



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών
Επιστημών και
Διαχείρισης
Περιβάλλοντος

Πτυχιακή εργασία

**ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ MULTIPLEX ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ
ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ**

Πέτρος Φούκας

Λεμεσός, Μάιος 2021

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή εργασία

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ MULTIPLEX ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ
ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ

του

Πέτρου Φούκα

Επιβλέπων Καθηγητής
Δρ. Νικόλαος Νικολουδάκης

Λεμεσός, Μάιος 2021

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Πέτρου Φούκα, 2021

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέπων καθηγητή της πτυχιακής μου διατριβής Δρ. Νικόλαο Νικολουδάκη για την υπόδειξη του θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση, την υποστήριξη, την κατανόηση και εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τόσο το Ίδρυμα Γεωργικών Ερευνών όσο και τον Δρ. Δελή για την παροχή του φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε για πραγματοποίηση της πτυχιακής έρευνας. Ένα ευχαριστώ στους συμφοιτητές μου και τους φίλους μου σε Ελλάδα και Κύπρο για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και την ανταλλαγή απόψεων που βοήθησαν στην ολοκλήρωση της διπλωματικής. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της την οικογένειας μου για την αδιάκοπη στήριξη, ηθική συμπαράσταση, ανεκτικότητα και κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τομάτα αποτελεί ένα φυτό μοντέλο της οικογένειας Solanaceae το οποίο κατά καιρούς έχει χρησιμοποιηθεί για την πραγματοποίηση πειραμάτων και ερευνών, ενώ είναι από τα πρώτα φυτά που έχουν υποβληθεί σε μελέτες DNA markers. Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας και την ανακάλυψη μοριακών δεικτών, ο εντοπισμός μεταλλάξεων σε γενετικούς χάρτες έγινε ακριβής και η χαρτογράφηση γενετικών τόπων έγινε εφικτή. Στη συγκεκριμένη πτυχιακή αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο multiplex PCR-SSR έτσι ώστε να γίνει δυνατή η γονοτύπηση, ο χαρακτηρισμός και η ανίχνευση γενετικής ποικιλομορφίας σε ελληνικές και κυπριακές παραδοσιακές ποικιλίες (heirloom) τομάτας. Το πείραμα ξεκίνησε με την συλλογή του φυτικού υλικού, το οποίο αποτελούνταν από 70 δείγματα 10 διαφορετικών ποικιλιών τομάτας, περίπου 2 εβδομάδων. Κατόπιν ακολούθησε η απομόνωση του DNA με τη χρήση κατιονικού απορρυπαντικού CTAB και πολυβινυλοπυρρολιδόνης (PVP). Έπειτα έγινε η χρήση Nanodrop, με σκοπό να γίνει η ποσοτικοποίηση του DNA αλλά και ο έλεγχος καθαρότητας του δείγματος, τα αποτελέσματα του οποίου φάνηκαν ικανοποιητικά. Στην συνέχεια εφαρμόστηκε multiplex PCR, με τη μέθοδο M13-tails primer, με σκοπό να μειωθεί το κόστος των φθοριζόντων εκκινητών, όπου σε περίπτωση μη σημασμένου εκκινητή μπορεί να κοστίζει έως και 10 φορές πιο ακριβά. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να απαιτείται μια μόνο χρωστική ουσία M13 primer για κάθε SSR marker. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση και η επιλογή των panels, όπου αναπτυχθήκαν 4 multiplex PCR panels. Η ύπαρξη του σημασμένου με 4 χρωστικές φθορισμού M13 primer σε κάθε multiplex panel επέτρεπε την ταυτόχρονη ανάλυση δέκα γενετικών τόπων σε μια ηλεκτροφόρηση.

Λέξεις κλειδιά: Multiplex PCR - SSRs, M13 primer, Multiplex PCR panels

ABSTRACT

The tomato is a model plant of the Solanaceae family which has occasionally been used for experiments and research. It is also one of the first plants to undergo DNA marker studies. With the development of technology and the discovery of molecular markers, the detection of mutations in genetic maps became accurate and the mapping of genetic sites became possible. In this dissertation, a multiplex PCR-SSR protocol was developed in order to enable the genotyping, characterization and detection of genetic diversity in Greek and Cypriot traditional tomato varieties (heirloom). The experiment began with the collection of plant material, which consisted of 70 samples of 10 different tomato varieties, about 2 weeks old. DNA was then isolated using CTAB cationic detergent and polyvinylpyrrolidone (PVP). Afterwards, Nanodrop was used, in order to quantify the DNA and check the purity of the sample, the results of which seemed satisfactory. Multiplex PCR was then applied, using the M13-tails primer method, in order to reduce the cost of fluorescent primers, where in the case of an unmarked primer it can cost up to 10 times more expensive. As a result, only one M13 primer was required for each SSR marker. Finally, the electrophoresis and the selection of the panels took place, where 4 multiplex PCR panels were developed. The presence of the M13 primer labeled with 4 fluorescent dyes in each multiplex panel allowed the simultaneous analysis of ten genetic sites in one electrophoresis.

Keywords: Multiplex PCR - SSRs, M13 primer, Multiplex PCR panels