



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ
ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

Ραφαηλία-Χρυσοβαλάντου Τσάκου
Α.Μ.:11733

**Γενετική Διαφοροποίηση Εγχώριων Ποικιλιών και
Πληθυσμών Σκόρδου *Allium sativum* L. Χρησιμοποιώντας την
Τεχνική HRM-barcoding**

Πτυχιακή Εργασία



Επιβλέπων: Παπασωτηρόπουλος Βασίλειος, Αναπληρωτής
Καθηγητής

ΑΜΑΛΙΑΔΑ 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν να την φέρω εις πέρας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Βασίλειο Παπασωτηρόπουλο για την βοήθεια του και τις συμβουλές του.

Στη συνέχεια, θέλω να ευχαριστήσω την κ. Κωνσταντίνα Ζέλιου για την πολύτιμη βοήθεια της και τις επίσης κατάλληλες συμβουλές για την τεκμηρίωση της εργασίας αυτής.

Τέλος, να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την στήριξη της όλο αυτό το διάστημα.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Γενικά.....	7
1.2 Βοτανικά χαρακτηριστικά.....	8
1.3 Συστηματική ταξινόμηση.....	10
1.4 Καλλιέργεια.....	12
1.4.1 Κλιματικές συνθήκες.....	12
1.4.2 Εδαφικές συνθήκες.....	13
1.4.3 Βολβοποίηση.....	13
1.4.4 Καλλιεργούμενες Ελληνικές Ποικιλίες.....	14
1.5 Γενετική Ποικιλότητα	16
1.6 Χρήση μοριακών δεικτών για τη διάκριση πληθυσμών.....	17
1.6.1 Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες.....	17
Simple Sequence Repeats (SSR)	17
2. Σκοπός	18
3. Υλικά και μέθοδοι	18
3.1 High Resolution Melt (HRM)	18
3.1.1 Θεωρητικό μέρος	19
3.1.1.1 PCR.....	19
3.1.1.2 Real Time PCR.....	20
3.1.1.3 Ανίχνευση του σήματος φθορισμού	23
3.1.2 Πειραματικό μέρος.....	24
3.1.2.1 Φυτικό Υλικό	24
3.1.2.2 Υλικά για HRM ανάλυση.....	26
3.2 Εκκινητές	28
3.2.1 Πειραματικό πρωτόκολλο	29
4. Αποτελέσματα	33
4.1 Ccmp1	33
4.2 Ccmp2	35
4.3 Ccmp3.....	37
4.4 Ccmp4	38
4.5 Ccmp5	40

4.6 Ccmp6	42
4.7 Ccmp7	45
4.8 Ccmp8	46
4.9 Ccmp10	50
4.10 NTCP.....	52
5. Συζήτηση-Συμπεράσματα	54
6. Βιβλιογραφία.....	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έγινε χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) για την μελέτη και σύγκριση 35 πληθυσμών σκόρδου (*Allium sativum*). Τα δεδομένα που συγκρίθηκαν αφορούσαν κυρίως τα χαρακτηριστικά των ποικιλιών, το DNA, καθώς και την διαφορά που παρουσιάζουν στο φθορισμό μεταξύ τους.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι διαδικασία ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης (Real-time PCR), μέσω της χρήσης ειδικών φθορίζοντων χρωστικών που ενσωματώνονται στην αλληλουχία που ενισχύεται.

Η Real Time PCR αναφέρεται στη μεγέθυνση DNA με PCR που ελέγχεται ενώ συμβαίνει η μεγέθυνση. Η real-time PCR στον πραγματικό χρόνο είναι μία ποσοτική αντίδραση PCR κατά την οποία η μεγέθυνση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη real-time PCR. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της μεγέθυνσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA.

Η επιτυχία ενός πειράματος PCR εξαρτάται κυρίως από τη σχεδίαση των εκκινήτων. Οι εκκινήτες (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια που

οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινήτων επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR.

Οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν είναι κατά κύριο λόγο ελληνικής προέλευσης αλλά υπάρχουν και ισπανικής και κινέζικης προέλευσης. Όλες οι ποικιλίες που μελετήθηκαν καλλιεργήθηκαν και αναπτύχθηκαν στον ίδιο αγρό με τις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης και τις ίδιες καλλιεργητικές φροντίδες.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι να βρεθούν οι διαφορές που υπάρχουν σε αυτούς τους πληθυσμούς όσον αφορά τα χαρακτηριστικά τους, τη διαφορά που παρουσιάζουν στο φθορισμό και την αντίδραση τους στις δόκιμες με διαφορετικούς χλωροπλαστικούς primers τύπου ccmr.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Το σκόρδο (επιστημονική ονομασία: *Allium sativum*) είναι ένα ποώδες, ετήσιο, μονοκοτυλήδονο, βολβώδες φυτό και ανήκει στο γένος *Allium* και στην οικογένεια των Λειριοειδών ή Υακινθοειδών. Τα σκόρδα, τα κρεμμύδια, τα πράσα και το σχοινόπρασο είναι όλα μέλη του γένους *Allium*, το οποίο περιλαμβάνει περίπου 750 είδη. Το σκόρδο μοιάζει περισσότερο με το κρεμμύδι στο μέγεθος και τις συνήθειες ανάπτυξης του φυτού, αλλά διαφέρει, όσον αφορά στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού και του βολβού. Είναι ένας αρωματικός βολβός που έχει χρησιμοποιηθεί για μαγειρική και ιατρική. Είναι γνωστός σε όλο τον κόσμο για τη χαρακτηριστική γεύση του καθώς και για τις ιδιότητές του στην υγεία. Χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα ως άρτυμα στην παρασκευή φαγητών, και για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες.

Κέντρο καταγωγής του σκόρδου αποτελεί η Κεντρική Ασία με δευτερογενές κέντρο τη Μεσόγειο και τις περιοχές του Καυκάσου ενώ άγριος πρόγονος του σκόρδου θεωρείται το *Allium longicuspis*. Εξημερώθηκε εδώ και πολύ καιρό και αναφέρεται σε αρχαία αιγυπτιακά, ελληνικά, ινδικά και κινεζικά συγγράμματα. Σήμερα, το σκόρδο αναπτύσσεται σε εύκρατες και τροπικές περιοχές σε όλο τον κόσμο και πολλές ποικιλίες έχουν αναπτυχθεί για να ταιριάζουν σε διαφορετικά κλίματα.

Το σκόρδο χρησιμοποιείται για αρωματισμό μεγάλης ποικιλίας φαγητών, στη μεταποίηση κρεάτων και αποτελεί συστατικό μείγματος μπαχαρικών. Επίσης, έχει βρεθεί ότι εκχύλισμα από τα φύλλα του σκόρδου έχει μυκητοκτόνο, εντομοκτόνο και αντιβακτηριακή δράση καθώς και

εντομοαπωθητικές ιδιότητες. Καταναλώνεται ως νεαρό φυτό ή υπό μορφή βολβού, ή τουρσί σε ξύδι, ή αποξηραμένο σε σκόνη. Ο βολβός τρώγεται ωμός ή σαν άρτυμα σε διάφορα φαγητά (Ολύμπιος, 2008).

Οι εμπορικές μορφές του σκόρδου στην αγορά περιλαμβάνουν:

- i. Σκελίδες σκόρδου
- ii. Φρέσκα υδατικά και αλκοολικά εκχυλίσματα
- iii. Λυοφιλοποιημένες σκόνες
- iv. Αποσταγμένα έλαια

1.2 Βοτανικά χαρακτηριστικά

Είναι ένα βολβώδες βότανο ύψους περίπου 60cm. Έχει βολβώδες στέλεχος και τα φύλλα του μέχρι τη μέση είναι επίπεδα και λεία. Τα φύλλα του είναι στενά, μακριά και κοφτερά. Στην κορυφή του στελέχους είναι το άνθος που έχει λευκό χρώμα. Τέσσερα έως δώδεκα μακρά, σπαρταρισμένα φύλλα που συνδέονται με ένα υπόγειο στέλεχος.

Ο βολβός του σκόρδου αποτελείται από πολλά μικρά βολβοειδή μέρη που λέγονται σκελίδες και έχουν κοινή βάση. Καλύπτονται όλα μαζί από 3-5 ή 3-4 μεμβράνες που έχουν μορφή κολεού (σωληνοειδούς θήκης). Στρογγυλεμένος, αποτελούμενος από μέχρι και 15 μικρότερα βότσαλα γνωστά ως γαρίφαλλα. Τα γαρίφαλα και οι βολβοί καλύπτονται από ένα λευκόχρωμο ή ροζ παντελόνη.



Εικόνα 1:Βολβός-σκελίδα σκόρδου

Κάθε κολεός σχίζεται σε μία μορφή σχήματος λογχοειδούς φύλλου που είναι λίγο μικρότερο από αυτό του κρεμμυδιού και λίγο στενότερο και μικρότερο από το φύλλο του πράσου. Το σκόρδο πολλαπλασιάζεται με τους βολβούς του.

Τα άνθη φέρουν ένα πυκνό, σφαιρικό σμήνος σε μια ακίδα μήκους έως 25cm. Η νεαρή κεφαλή λουλουδιού περικλείεται σε ένα ζευγάρι βραχίονες που περικλείουν μακρυνά και χωρίζονται για να αποκαλύψουν τα λουλούδια. Ατομικά μίσχοι λουλουδιών προκύπτουν από ένα κοινό σημείο. Τα άνθη είναι πρασινο-λευκά ή ροζ χρώματα με έξι περιγενή τμήματα (σέπαλα και πέταλα) μήκους περίπου 3 mm. Τα μπουλντόλια (ασεξουαλικά μοσχεύματα), τα οποία μοιάζουν με μικροσκοπικά γαρύφαλλα, συχνά διαχέονται μεταξύ των λουλουδιών.



Εικόνα 2:Άνθος σκόρδου

1.3 Συστηματική ταξινόμηση

Το σκόρδο ανήκει στο βασίλειο των φυτών, στη συνομοταξία αγγειόσπερμα (*Mangoliopgyta*) στην ομοταξία των μονοκοτυλήδωνων (*Liliopsida*), στην τάξη των λειριώδων (*Liliales*), στην οικογένεια λειριοειδών (*Liliaceae*) και στο γένος *Allium*.

Αναλυτικότερα παρατίθεται η συστηματική κατάταξή του:

Κλάση – *Liliopsida*

Υποκλάση – *Liliidae*

Συνομοταξία – *Liliana*

Ομοταξία – *Amaryllidales*

Οικογένεια – *Alliaceae*

Υποοικογένεια – *Allioideae*

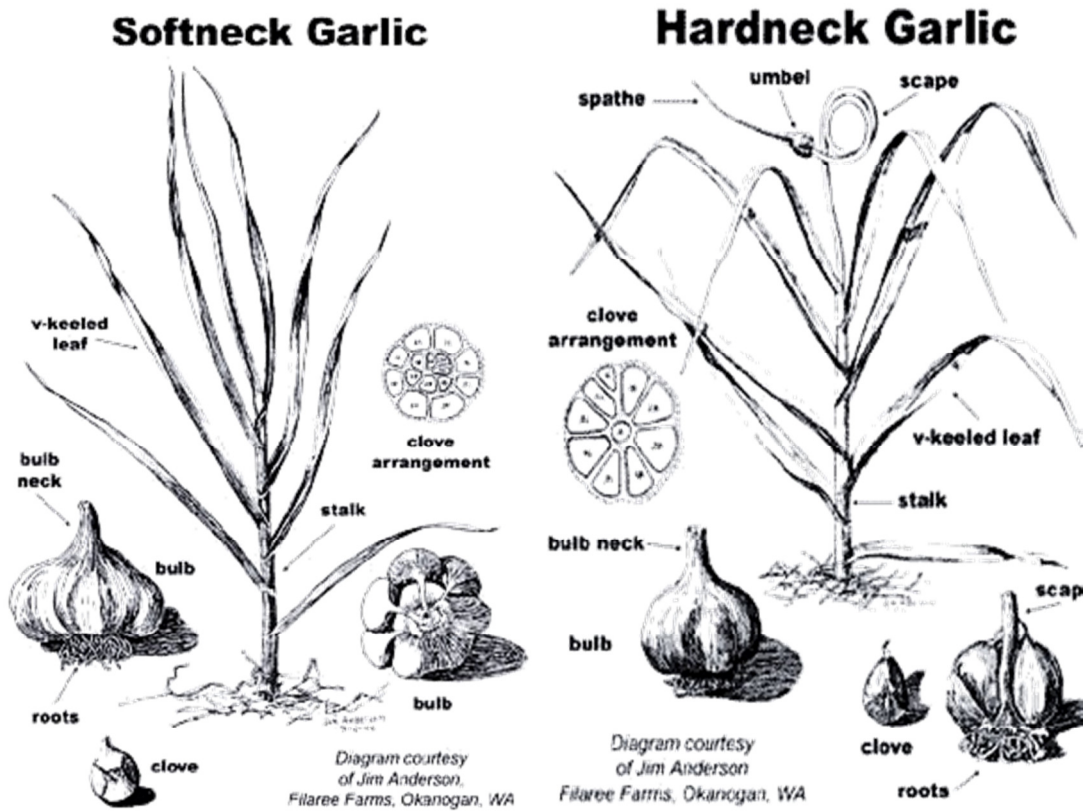
Φυλή – *Allieae*

Γένος – *Allium*

Τα διάφορα είδη σκόρδου έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερις βασικές ομάδες με βάση τα μορφολογικά και φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά

- 1. Ομάδα *Sativum*:** Στην ομάδα αυτή συγκαταλέγονται τα σκόρδα που καλλιεργούνται στην Ελλάδα, χαρακτηρίζονται από μαλακό λαιμό (*soft-neckedgarlic*) και εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια.
- 2. Ομάδα *Ophioscordon*:** Η ομάδα αυτή γνωστή και ως φιδόσκορδο περιλαμβάνει σκόρδα τα οποία καλλιεργούνται στην Ανατολική Ευρώπη, παρουσιάζουν σκληρό λαιμό (*hard-necked*) και έχουν το χαρακτηριστικό ότι το ανθικό στέλεχος έχει σπειροειδή μορφή στο άκρο του.
- 3. Ομάδα *Longicuspis*:** Η ομάδα αυτή χρησιμοποιείται για την παραγωγή σπόρων στην Κεντρική Ασία και θεωρείται η αρχέγονη ομάδα, από την οποία προήλθαν όλες οι υπόλοιπες.

4. **Υποτροπική ομάδα:** Στην ομάδα αυτή, συγκαταλέγονται πληθυσμοί σκόρδου που καλλιεργούνται σε κλιματικές συνθήκες της Νοτιοανατολικής και Ανατολικής Ασίας.



Εικόνα 3. Διαφορετικοί τύποι σκόρδου ανάλογα με τον λαιμό που σχηματίζουν (Sterling, 2000)

1.4 Καλλιέργεια

Στην Ελλάδα καλλιεργείται από τα αρχαία χρόνια Η φύτευση του σκόρδου για το ελληνικό κλίμα γίνεται από το φθινόπωρο τον Οκτώβριο ή την άνοιξη για τα νωπά σκόρδα μέχρι το Φεβρουάριο για τα ξερά. Αυτά φυτεύονται σε βάθος ως 5 εκ. και σε απόσταση 5-10 εκ. μεταξύ τους. Πρέπει να σκαλίζονται επιπόλαια, να βοτανίζονται και να ποτίζονται τακτικά. Ο βολβός δημιουργείται κατά την Άνοιξη όταν και οι μέρες είναι μεγαλύτερες. Το σκόρδο ανθίζει κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και το ύψος του κυμαίνεται από 30-50 πλέον πόντους. Η συγκομιδή γίνεται κατά τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο. Τα σκόρδα ξεριζώνονται, αφήνονται να μαραθούν και στη συνέχεια γίνονται αρμαθιές για να διατηρηθούν για μακρά χρονικά διαστήματα και στέλνονται στην αγορά.

Στην Ελλάδα καλλιεργούνται 30.000 στρέμματα και η ετήσια παραγωγή φτάνει τους 18,000 τόνους με κυριότερες περιοχές παραγωγής τη Μακεδονία, τη Θράκη, και τον Πλατύκαμπο Λάρισας. Οι σπουδαιότερες ποικιλίες που καλλιεργούνται στην Ελλάδα είναι τα άσπρα (Θράκης και Τριπόλεως), οι γίγαντες και τα κοινά.

1.4.1 Κλιματικές συνθήκες

Το σκόρδο καλλιεργείται σε κλίματα της ευκράτου ζώνης κατά την διάρκεια του χειμώνα και της άνοιξης. Αντέχει τις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα. Η υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία δεν είναι και τόσο επιθυμητή για το σκόρδο, ιδιαίτερα κατά το στάδιο της ωρίμανσης των βολβών, γιατί και η ωρίμανση καθυστερεί και ο κίνδυνος προσβολής από μύκητες είναι μεγαλύτερος.

1.4.2 Εδαφικές συνθήκες

Το σκόρδο μπορεί να καλλιεργηθεί σε ποικιλία εδαφών, όμως ένα καλά αποστραγγιζόμενο, γόνιμο, βάθους τουλάχιστον 45-60cm και πλούσιο σε οργανική ουσία έδαφος, θεωρείται περισσότερο ικανοποιητικό. Οι αποδόσεις στα εδάφη αυτά είναι και πιο υψηλές. Σε πολύ υγρά εδάφη και κάτω από συνθήκες συνεχούς υψηλής εδαφικής υγρασίας, ιδιαίτερα την περίοδο της βολβοποίησης μέχρι την ωρίμανση, ο βολβός συχνά σαπίζει. Σε βαριά εδάφη και για χειμερινές καλλιέργειες, τόσο η φύτευση όσο και η καταπολέμηση των ζιζανίων μπορεί να είναι προβληματική. Στα εδάφη αυτά εμποδίζεται η κανονική ανάπτυξη των βολβών και μπορεί να είναι κακοσχηματισμένοι. Το σκόρδο αποδίδει καλύτερα στα ουδέτερα ή τα ελαφρά όξινα εδάφη με pH=6-7. Ευδοκίμει και σε εδάφη με pH 5,5-8. Το σκόρδο δεν θα πρέπει να καλλιεργείται σε έδαφος στο οποίο προηγήθηκε καλλιέργεια κρεμμυδιού, πράσου ή σκόρδου, προς αποφυγή προσβολών από εχθρούς και ασθένειες που προσβάλουν την καλλιέργεια, λόγω της συγγένειας που υπάρχει μεταξύ των ειδών. Θα πρέπει η καλλιέργεια του σκόρδου να ενταχθεί σε ένα σύστημα αμειψισποράς με άλλες καλλιέργειες κηπευτικών ή βιομηχανικών φυτών και δημητριακών.

1.4.3 Βολβοποίηση

Η βολβοποίηση στο σκόρδο αρχίζει με την αύξηση του μήκους της φωτοπεριόδου την άνοιξη και η διαδικασία επιταχύνεται και με την αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι 25°C. Η βολβοποίηση στο σκόρδο επηρεάζεται από τις θερμοκρασίες αποθήκευσης των σκελίδων που βρίσκονται στο στάδιο του λήθαργου και από τις θερμοκρασίες που επικρατούν κατά την διάρκεια ανάπτυξης του φυτού πριν τη βολβοποίηση. Η έκθεση των σκελίδων ή των φυτών σε θερμοκρασίες 0-10°C για 30-60 ημέρες, επιταχύνει στη συνέχεια τη βολβοποίηση κάτω από συνθήκες μεγάλης φωτοπεριόδου. Η διατήρηση

των σκελίδων ή η ανάπτυξη του φυτού σε θερμοκρασίες των 25°C είναι δυνατό να παρεμποδίζει τη βολβοποίηση. Ορατή βολβοποίηση συνήθως αρχίζει τον Απρίλη μέχρι τον Ιούνιο, ανάλογα βέβαια και με την ημερομηνία φύτευσης, την ποικιλία, την θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της βλαστικής περιόδου και την θερμοκρασία αποθήκευσης του πολλαπλασιαστικού υλικού πριν την φύτευση.

1.4.4 Καλλιεργούμενες Ελληνικές Ποικιλίες

Στην Ελλάδα καλλιεργούνται ποικιλίες σκόρδου που παράγουν βολβούς που διαφέρουν, στο μέγεθος, τον αριθμό των σκελίδων ανά βολβό (μεγάλες σκελίδες σε μικρούς αριθμούς ή μικρές σκελίδες σε μεγάλους αριθμούς) και το χρώμα των χιτώνων που ποικίλει από το λευκό προς το ρόδινο. Προτιμούνται οι ποικιλίες που σχηματίζουν βολβό λευκό, με λεπτούς χιτώνες και με λίγες στον αριθμό σκελίδες αλλά μεγάλες στο μέγεθος. Πιο διαδεδομένη είναι η ποικιλία Τριπόλεως που χαρακτηρίζεται από λευκό και μεγάλο μεγέθους βολβό, με καλό μέγεθος σκελίδες.

Στην Ελλάδα οι κυριότερες τοπικές ποικιλίες σκόρδου που καλλιεργούνται είτε εμπορικά είτε για προσωπική χρήση είναι:

1. Σκόρδα Τριπόλεως: Αρκετά μεγάλοι άσπροι βολβοί, ενώ οι πρώιμοι βολβοί έχουν ρόδινο χρώμα. Γίνονται προσπάθειες για την αναγνώριση των σκόρδων Τριπόλεως ως προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π).
2. Σκόρδα Θράκης (Νέα Βύσσα): Άσπροι μεγάλοι βολβοί, ενώ έχει ξεκινήσει διαδικασία αναγνώρισης του προϊόντος ως Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (Π.Γ.Ε)

3. Σκόρδα κοινά: Μικρότεροι βολβοί και σκελίδες με κίτρινη ή άσπρη σάρκα
4. Σκόρδα Εύβοιας: Δύο ποικιλίες σκόρδων τα λευκά και κόκκινα που εμφανίζουν κόκκινους ιριδισμούς στην εξωτερική τους επιφάνεια
5. Σκόρδα Λακωνίας: Πράσινα σκόρδα με μέτριο μέγεθος βολβού και πολλές σκελίδες
6. Σκόρδα Σαντορίνης: Αυτοφυή ποικιλία μονόλοβου ή μονοσκελίδου σκόρδου με μία μόνο αρκετά μεγάλη σκελίδα με έντονη γεύση
7. Σκόρδα Κεφαλονιάς
8. Σκόρδα Μήλου
9. Σκόρδα Κουφόβουνου Διδυμότειχου
10. Σκόρδα Ξυλαγανής

1.5 Γενετική Ποικιλότητα

Το σκόρδο είναι διπλοειδές άτομο που αναπαράγεται κυρίως αγενώς με τις σκελίδες του βολβού . Ο αγενής πολλαπλασιασμός του σκόρδου για πολλούς αιώνες έχει οδηγήσει σε μια συσσώρευση χρωμοσωματικών αλλαγών στο γονιδίωμα του σκόρδου. Επομένως, η μεγάλη ποικιλότητα που παρουσιάζεται συνήθως στους γονοτύπους σκόρδου οφείλονται στις μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο γονιδίωμα. Παρά την στειρότητα του σκόρδου, οι πληθυσμοί σκόρδου εμφανίζουν μια μεγάλη ποικιλότητα η οποία είναι επιθυμητή καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί προς το όφελος των βελτιωτών για την ανάπτυξη ποικιλιών σκόρδου με βελτιωμένα οικονομικής σημασίας χαρακτηριστικά όπως η απόδοση και η αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις .

Η επίδραση του περιβάλλοντος στα μορφολογικά χαρακτηριστικά δυσχεραίνει τον χαρακτηρισμό των γονοτύπων σκόρδου . Για την εξάλειψη τέτοιων φαινομένων οι ερευνητές στοχεύουν με άλλες στρατηγικές για τον χαρακτηρισμό των γονοτύπων σκόρδου. Τα τελευταία χρόνια, οι μοριακοί δείκτες αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλοτητας και τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων των φυτών. Για την αξιολόγηση της γενετικής ποικιλότητας των γονοτύπων σκόρδου έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετοί βιοχημικοί δείκτες όπως για παράδειγμα ισοενζυμικοί δείκτες , RAPD (Random Amplified PolymorphicDNA) , AFLP (Amplified Length Polymorphisms) SSR (Simple Sequence Repeat) , SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism)

1.6 Χρήση μοριακών δεικτών για τη διάκριση πληθυσμών

1.6.1 Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες

Simple Sequence Repeats (SSR)

Οι απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αποτελούνται από 2-5 νουκλεοτίδια, όπως (AC), (ATT), (ATGT). Οι (SSR) μπορούν να απομονωθούν από τράπεζες DNA ή από ειδικές τράπεζες μικροδορυφόρων και αναλύονται μετά από πολλαπλασιασμό με PCR μίας περιοχής που περιέχει την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία και διαχωρισμό των επαναλήψεων. Απαιτείται μόνο μία μικρή ποσότητα DNA. Οι μικροδορυφόροι SSR μπορούν να διαχωρίσουν όλες τις μορφές μιας μικροδορυφορικής περιοχής, άρα είναι αρκετά πληροφοριακοί και πολυμορφικοί. Αυτό οφείλεται στον υψηλό βαθμό μετάλλαξης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και η παραλλακτικότητά τους οφείλεται στις αποκλείσεις που υπάρχουν κατά την αντιγραφή και σε άλλες διεργασίες που πραγματοποιούνται κατά τη μείωση. Οι μικροδορυφόροι στα φύτα μπορεί να είναι έως και δέκα φορές πιο μεταβλητοί από άλλους δείκτες, έτσι συνιστώνται για γενετική ανάλυση και ταυτοποίηση ειδών και γενοτύπων.

Η χρήση των SSR ως μοριακοί δείκτες έχει αυξηθεί, αλλά η χρήση τους για γενετική ανάλυση δημιουργεί προβλήματα στην ανάλυση των αποτελεσμάτων λόγω της επανάληψης των αλληλουχιών. Ο σχεδιασμός εκκινητών που ενισχύουν μία μικροδορυφορική περιοχή δίνουν καλύτερα αποτελέσματα.

2. Σκοπός

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η γενετική διάκριση εγχώριων ποικιλιών σκόρδου (*Allium sativum*) με τη χρήση απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών SSR's συγκεκριμένα χλωροπλαστικών δεικτών και τη χρήση της μεθόδου HRM.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 High Resolution Melt (HRM)

Η HRM είναι μία νέα μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της γενετικής μεταβολής σε αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων. Αυτή η μέθοδος στηρίζεται στις τεχνικές που προέρχονται από την καμπύλη της PCR. Στην ανάλυση HRM, η περιοχή που μας ενδιαφέρει ενισχύεται με μία φθορίζουσα χρωστική κι έτσι σταδιακά μετριέται ο φθορισμός σε ένα εξειδικευμένο μηχάνημα και δημιουργείται μία χαρακτηριστική καμπύλη.



Εικόνα 4:Υπολογιστής που τρέχει το πρόγραμμα το σύστημα CFX96 Real-Time System

Η ανάλυση της HRM χρησιμοποιεί δύο προφίλ παρατηρήσεων:

Καμπύλες τήξης που έχουν παρόμοιο σχήμα αλλά διακρίνονται μεταξύ τους από διαφορές στη θερμοκρασία τήξης T_m του αμπλικονίου. Τυπικά, τέτοια προφίλ δημιουργούνται από ομοζυγωτά παραλλαγμένα δείγματα που συγκρίνονται με δείγμα άγριου τύπου. Σε τέτοιες καταστάσεις, η διαφορά T_m μεταξύ των δειγμάτων οφείλεται σε μεταβολή αλληλουχίας από τον άγριο τύπο.

Καμπύλες τήξης που εμφανίζουν σχήμα καμπύλης διαφορετικό από τις καμπύλες ομοζυγώτη τήγματος. Αυτά τα προφίλ οφείλονται συνήθως στην ύπαρξη αναντιστοιχιών ζεύγους βάσης που υπάρχουν στο μίγμα προϊόντων PCR.

3.1.1 Θεωρητικό μέρος

3.1.1.1 PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction) είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών.

Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Μπορεί ακόμα να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση ποικίλων μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με τη χρήση της συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων.

3.1.1.2 Real Time PCR

Η real-time PCR βασίζεται στην επαναστατική μεθοδολογία της ποσοτικής PCR. Η real-time PCR, αναφέρεται στη μεγέθυνση DNA με PCR που ελέγχεται ενώ συμβαίνει η μεγέθυνση. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα που προσφέρει στον ερευνητή να καθορίζει καλύτερα το ποσό του αρχικού DNA στο δείγμα πριν τη μεγέθυνση με PCR. Τα τελευταία χρόνια η χρήση της γίνεται πιο ευρεία, εξαιτίας του αυξανόμενου αριθμού real-time PCR θερμοκυκλοποιητών στην αγορά και της επακόλουθης πτώσης των τιμών τους καθώς επίσης και των αντιδραστηρίων.

Η real-time PCR στον πραγματικό χρόνο είναι μία ποσοτική αντίδραση PCR κατά την οποία η μεγέθυνση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη real-time PCR. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της μεγέθυνσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA.

Η real-time PCR μετράει τα προϊόντα PCR καθώς συσσωρεύονται ή μετράει σε πραγματικό χρόνο το ποσό των PCR προϊόντων σε σημείο όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των φθορίζουσών χρωστικών. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ένα σήμα φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει σε πιο σημείο όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Αυτό το σήμα υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που

απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα φθάσει σε αυτό το σήμα χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct). Οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι η βάση για τον υπολογισμό των DNA αντιγράφων ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA

Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού είναι η συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων. Ως baseline ορίζονται οι κύκλοι PCR κατά τους οποίους το σήμα συσσωρεύεται αλλά είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης από το μηχάνημα. Αυτό το σήμα χρησιμοποιείται για τη χάραξη του κατωφλιού. Το κατώφλι υπολογίζεται επί 10 φορές της κανονικής παρέκκλισης από το μέσο σήμα της χρωστικής της baseline. Σήμα χρωστικής το οποίο ανιχνεύεται πάνω από το κατώφλι θεωρείται πραγματικό και χρησιμοποιείται για το καθορισμό του κατώφλι κύκλου (Ct) για ένα δείγμα. Οι τιμές του Ct καθορίζονται από τον κλασματικό αριθμό των PCR κύκλων, κατά τους οποίους το σήμα της χρωστικής είναι μεγαλύτερο από ένα ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης. Στη συνέχεια οι τιμές του Ct των διαφόρων δειγμάτων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας του κάθε δείγματος.

Με τη real-time PCR, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis), κατά την οποία οι μεγεθυμένες αλληλουχίες μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση το σημείο τήξης τους (T_m), το οποίο είναι συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος. Το σημείο τήξης είναι μοναδικό για κάθε αλληλουχία και χαρακτηριστικό για αυτήν.

Τα πλεονεκτήματα της real-time PCR, έναντι της απλής PCR, αλλά και άλλων μοριακών μεθόδων, είναι πολλά. Το πιο σημαντικό αναφέρεται στην ικανότητα υπολογισμού νουκλεϊκών οξέων με απίστευτο πλατύ δυναμικό εύρος. Η ικανότητα αυτή σχετίζεται με την ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία που έχει η μέθοδος, στην οποία οφείλεται η ανίχνευση αντιγράφων νουκλεϊκών αλληλουχιών λιγότερων από πέντε. Επιπλέον πλεονεκτήματα είναι ο μικρότερος χρόνος που απαιτείται για την αντίδραση με παράλληλη ανάλυση του αποτελέσματος, η υψηλή ακρίβεια, η επαναληψιμότητα εξαιτίας του αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης, η αποφυγή επιμολύνσεων, λόγω της εκτέλεσης της αντίδρασης σε ένα κλειστό υψηλής τεχνολογίας σύστημα ώστε να μην απαιτούνται χειρισμοί μετά την PCR για την ανάλυση του προϊόντος και να ελαχιστοποιούνται έτσι οι επιμολύνσεις στο εργαστήριο και τέλος η δυνατότητα ποσοτικοποίησης.

Η real-time PCR μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε παραδοσιακές όσο και σε νέες εφαρμογές, με πολύ μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με την απλή PCR. Το γεγονός ότι η μέθοδος συλλέγει στοιχεία κατά την εκθετική φάση πολλαπλασιασμού του DNA, ανοίγει νέες προοπτικές για νέες εφαρμογές :

- Ποσοτικό προσδιορισμό μικροοργανισμών
- Μέτρηση της έκφρασης κάποιων γονιδίων.
- Επαλήθευση πολλαπλασιασμού κάποιων γονιδίων
- Αποτελεσματικότητα θεραπευτικής αγωγής
- Ποσοτικό προσδιορισμό βλάβης στο DNA.
- Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών.
- Προσδιορισμό γονότυπου

3.1.1.3 Ανίχνευση του σήματος φθορισμού

Το σημείο κατά το οποίο το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης, ορίζεται ως το «κατώφλι» μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Threshold Cycle ή CT), είναι στατιστικά σημαντική και ανιχνεύεται ως σήμα φθορισμού. Η μεταβολή αυτή της συγκέντρωσης γίνεται σε συγκεκριμένο κύκλο και εξαρτάται απόλυτα από την αρχική συγκέντρωση του κάθε δείγματος. Μετά από ενίσχυση PCR σε πραγματικό χρόνο, η καμπύλη τήξης είναι που διεξάγεται παρουσία μιας "χρωστικής κορεσμού" σύνδεσης DNA.

3.1.2 Πειραματικό μέρος

3.1.2.1 Φυτικό Υλικό

Για το πειραματικό μέρος έγινε καλλιέργεια σε αγρό της περιοχής των Καβασίων Ηλείας (37°52' N, 21°15' E) κατά την καλλιεργητική περίοδο 2016-2017. Η φύτευση έγινε στις 5/12/16 και η συγκομιδή στις 15/6/17. Το έδαφος στο οποίο έγινε η καλλιέργεια ήταν αμμοπηλώδες (76,6% άμμος, 7,4% ίλος, 16% άργιλος) με pH 7,4 και οργανική ουσία 0,94%. Οι αποστάσεις φύτευσης ήταν 30 cm μεταξύ των γραμμών και 30 cm επί των γραμμών, ενώ η άρδευση πραγματοποιήθηκε με το σύστημα καταιονισμού και ο έλεγχος των ζιζανίων έγινε χειρωνακτικά.



Οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν είναι οι εξής:

<u>a/a</u>	<u>Ποικιλία</u>
1	Άγιος Πέτρος - Λευκάδα
2	Νέα Βύσσα-Εύβοια
4	Πολίχνη-Τύρος
5	Καρυά
6	Κατούνα
7	Τριπόλεως-Τρίπολη
8	Μανάση-Λευκαδας
9	Παταράκη Βρυσούλας
10	Τραχύ-Σκύρος
11	Τσουρέκι Μοναστήρι
12	Κεφαλλονιάς-Κεφαλλονιά
13	Ανδανία-Κωνσταντίνοι -Μεσσηνία
14	Κομοτηνής-Κομοτηνή
15	Κάμπος Αλτομιρά Αβοία-Μεσσηνία
16	Cardos Ισπανικά
17	Μαυρίκι -Τρίπολη
18	Ριζόμυλος-Μαγνησία
19	Λιθοβούνι -Τρίπολη
20	Κινέζικο (Ψαχνά)-Εύβοια
21	Στάδιο -Τρίπολη
22	Κινέζικο (Στεφανοβίκειο)-Μαγνησία
23	Κακκαλέτρι ΑΥΑ 167-Μεσσηνία
24	Νεάπολη Βοιών- Λακωνία
25	Μεσα Βουνί-Άνδρος
26	Aho monado Los Pedvonienos -Ισπανικό
27	Νεάπολη Ντόπιο
28	ΑΥΑ Messi 394 Κιτριές Αβίας-Μεσσηνία
29	Αμπελόπρασσο
30	Κεφαλλονιάς-Κεφαλλονιά
31	Ναυπάκτου-Αιτωλοακαρνανία
32	Μεγάλη Ματινία -Μεσσηνία
33	Κάτω Δολί -Μεσσηνία
34	Μύλου-Μύλος Κυκλάδες
35	Τριπόλεως (Μανθυρέα) –Τρίπολη
36	Τριπόλεως (Μαυρίκι)- Τρίπολη

3.1.2.2 Υλικά για HRM ανάλυση

Για την μελέτη των ποικιλιών με την μέθοδο HRM χρησιμοποιήθηκε η χρωστική EvaGreen® της εταιρίας Bio-Rad. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το SsoFast™ EvaGreen® Supermix, (Bio-Rad). Το supermix είναι μια συμπυκνωμένη αντίδραση, έτοιμη για χρήση και περιέχει όλα τα συστατικά που χρειάζεται για την real-time pcr, εκτός από τους εκκινητές. Συγκεκριμένα περιέχει την πολυμεράση Sso7d-fusion. Η πολυμεράση αυτή συμμετέχει στην γρήγορη ολοκλήρωση των κύκλων του πειράματος της pcr, χωρίς να επηρεάζει την ευαισθησία της, την αποδοτικότητα και την παραγωγικότητά της.



Εικόνα 5:Συσκευασία SuperMix

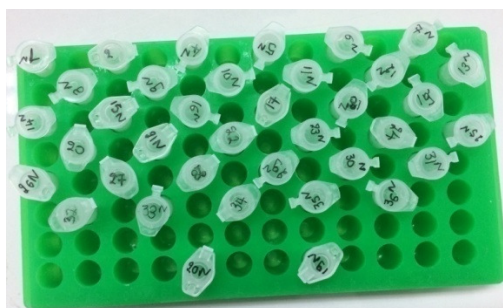
Χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή:

Thodoridis, Stefanaki et al 2012 Molecular Biology Resources

Component	Volume of reaction	Final concentration
SsoFast EvaGreen Supermix	10μl	1x
Forward primer	Variable	300-500nM
Reverse primer	Variable	300-500nM
RNase/DNase-Free water	Variable	-
DNA template	Variable	-
Total	20μl	-

1

Τα υπόλοιπα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι H₂O και το απομονωμένο DNA από τους πληθυσμούς των σκόρδων που μελετήθηκαν.



Εικόνα 6: Ποσότητες DNA πριν την αραίωση



Εικόνα 7: Ποσότητες DNA αραιωμένες V_τ=15λ C_τ=10ng/λ

¹ Πίνακας 1.

3.2 Εκκινητές

Χρησιμοποιήθηκαν 10 εκκινητές SSR's γλωροπλαστικοί τύπου, η αλληλουχία των οποίων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

2

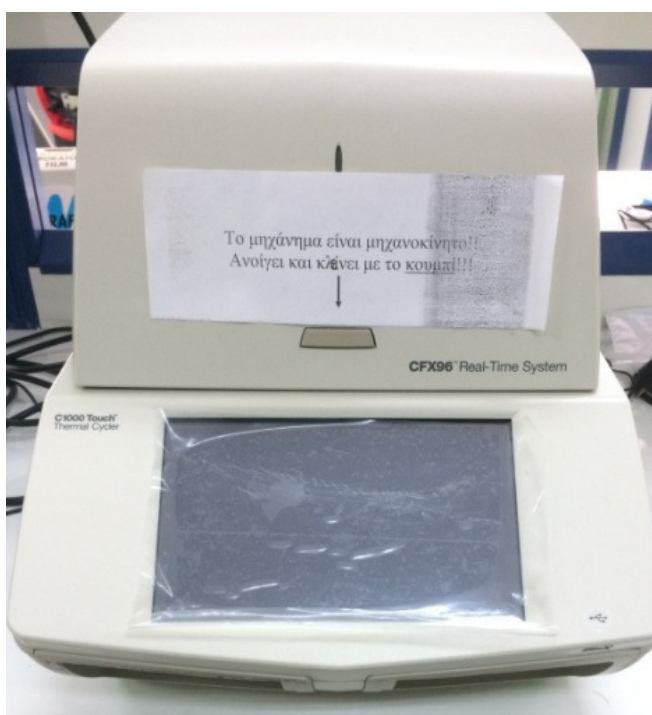
Ccmp1	Forward.	5' - GAG GTA AAC TTC T_A ACG GA-3'
	Reverse.	5' - CCG AAG TCA AAA G_G CGA TT-3'
Ccmp2	Forward.	5' - GAT CCC GGA CGT AAT CCT G-3'
	Reverse.	5' - ATC GTA CCG AGG GTT CGA AT-3'
Ccmp3	Forward.	5' - GAG ACC AAA ACG TGA CAT AG-3'
	Reverse.	5' - GTT TCA TTC GGC TCC TTT AG-3'
Ccmp4	Forward.	5' - AAT GCT GAA TCG AYG ACC TA-3'
	Reverse.	5' - CCA AAA TAT TBG GAG GAC TCT-3'
Ccmp5	Forward.	5' - TGT TCC AAT ATC TTC TTG TCA TTT-3'
	Reverse.	5' - AGG TTC CAT CGG AAC AAT TAT-3'
Ccmp6	Forward.	5' - GGA TGC ATA TGT AGA AAG CC-3'
	Reverse.	5' - CAT TAC GTG CGA CTA TCT CC-3'
Ccmp7	Forward.	5' - CAA CAT ATA CCA CTG TCA AG-3'
	Reverse.	5' - ACA TCA TTA TTG TAT ACT CTT TC-3'
Ccmp8	Forward.	5' - TTG GCT ACT CTA AC TTC CC-3'
	Reverse.	5' - TTC TTT CTT ATT TC_GAG DGAA-3'
Ccmp10	Forward.	5' - TTT TTT TTT A_T GAG GTG TCA-3'
	Reverse.	5' - TTC GTC GCC GTA GAAA TAG-3'
NTCP	Forward.	5' - CCT CCA TCA TCT CT CCA A-3'
	Reverse.	5' - ATT TAT TTC AGT TC GGG TTC C-3'

² Πίνακας 2. Αλληλουχία εκκινητών

3.2.1 Πειραματικό πρωτόκολλο

Αρχικά, αποφασίζουμε με ποιον primer θα δουλέψουμε και τον βγάζουμε από την κατάψυξη να ξεπαγώσει, καθώς και τα υπόλοιπα υλικά που θα χρησιμοποιήσουμε, όπως είναι H₂O και το DNA το οποίο θα χρειαστούμε. Στη συνέχεια, με τη χρήση του vortex, κάνουμε μία ανακίνηση σε όλα τα υλικά έτσι ώστε να είμαστε σίγουροι για το προϊόν το οποίο θα πάρουμε.

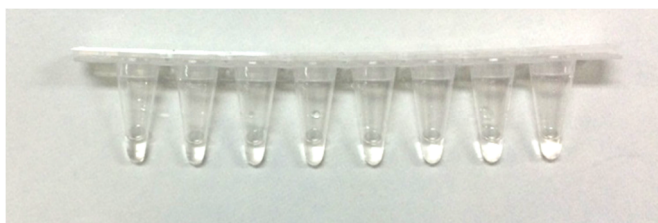
Με βάση τον Πίνακα 1 και το πρόγραμμα Mastermix calculator υπολογίζουμε τις ποσότητες που θα χρησιμοποιήσουμε. Έπειτα, με πολύ προσοχή και χωρίς να μολύνουμε κάποιο προϊόν, με την χρήση πιπετών τοποθετούμε την επιθυμητή ποσότητα από το κάθε υλικό στα ειδικά strips που χρησιμοποιούνται στην Real-Time PCR. Στη συνέχεια, κλείνουμε τα strips με προσοχή και τα τοποθετούμε στο μηχάνημα. Στο πρόγραμμα Bio-Rad CFX Manager φτιάχνουμε το plate και το πρωτόκολλο στο οποίο θα τρέξει η PCR.



Εικόνα 8: CFX96 Real-Time System

Αναλυτικότερα:

- Προετοιμασία πλάκας τήξης.
- Προσθήκη απαραίτητης ποσότητας του κάθε υλικού στο κατάλληλο tube
- Κλείνουμε το tube και κάνουμε μίξη της ποσότητας των υλικών με προσοχή χρησιμοποιώντας vortex
- Φυγοκεντρούμε το tube για την αφαίρεση όποιας φουσκάλας έχει δημιουργηθεί και συλλέγουμε τα υλικά στο κάτω μέρος
- Τοποθετούμε την κατάλληλη ποσότητα του μιξ σε κάθε κελί του strip



Εικόνα 8: Strips πριν τοποθετηθούν στο μηχάνημα

Προετοιμασία προγράμματος πειράματος.

Το πείραμα τρέχει μέσω του προγράμματος CFX Manager®

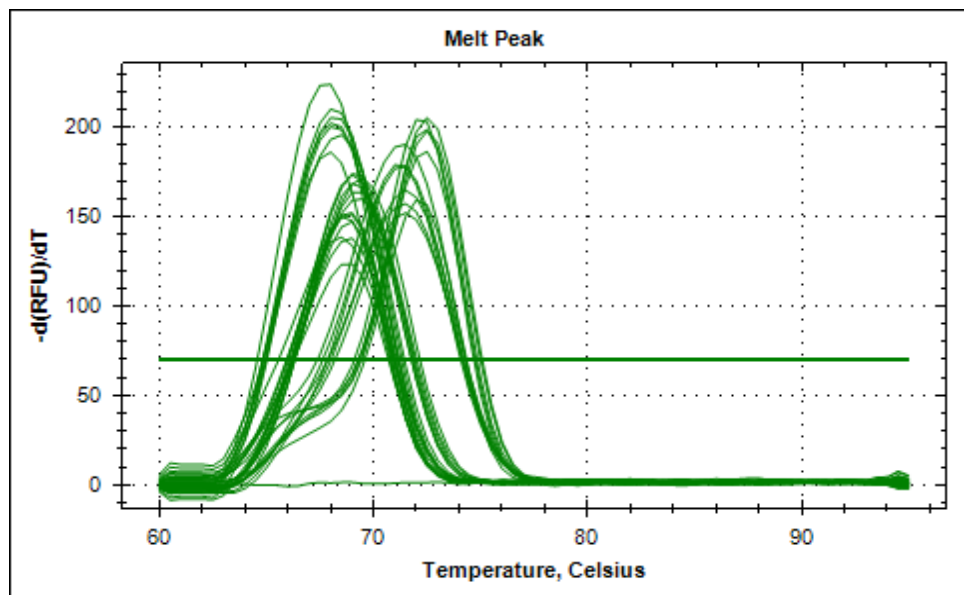
1. Ανοίγουμε το σύστημα CFX96
 2. Κάνουμε διπλό κλικ στο εικονίδιο CFX Manager
 3. Επιλέγουμε δημιουργία νέου πειράματος από τη λίστα των επιλογών στο startup wizard. Επιλέγουμε το OK στο παράθυρο που εμφανίζεται από το setup του πειράματος.
- Στην καρτέλα του πρωτοκόλλου, επιλέγουμε δημιουργία νέου για να ανοίξουμε την σύνταξη πρωτοκόλλου
 - Δημιουργία του παρακάτω πρωτοκόλλου

Cycling step	Temperature	Time	# of cycles
Enzyme activation	98°C	2 min	1
Denaturation	98°C	5 sec	35
Anneling/extetion	55°C	10 sec	
	95°C	1 min	1
	70°C	1 min	1
Melt curve	70-95°C	10 sec/ step	1

3

- Επιλέγουμε OK για να αποθηκεύσουμε το πρωτόκολλο και επιστρέφουμε στο παράθυρο με τις ρυθμίσεις πειράματος.
- Επιλέγουμε τη σελίδα της πλάκας
- Κάνουμε κλικ στο Select existing > Sample files > Melt calibration και επιλέγουμε το αρχείο που έχουμε φτιάξει με βάση τα υλικά μας
- Κάνουμε κλικ στο start run
- Επιλέγουμε το εργαλείο που θέλουμε στο start run από τη λίστα που υπάρχει κάνοντας κλικ στο κουτάκι που υπάρχει δίπλα από το κάθε εργαλείο
 - Φορτώνουμε την πλάκα τήξης στο εργαλείο που έχουμε επιλέξει
 - Πατάμε start run για να ξεκινήσει να τρέχει το πείραμα
 - Αποθηκεύουμε το όνομα του πειράματος ως Melt calibration_ και την ημερομηνία που τρέχει το πείραμα
 - Όταν το πείραμα ολοκληρωθεί τα δεδομένα αποθηκεύονται αυτόματα στο φάκελο και ανοίγουν με το CFX Manager. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται με την παρακάτω μορφή

³ Πίνακας 3. Ενδεικτικό πρωτόκολλο



Εικόνα 10:Εικονικό τελικό αποτέλεσμα

4. Αποτελέσματα

Παρακάτω αναλύονται τα αποτελέσματα της HRM με τη χρήση 10 διαφορετικών εκκινητών (Πίνακας 2). Κάποιοι από αυτούς φαίνεται να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συγκεκριμένη μέθοδο ενώ άλλοι όχι

4.1 Ccmp1

Για την δοκιμή του εκκινητή ccmp1 χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα δείγματα AS6 και AS14, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

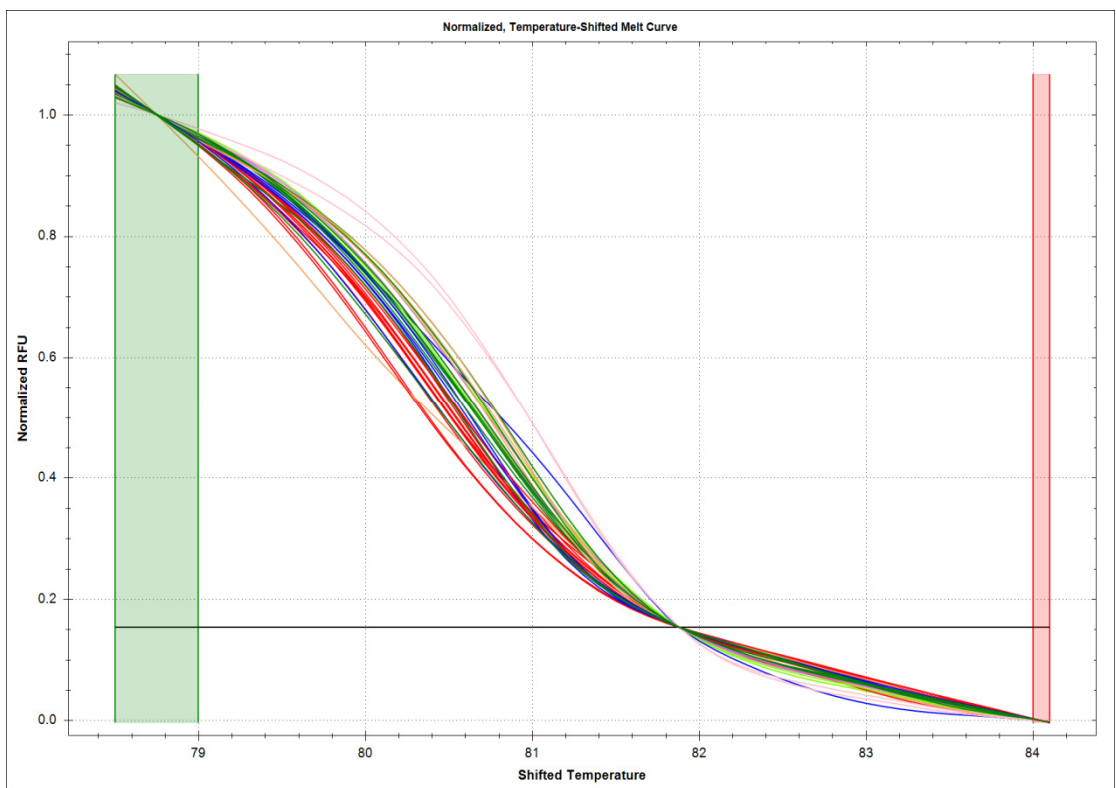
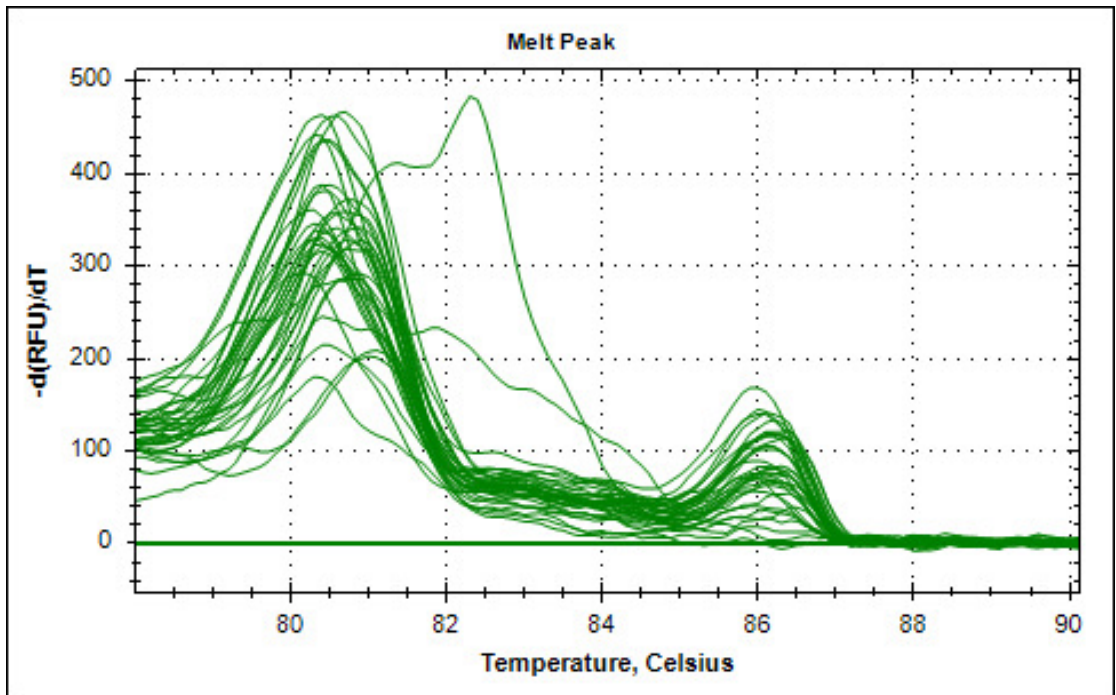
94°C	3'	
94°C	1'	x40
56°C	1'	
72°C	1'	
72°C	5'	
4°C	∞	

Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά (καθόλου ικανοποιητικά), οπότε και έγινε δοκιμή του εκκινητή ccmp1 χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα AS8 και AS10, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο με μεταβλητές θερμοκρασίες annealing:

95°C	5'	
95°C	30''	x39
49-59°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,3°C/2''	

Μεταβάλλαμε το annealing temperature από 49°C με 59°C με σκοπό την βελτίωση της εικόνας των καμπυλών φθορισμού ή λόγω αυξημένου φθορισμού του αρνητικού κοντρόλ. Φάνηκε ότι η βέλτιστη η θερμοκρασία είναι 50°C. Οι παρακάτω εικόνες παρουσιάζουν τις λογαριθμικές καμπύλες φθορισμού με βάση το πρόγραμμα CFX manager όλων των ποικιλιών καθώς

και τα αποτελέσματα ταξινόμησης με τη χρήση του προγράμματος Precision Melt Analysis.



4.2 Ccmp2

Για την δοκιμή του εκκινητή ccmp2 χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα δείγματα AS6 και AS14, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

95°C	5'	
95°C	30''	x39
55°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 94,5°C	0,3°C/2''	

Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά (καθόλου ικανοποιητικά), οπότε και έγινε δοκιμή του εκκινητή ccmp2 χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα AS8 και AS10, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο με μεταβλητές θερμοκρασίες annealing:

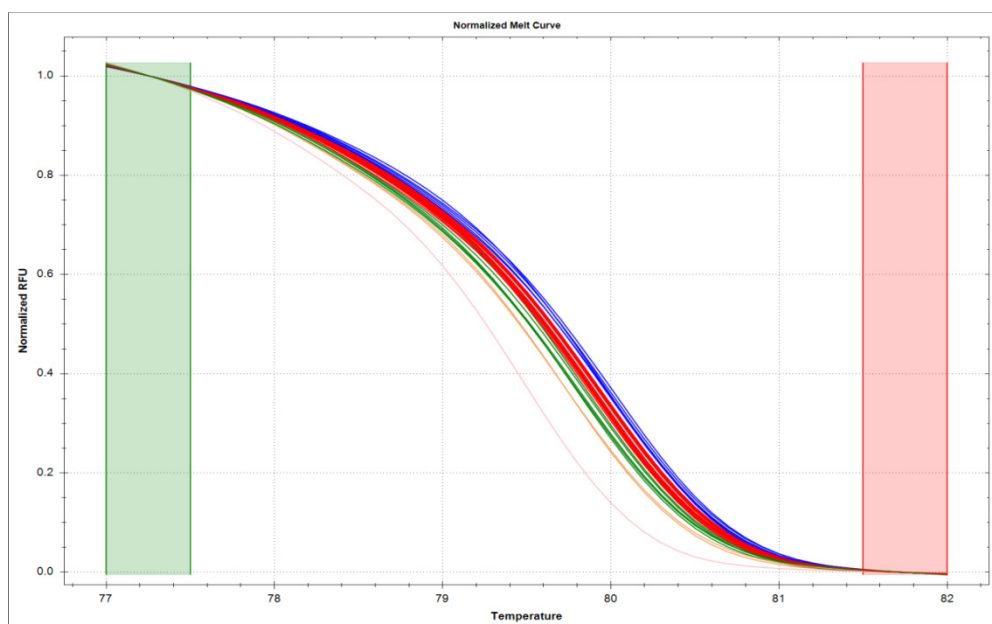
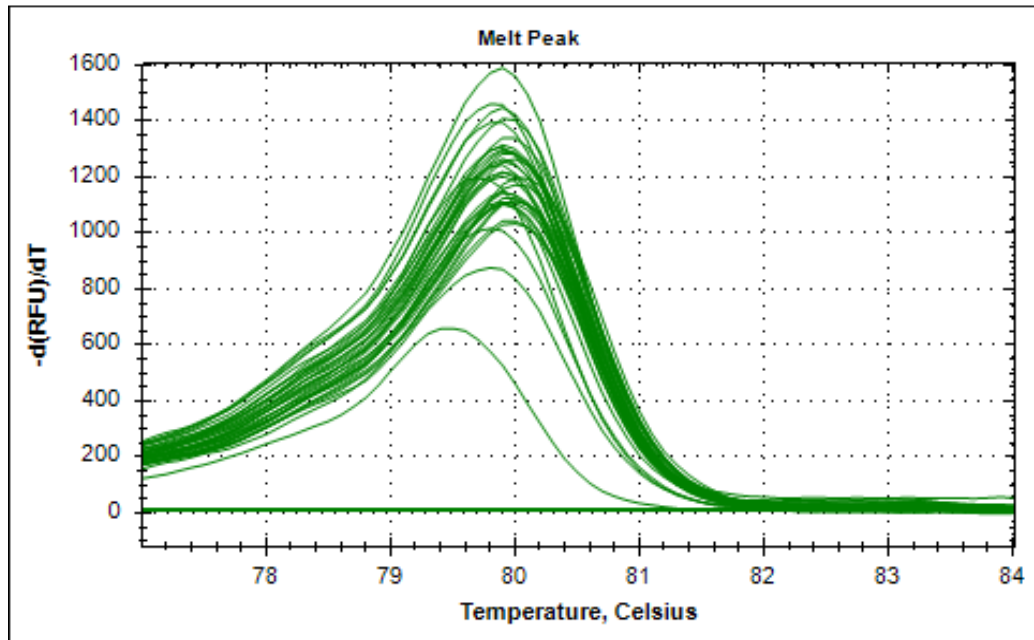
95°C	5'	
95°C	30''	x39
49-59°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,3°C/2''	

Μεταβάλλαμε το annealing temperature από 49°C με 59°C με σκοπό την βελτίωση της εικόνας των καμπυλών φθορισμού ή λόγω αυξημένου φθορισμού του αρνητικού κοντρόλ. Φάνηκε ότι η βέλτιστη η θερμοκρασία είναι 50°C. Οι παρακάτω εικόνες παρουσιάζουν τις λογαριθμικές καμπύλες φθορισμού με βάση το πρόγραμμα CFX manager όλων των ποικιλιών καθώς και τα αποτελέσματα ταξινόμησης με τη χρήση του προγράμματος Precision Melt Analysis.

Τελικό αποτέλεσμα

- 1^η δοκιμή στους **55°C** - το αρνητικό παρουσίασε υψηλό φθορισμό
- 2^η δοκιμή gradient **49°C-59°C**

Επιλέξαμε ως βέλτιστη θερμοκρασία **50°C**



4.3 Ccmp3

Για την δοκιμή του εκκινητή ccmp3 χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα δείγματα AS6 και AS14, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

94°C	3'	
94°C	1'	x40
56°C	1'	
72°C	1'	
72°C	5'	
40°C	∞	

Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά (καθόλου ικανοποιητικά), οπότε και έγινε δοκιμή του εκκινητή ccmp3 χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα AS2 και AS12, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο με μεταβλητές θερμοκρασίες annealing:

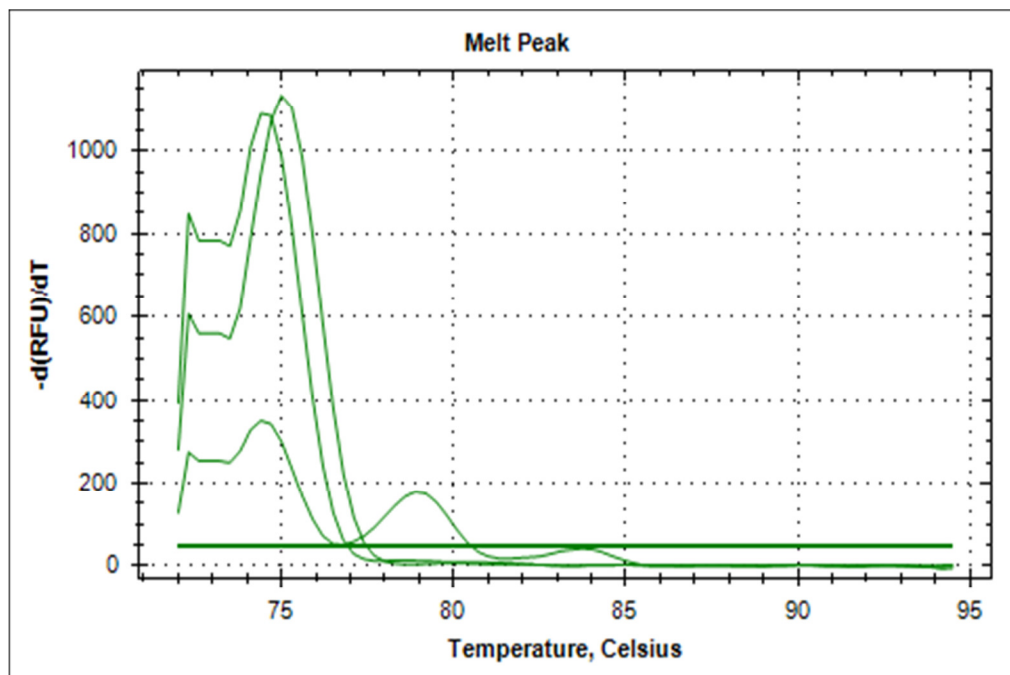
95°C	5'	
95°C	30''	x39
47-57°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,3°C/2''	

Μεταβάλλαμε το annealing temperature από 47°C με 57°C με σκοπό την βελτίωση της εικόνας των καμπυλών φθορισμού ή λόγω αυξημένου φθορισμού του αρνητικού κοντρόλ. Δεν υπήρξε βέλτιστη θερμοκρασία, άρα δεν υπήρξε φθορισμός. Οι παρακάτω εικόνες παρουσιάζουν τις λογαριθμικές καμπύλες φθορισμού με βάση το πρόγραμμα CFX manager όλων των ποικιλιών καθώς και τα αποτελέσματα ταξινόμησης με τη χρήση του προγράμματος Precision Melt Analysis.

Τελικό αποτέλεσμα

- 1^η δοκιμή στους **54°C** –καθόλου φθορισμός
- 2^η δοκιμή gradient **47°C-57°C**

Δεν έχουμε φθορισμό



4.4 Ccmp4

Για την δοκιμή του εκκινήτη ccmp4 χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα δείγματα AS2 και AS12, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

95°C	5'	
95°C	30''	x39
47-57°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,3°C/2''	

Μεταβάλλαμε το annealing temperature από 47°C με 57°C με σκοπό την βελτίωση της εικόνας των καμπυλών φθορισμού ή λόγω αυξημένου

φθορισμού του αρνητικού κοντρόλ. Φάνηκε ότι η βέλτιστη η θερμοκρασία 55°C. Οι παρακάτω εικόνες παρουσιάζουν τις λογαριθμικές καμπύλες φθορισμού με βάση το πρόγραμμα CFX manager όλων των ποικιλιών καθώς και τα αποτελέσματα ταξινόμησης με τη χρήση του προγράμματος Precision Melt Analysis

Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά και υπήρξε χαμηλός φθορισμός

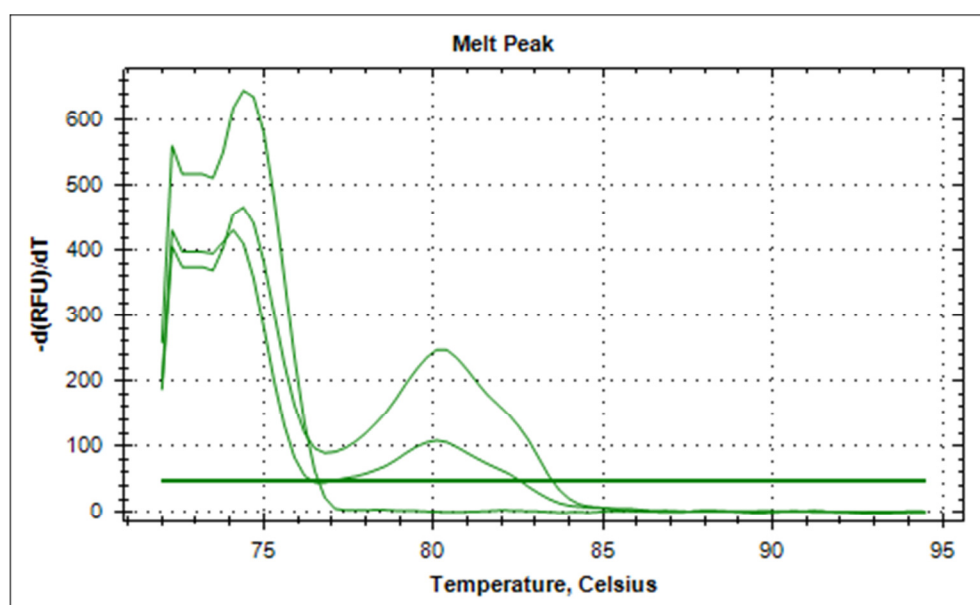
Τελικό αποτέλεσμα

- 1^η δοκιμή στους **55°C**-Το αρνητικό έχει πιο υψηλό φθορισμό από τα δείγματα
- 2^η δοκιμή gradient **47°C-57°C**- Έχουμε σχετικά χαμηλό φθορισμό

Βέλτιστη θερμοκρασία 55°C

- 3^η δοκιμή όλα τα δείγματα- θερμοκρασία 55°C

Δεν δίνει κάποιο αποτέλεσμα έχει χαμηλό φθορισμό



4.5 Ccmp5

Για την δοκιμή του εκκινητή ccmp5 χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα δείγματα AS2 και AS12, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

95°C	5'	
95°C	30''	x39
47-57°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,3°C/2''	

Μεταβάλλαμε το annealing temperature από 47°C με 57°C με σκοπό την βελτίωση της εικόνας των καμπυλών φθορισμού ή λόγω αυξημένου φθορισμού του αρνητικού κοντρόλ. Φάνηκε ότι η βέλτιστη η θερμοκρασία 46-47°C. Οι παρακάτω εικόνες παρουσιάζουν τις λογαριθμικές καμπύλες φθορισμού με βάση το πρόγραμμα CFX manager όλων των ποικιλιών καθώς και τα αποτελέσματα ταξινόμησης με τη χρήση του προγράμματος Precision Melt Analysis

Ωστόσο υπήρξε δοκιμή του εκκινητή με τα παρακάτω πρωτόκολλα:

Protocol.

95°C	5'	
95°C	30''	x48
46°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,1°C/2''	

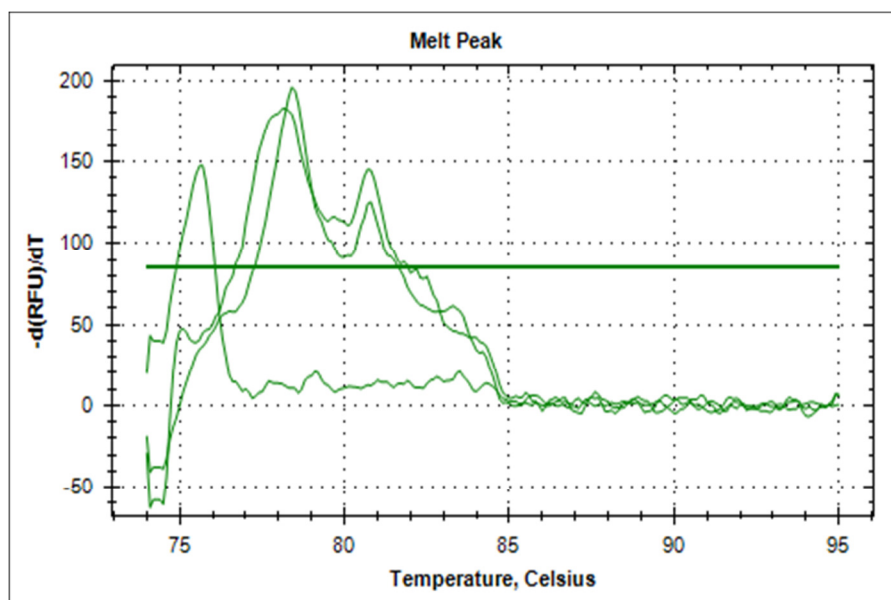
Protocol.

95°C	5'	
95°C	30''	x34
47°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,1°C/2''	

Τελικό αποτέλεσμα

- 1^η δοκιμή **55°C**- Δεν λειτούργησε
- 2^η δοκιμή gradient **47°C-57°C**

Έχουμε χαμηλό φθορισμό. Βέλτιστη θερμοκρασία 46-47°C



4.6 Ccmp6

Για την δοκιμή του εκκινητή ccmp6 χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα δείγματα AS6 και AS14, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

95°C	5'	
95°C	30''	x39
52°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,3°C/2''	

Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά (καθόλου ικανοποιητικά), οπότε και έγινε δοκιμή του εκκινητή ccmp6 χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα AS2 και AS12, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο με μεταβλητές θερμοκρασίες annealing:

95°C	5'	
95°C	30''	x39
47-57°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,3°C/2''	

Μεταβάλλαμε το annealing temperature από 47°C με 57°C με σκοπό την βελτίωση της εικόνας των καμπυλών φθορισμού ή λόγω αυξημένου φθορισμού του αρνητικού κοντρόλ. Δεν υπήρξε βέλτιστη θερμοκρασία, υπήρξε χαμηλός φθορισμός. Οι παρακάτω εικόνες παρουσιάζουν τις λογαριθμικές καμπύλες φθορισμού με βάση το πρόγραμμα CFX manager όλων των ποικιλιών καθώς και τα αποτελέσματα ταξινόμησης με τη χρήση του προγράμματος Precision Melt Analysis

Για την δοκιμή του εκκινητή csmrb χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα AS22 και AS27, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

95°C	5'	
95°C	30''	x45
46-56°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,73°C/5''	

Μεταβάλλαμε το annealing temperature από 47°C με 57°C με σκοπό την βελτίωση της εικόνας των καμπυλών φθορισμού ή λόγω αυξημένου φθορισμού του αρνητικού κοντρόλ. Φάνηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 49°C, στην οποία έγινε δοκιμή σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο. Οι παρακάτω εικόνες παρουσιάζουν τις λογαριθμικές καμπύλες φθορισμού με βάση το πρόγραμμα CFX manager όλων των ποικιλιών καθώς και τα αποτελέσματα ταξινόμησης με τη χρήση του προγράμματος Precision Melt Analysis

Protocol.

95°C	5'	
95°C	30''	x45
49°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,1°C/2''	

Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά και υπήρξε χαμηλός φθορισμός

Τελικό αποτέλεσμα

- 1^η δοκιμή στους **52°C**

Έχει χαμηλό φθορισμό , δεν λειτούργησε

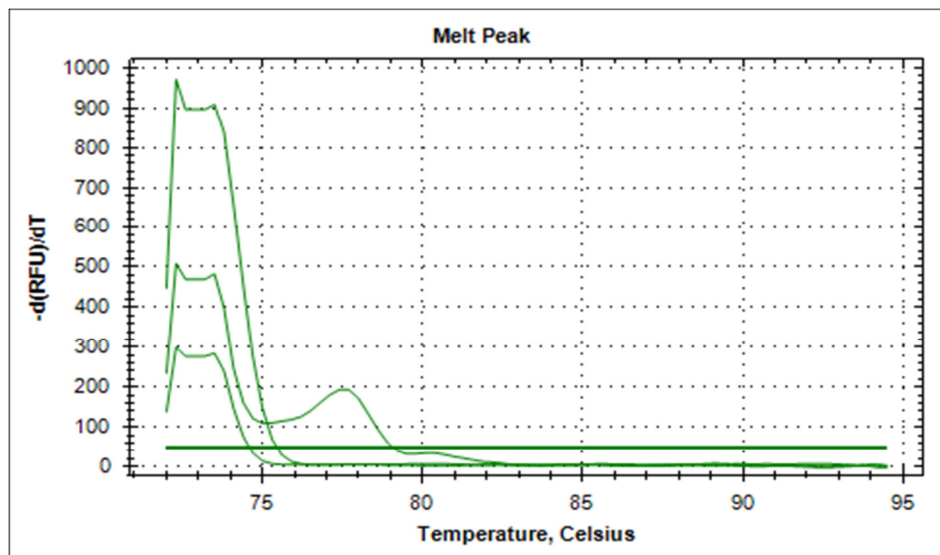
- 2^η δοκιμή gradient **47°C-57°C**

Δεν λειτούργησε καλά

- 3^η δοκιμή gradient **46°C-56°C**

Βέλτιστη θερμοκρασία **49°C**

Δεν λειτουργεί



4.7 Ccmp7

Για την δοκιμή του εκκινητή ccmp7 χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα δείγματα AS6 και AS14, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

95°C	5'	
95°C	30''	x39
52°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,3°C/2''	

Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά (καθόλου ικανοποιητικά), οπότε και έγινε δοκιμή του εκκινητή ccmp7 χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα AS22 και AS27, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο με μεταβλητές θερμοκρασίες annealing:

95°C	5'	
95°C	30''	x45
46-56°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,7°C/5''	

Μεταβάλλαμε το annealing temperature από 46°C με 56°C με σκοπό την βελτίωση της εικόνας των καμπυλών φθορισμού ή λόγω αυξημένου φθορισμού του αρνητικού κοντρόλ. Δεν υπήρξε βέλτιστη θερμοκρασία, συνεπώς δεν υπήρξε φθορισμός. Οι παρακάτω εικόνες παρουσιάζουν τις λογαριθμικές καμπύλες φθορισμού με βάση το πρόγραμμα CFX manager

όλων των ποικιλιών καθώς και τα αποτελέσματα ταξινόμησης με τη χρήση του προγράμματος Precision Melt Analysis

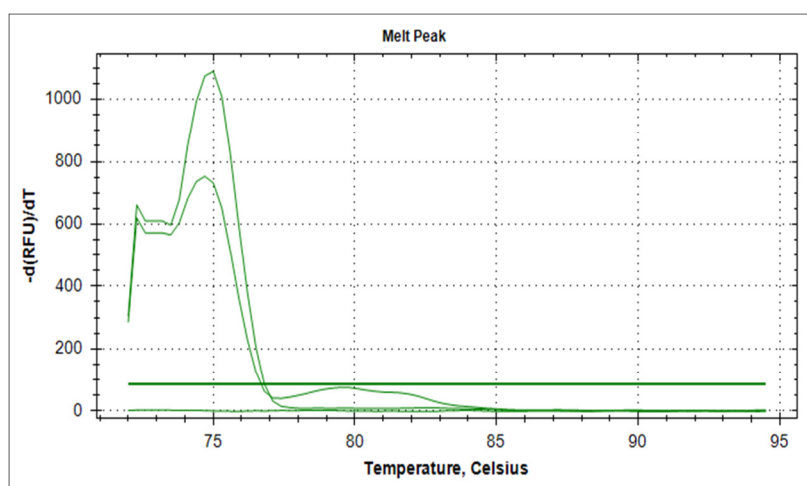
Τελικό αποτέλεσμα

- 1^η δοκιμή στους **52°C**

Φαίνεται να λειτουργεί αλλά με χαμηλό φθορισμό

- 2^η δοκιμή gradient **46°C-56°C**

Δεν έχει φθορισμό



4.8 Ccmp8

Για την δοκιμή του εκκινητή ccmp8 χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα δείγματα AS6 και AS14, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

95°C	5'	
95°C	30''	x39
52°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,3°C/2''	

Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά (καθόλου ικανοποιητικά), οπότε και έγινε δοκιμή του εκκινητή ccmr8 χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα AS22 και AS27, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο με μεταβλητές θερμοκρασίες annealing:

95°C	5'	
95°C	30''	x45
46-56°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,7°C/5''	

Μεταβάλλαμε το annealing temperature από 46°C με 56°C με σκοπό την βελτίωση της εικόνας των καμπυλών φθορισμού ή λόγω αυξημένου φθορισμού του αρνητικού κοντρόλ. Φάνηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 50-54°C. Οι παρακάτω εικόνες παρουσιάζουν τις λογαριθμικές καμπύλες φθορισμού με βάση το πρόγραμμα CFX manager όλων των ποικιλιών καθώς και τα αποτελέσματα ταξινόμησης με τη χρήση του προγράμματος Precision Melt Analysis

Επίσης, υπήρξε και μια δοκιμή του εκκινητή με όλα τα δείγματα σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

95°C	5'	
95°C	30''	x42
54,5°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,1°C/2''	

Μεταβάλλαμε το annealing temperature από 46°C με 56°C με σκοπό την βελτίωση της εικόνας των καμπυλών φθορισμού ή λόγω αυξημένου φθορισμού του αρνητικού κοντρόλ. Φάνηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 50-54°C. Οι παρακάτω εικόνες παρουσιάζουν τις λογαριθμικές καμπύλες φθορισμού με βάση το πρόγραμμα CFX manager όλων των ποικιλιών καθώς και τα αποτελέσματα ταξινόμησης με τη χρήση του προγράμματος Precision Melt Analysis

Τελικό αποτέλεσμα

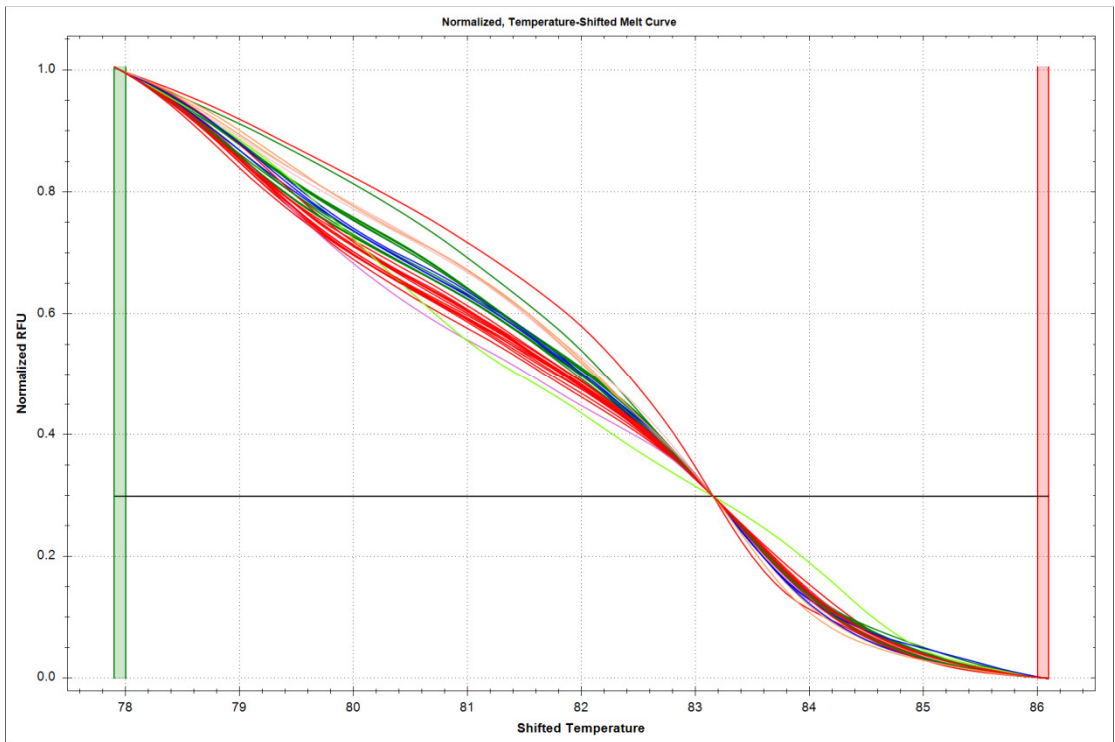
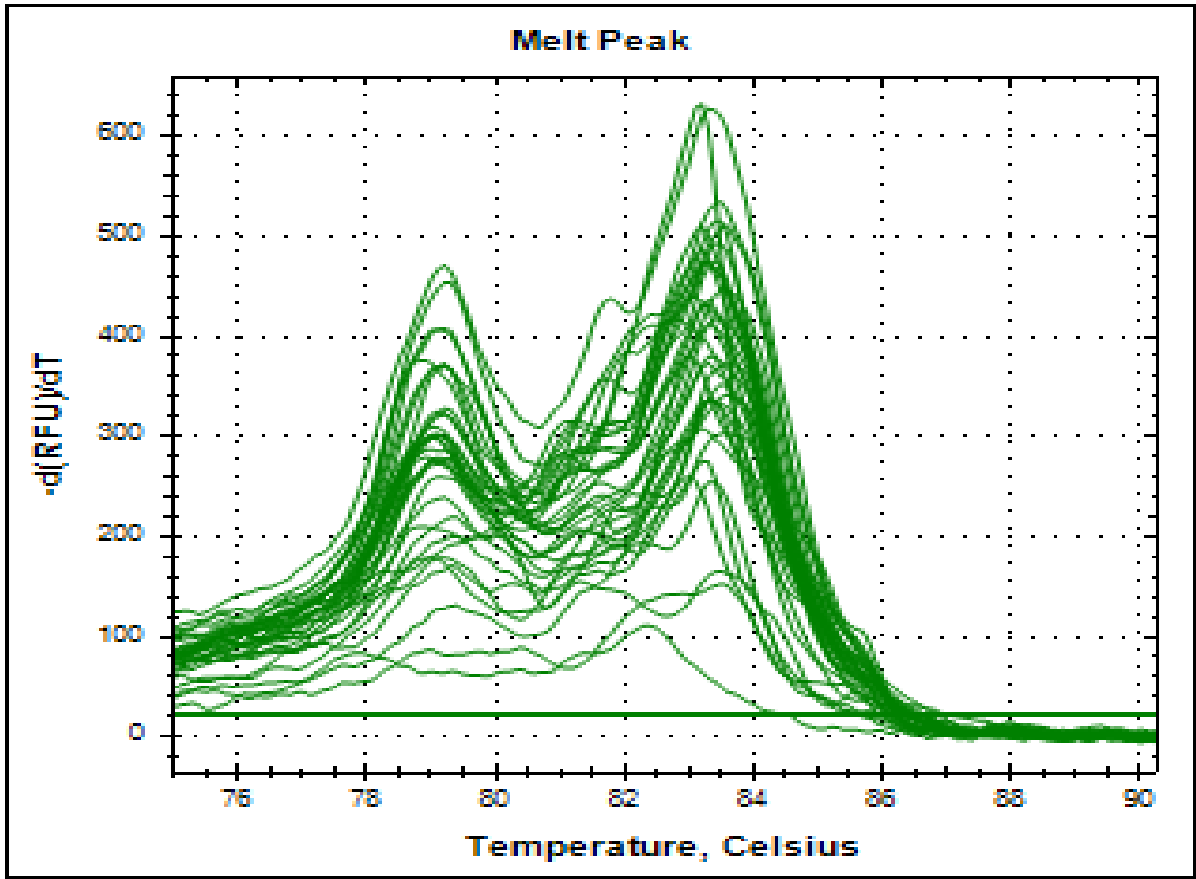
- 1η δοκιμή **52°C**

Λειτουργεί , φαίνεται να θέλει βελτίωση στην θερμοκρασία

- 2^η δοκιμή gradient **46°C-56°C**
- 3^η Στους **54,5°C**
Όχι τόσο καλά

Βέλτιστη θερμοκρασία 50-54 °C

- 4^η δοκιμή όλα τα δείγματα στους **52°C**



4.9 Ccmp10

Για την δοκιμή του εκκινητή ccmp10 χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα δείγματα AS6 και AS14, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

95°C	5'	
95°C	30''	x39
52°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,3°C/2''	

Επίσης, υπήρξε και μια δοκιμή του εκκινητή με όλα τα δείγματα σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

95°C	5'	
95°C	30''	x44
53°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 94,5°C	0,1°C/2''	

Υπήρξε και δεύτερη δοκιμή του εκκινητή σε όλα τα δείγματα σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

95°C	5'	
95°C	30''	x48
53°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 94,5°C	0,1°C/2''	

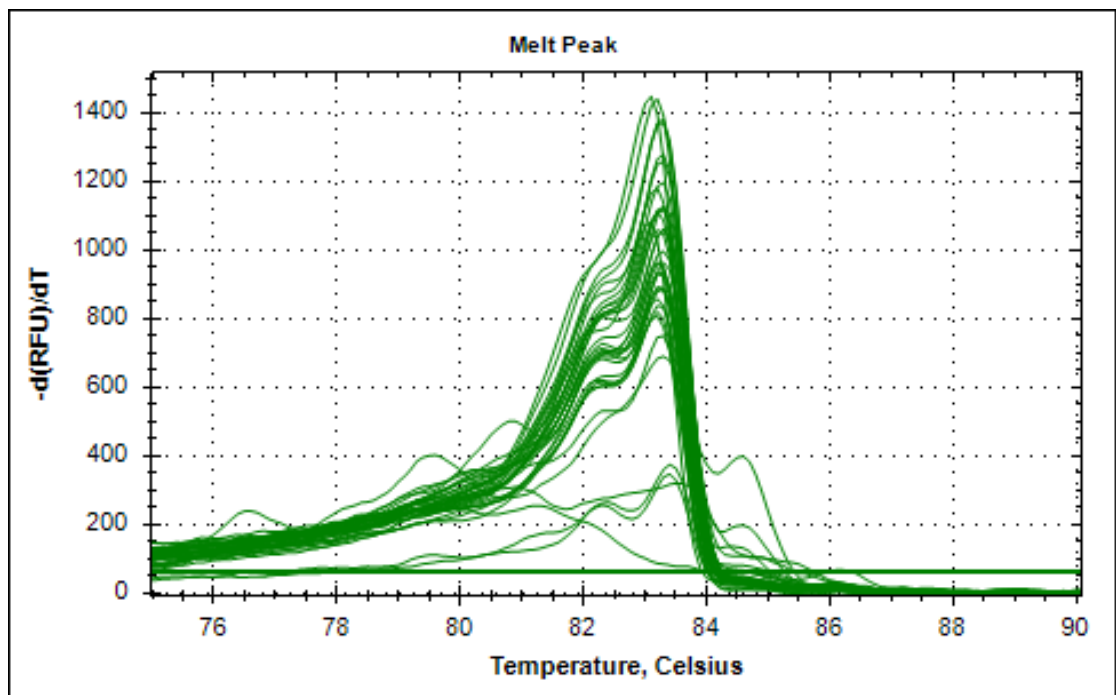
Φάνηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 53°C. Οι παρακάτω εικόνες παρουσιάζουν τις λογαριθμικές καμπύλες φθορισμού με βάση το πρόγραμμα CFX manager όλων των ποικιλιών καθώς και τα αποτελέσματα ταξινόμησης με τη χρήση του προγράμματος Precision Melt Analysis

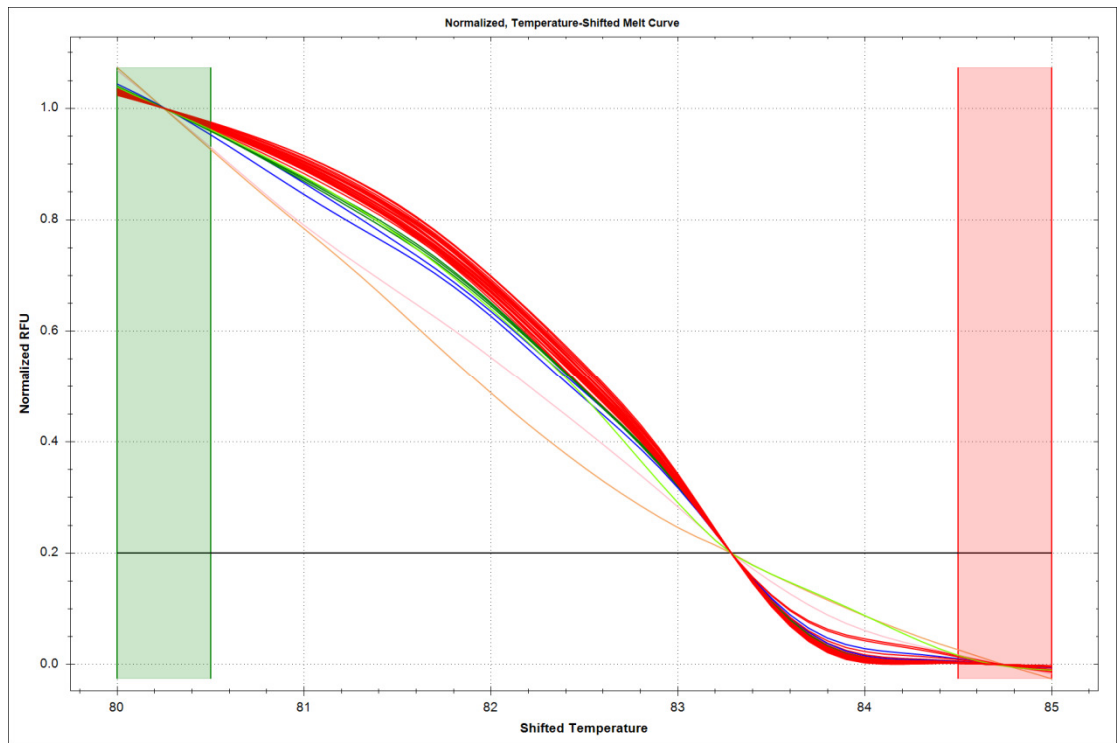
Τελικό αποτέλεσμα

- 1^η δοκιμή στους 52°C
Λειτουργεί, φαίνεται να θέλει βελτίωση στην θερμοκρασία
- 2^η δοκιμή gradient 46°C-56°C
- 3^η δοκιμή στους 54°C
- 4^η δοκιμή στους 55,5 °C

Βέλτιστη θερμοκρασία 53°C

- 5^η δοκιμή στους 53 °C , όλα τα δείγματα





4.10 NTCP

Για την δοκιμή του εκκινητή NTCP χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα δείγματα AS6 και AS14, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

95°C	5'	
95°C	30''	x39
52°C	45''	
72°C	30''	
95°C	1'	
40°C	1'	
72°C	1'	
Melt curve 72°C to 95°C	0,3°C/2''	

Φάνηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 52°C, αλλά υπήρξε χαμηλός φθορισμός. Οι παρακάτω εικόνες παρουσιάζουν τις λογαριθμικές καμπύλες φθορισμού με βάση το πρόγραμμα CFX manager όλων των ποικιλιών καθώς και τα αποτελέσματα ταξινόμησης με τη χρήση του προγράμματος Precision Melt Analysis

Τελικό αποτέλεσμα

- 1^η δοκιμή 52°C

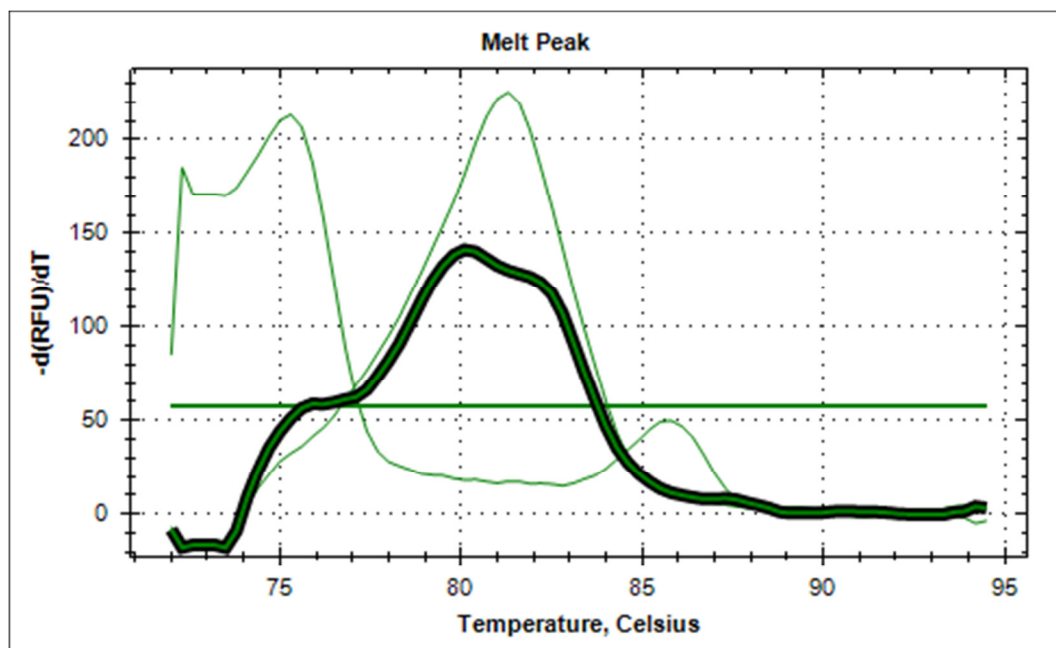
Φαίνεται να λειτουργεί, θέλει βελτίωση στην θερμοκρασία

- 2^η δοκιμή gradient 46°C-56°C

Βέλτιστη θερμοκρασία 52°C , αλλά με χαμηλό φθορισμό

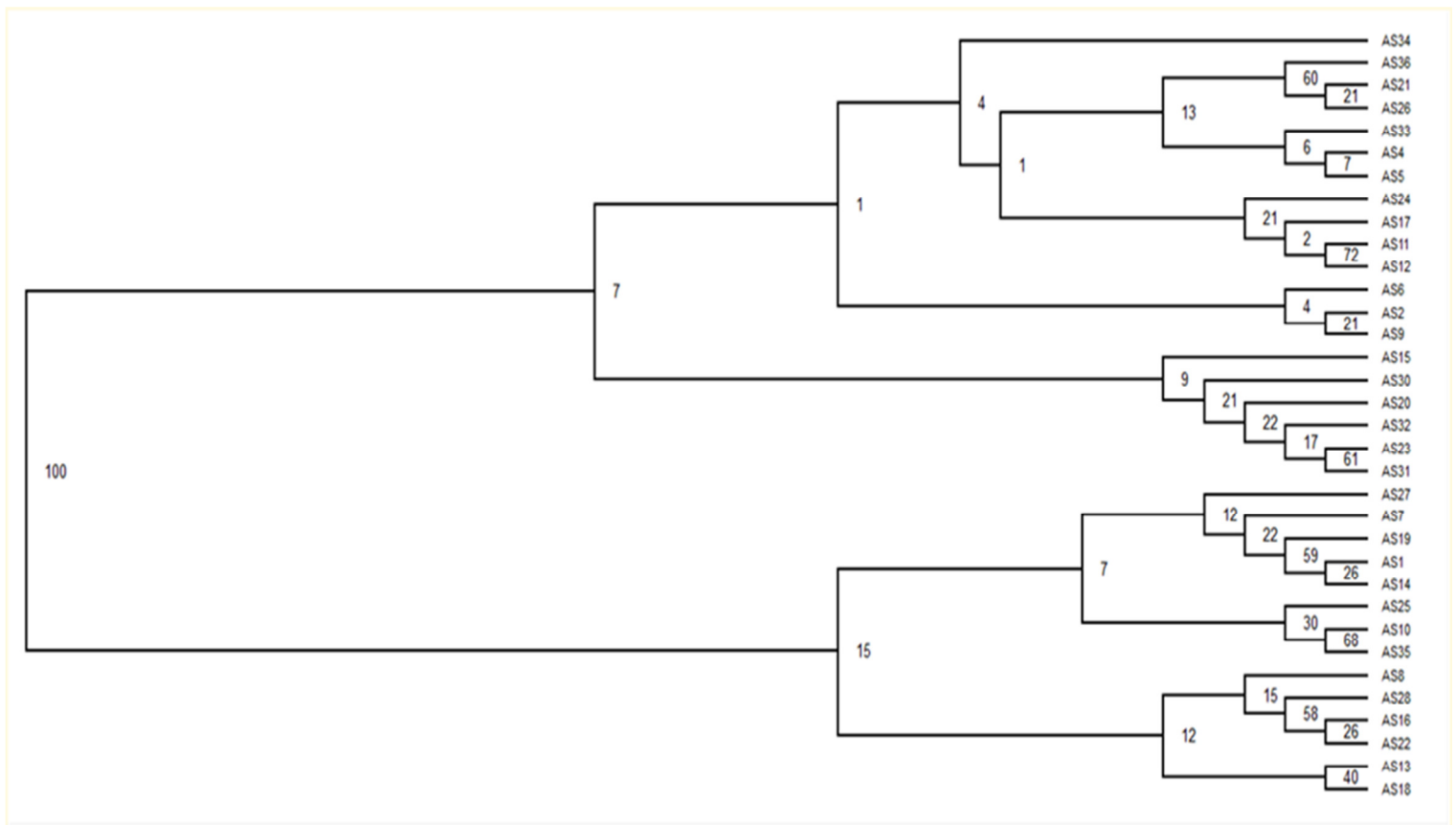
- 3^η δοκιμή στους 52°C

Όχι καλά αποτελέσματα



5. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Χρήση μεθόδου: Nei and Li/Dice UPGMA 1000 bootstrapping Free Tree



Στο παραπάνω δενδρόγραμμα παρουσιάζονται οι ομάδες που σχηματίζονται από τους πληθυσμούς σκόρδου. Οι ομάδες που προκύπτουν έχουν κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά και είναι οι εξής:

Ομάδα 1: AS2 AS4 AS5 AS6 AS9 AS11 AS12 AS17 AS21 AS24 AS26
AS33 AS34 AS36

Ομάδα 2: AS12 AS17

Ομάδα 4: AS2 AS4 AS5 AS6 AS9 AS11 AS12 AS17 AS21 AS24 AS26
AS33 AS34 AS36

Ομάδα 6: AS33 AS4 AS5

Ομάδα 7: AS1 AS2 AS4 AS5 AS6 AS7 AS9 AS11 AS12 AS14 AS15 AS17
AS19 AS20 AS21 AS23

AS24 AS25 AS26 AS27 AS30 AS31 AS32 AS33 AS34 AS35 AS36

Ομάδα 9: AS15 AS20 AS23 AS30 AS31 AS32

Ομάδα 12: AS1 AS7 AS8 AS13 AS14 AS16 AS18 AS19 AS22 AS27 AS28

Ομάδα 13: AS4 AS5 AS21 AS26 AS33 AS36

Ομάδα 15: AS1 AS7 AS8 AS10 AS13 AS14 AS16 AS18AS19 AS22 AS25
AS27 AS28 AS35

Ομάδα 17: AS23 AS31 AS32

Ομάδα 21: AS2 AS9 AS11 AS12 AS17 AS20 AS21 AS23 AS24 AS26
AS30 AS32 AS31

Ομάδα 22: AS1 AS7 AS14 AS19 AS23 AS30 AS31 AS32

Ομάδα 26: AS1 AS14

Ομάδα 30: AS10 AS18 AS22 AS25 AS35

Ομάδα 40: AS13 AS18

Ομάδα 58: AS16 AS22 AS28

Ομάδα 59: AS1 AS14 AS19

Ομάδα 60: AS21 AS26 AS36

Ομάδα 61: AS23 AS31

Ομάδα 68: AS10 AS35

Ομάδα 72: AS11 AS12

Ομάδα 100: Όλοι οι πληθυσμοί

6. Βιβλιογραφία

<http://www.science.gr/main/arthra/epistimes/40-epistimes-ygeias/104-real-time-pcr>

<https://www.google.gr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=9&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwios-eBvaLXAhUFmrQKHdK1BqoQFghSMAg&url=https%3A%2F%2Fclass.uoa.gr%2Fmodules%2Fdocument%2Ffile.php%2FMED735%2F%25CE%2591%25CE%25A3%25CE%259A%25CE%2597%25CE%25A3%25CE%2595%25CE%2599%25CE%25A3%2520%25CE%2595%25CE%25A1%25CE%2593%25CE%2591%25CE%25A3%25CE%25A4%25CE%2597%25CE%25A1%25CE%2599%25CE%25A9%25CE%259D%2F%25CE%259C%25CE%25A0%25CE%2591%25CE%259A%25CE%2591%2520%25CE%25A3.%2F%25CE%259C%25CE%259F%25CE%25A1%25CE%2599%25CE%2591%25CE%259A%25CE%2595%25CE%25A3%2520%25CE%25A4%25CE%2595%25CE%25A7%25CE%259D%25CE%2599%25CE%259A%25CE%2595%25CE%25A3%25202014.ppt&usg=AOvVaw3rN42HoAU5FxFE1yJev32U>

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Δ. Παλαιολόγου, Ε. Κατσαρέλη και Γ. Παπανικολάου
https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/647/1/02_chapter_07.pdf

<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A3%CE%BA%CF%8C%CF%81%CE%B4%CE%BF>

<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A3%CE%BA%CF%8C%CF%81%CE%B4%CE%BF>

http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/%CE%A3%CE%BA%CF%8C%CF%81%CE%B4%CE%BF_%CF%86%CF%85%CF%84%CF%8C

https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BB%CF%85%CF%83%CE%B9%CE%B4%CF%89%CF%84%CE%AE_%CE%B1%CE%BD%CF%84%CE%AF%CE%B4%CF%81%CE%B1%CF%83%CE%B7_%CF%80%CE

[%BF%CE%BB%CF%85%CE%BC%CE%B5%CF%81%CE%AC%CF%83%CE%B7%CF%82](#)

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ, Μπάκα Σταυρούλα, Αν. Καθηγήτρια

Applied biosystem, A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis

Γανόπουλος Ιωάννης, Μεταπτυχιακή διατριβή, Ταυτοποίηση επιλεγμένων Ελληνικών ποικιλιών κερασιάς (*Prunius avium* L.) με μοριακούς γενετικούς δείκτες μικροδορυφόρων, Θεσσαλονίκη 2007

ΝΙΚΟΣ ΠΟΛΥΖΟΣ, Γεωπόνος, ΑΘΗΝΑ, 2018. Μεταπτυχιακή μελέτη. Αξιολόγηση ποικιλότητας εγχώριων πληθυσμών σκόρδου. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα επιστήμης φυτικής παραγωγής, εργαστήριο βελτίωσης φυτών και γεωργικού πειραματισμού

Weising K. & Gardner R.C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in the chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms [Genome](#). 1999 Feb;42(1):9-19

SsoFast™EvaGreen®Supermix, Bio-Rad

Melt Calibration Kit, catalog #184-5020, Bio-Rad

