



Εικόνα 10. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από όλους τους υποψήφιους θετικούς κλώνους στο οποίο πραγματοποιείται πέψη για την εξαγωγή του ενθέματος με EcoRI. Στην εικόνα εμφανίζεται το gel το οποίο περιέχει τα ενθέματα των υπό εξέταση κλώνων.



Εικόνα 11.

Το gel της Εικόνας 10 μεταφέρεται σε μεμβράνη για υβριδισμό με probe το SMR_C.

Εδώ εμφανίζεται το film αυτοραδιαγραφίας της μεμβράνης. Τα δυο έντονα σήματα κάτω αριστερά είναι + control, ενώ τα άλλα σήματα δείχνουν τις θέσεις των υποψήφιων θετικών κλώνων.

Οι υποψήφιοι θετικοί κλώνοι που εντοπίστηκαν με τις παραπάνω διαδικασίες αλληλουχήθηκαν, αλλά τα αποτελέσματα αυτών δεν έδειξαν ότι επρόκειτο για τμήματα RGAs.

Συζήτηση

A. Μικροδορυφόροι.

1. Επιλογή Στρατηγικής

Η ανάπτυξη μοριακών δεικτών με την χρήση μικροδορυφορικών αλληλουχιών, μετά από τον έλεγχο κατατεθειμένων αλληλουχιών, είναι μια σχετικά εύκολη, γρήγορη, φτηνή και αποτελεσματική στρατηγική, συγκρινόμενη με αυτή της κατασκευής γενωμικής βιβλιοθήκης, εμπλουτισμένης σε SSRs. Επιπλέον, η πρώτη στρατηγική προσφέρει την δυνατότητα εύρεσης όλων των υποψήφιων μικροδορυφορικών τόπων, ακόμα και των περισσότερο σπανίων (με επαναλήψεις 4-6 νουκλεοτιδίων), σε αντίθεση με τη δεύτερη.

Οι μικροδορυφόροι που προέρχονται από την ανάλυση ESTs (ESTs-SSRs), αν και είναι λιγότεροι αριθμητικά αφού οι κωδικές περιοχές περιέχουν κατά κανόνα μικρότερο αριθμό επαναλαμβανόμενων περιοχών, έχουν ιδιαίτερη αξία μιας και μπορούν να ανιχνεύσουν «λειτουργική» ποικιλομορφία. Αντίθετα με τους πυρηνικούς μικροδορυφόρους, οι χλωροπλαστικοί δεν παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό πολυμορφισμού και περιέχουν μόνο μονό- και δυ-νουκλεοτιδικές επαναλήψεις. Για το λόγο αυτό, αν και αναφέρονται, δεν χρησιμοποιηθήκαν.

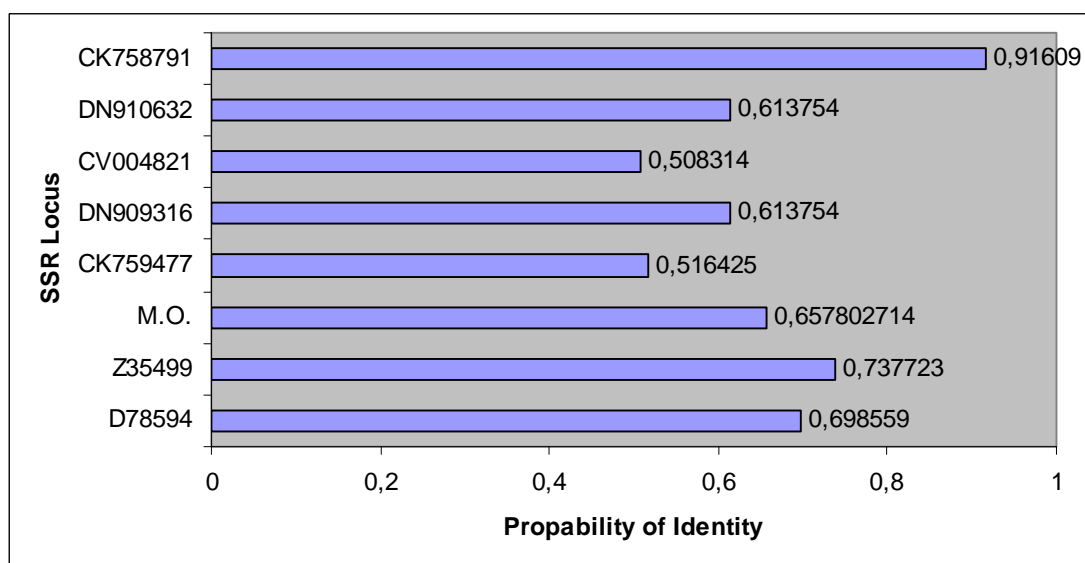
Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή παρουσιάζονται όλοι οι μικροδορυφόροι για το *Cucumis sativus*, συγκεντρωμένοι σε μια *in silico* βιβλιοθήκη προκειμένου να γίνει εφικτός ο έλεγχος τους για *in vitro* ανάλυση.

2. Ανάλυση πολυμορφισμών.

Οι μικροδορυφόροι αποδείχτηκαν ένα μοριακό εργαλείο με μεγάλη διακριτική ικανότητα αφού σε αρκετές περιπτώσεις μπόρεσαν να εντοπίσουν ετεροζυγωτία σε φυτά που ανήκουν σε καθαρές σειρές, δηλαδή είχαν υποστεί αυτοδιαστάυρωση πάνω από οχτώ φορές. Τα φυτά αυτά συμφωνά με το νόμο των Hardy και Weinberg είναι ομοζυγωτά σε ποσοστό μεγαλύτερο του 99,8%.

Όσον αφορά τους επτά τόπους που έδωσαν πολυμορφισμούς στα αναλυόμενα δείγματα, ο πλέον πολυμορφικός ήταν ο CV004821 με επανάληψη (CTT)_n, ο οποίος είχε και την χαμηλότερη τιμή PI. Ο λιγότερο πολυμορφικός ήταν ο CK758791 επίσης με επανάληψη ένα τρι-νουκλεοτίδιο (CAA)_n, ο οποίος είχε την υψηλότερη τιμή PI. Οι δυο νέοι τόποι παρουσίασαν σχετικά υψηλές τιμές PI, πάνω από τον μέσο όρο (M.O.) και των επτά τόπων, γεγονός που συνάγει με τον σχετικά μικρό βαθμό πολυμορφισμού που έδειξαν στα αναλυόμενα δείγματα. Πάντως και οι επτά τόποι έδωσαν σχετικά υψηλές τιμές PI ενισχύοντας την άποψη πως το *Cucumis sativus* είναι φυτό με αρκετά στενή γενετική βάση εξαιτίας των πολλών αιώνων συνεχής καλλιέργειας και επιλογής.

Όμως, η σχετικά μικρή τιμή της Ολικής Πιθανότητας Ομοιότητας (total PI), η οποία ήταν $4,668345e^{-002}$, δηλώνει πως η πιθανότητα να βρεθούν δυο διαφορετικά δείγματα με το ίδιο προφίλ SSR είναι πολύ μικρή.



Όσον αφορά τους σύνθετους μικροδορυφορικούς τόπους DN909316 [(TTA)_n (CTT)_n] και DQ839410 [(ATT)_n (ATT)_n] που δεν έδειξαν διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων, μπορεί να υποθεθεί πως η διαφορά στο μήκος της πρώτης επανάληψης θα μπορούσε να «εξουδετερωθεί» με ίση διαφοροποίηση του μήκους στη δεύτερη επανάληψη, με αποτέλεσμα το

συνολικό μήκος του τόπου να μείνει σταθερό για τα δείγματα. Όμως, μια τέτοια πιθανότητα είναι μάλλον μηδαμινή, έτσι ώστε να χρειάζεται να διευκρινιστεί με αλληλούχηση. Εξάλλου μια τέτοια προσέγγιση δεν συμβαδίζει με την γενική πειραματική προσέγγιση των SSRs.

Στο φαινόγραμμα των γονοτύπων που δημιουργήθηκε με βάση την διαφοροποίηση των δειγμάτων με τους επτά μικροδορυφορικούς τόπους γίνεται φανερός ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε δυο ομάδες, οι οποίες διαφέρουν στο μέγεθος του καρπού, εμφανίζοντας βέβαια και κάποιες αποκλίσεις. Στην ορθότητα του φαινογράμματος, το οποίο μπορεί να γίνει ακόμα πιο λεπτομερές και αξιόπιστο με την ανάλυση επιπλέον μικροδορυφορικών τόπων, συνάγει και το γεγονός πως το δείγμα Κνωσός εμφανίζεται ως πιο απομακρυσμένο από τα υπόλοιπα, μαζί με το δείγμα SMR18, αφού τα δείγματα αυτά δεν χρησιμοποιούνται ως πατρικές σειρές σε προγράμματα βελτίωσης και θεωρούνται τα λιγότερο συγγενικά.

Συμπερασματικά, οι μικροδορυφόροι αποτελούν ένα πολύ ισχυρό μοριακό εργαλείο γενετικής ταυτοποίησης, το οποίο όμως έχει κάποια μειονεκτήματα που επιβάλλουν την επικουρική χρήση άλλων μοριακών δεικτών. Τέτοιοι δείκτες, όπως τα AFLPs μπορούν να προσφέρουν μαζικότερη και εκτενέστερη ανάλυση γονοτύπων.

B. Ανάλογα Γονιδίων Ανθεκτικότητας.

Βασική ιδέα στη χρήση των RGAs ως μέθοδο γενετικής ταυτοποίησης αποτέλεσε το γεγονός ότι δυο διαφορετικοί φαινότυποι στο ίδιο περιβάλλον θα οφείλονται σε διαφορετικό γενετικό περιεχόμενο. Αντιπαρατάσσοντας λοιπόν ένα γονότυπο με πολλαπλές ανθεκτικότητες με ένα ευπαθή γονότυπο και εξετάζοντας στοχευμένα μόνο τα γονίδια που έχουν χαρακτηριστικά γονιδίων ανθεκτικότητας θα μπορούσαμε να αποκτήσουμε μια πρώτη εικόνα διαφοροποίησης του γενετικού περιεχομένου σε R γονίδια.

Φυσικά δεν θα ήταν εφικτό όλες οι αλληλουχίες RGAs να αντιστοιχούν σε γονίδια ανθεκτικότητας. Έτσι οι αλληλουχίες αυτές θα μπορούσαν να μελετηθούν περαιτέρω για το εάν συνδέονται, με βάση την έκφραση τους με κάποιο μηχανισμό ανθεκτικότητας.

Επιπλέον, τα απομονωμένα RGAs θα έδιναν την δυνατότητα γενετικής ταυτοποίησης ποικιλιών με βάση την διαφοροποίηση των συγκεκριμένων περιοχών.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έγιναν κάποια πρώτα βήματα προς αυτή την κατεύθυνση. Ίσως με την χρήση διαφορετικών εκφυλισμένων εκκινήτων θα γίνει εφικτή η απομόνωση μεγαλύτερων τμημάτων (3' άκρο) RGAs τα οποία θα δώσουν την δυνατότητα για περαιτέρω ανάλυση.

Συντμήσεις

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

Avr gene: avirulence gene

BSA: Bulk Segregant Analysis

CAP: Cleaved Amplified Polymorphism

EST: Expressed Sequence Tag

GSS: Gene Specific Sequence

HR: Hypersensitive response

ISSR: Inter Simple Sequence Repeat

MAS: Marker Assistant Selection

NIL: Near Isogenic Lines

R gene: Resistance gene

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RGA: Resistance Genes Analogs

SCAR: Sequence Characterized Amplified Region

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SSR: Simple Sequence Repeat

VNTR: Variable Number of Tandem Repeat

Παράρτημα

1. Ο κλώνος SMR_C καθώς και παραδείγματα απομονωμένων κλώνων.

>SMR_C

```
1   ATAGCGGTAC CTTCTTCAAC ATCCATTATG TGATTGTTTT TAAGCGAAAA CATGCTTGAA
61  AGGAGTTTGG TTTGTAAACA TGAAAGGTTT CCAAGGGTTC TGATATAATT CTCTCGAACG
121 TTGGAGAGGA AGCAATGAGC TTCAAATTCG TCACGAATTC GCTCATAACA CACCCTAGCT
```

>KN_1

```
1   ATGCACTTTT TACBACCGTC CGACCGTTAC TGAGGCTTTT GCTTCTGTTC MATATATAAT
61  GACGGAAGCA AATTTTGGTT GGTTAATCCG ATCAGTTCAT AGATGGTTCG CAAGTATGAT
121 GGTCTTAATG ATGATCCTGC ACGTATTTTCG CGTGTATCTT ACTGGTGGAT TTMAAAAACC
181 TCGTGMATTG ACTTGGGTTA CAGGTGTGGT TCTGGSTGTA TTGACCGCAT CCTTTGGTGT
241 AACTGGTTAT TCCTTACCTT GGGACCAAAT TGGTTATTGG GCAGTCAAAA TTGTAACAGG
301 TGTACCGGAA GCTATTCCAG TAATAGGGTC GSCTTTGGTA GAGTTATTAC GCGGAAGTGC
361 TAGTGTGGGA CAATCTACCT TGACTCGTTT TTATAGTTTA CACACTTTTG TATTACCTCT
421 TCTTACTGCC GTATTTATGT TAATGCACTT CCTMATGATA CGTAAGCMAG GSATTTCTGG
481 TCCTTTATAG AGAATAGAAA TTAGAAATCA TAGATTTGTA ATTAGTTATT TATGATTACT
541 CGGGGGGGGA AGAAGAGTAT TTCATTGCTG CAAATATGGA TTATTGAAAA ATAAGACATG
601 TATTTGGATA TTTCCCTTCA ACTCCACGRA ATTTTATTTCG TTATTTTTC AATAAATA
661 ATAGTTGAAG GGAATTCCTC GHAGAGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAACCCC TTACCTTACC
721 CTCCAGAAGG GCGRA
```

>SMR_1

```
1   TGTGCTGGRR TTCGCCCTTM TGGAGGGTAA GGTAAGGGGT TTTTTTTTTT
51  TTTTTTTTTT TCTTSGAAGA ATTCCCTTCA ACTATTATTT ATTATTGAAA
101 AATAACGAAT AAAATTTTCGT GGRGTTGAAG GGAAATATCC AAATACATGT
151 CTTATTTTTT AATAATCCAT ATTTGCAGCA ATGAAATACT CTTCTTCCCC
201 CCCCAGATA TCATMAATAA CTAATTACAA ATCTATGATT TCTAATTTCT
251 ATTCTCTATA AAGGMCCAGA AATGCCTTGC TTACGKATCA TTAGGRAGTG
301 CATTACATA AATACGGCAG TMAGAAGAGG TAATACAAAA GTGTGTAAAC
351 TATAAAAACG AGTCAAGGTA GATTGTCCA CACTAGCACT TCCGCGTAAT
401 AACTCTACCA AAGSGACCC TATTACTGGA ATAGCTTCCG GTACACCTGT
451 TACAATTTTG ACTGCCCAAT AACCAATTTG GTCCAAGGT AAGGAATAAC
501 CAGTTACACC AAAGGATGCG GTCAATACAG CCAGAACCAC ACCTGTAACC
551 CAAGTCAATT CACGRGKTT TTTAAATCCA CCAGTAAGAT ACACGCGRAA
601 TASGTGCAGG ATCATCATTA AGACCATCAT ACTTGCCGAC CATCTATGAA
651 CTGATCGGAT TAACCAACCA AAATTTBCTT CCGTCATTAT ATATTGAACA
701 GAAGCAAAAAG CCTCAGTAAC GGTCGGACGG TAGTARAAAAG TCATAACACA
751 CCCTAGCTAT TGTAAGGGCG AATT
```


2. Αναλυτικά αποτελέσματα προγράμματος IDENTITY.

List of loci

```
=====
Locus1: D78594
Locus2: Z35499
Locus3: CK759477
Locus4: DN909316
Locus5: CV004821
Locus6: DN910632
Locus7: CK758791
```

List of clones

```
=====
Clone1: TM11
Clone2: ZxL12
Clone3: SMR18
Clone4: L20
Clone5: M20
Clone6: M10
Clone7: ZxL2
Clone8: DIAS
Clone9: L6
Clone10: L25
Clone11: CRETA
Clone12: VALENTIN
Clone13: L4
Clone14: TM1
Clone15: M4
Clone16: L14
Clone17: L1
Clone18: M1
Clone19: M21
Clone20: F1PS
Clone21: F1GE
Clone22: ΚΝΩΣΣΟΥ
```

In total 7 loci, 22 clones

Statistics

```
=====
Locus 1 : 'D78594'
Number of Alleles : 2
268      274
Allele Frequency      0.88636 0.11364
Standard Deviation    0.04785 0.04785
95% upper conf. Limit 0.94358 0.21562
sum 44
Heterozygosity - expected: 0.201446
- observed: 0.045455
Estimated Frequency of Null Alleles: 0.129837

Paternity Exclusion Probability : 0.090578
Probability of Identity (PI): 0.698559
```


Locus 2 : 'Z35499'
 Number of Alleles : 2
 225 227
 Allele Frequency 0.09091 0.90909
 Standard Deviation 0.04334 0.04334
 95% upper conf. Limit 0.18775 0.95853
 sum 44
 Heterozygosity - expected: 0.165289
 - observed: 0.000000
 Estimated Frequency of Null Alleles: 0.141844

Paternity Exclusion Probability : 0.075814
 Probability of Identity (PI): 0.737723

 Locus 3 : 'CK759477'
 Number of Alleles : 3
 166 169 175
 Allele Frequency 0.04545 0.20455 0.75000
 Standard Deviation 0.03140 0.06081 0.06528
 95% upper conf. Limit 0.12842 0.32025 0.84074
 sum 44
 Heterozygosity - expected: 0.393595
 - observed: 0.318182
 Estimated Frequency of Null Alleles: 0.054114

Paternity Exclusion Probability : 0.188817
 Probability of Identity (PI): 0.516425

 Locus 4 : 'DN909316'
 Number of Alleles : 2
 160 166
 Allele Frequency 0.61364 0.38636
 Standard Deviation 0.07341 0.07341
 95% upper conf. Limit 0.72444 0.51033
 sum 44
 Heterozygosity - expected: 0.474174
 - observed: 0.136364
 Estimated Frequency of Null Alleles: 0.229152

Paternity Exclusion Probability : 0.180877
 Probability of Identity (PI): 0.613754

 Locus 5 : 'CV004821'
 Number of Alleles : 4
 256 265 274 277
 Allele Frequency 0.13636 0.02273 0.04545 0.79545
 Standard Deviation 0.05174 0.02247 0.03140 0.06081
 95% upper conf. Limit 0.24268 0.09567 0.12842 0.87693
 sum 44
 Heterozygosity - expected: 0.346074
 - observed: 0.318182

Estimated Frequency of Null Alleles: 0.020721

Paternity Exclusion Probability : 0.181333

Probability of Identity (PI): 0.508314

Locus 6 : 'DN910632'

Number of Alleles : 2

188 190

Allele Frequency 0.38636 0.61364

Standard Deviation 0.07341 0.07341

95% upper conf. Limit 0.51033 0.72444

sum 44

Heterozygosity - expected: 0.474174

- observed: 0.590909

Estimated Frequency of Null Alleles: -0.079187

Paternity Exclusion Probability : 0.180877

Probability of Identity (PI): 0.613754

Locus 7 : 'CK758791'

Number of Alleles : 2

135 150

Allele Frequency 0.97727 0.02273

Standard Deviation 0.02247 0.02247

95% upper conf. Limit 0.99491 0.09567

sum 44

Heterozygosity - expected: 0.044421

- observed: 0.045455

Estimated Frequency of Null Alleles: -0.000989

Paternity Exclusion Probability : 0.021717

Probability of Identity (PI): 0.916090

Total Exclusion Probability : 0.633635133932

Total Probability of Identity (PI): 4.668345e-002

3. Πίνακας Γενετικών Αποστάσεων με τον αλγόριθμο Dps του προγράμματος MSat2.

	TM11	ZxL12	SMR18	L20	M20	M10	ZxL2	DIAS	L6	L25	CRETA	VALENTIN	L4	TM1	M4	L14	L1	M1	M21	F1PS	F1GE	ΚΝΩΣΟΥ	
TM11	0.000																						
ZxL12	0.560	0.000																					
SMR18	1.946	0.847	0.000																				
L20	0.693	0.074	1.030	0.000																			
M20	0.336	0.154	0.847	0.241	0.000																		
M10	0.442	0.241	1.030	0.154	0.074	0.000																	
ZxL2	0.442	0.241	1.030	0.154	0.074	0.000	0.000																
DIAS	0.847	0.154	1.253	0.074	0.336	0.241	0.241	0.000															
L6	0.847	0.154	1.253	0.074	0.336	0.241	0.241	0.000	0.000														
L25	0.693	0.074	1.030	0.000	0.241	0.154	0.154	0.074	0.074	0.000													
CRETA	0.693	0.074	1.030	0.000	0.241	0.154	0.154	0.074	0.074	0.000	0.000												
VALENTIN	0.693	0.074	1.030	0.000	0.241	0.154	0.154	0.074	0.074	0.000	0.000	0.000											
L4	0.693	0.074	1.030	0.000	0.241	0.154	0.154	0.074	0.074	0.000	0.000	0.000	0.000										
TM1	0.074	0.693	2.639	0.560	0.442	0.336	0.336	0.693	0.693	0.560	0.560	0.560	0.560	0.000									
M4	0.693	0.074	1.030	0.000	0.241	0.154	0.154	0.074	0.074	0.000	0.000	0.000	0.000	0.560	0.000								
L14	0.693	0.074	1.030	0.000	0.241	0.154	0.154	0.074	0.074	0.000	0.000	0.000	0.000	0.560	0.000	0.000							
L1	0.693	0.241	1.030	0.154	0.241	0.154	0.154	0.241	0.241	0.154	0.154	0.154	0.154	0.560	0.154	0.154	0.000						
M1	0.693	0.074	1.030	0.000	0.241	0.154	0.154	0.074	0.074	0.000	0.000	0.000	0.000	0.560	0.000	0.000	0.154	0.000					
M21	0.847	0.154	0.560	0.241	0.336	0.442	0.442	0.336	0.336	0.241	0.241	0.241	0.241	1.030	0.241	0.241	0.442	0.241	0.000				
F1PS	0.442	0.241	1.030	0.154	0.074	0.000	0.000	0.241	0.241	0.154	0.154	0.154	0.154	0.336	0.154	0.154	0.154	0.154	0.442	0.000			
F1GE	0.560	0.000	0.847	0.074	0.154	0.241	0.241	0.154	0.154	0.074	0.074	0.074	0.074	0.693	0.074	0.074	0.241	0.074	0.154	0.241	0.000		
ΚΝΩΣΟΥ	1.253	0.336	0.336	0.442	0.560	0.693	0.693	0.560	0.560	0.442	0.442	0.442	0.442	1.540	0.442	0.442	0.693	0.442	0.154	0.693	0.336	0.000	

Βιβλιογραφία

- Beckmann, J.S., Weber, J.L., (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12, 627–631.
- Bennett, M.D., and Smith, J.B. (1976). Nuclear DNA amounts in Angiosperms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* pp. 227–274
- Burger Y, Katzir N, Tzuri G, Portnoy V, Saar U, Shriber S, Perl-TrevesR, CohenR (2003). Variation in the response of melon genotypes to *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race 1 determined by inoculation tests and molecular markers. *Plant Pathol* 52:204–211
- C.M. Thomas, P. Vos, M. Zabeau, D.A. Jones, K.A. Norcott, B.P. Chadwick, J.D.G. Jones, (1995) Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*, *Plant J.* 8 785–794
- Calo, A., Costacurta, A., Paludetti, G., Calo, G., Aruselkar, S., and D. Parfit (1989) The use of isoenzyme markers to characterize grape cultivars. *Rivista Vitic. Enol.* 42(1): 15-22
- Chiba N, Suwabe K, Nunome T, Hirai M (2003) Development of microsatellite markers in melon (*Cucumis melo* L.) and their application to major cucurbit crops. *Breed Sci* 53:21–27
- Debrauwere H, Gendrel CG, Lechat S, Dutreix M (1997) Differences and similarities between various tandem repeat sequences: minisatellites and microsatellites. *Biochimie*, **79**.
- G. Brigneti, J. Garcia-Mas, D.C. Baulcombe, (1997) Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Rysto* in potato, *Theor. Appl. Genet.* 94 198–203.
- Ivo Feussner and Helmut Kindl (1994) Particulate and soluble lipoxygenase isoenzymes. *Planta* (vol 194)
- Jaber, E.H., Srour, A.Y., Miliotis, D.A., Vakalounakis, D.J. and Doulis, A.G. (unpublished) Identification of AFLP and SCAR markers linked to resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in cucumber

- Jeffrey C., (1980): A review of the Cucurbitaceae. Bot. J. Linn. Soc. 81, 233-247.
- Jin L and Chakraborty R, 1993. Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-probe multilocus DNA fingerprinting data. Mol Biol Evol 11:120–127.
- K. Semagn, A. Bjornstad and M. N. Ndjiondjop, (2006). An overview of molecular marker methods for plants, Afr. Journal of Biotechnology Vol. 5 (25) pp. 2540-2568
- Katzir N, Danin-Poleg Y, Tzuri G, Karchi Z, Lavi U, Cregan PB: Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theor Appl Genet* 1996, 93:1282-1290
- Knerr LD, Staub JE (1992) Inheritance and linkage relationships of isozyme loci in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet* 84:217-224
- Knerr LD, Staub JE, Holder DJ, May BP (1989) Genetic diversity in *Cucumis sativus* L. assessed by variation at 18 allozyme loci. *Theor. Appt. Genet.* 78:119-128
- Konieczny, A. and F.M. Ausubel. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4(2):403-410.
- Liu ZW, Biyashev RM, Saghai Maroof MA (1996) Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor Appl Genet* 93:869–876
- Martin M. Kater, John Franken, Kim J. Carney, Lucia Colombo, Gerco C. Angenent, (2001), Sex Determination in the Monoecious Species Cucumber Is Confined to Specific Floral Whorls, *The Plant Cell*, Vol. 13, 481–493.
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral BW, Young ND (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J* 20:317–332

- Meyers BC, Morgante M, Michelmore RW (2002) TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in Arabidopsis and other plant genomes. *Plant J* 32:77–92
- Michalek W, Weschke W, Pleissner KP, Graner A (2002) EST analysis in barley defines a unigene set comprising 4,000 genes. *Theor Appl Genet* 104:97–103
- Minch E. 1997: MICROSAT, Version 1.5b. Stanford University Medical Center, Stanford
- Mohd Shuaib, Alam Zeb, Zahir Ali, Waqar Ali, Taufiq Ahmad and Ikhtiar Khan (2007) Characterization of wheat varieties by seed storage protein electrophoresis. *Afr. Journal of Biotechnology* Vol. 6 (5), pp. 497-500
- N. Katzir, Y. Danin-Poleg, G. Tzori, and P.B. Cregan (1996). Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theor Appl Genet* 93 :1282-1290
- Park YH, Sensory S, Wye C, Antonise R, Peleman J, Havey MJ (2000) A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs, and loci conditioning resistance to papaya ringspot and zucchini yellow mosaic viruses. *Genome* 43:1003–1010
- Q. Kong, C. Xiang And Z. Yu (2006). Development of EST-SSRs in *Cucumis sativus* From sequence database. *Molecular Ecology Notes*, 1234–1236
- R.W. Michelmore, I. Paran, R.V. Kesseli, (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 9828–9832
- Rehm S., Wessels J., Bitter principles of the *Cucurbitaceae* (1957), *J. Sci. Food Agric.*, pp 687-691.
- Robinson RW, Decker-Walters DS (1997) Cucurbits. CABI, New York, 226 p

- Rozen S, Skaletsky HJ (1998) Primer3. Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.htm
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E (1989) Molecular cloning manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Sefc, K.M., Lopes, M.S., Lefort F., Botta R., Roubelakis-Angelakis K.A., Ibanez J., Pejic I., Wagner H.W., Glössl J., and H. Steinkellner (2000). Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 100: 498-505.
- Serquen, F.C., Bacher, J., and Staub, J.E. (1997). Mapping and QTL analysis of horticultural traits in a narrow cross in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using random-amplified polymorphic DNA markers. *Mol. Breed.* **3**: 257–268.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K., Graner, A., 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of genederived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor.Appl. Genet.* 106, 411–422.
- Walter, T.W., Posluszny, U., and P.G. Kevan (1989) Isoenzyme analysis of the grape (*Vitis*). I. A practical solution. *Can. J. Bot.* 67: 2894-2899.
- Weising, K. and R.C. Gardner (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.
- Zhuang J., Chen T, Staub and Qian C., (2004) Assessment of genetic relationships among *Cucumis* spp. by SSR. *Plant Breeding* 123, 167–172
- Ολύμπιος Χ., (2001). Λαχανοκομία, εκδόσεις Σταμούλης
- Χατζόπουλος Π., (2001). Βιοτεχνολογία φυτών, εκδόσεις Έμβρυο
- <http://www.keygen.com>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://www.varinst.gr>