



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών
Επιστημών και Διαχείρισης
Περιβάλλοντος

Πτυχιακή εργασία

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΩΝ (C-VALUES)

ΣΕ ΚΥΠΡΙΑΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ *Allium* spp.

Γεώργιος Λαζάρου

Λεμεσός, Μάιος 2025

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

Πτυχιακή εργασία

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΩΝ (C-VALUES)

ΣΕ ΚΥΠΡΙΑΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ *Allium* spp.

ΤΟΥ

Γεώργιου Λαζάρου

Επιβλέπων Καθηγητής

Δρ. Νικόλαος Νικολουδάκης

Λεμεσός, Μάιος 2025

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Γεώργιος Λαζάρου, 2025

Με επιφύλαξη παντός δικαιωμάτων 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 θερμά το επιβλέποντά μου, Δρ. Νικόλαο Νικολουδάκη, για την καθοδήγηση και στήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ τη Δρ. Μαρία Τσολακίδου για τη πολύτιμη βοήθεια της και το Δρ. Άγγελο Κυρατζή για την παραχώρηση των δειγμάτων που ήταν απαραίτητα για την μελέτη.

Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αφορά τη σύγκριση του μεγέθους των γονιδιωμάτων (C-values) σε κυπριακούς πληθυσμούς ειδών του γένους *Allium*, τόσο καλλιεργούμενων όσο και άγριων. Μέσω κυτταρομετρίας ροής, μελετήθηκαν περίπου 80 γονότυποι με σκοπό την εκτίμηση της γενετικής και γινιδιωματικής ποικιλομορφίας. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν σημαντικές διαφορές στο πυρηνικό περιεχόμενο μεταξύ ειδών, γεγονός που σχετίζεται με εξελικτικές διαδικασίες, περιβαλλοντική προσαρμογή και παρουσία πολυπλοειδίας. Τα άγρια κυπριακά είδη του γένους *Allium* παρουσιάζουν υψηλή ποικιλομορφία στο μέγεθος του γονιδιώματος, υποδεικνύοντας την ύπαρξη σημαντικής γενετικής παραλλακτικότητας με δυνατότητα αξιοποίησης στη βελτίωση ήδη υπάρχοντων ποικιλιών και στη διατήρηση της άγριας βιοποικιλότητας της περιοχής.

Λέξεις-κλειδιά

1. *Allium spp.*
2. Κυτταρομετρία ροής
3. Γονιδιωματικό μέγεθος
4. Γενετική ποικιλομορφία
5. Πολυπλοειδία

ABSTRACT

This thesis focuses on the comparison of genome sizes (C-values) in Cypriot populations of species from the genus *Allium*, including both cultivated and wild types. Using flow cytometry, approximately 80 genotypes were analyzed in order to assess genetic and genomic diversity. The results revealed significant differences in nuclear DNA content among species, a finding that is associated with evolutionary processes, environmental adaptation, and the presence of polyploidy. According to the study's conclusions, the wild Cypriot species of the genus *Allium* exhibit high genome size diversity, indicating substantial genetic variability. This variability holds potential for use in the improvement of existing varieties and in the conservation of the region's wild biodiversity.

Keywords

1. *Allium* spp.
2. Flow cytometry
3. Genome size
4. Genetic diversity
5. Polyploidy

Πίνακας Περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων

Εισαγωγή	14
φυτικό υλικό.....	14
Το γένος <i>Allium</i>	14
Η εξέλιξη του γένους <i>Allium</i>	14
Το είδος <i>Allium cepa</i>	16
Βοτανική περιγραφή	16
Καλλιεργούμενες ομάδες <i>Allium cepa</i>	17
Αύξηση και ανάπτυξη	17
Οικολογικές απαιτήσεις	17
Το είδος <i>Allium sativa</i>	18
Βοτανική περιγραφή	18
Καλλιεργητικές ομάδες <i>Allium sativa</i>	19
Αύξηση και ανάπτυξη	19
Οικολογικές απαιτήσεις	19
Το <i>Allium ampeloprasum</i>	20
Βοτανική περιγραφή	20
Καλλιεργητικές ομάδες <i>Allium ampeloprasum</i>	20
Αύξηση και ανάπτυξη	21
Οικολογικές απαιτήσεις	21
Η χρήση άγριων ειδών.....	21
<i>Allium</i> sp. CWRs στην Κύπρο	22
Βιολογία κυττάρου/Κυτταρομετρία ροής.....	24
Κυτταρικός κύκλος.....	24
Αρχή λειτουργίας κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry).....	25
Χρήσεις της κυτταρομετρίας ροής.....	29
Σκοπός της εργασίας	30
Υλικά και μέθοδοι	31
Φυτικό υλικό	31
Συλλογή Δειγμάτων	31

Συνθήκες Ανάπτυξης.....	36
Διαλύματα	36
Πειραματική Διαδικασία.....	37
Ρυθμίσεις Flow Cytometer	37
Ανάλυση με τη χρήση του λογισμικού Modfit LT.....	38
Αποτελέσματα	39
Προσδιορισμός πειραματικών συνθηκών	39
Σύγκριση C values	39
Συζήτηση.....	44
Ποσοτικές διαφορές στο DNA μεταξύ των φυτών Allium spp.	44
Διάσπαρτες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA	44
Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες σε σειρά.....	45
Αβιοτική καταπόνηση	45
Ενδοπολυπλοειδία	46
Συμπέρασμα.....	47
Βιβλιογραφία	48

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Ο Κατάλογος Πινάκων έχει αντίστοιχη μορφή με τον πίνακα περιεχομένων. Σε περίπτωση που υπάρχουν πολλοί πίνακες εντός του κειμένου, συνίσταται η αυτόματη δημιουργία λίστας πινάκων μέσω της Word όπως φαίνεται στο παράδειγμα που ακολουθεί. Βρείτε τις οδηγίες στον Οδηγό Συγγραφής Πτυχιακών εργασιών και Διατριβών.

Πίνακας 1: Συλλογή πληθυσμού <i>Allium</i> spp.....	31
Πίνακας 2: Μάρτυρες πυρηνικού περιεχομένου.....	36
Πίνακας 3: Σύσταση διαλύματος SBB	36
Πίνακας 4: Τιμές συνδιακύμανσης με βάση τον χρόνο επώασης.....	Error! Bookmark not defined.
Πίνακας 5: Τιμές πυρηνικού περιεχομένου σε Κυπριακά είδη <i>Allium</i>	39
Πίνακας 6: Αντιπαραβολή των C-Values σε είδη <i>Allium</i> που μελετήθηκαν σε αυτή και σε παλαιότερες μελέτες	Error! Bookmark not defined.

Εισαγωγή

Φυτικό υλικό

Το γένος *Allium*

Τα *Allium* ανήκουν στην οικογένεια των Λειριοειδών (Liliaceae) και περιέχει ένα από τα πιο μεγάλα γονιδιώματα από την κλάση των μονοκοτυλήδων φυτών. Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 1000 είδη και 50 υποείδη φυτών, τα οποία περιλαμβάνουν τόσο καλλιεργούμενα όσο και άγρια είδη. Η έμφαση που δόθηκε στο είδος δεν σχετίζεται μόνο με το μέγεθος του γονιδιώματός του, αλλά και για τη σημαντική οικονομική του αξία, καθώς περιλαμβάνει καλλιέργειες που αξιοποιούνται για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες και τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους.(Shigyo *et al.*, no date). Οι κύριες καλλιέργειες φυτών του γένους *Allium* είναι το κρεμμύδι (*Allium cepa* L.) και το σκόρδο (*Allium sativum* L.)(Xie *et al.*, 2020)

Τα φυτά του γένους *Allium* έχουν την ικανότητα να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχουν θείο όπως αλλισίνη και ισοαλλισίνη που είναι στενά συνδεδεμένες με το άρωμα και τη γεύση. Επιπλέον, οι ουσίες αυτές ευθύνονται για τη σύνθεση του δακρυγόνου παράγοντα, ο οποίος διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο απέναντι σε επιθέσεις φυτοφάγων οργανισμών και σε μηχανικούς τραυματισμούς.Μέχρι τώρα δεν έγιναν πολλές έρευνες σχετικά με το γονιδίωμα του γένους λόγω του πάρα πολύ μεγάλου γονιδιώματος τους το οποίο περιορίζει πολύ την αποκωδικοποίηση και την έρευνα του. Επίσης, ένα άλλο χαρακτηριστικό που δυσκολεύει τη μελέτη του γένους είναι ο αγενής και εγγενής ο τρόπος αναπαραγωγής. Εν τούτοις υπάρχουν αρκετές αναφορές για καλλιεργούμενα είδη όπως το σκόρδο και το σουαλικό κρεμμύδι. (Hao *et al.*, 2023)

Η εξέλιξη του γένους *Allium*

Τα φυτά του γένους *Allium* παρουσιάζουν υψηλή προσαρμοστικότητα σε ποικίλα οικοσυστήματα, από τις υποαρκτικές ζώνες έως τις ερήμους και τα ορεινά τροπικά περιβάλλοντα.Το γονιδίωμα του είδους εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία, που μας δίνει την πληροφορία ότι έγιναν σημαντικές εξελικτικές διαδικασίες. Συγκεκριμένα οι τιμές του 4C

DNA κυμαίνεται από 34.60 pg (*Allium ledeboyrianum*) έως 297.13 pg (*Allium Valium*) άρα οι τιμές που παρουσιάζει είναι ενός εύρους σχεδόν 10X. Επιπρόσθετα, σε διπλοειδες επίπεδο το εύρος των διαφοροποιήσεων κυμαίνεται στις 4X φορές που δείχνουν ότι οι αυξομειώσεις του DNA δεν σχετίζονται με την πολυπλοειδία αποκλειστικά αλλά και από άλλους εξελικτικούς παράγοντες όπως οι μεταλλάξεις και η αναδιάταξη της ετεροχρωματινης. Το μέγεθος του γονιδιώματος συνδέεται επίσης με διάφορα οικολογικά χαρακτηριστικά, καθώς είδη με μεγάλο γονιδίωμα εμφανίζουν παρατεταμένο λήθαργο, αλλά παρουσιάζουν ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές. Αντίθετα, είδη με μικρότερο γονιδίωμα αναπτύσσονται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, προσαρμοζόμενα καλύτερα σε σταθερά περιβάλλοντα. (Ohri, Fritsch and Hanelt, 1998a)

Κατά την εξελικτική πορεία του γένους, η πολυπλοειδία, αν και παρατηρείται σε σχετικά χαμηλό ποσοστό (24%), έχει συμβάλει σημαντικά στη γενετική διαφοροποίησή του. Η παρουσία πολυπλοειδίας συνδέεται με αυξημένη προσαρμοστικότητα σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Φαινόμενα πολυπλοειδίας εντοπίζονται κυρίως σε υπογένη όπως τα *Butomissa*, *Microscordum* και *Reticulatobulbosa*. (Peruzzi, Carta and Altinordu, 2017)

Το γένος παρουσιάζει σημαντική ποικιλομορφία ως προς τον βασικό αριθμό χρωμοσωμάτων. Αν και συχνότερα εμφανίζεται αριθμός χρωμοσωμάτων $X = 8$, σε ορισμένες ομάδες απαντώνται επίσης αριθμοί $X = 7, 9, 10$ ή 11 . Οι διαφοροποιήσεις αυτές στους καρυότυπους των ειδών φαίνεται να έχουν επηρεαστεί από την παρουσία δορυφορικών χρωμοσωμάτων, μεταβολές στο μέγεθος των χρωμοσωμάτων, μετατοπίσεις των κεντρομερών, καθώς και από ανακατανομές της νουκλεοτιδικής αλυσίδας. Οι αλλαγές αυτές τροποποιούν τη δομή του γονιδιώματος και ενδέχεται να σχετίζονται με την προσαρμογή των ειδών σε νέα οικοσυστήματα. Ένας επιπλέον εξελικτικός μηχανισμός που έχει προταθεί είναι η εισαγωγή κινητών γενετικών στοιχείων (transposable elements) στο γονιδίωμα του γένους. Μελέτες έχουν δείξει ότι τέτοια στοιχεία ενσωματώθηκαν σε συγκεκριμένα γονίδια, όπως το *DFR-A* (Dihydroflavonol-4-reductase) και το *ANS* (Anthocyanidin synthase), τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ανθοκυανινών. Τα κινητά αυτά στοιχεία είναι τμήματα του DNA που έχουν τη δυνατότητα να μετακινούνται εντός του γονιδιώματος, επηρεάζοντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση και τη γενετική ποικιλότητα.

Επιπρόσθετα, η εισαγωγή αυτών των στοιχείων συνεισφέρουν στην διαφοροποίηση του χρώματος των ανθών και στην προσαρμογή τους σε διαφορετικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. (Peruzzi, Carta and Altinordu, 2017)

Εν κατακλείδι, τα φυτά του γένους *Allium* αποτελούν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ γενετικών, χρωμοσωμικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Το γένος αυτό παρουσιάζει αξιοσημείωτη ποικιλομορφία ως προς το μέγεθος του γονιδιώματος, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, φαινόμενα πολυπλοειδίας, καθώς και την παρουσία κινητών γενετικών στοιχείων, όλα εκ των οποίων έχουν διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στην εξελικτική του πορεία (Peruzzi, Carta and Altinordu, 2017)

Το είδος *Allium cepa*

Το *Allium cepa*, κοινώς το κρεμμύδι είναι ένα μονοκότυλο ποώδες φυτό αναπτύσσεται ως διετές ή πολυετές φυτό (Rabinowitch and Brewster, 1990). Κατά το πρώτο έτος όπως σχεδόν όλα τα βολβοειδή σχηματίζει το υπόγειο βολβό, που αποτελείται από σαρκώδες φύλλα και το δεύτερο χρόνο αρχίζει και αναπτύσσει το ανθοφόρο βλαστό, ώστε να ολοκληρωθεί ο αναπαραγωγικός κύκλος του (Pareek et al., 2017).

Βοτανική περιγραφή

Το ριζικό σύστημα είναι ινώδες και επιφανειακό, γεγονός που το καθιστά ευαίσθητο στην ξηρασία και, κατά συνέπεια, εξαρτώμενο από την υγρασία του εδάφους (Rabinowitch and Brewster, 1990). Τα φύλλα είναι σωληνοειδή, παχιά με παράλληλες νευρώσεις (Pareek et al., 2017). Ο βλαστός σχηματίζεται στο δεύτερο έτος ζωής του φυτού και είναι ένας κυλινδρικός, ογκώδης ανθοφόρος βλαστός ο οποίος ψυλώνει 1 - 2 μέτρα (Rabinowitch and Brewster, 1990). Τα άνθη είναι μικρά, λευκά ή πράσινα, ερμαφρόδιτα και βρίσκονται σε ταξιανθίες τύπου σκιαδίου (Pareek et al., 2017). Ο βολβός λαμβάνει διάφορα χρώματα όπως κίτρινο, λευκό και κόκκινο, και καλύπτεται από λεπτές ξηρές επιδερμίδες, οι οποίες περιορίζουν την απώλεια της υγρασίας (Rabinowitch and Brewster, 1990). Η ιδανικότερη εδαφική υγρασία της καλλιέργειας στο κρεμμύδι είναι μεταξύ 60-80%. Τις υψηλότερες ανάγκες σε νερό το φυτό τις παρουσιάζει κατά το στάδιο της δημιουργίας του βολβού, ενώ σε περιόδους έντονης ξηρασίας ο βολβός εμφανίζει ασύμμετρη ανάπτυξη (Pareek et al., 2017).

Καλλιεργούμενες ομάδες *Allium cepa*

- Κοινό κρεμμύδι (*A. cepa* var. *cepa*) που χωρίζεται σε ποικιλίες που περιλαμβάνουν τις κόκκινες (Spanish onion), τις κίτρινες (brown onion) και τις λευκές (white onion).
- Πολυβολβώδεις ποικιλίες που χρησιμοποιούνται για πολλαπλασιασμό (*Allium cepa* var. *aggregatum*) και παρουσιάζουν μικρούς βολβούς.
- Επιμηκυμένο κρεμμύδι (ομάδα banana shallot), το οποίο χαρακτηρίζεται από μακρόστενο σχήμα και πιο ήπια γεύση σε σύγκριση με άλλες ποικιλίες.
- Τα κρεμμύδια μικρής και μεγάλης ημέρας που χαρακτηρίζονται από την φωτοπερίοδο που χρειάζονται για να αναπτυχθούν. Για παράδειγμα σε χώρες της Βόρειας Ευρώπης χρησιμοποιούνται οι ποικιλίες μεγαλύτερης ημέρας ενώ στις χώρες της Νότιας Ευρώπης χρησιμοποιούνται της μικρής ημέρας.

Αύξηση και ανάπτυξη

Το *Allium cepa* ξεκινάει με τη βλάστηση των σπόρων, όπου εμφανίζονται τα πρώτα ριζίδια και μετέπειτα τα πρώτα φύλλα. Κατά το στάδιο της βλαστικής ανάπτυξης, το φυτό αυξάνει το ύψος του, ενώ ταυτόχρονα εκπτύσσονται τα φύλλα. Παράλληλα, αναπτύσσεται και το ριζικό σύστημα. Ακολούθως αρχίζει η βολβοποίηση όπου το φυτό αρχίζει να αποθηκεύει θρεπτικά συστατικά στη βάση της ρίζας με αποτέλεσμα να αρχίζει η διόγκωση του βολβού. Μετά τον σχηματισμό του βολβού, κατά το δεύτερο έτος ζωής του φυτού, αυτό εισέρχεται στο στάδιο της άνθησης. Τότε εμφανίζονται ταξιανθίες τύπου σκιαδίου. Το επόμενο στάδιο είναι η παραγωγή και η ωρίμανση των σπόρων (Mushtaq et al., 2018).

Οικολογικές απαιτήσεις

Τα *Allium* αναπτύσσονται σε διάφορες κλιματικές ζώνες από εύκρατες μέχρι και τροπικές περιοχές. Οι διάφορες καλλιεργητικές ποικιλίες χωρίζονται σε μακράς ημέρας που χρειάζονται πάνω από 14 ώρες φωτός και αυτές βραχείας ημέρας που χρειάζονται 10-12 ώρες φως. Όσο αφορά τη θερμοκρασία, στους 15-25 βαθμούς Κελσίου ενισχύεται η διαδικασία βολβοποίησης ενώ σε χαμηλότερες ενισχύεται η διαδικασία της ανθοφορίας (Rabinowitch and Brewster, 1990; Pareek et al., 2017)

Το είδος *Allium sativa*

Το σκόρδο είναι ένα πολυετές ποώδες φυτό της οικογένειας *Alliaceae*, με σημαντική διατροφική και οικονομική σημασία. Το σκόρδο είναι γνωστό παγκόσμιως για τη χρήση του στη μαγειρική, όσο και για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες που οφείλονται κυρίως στις βιοδραστικές του ουσίες, που κυρίως αποτελούνται από θειούχες ενώσεις που όπως και το κρεμμύδι και είναι υπεύθυνες για το άρωμα και τη γεύση του, καθώς και για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. Παραδείγματα αυτών των ουσιών είναι η Αλλιίνη, η αλλισίνη που υπάρχει και στο κρεμμύδι που είναι υπεύθυνη για τις κυριότερες ευεργετικές ιδιότητες του σκόρδου, δισουλφίδια του διαλλυλιου και άλλες σημαντικές ενώσεις όπως θειοθειικά άλατα, φλαβονοειδή και πολυφαινόλες. Η προέλευση του σκόρδου τοποθετείται στην κεντρική Ασία. Η εξάπλωση του έγινε σταδιακά στην Μεσόγειο την Ευρώπη και την Ασία και θεωρείται μια αρχαία καλλιέργεια αφού καλλιεργείται πάνω από 1000 χρόνια. Ακόμη ένα χαρακτηριστικό του σκόρδου είναι ότι αναπαράγεται αγενώς μέσω των σκελίδων του, έτσι κατάφερε να διατηρήσει τα γενετικά του χαρακτηριστικά αλλά αυτό περιορίζει την ύπαρξη σημαντικής ποικιλομορφίας. (Lopez-Bellido *et al.*, 2016)

Βοτανική περιγραφή

Ο σκόρδος σχηματίζει ένα υπόγειο βολβό, ο οποίος αποτελείται από πολλές σκελίδες. Οι σκελίδες περιβάλλονται από λεπτούς, λευκούς ή μωβ χιτώνες. Η κάθε σκελίδα έχει τη δυνατότητα να αναπτύξει νέο φυτό, γεγονός που συνιστά τον βασικό μηχανισμό αναπαραγωγής του είδους. Επίσης, οι σκελίδες χρησιμοποιούνται ως όργανα αποθήκευσης ενέργειας. Τα φύλλα του είναι στενά, γραμμοειδή, επιμήκη με παράλληλη νεύρωση. Παρουσιάζουν εναλλάξ ανάπτυξη στο ψευδοστέλεχος, που σχηματίζεται από τις βάσεις των φύλλων.

Το ριζικό σύστημα του είναι ινώδες και επιφανειακό, με μικρές διακλαδώσεις, που του δίνει τη δυνατότητα να απορροφά θρεπτικά συστατικά από τα ανώτερα στρώματα του εδάφους. Σε ορισμένες ποικιλίες παρατηρείται η ανάπτυξη ανθοφόρου στελέχους, το οποίο μπορεί να φτάσει σε ύψος 30–40 cm και φέρει στο άκρο του σφαιρική ταξιανθία. Η ταξιανθία αποτελείται από μικρά άνθη που έχουν λευκό ή μωβ χρώμα, και συχνά είναι στείρα ενώ στην θέση τους αναπτύσσονται βολβίδια τα οποία έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν για αναπαραγωγή. (Dhall *et al.*, 2023)

Καλλιεργητικές ομάδες *Allium sativa*

Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες του σκόρδου χωρίζονται σε δύο κατηγορίες.

Οι ποικιλίες οι οποίες παρουσιάζουν σκληρό λαιμό και παράγουν ανθοφόρο στέλεχος, παρουσιάζουν λίγες αλλά μεγάλες σκελίδες, είναι πιο ανθεκτικές στο ψύχος, παρόλα αυτά έχουν μικρότερη διατηρησιμότητα. Υπάρχουν και αυτές οι οποίες έχουν μαλακό λαιμό, που δεν παράγουν ανθοφόρο στέλεχος, έχουν περισσότερες αλλά μικρότερες σκελίδες, είναι πιο ευαίσθητες στο ψύχος και παρουσιάζουν μεγαλύτερη διατηρησιμότητα, οι οποίες είναι καταλληλότερες για εμπορικές καλλιέργειες. (Dhall *et al.*, 2023)

Αύξηση και ανάπτυξη

Όπως και το κρεμμύδι έτσι και ο σκόρδος παρουσιάζει παρόμοια στάδια ανάπτυξης. Κατά το στάδιο της βλάστησης, η σκελίδα απορροφά υγρασία και θρεπτικά συστατικά από το έδαφος, γεγονός που ενεργοποιεί την ανάπτυξη της ρίζας και των πρώτων φύλλων. Στη συνέχεια το φυτό ενισχύει τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Μετέπειτα, σχηματίζονται οι σκελίδες που διαφοροποιούνται και έχουν την ιδιότητα να αποθηκεύουν θρεπτικά στοιχεία. Ακολουθεί το στάδιο της ωρίμανσης που τα εξωτερικά φύλλα αρχίζουν να ξηραίνονται, ενώ ο βολβός - σκελίδες αρχίζουν να σκληραίνουν. Τέλος, στις ποικιλίες με σκληρό λαιμό αναπτύσσεται το ανθοφόρο στέλεχος που είτε θα αφαιρεθεί για την ενίσχυση της ανάπτυξης του βολβού ή θα παραμείνει για να γίνει η δημιουργία των βολβιδίων. (Lopez-Bellido *et al.*, 2016)

Οικολογικές απαιτήσεις

Ο σκόρδος όπως και το κρεμμύδι προσαρμόζονται σε διάφορα περιβάλλοντα. Αλλά πιο συγκεκριμένα το σκόρδο παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη σε δροσερά εύκρατα κλίματα. Οι καταλληλότερες θερμοκρασίες ανάπτυξης είναι από 10-15°C ενώ για το στάδιο της βολβοποίησης είναι μεταξύ 18-25°C. Είναι ένα φυτό μεγάλης διάρκειας φωτός και χρειάζεται αρκετό ηλιακό φως αλλά αυτό εξαρτάται και από την ποικιλία. Όσο αφορά το έδαφος το σκόρδο αναπτύσσεται σε καλά στραγγισμένα γόνιμα εδάφη, με ουδέτερο ελαφρώς όξινο pH (6.0-7.5). Κατά το βλαστικό στάδιο και το στάδιο ανάπτυξης του βολβού απαιτείται σταθερή υγρασία, αλλά κατά το στάδιο της συγκομιδής η άρδευση πρέπει να διακόπτεται για την προστασία των βολβών από σήψεις. (Lopez-Bellido *et al.*, 2016)

Το *Allium ampeloprasum*

Το *Allium ampeloprasum* κοινώς πράσο είναι ένα πολυετές, βολβώδες φυτό της οικογένειας *Allium*. Είναι ένα από τα πιο ποικιλόμορφα φυτά του γένους. Στο γένος του περιλαμβάνει αρκετές καλλιεργούμενες ομάδες αλλά και αυτοφυείς μορφές. Το πράσο σε σχέση με τα άλλα σημαντικά γένη του είδους το σκόρδο και το κρεμμύδι περιέχει λιγότερες θειούχες ουσίες για αυτό η γεύση του είναι πιο ήπια από τα άλλα είδη. Εντούτοις, περιέχει S-οξειδία της κυστεΐνης, μεθειονίνη και ισοαλλίνη, ενώσεις που του προσδίδουν πιο ήπια γεύση σε σύγκριση με το σκόρδο, το οποίο περιέχει αλλισίνη και προπανοθειόλη-S-οξείδιο — ουσίες που ευθύνονται για τη χαρακτηριστικά έντονη και πικάντικη γεύση του. Επιπλέον, περιέχει φλαβονοειδή, όπως η καμφερόλη, πολυσακχαρίτες, καθώς και σημαντικές ποσότητες μετάλλων και βιταμινών. (Stavělíková, 2008)

Βοτανική περιγραφή

Το *Allium ampeloprasum* παρουσιάζει βολβώδεις ρίζες και όρθια, κυλινδρικά ψευδοστελέχης που σχηματίζονται από τα φύλλα. Τα φύλλα είναι μακριά, επίπεδα ή παρουσιάζουν ελαφρώς ημικυκλική μορφή και έχουν λευκοπράσινη απόχρωση. Αναπτύσσονται το ένα γύρω από το άλλο διαδοχικά δημιουργώντας συμπαγή μορφή. Παράλληλά, παρουσιάζει διαφορά στην τρυφερότητα των φύλλων. Συγκεκριμένα τα εξωτερικά είναι πιο σκληρά με σκοπό την προστασία του φυτού από το περιβάλλον και τα εσωτερικά παρουσιάζουν πιο τρυφερή υφή. Η ταξιανθία είναι σφαιρική, μοιάζει με ομπρέλα και φέρει λουλούδια που έχουν λευκά και ροζ-μωβ χρώμα. Ανάλογα την ποικιλία το φυτό σχηματίζει πολλούς μικρούς βολβούς ή ένα μεγαλύτερο κεντρικό βολβό. (Lim, 2015)

Καλλιεργητικές ομάδες *Allium ampeloprasum*

Το πράσο περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές καλλιεργούμενες ποικιλίες που κάθε μια χρησιμοποιείται για διαφορετικό σκοπό. Πρωταρχικής σημασίας είναι η ομάδα *Allium ampeloprasum* var. *Porrum*, η οποία είναι η πιο γνωστή και καλλιεργείται για το ψηλό, τρυφερό ψευδοστέλεχος, που αποτελεί τον τύπο φυτού που ονομάζουμε πράσο. Ακόμη μια καλλιεργητική ομάδα είναι το λεγόμενο μεγαλοσκόρδο ή ελαφαντοσκόρδο (*A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum*) που εμφανίζει μεγάλους βολβούς παρόμοιους με του σκόρδου αλλά με ηπιότερη γεύση. Μια ομάδα επίσης γνωστή που καλλιεργείται κυρίως στην Μέση Ανατολή

είναι η ποικιλία Kurrat (*A. ampeloprasuum* var. *kurrat*) και καλλιεργείται για το φύλλωμα της.(Lim, 2015)

Αύξηση και ανάπτυξη

Η ανάπτυξη του φυτού εξαρτάται από τον τύπο της καλλιέργειας. Η καλλιέργεια του μπορεί να είναι διετής και επικεντρώνεται στην παραγωγή βολβών ή ετήσια που πραγματοποιείται όταν η καλλιέργεια προορίζεται για τη συγκομιδή των φύλλων/βλαστού. Σε χαμηλές θερμοκρασίες προάγεται η ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και των φύλλων, ενώ η περεταίρω έκθεση σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες προκαλεί την ανθοφορία του φυτού που δεν είναι επιθυμητή για την καλλιέργεια.(Lim, 2015)

Οικολογικές απαιτήσεις

Το πράσο παρουσιάζει αντοχή στο κρύο και μπορεί να αντέξει σε χαμηλές θερμοκρασίες (5°C) και στους ήπιους παγετώνες και αυτό το κάνει κατάλληλο για εύκρατες περιοχές και υποτροπικά κλίματα. Χρειάζεται πλήρη ηλιοφάνεια για να αναπτυχθεί βέλτιστα, αλλά μπορεί να ανταπεξέλθει και σε συνθήκες μικρής σκίασης. Απαιτεί συχνή υγρασία στο έδαφος αλλά όχι υπερβολική γιατί υπάρχει περίπτωση να σαπίσει για αυτό εμφανίζει καλύτερη ανάπτυξη σε αμμοπηλώδη η πηλοαμμώδη εδάφη. Ο ιδανικός τύπος εδάφους για την καλλιέργεια του είναι βαθιά καλά στραγγιζόμενα, γόνιμα εδάφη όπως και τα άλλα γένη του είδους *Allium*. Το *A. ampeloprasum* προτιμά εδάφη με pH 5.0 έως 7.5 με βέλτιστο 6.8.(Lim, 2015)

Η χρήση άγριων ειδών

Κατά τους αιώνες, η γεωργία έχει εξελιχθεί μέσα από σημαντικούς σταθμούς, ξεκινώντας από τη νεολιθική εποχή, όταν ο άνθρωπος άρχισε να εγκαθίσταται σε κοινότητες και να παράγει μόνος του την τροφή του, καθώς και μέσω της επέκτασης της γεωργίας σε νέες περιοχές. Με τις επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες άρχισε να πραγματοποιείται και η δευτερογενής εξημέρωση των φυτών. Άλλα γεγονότα που ήταν σημαντικά για την εξέλιξη της γεωργίας είναι η περίοδος της πράσινης επανάστασης κατά την οποία δημιουργήθηκαν νέες ποικιλίες που παρουσίαζαν υψηλές αποδόσεις, αυξημένη αντοχή σε ασθένειες και καλύτερη απορρόφηση θρεπτικών συστατικών των λιπασμάτων μέσω της μεθόδου της κλασικής γενετικής βελτίωσης.

Όμως αυτές οι αλλαγές οδήγησαν σε αυξημένη παραγωγικότητα και διαθεσιμότητα τροφής, εις βάρος της βιοποικιλότητας. Καταρχάς έγινε απώλεια της γενετική ποικιλομορφίας αφού παραδοσιακές ποικιλίες αντικαθίστανται από σύγχρονες ομοιογενείς ποικιλίες. Αυτό δημιούργησε φυτά ευαίσθητα σε ασθένειες αλλά και σε περιβαλλοντικές συνθήκες. Η εμφάνιση μιας νέα ασθένειας μπορεί να προκαλέσει καταστροφή ολόκληρων καλλιεργειών. Ένα κλασικό παράδειγμα είναι ο λιμός της Ιρλανδίας όπου η μονοκαλλιέργειας ομοιογενούς πατάτας οδήγησε σε μαζική καταστροφή των καλλιεργειών. Ακόμη ένα πρόβλημα είναι πως αυτές οι ποικιλίες είναι αυστηρά εξαρτημένες από συστήματα εντατικής γεωργίας απαιτώντας λιπάσματα και φυτοφάρμακα.(von Wettberg, Davis and Smýkal, 2020)

Τα άγρια συγγενικά είδη των καλλιεργειών αποτελούν την μεγαλύτερη πηγή γενετικής ποικιλότητας για τη βελτίωση της γεωργίας. Τα γονίδια τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία νέων ποικιλιών που θα εμφανίζουν περισσότερα βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Αυτά τα γονίδια μπορούν να βελτιώσουν την ανθεκτικότητα σε ασθένειες και παράσιτα, να παρουσιάζουν περισσότερη προσαρμοστικότητα στην κλιματική αλλαγή ειδικότερα σε εποχές που παρουσιάζουν έντονα καιρικά φαινόμενα όπως ξηρασία και ακραίες θερμοκρασίες και τέλος μπορούν να συμβάλουν στην δημιουργία ποικιλιών που θα βελτιώνουν την διατροφική αξία.(von Wettberg, Davis and Smýkal, 2020)

Allium sp. CWRs στην Κύπρο

Η Κύπρος είναι ένας σημαντικός βιότοπος για το γένος *Allium* καθώς καταγράφονται αρκετά διαφορετικά είδη και υποείδη. Τα είδη αναφέρονται στον ιστότοπο Flora of Cyprus – a dynamic checklist (<https://www.flora-of-cyprus.eu>) και συνοψίζονται παρακάτω.

1. *Allium sec. Cyprus*
2. *Allium amethystinum Tausch sec. Cyprus*
3. *Allium ampeloprasum L. sec. Cyprus*
4. *Allium autumnale P. H. Davis sec. Cyprus*
5. *Allium cassium Boiss. sec. Cyprus*
6. *Allium cassium var. hirtellum Boiss.*
7. *Allium cupani Raf. sec. Cyprus*
8. *Allium cupani subsp. cyprium Meikle sec. Cyprus*
9. *Allium curtum Boiss. & Gaill. sec. Cyprus*
10. *Allium curtum Boiss. & Gaill. subsp. curtum*

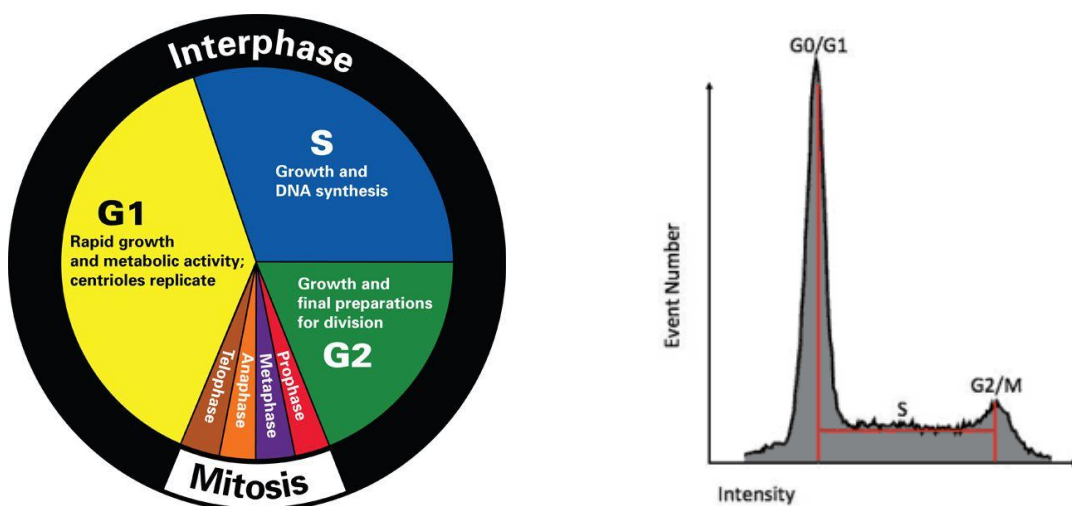
11. *Allium cypricum* Brullo & al. sec. Cyprus
12. *Allium cypricum* subsp. *lefkarense* (Brullo & al.) Christodoulou & Hand sec. Cyprus
13. *Allium dentiferum* Webb & Berthel. sec. Cyprus
14. *Allium exaltatum* (Meikle) Brullo & al. sec. Cyprus
15. *Allium fuscum* auct. as misapplied for *Allium dentiferum* Webb & Berthel.
16. *Allium guttatum* Steven sec. Cyprus
17. *Allium guttatum* Steven subsp. *guttatum* sec. Cyprus
18. *Allium guttatum* subsp. *sardoum* (Moris) Stearn
19. *Allium guttatum* subsp. *tenorei* (Parl.) Soldano sec. Cyprus
20. *Allium junceum* Sm. sec. Cyprus
21. *Allium junceum* Sm. subsp. *junceum*
22. *Allium junceum* Sm. var. *junceum*
23. *Allium kyrenium* Giusso & al.
24. *Allium lefkarense* Brullo & al.
25. *Allium marathasicum* Brullo & al. sec. Cyprus
26. *Allium margaritaceum* var. *guttatum* (Steven) Gay
27. *Allium meikleanum* Brullo & al., nom. nov.,
28. *Allium neapolitanum* Cirillo sec. Cyprus
29. *Allium nigrum* L. sec. Cyprus
30. *Allium orientale* Boiss. sec. Cyprus
31. *Allium pallens* L. sec. Cyprus
32. *Allium pallens* L. subsp. *pallens*
33. *Allium paniculatum* subsp. *exaltatum* Meikle
34. *Allium paniculatum* subsp. *fuscum*
35. *Allium paniculatum* subsp. *pallens* (L.) Arcang.
36. *Allium ramosum* L. p. p.
37. *Allium roseum* L. sec. Cyprus
38. *Allium roseum* var. *bulbiferum* DC.
39. *Allium rotundum* L. sec. Cyprus
40. *Allium rotundum* L. subsp. *rotundum* sec. Cyprus
41. *Allium rubrovittatum* as misapplied for *Allium curtum* Boiss. & Gaill.
42. *Allium scorodoprasum* subsp. *rotundum* (L.) Stearn
43. *Allium sphaerocephalon* L. sec. Cyprus
44. *Allium sphaerocephalon* L. subsp. *sphaerocephalon* sec. Cyprus

45. *Allium stamineum* as misapplied for *Allium cyprium* Brullo & al.
46. *Allium stamineum*
47. *Allium trifoliatum* Cirillo sec. Cyprus
48. *Allium tuberosum* Rottler ex Spreng. sec. Cyprus
49. *Allium willeianum* Holmboe sec. Cyprus

Βιολογία κυττάρου/Κυτταρομετρία ροής

Κυτταρικός κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος είναι τα γεγονότα που διαδραματίζονται από ένα στάδιο του κυττάρου μέχρι το αντίστοιχο στάδιο στο θυγατρικό κύτταρο. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από δυο φάσεις, την **μίτωση (M)** και την **ενδιάμεση φάση** όπου είναι η περίοδος μεταξύ των δυο διαδοχικών μιτωτικών διαιρέσεων. Η ενδιάμεση φάση απαρτίζεται από τρεις περιόδους: **G1** (gap 1), **S** (synthesis), **G2** (gap 2). Κατά την διάρκεια αυτών των τριών περιόδων παρατηρείται έντονη μεταβολική δραστηριότητα, αύξηση του κυττάρου και κυτταρική διαφοροποίηση. Η περίοδος G1 είναι ζωτικής σημασίας για τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου και κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου πραγματοποιείται η σύνθεση πολλών κυτταροπλασματικών στοιχείων όπως τα ριβοσώματα, τα ένζυμα και πολλά μεμβρανοειδή οργανίδια (Εικόνα 1).



Διάγραμμα 1: Φάσεις του κυτταρικού κύκλου και απεικόνιση του ποσοστού τους σε σωματικά κύτταρα

Τα μεριστωματικά φυτικά κύτταρα διέρχονται από συνεχείς κυτταρικούς κύκλους, ενώ άλλα κύτταρα εισέρχονται στην κατάσταση G₀ (κατάσταση ηρεμίας), όπου παρόλο που τα αυτά κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά δεν έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιαστούν. Κάποια κύτταρα έχουν την ικανότητα να επανέλθουν από την κατάσταση G₀ ξανά στον κυτταρικό κύκλο κατά την παρουσία κατάλληλων αναπτυξιακών παραγόντων. Για την πραγματοποίηση της μεταβίβασης από την περίοδο G₁ στην περίοδο S υπεύθυνο είναι το **G1 σημείο ελέγχου**.

Στην περίοδο S εκτελείται η σύνθεση του DNA, όπου το DNA διπλασιάζεται και ως απόρροια δημιουργούνται αντίγραφα του κάθε χρωμοσώματος. Μετά την περίοδο S ακολουθεί η περίοδος G₂, όπου είναι η περίοδος ανάπτυξης και σύνθεσης, αφού κατά την διάρκεια αυτής της φάσης λαμβάνουν χώρα ξανά οι βιοσυνθετικές δραστηριότητες και κυρίως η παραγωγή μικροσωληνίσκων οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου κατά την διάρκεια της μίτωσης. Η περίοδος G₂ προηγείται της μίτωσης. Για την μεταβίβαση από την περίοδο G₂ στην μίτωση υπεύθυνο είναι ένα δεύτερο σημείο ελέγχου το **G2 σημείο ελέγχου**. Η διαδικασία της μίτωσης μπορεί να διακοπεί από ένα σημείο ελέγχου όταν η άτρακτος δεν έχει σχηματιστεί πλήρως ή τα ινίδια της ατράκτου δεν έχουν συνδεθεί κατάλληλα με τις χρωματίδες. Τα συνεχώς διαιρούμενα κύτταρα επαναλαμβάνουν διαρκώς τον κυτταρικό κύκλο (G₁, S, G₂, M).

Η μίτωση καταλαμβάνει το 5-10 % της συνολικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου και έτσι χαρακτηρίζεται ως η μεγαλύτερη περίοδος. Η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυττάρων στον ίδιο οργανισμό. Στους περισσότερους τύπους κυττάρων οι περίοδοι S και G₂ έχουν σταθερή διάρκεια ενώ η περίοδος G₁ εμφανίζει την περισσότερη ποικιλότητα όσο αφορά την χρονική διάρκεια. Τα μόρια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο είναι οι **κινάσες των πρωτεϊνών** και οι **κυκλίνες**, όπου βρίσκονται στα σημεία ελέγχου.

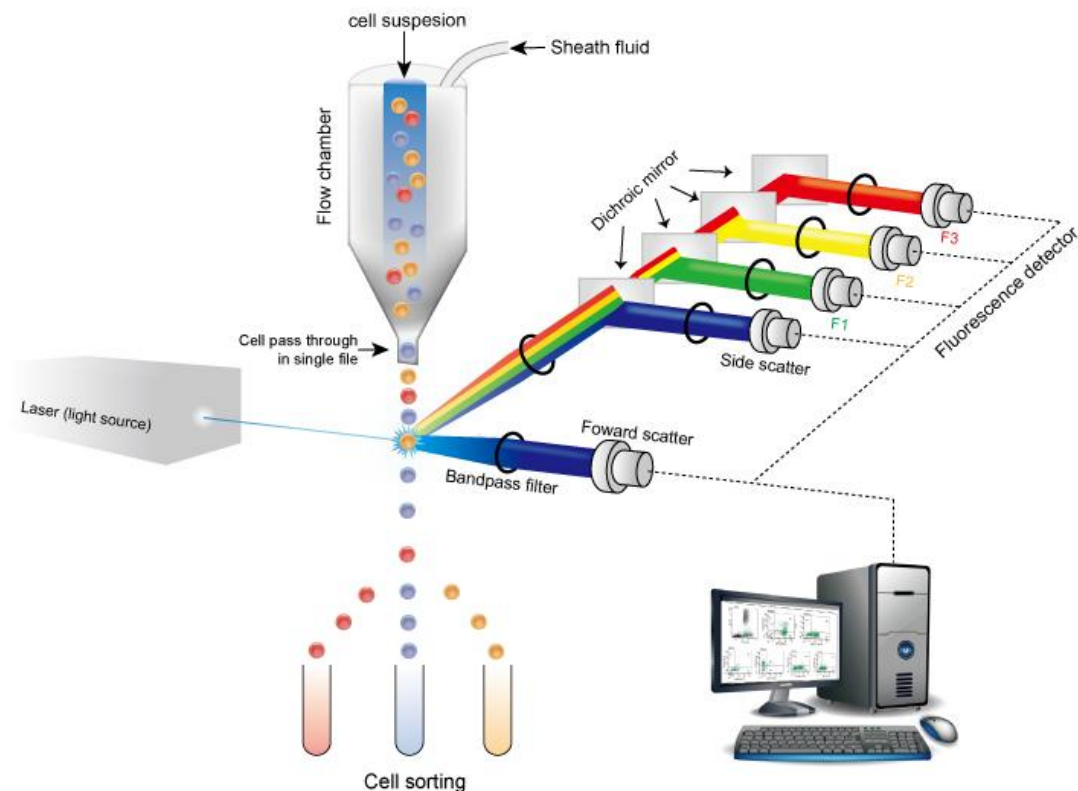
Αρχή λειτουργίας κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία μέθοδος μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η παρατήρηση, η ποσοτικοποίηση και ο διαχωρισμός μικροσκοπικών σωματιδίων (π.χ. κυττάρων) τα οποία κινούνται σε μία γραμμική ροή υγρού με σταθερή ταχύτητα και ανιχνεύονται μέσω οπτικών και ηλεκτρονικών σημάτων. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών χαρακτηριστικών σε ένα μόνο κύτταρο.

Χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής μπορούν να αναλυθούν αρκετά δεδομένα των κυττάρων, όπως:

1. Κυτταρική διάμετρος
2. Πυρηνική διάμετρος
3. Όγκος
4. Κατανομή χρωστικών
5. Εσωτερική δομή
6. Η επιφάνεια και το δυναμικό μεμβράνης του κυττάρου
7. Τα νουκλεϊνικά οξέα (DNA και RNA)
8. Οι πρωτεΐνες, όπως επιφανειακά αντιγόνα, πυρηνικά αντιγόνα, ένζυμα και ορμόνες

Τα βασικά συστατικά του συστήματος κυτταρομετρίας ροής είναι το σύστημα ρευστών (fluidics), το οπτικό σύστημα, το ηλεκτρονικό σύστημα και το σύστημα ανάλυσης δεδομένων. Το σύστημα ρευστών είναι απαραίτητο διότι μέσω της υδροδυναμικής εστίασης (hydrodynamic focusing), δηλαδή της περιοχής ενός μεγάλου όγκου σε ένα μικρό όγκο με τέτοιο τρόπο ώστε να ευθυγραμμιστεί κατά μήκος ενός άξονα, μεταφέρει και διευθετεί τα κύτταρα, που βρίσκονται σε αιώρημα έτσι ώστε να περνούν ένα-ένα κάθε φορά μέσω μιας περιοχής ανάκρισης (Interrogation Point), που έχει εστιασμένο φωτισμό. Καθώς τα κύτταρα συναντούν την εστιασμένη πηγή φωτός, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους, σκεδάζουν το φως (Εικόνα 2).



Διάγραμμα 2: Αρχή λειτουργίας και οπτικά μέρη του κυτταρομετρητή ροής. Τα δεδομένα που συλλέγονται αφορούν τις παραμέτρους FSC, SSC, FL1, FL2, FL3 και FL4.

Αναλυτικότερα, το σύστημα ρευστών, αποτελείται από το υπό μελέτη δείγμα (sample) και το υγρό περιβλήματος (sheath fluid). Το υγρό περιβλήματος βρίσκεται σε ένα δοχείο (sheath tank) και συνήθως είναι ρυθμιστικό διάλυμα άλατος ή νερό. Εφαρμόζοντας διαφορετική πίεση στο δείγμα και στο υγρό περίβλημα επιτυγχάνεται διαφορετική ταχύτητα κίνησης των δύο υγρών. Καθώς κινούνται τα δύο υγρά καταλήγουν σε μια περιοχή που ονομάζεται θάλαμος ροής (flow chamber) ή περιοχή υδροδυναμικής εστίασης, η οποία καταλήγει σε ένα πολύ μικρό στόμιο. Όταν οι συνθήκες είναι σωστές το υγρό που περιέχει τα κύτταρα ρέει σε ένα κεντρικό πυρήνα που δεν αναμιγνύεται με το υγρό που το περιβάλλει.

Το οπτικό σύστημα περιλαμβάνει οπτικά φίλτρα και ανιχνευτές με στόχο τη συλλογή και το φιλτράρισμα των δεδομένων. Έπειτα, τα δεδομένα αυτά μετατρέπονται σε ψηφιακές μονάδες μέσω του ηλεκτρονικού συστήματος και τέλος αποθηκεύονται σε υπολογιστή ώστε να μπορεί να γίνει η ανάλυση και η παράσταση των δεδομένων με ποικίλους τρόπους.

Ο αριθμός των ανιχνευτών ποικίλλει ανάλογα με το μηχάνημα και τον κατασκευαστή. Η μέτρηση του φθορισμού σε διαφορετικά μήκη κύματος μπορεί να δώσει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για κυτταρικούς υποδοχείς ή ενδοκυτταρικά μόρια που μπορούν να

σημανθούν με φθορίζουσες χρωστικές (φθοριοχρώματα), όπως τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) και πρωτεΐνες. Σε ένα συνδεδεμένο κύτταρο με μια φθορίζουσα χρωστική που ενσωματώνεται στο DNA, η ποσότητα του φθορίζοντος φωτός που εκπέμπει το κύτταρο παράγει ένα σήμα ανάλογο του περιεχομένου του DNA του κυττάρου. Το σήμα ελέγχεται από οπτικά φίλτρα, τα οποία μπλοκάρουν ορισμένα μήκη κύματος αλλά επιτρέπουν τη διόδο σε άλλα μήκη κύματος. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι φίλτρων:

1. Τα φίλτρα 'long pass', που αφήνουν να περάσει φως πάνω από ένα μήκος κύματος
2. Τα φίλτρα 'short pass', που αφήνουν να περάσει φως κάτω από ένα μήκος κύματος
3. Τα φίλτρα 'band pass', που αφήνουν να περάσει φως μεταξύ ενός συγκεκριμένου εύρους μηκών κύματος.

Για να επιτευχθεί η ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών σημάτων είναι σημαντική η ακριβής επιλογή και η σειρά τοποθέτησης των οπτικών φίλτρων. Το ηλεκτρονικό σύστημα περιλαμβάνει τους φωτοανιχνευτές και ένα σύστημα τροποποίησης σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό, το οποίο μετατρέπει σήματα πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης καθώς και σήματα φθορισμού από το φως σε ηλεκτρικά σήματα-ηλεκτρικές ώσεις. Η ένταση των ώσεων αυτών είναι ανάλογη της έντασης των φωτεινών σημάτων που προσπίπτουν στους φωτοανιχνευτές.

Η απόκριση του φωτοανιχνευτή στο φως μπορεί να ρυθμιστεί από το χρήστη με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι η αυξομείωση της διαφοράς δυναμικού που εφαρμόζεται στον φωτοπολλαπλασιαστή και ο δεύτερος τρόπος είναι η αυξομείωση της ενίσχυσης του ρεύματος αφού αφήσει τον φωτοπολλαπλασιαστή. Οι ενισχυτές μπορεί να είναι είτε γραμμικοί που χρησιμοποιούνται για σήματα μικρού εύρους έντασης είτε λογαριθμικοί που χρησιμοποιούνται για σήματα μεγάλου εύρους έντασης. Η λογαριθμική ενίσχυση χρησιμοποιείται για ανάλυση επιφανειακών και ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών ενώ η γραμμική ενίσχυση χρησιμοποιείται για ανάλυση DNA και κυτταρικού κύκλου.

Τέλος, οι τιμές του ηλεκτρικού ρεύματος αποθηκεύονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή σε ένα αρχείο ψηφιακών δεδομένων που καλείται αρχείο list-mode. Το αρχείο list-mode είναι μια μεγάλη λίστα όλων των παραμέτρων που συλλέχθηκαν για κάθε κύτταρο με την ακριβή χρονική σειρά συλλογής και χρησιμοποιείται για την ανάλυση και τη γραφική παράσταση των δεδομένων. Οι υπολογιστές διαθέτουν το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα για συλλογή και περαιτέρω επεξεργασία των σημάτων.

Τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης μπορούν να παρασταθούν γραφικά με πολλούς τρόπους:

1. Μια παράμετρος μπορεί να παρασταθεί σε ένα ιστόγραμμα μίας παραμέτρου όπου ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τις τιμές της παραμέτρου και ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυττάρων-γεγονότων (events) που αναλύθηκαν.
2. Μπορούν να παρασταθούν ταυτόχρονα και δύο παράμετροι, όπου η μία παράμετρος δίνεται στον άξονα x και η άλλη παράμετρος στον άξονα ψ. Στο σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος κάθε κουκίδα αντιπροσωπεύει ένα γεγονός με συγκεκριμένες τιμές πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης.
3. Είναι εφικτό να γίνουν και τρισδιάστατες γραφικές παραστάσεις, στις οποίες οι άξονες x, y και z αντιπροσωπεύουν αντίστοιχες παραμέτρους.

Μια σημαντική αρχή των δεδομένων ανάλυσης της κυτταρομετρίας ροής είναι ότι μας παρέχουν την δυνατότητα να επικεντρώσουμε τη μελέτη μας σε συγκεκριμένα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν, ενώ ταυτόχρονα δε λαμβάνουμε υπόψη μη επιθυμητά σωματίδια, όπως νεκρά κύτταρα ή κυτταρικά κατάλοιπα (gating). Σχεδιάζεται γραφικά μέσω του υπολογιστή ένα διαχωριστικό σχήμα-όριο, που καλείται gate και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθοριστούν τα χαρακτηριστικά συγκεκριμένων κυττάρων που επιλέγονται για περαιτέρω ανάλυση. Η διαδικασία αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για μία, δύο ή πολλαπλές παραμέτρους.

Χρήσεις της κυτταρομετρίας ροής

Η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την ανάλυση και απομόνωση κυτταρικών πληθυσμών με βάση φυσικά χαρακτηριστικά (μέγεθος, εσωτερική δομή) και τον φθορισμό τους (έκφραση επιφανειακών ή ενδοκυτταρικών ουσιών). Η τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη μοριακή βιολογία, στην ανοσολογία, στις γεωπονικές επιστήμες και στη θαλάσσια βιολογία. Ιδιαίτερα, η κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για :

- Τη μελέτη βασικής βιολογίας κυττάρων
- Την ανάλυση κυτταρικών λειτουργιών
- Την κινητική κυττάρων
- Τη μελέτη του καρυότυπου
- Την ταυτοποίηση και απομόνωση βλαστικών κυττάρων
- Τη διάγνωση ασθενειών και την ταυτοποίηση καρκινικών κυττάρων
- Την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου

- Τον υπολογισμό του πυρηνικού περιεχομένου
- Τον υπολογισμό του ποσοστού GC/AT κλπ.

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας ήταν η καταγραφή της γονιδιακής ποικιλομορφίας των πληθυσμών *Allium* στην Κύπρο. Μελετήθηκαν περίπου 80 γονότυποι που είναι άγριοι συγγενείς καλλιεργούμενων ειδών και καθώς τοπικοί πληθυσμοί καλλιεργούμενων *Allium*.

Υλικά και μέθοδοι

Φυτικό υλικό

Συλλογή Δειγμάτων

Τα δείγματα που αναλύθηκαν προβάλλονται στο πίνακα 1 και συλλέχθηκαν από σπόρους και βολβούς που δόθηκαν από το Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών της Κύπρου και από συλλογή χλωρών φυτών *Allium* σε περιοχές της Κύπρου από το Λειτουργό του ινστιτούτου γεωργικών ερευνών Δρ. Άγγελο Κυρατζή και τον Κο Χαράλαμπο Παναγιώτου.

Η ανάλυση των δειγμάτων έγιναν στο εργαστήριο του τμήματος των Γεωπόνων Επιστημών Βιοτεχνολογίας και επιστήμης τροφίμων στο τεχνολογικό πανεπιστήμιο Κύπρου

Πίνακας 1: Συλλογή πληθυσμού *Allium spp.*

	Species	Latitude	Longitude	Elevation	Habitat
1	<i>Allium amethystinum</i>	490558	3873353	603	Field margins
2	<i>Allium amethystinum</i>	520190	3873467	550	Field margins and under pines
3	<i>Allium amethystinum</i>	537831	3867439	269	Road margins
4	<i>Allium amethystinum</i>	518978	3871403	591	Roadmargins
5	<i>Allium amethystinum</i>				
6	<i>Allium ampeloprasum</i>	559058	3871923	137	Road margins (disturbed area)
7	<i>Allium ampeloprasum</i>	515806	3867497	967	Roadmargins
8	<i>Allium ampeloprasum</i>	454914	3883977	39	Abandoned field
9	<i>Allium ampeloprasum</i>	490579	3873472	603	Field margins
10	<i>Allium ampeloprasum</i>	535869	3888556	160	Road margins
11	<i>Allium ampeloprasum</i>	515806	3867497	967	Roadmargins
12	<i>Allium ampeloprasum</i>	490502	3873384	603	Field margins
13	<i>Allium ampeloprasum</i>	576123	3869037	5	Phrygana, very close to the beach, High salinity

14	<i>Allium ampeloprasum</i>	576123	3869037	5	Phrygana, very close to the beach, High salinity
15	<i>Allium autumnale</i> P. H. Davis	492169	3857829	610	Under Pine trees and natural vegetation, Igenous formations
16	<i>Allium autumnale</i> P. H. Davis	543603	3866554	157	Under Pine trees and natural vegetation, Calcareous soils
17	<i>Allium autumnale</i> P. H. Davis	518671	3868330	760	On igneous formations, mountain sides, abd roadbanks
18	<i>Allium autumnale</i> P. H. Davis	525675	3865804	518	Roadbanks and raod sides
19	<i>Allium cassium</i>	484541	3867678	1408	Forest area, under <i>Pinus nigra</i>
20	<i>Allium cupani</i> subsp. <i>cyprium</i> Meikle	552276	3867015	89	Phrygana
21	<i>Allium cupani</i> subsp. <i>cyprium</i> Meikle	535947	3888793	170	Phrygana
22	<i>Allium cupani</i> subsp. <i>cyprium</i> Meikle				
23	<i>Allium curtum</i>	552490	3867075	90	Phrygana
24	<i>Allium curtum</i>	587960	3871938	6	Dry rocky area very close to the beach, high salinity
25	<i>Allium curtum</i>	559031	3872139	167	Calcareous phrygana
26	<i>Allium curtum</i>	544308	3910244	5	Dry rocky area very close to the beach, high salinity
27	<i>Allium curtum</i>	535947	3888793	170	Phrygana
28	<i>Allium curtum</i>				
29	<i>Allium</i> <i>cyprium</i> Brullo & al. intermediate	438808	3875739	312	On serpentine formation with natural vegetation

30	Allium cyprium Brullo & al. intermediate	512612	3849915	650	Rocky slopes, along road with serpendine
31	Allium cyprium Brullo & al. subsp. cyprium	496754	3867825	1363	Rocky slope, openings of Pinus brutia forest
32	Allium cyprium Brullo & al. subsp. cyprium	484817	3867503	1462	Under Pinus nigra forest
33	Allium cyprium subsp. lefkarensis (Brullo & al.) Christodoulou & Hand	559031	3872139	167	Calcareous phrygana
34	Allium cyprium subsp. lefkarensis (Brullo & al.) Christodoulou & Hand	527677	3889735	210	Phrygana
35	Allium cyprium subsp. lefkarensis (Brullo & al.) Christodoulou & Hand	520591	3874064	460	Phrygana, on igneous formations
36	Allium dentiferum Webb & Berthel.	509033	3846393	91	Field margins
37	Allium dentiferum Webb & Berthel.	526872	3855209	340	Olive orchard
38	Allium dentiferum Webb & Berthel.	485092	3866997	1425	Abandoned orchards
39	Allium dentiferum Webb & Berthel.				
40	Allium exaltatum	499532	3868013	1500	Rocky slopes
41	Allium exaltatum	517169	3865543	1102	Rocky slopes
42	Allium exaltatum	468036	3862865	805	Calcareous rocky formations
43	Allium exaltatum	518061	3863606	1230	Screes on mountainside
44	Allium guttatum Steven subsp. guttatum	520885	3866955	619	Openings of Pinus forest
45	Allium guttatum Steven subsp. guttatum	491516	3873261	737	Openings of Pinus forest, annual vegetation
46	Allium guttatum Steven subsp. guttatum	483990	3873162	350	Igneous roadbanks
47	Allium junceum	468036	3862865	805	Calcareous rocky formations
48	Allium junceum	477915	3834930	10	Phrygana at the top of sea cliff
49	Allium junceum				
50	Allium junceum	483086	3836957	59	Roadside and openings of

					garrigue vegetation
51	<i>Allium junceum</i>	442972	3878056	9	Dry rocky area very close to the beach, high salinity
52	<i>Allium marathasicum</i> Brullo & al.	485092	3866997	1425	Margins of abandoned orchards
53	<i>Allium neapolitanum</i>	469217	3874790	490	Field margins on heavy soils
54	<i>Allium neapolitanum</i>	486899	3839620	185	Disturbed area, under a pine and carob tress
55	<i>Allium nigrum</i>	535730	3864532	280	Field margins and banks of a stream
56	<i>Allium nigrum</i>	455226	3873107	420	Fallow field on deep soils
57	<i>Allium orientale</i>	551912	3910651	77	Heavy alluvium soils
58	<i>Allium orientale</i>	529344	3889543	300	Olive orchard
59	<i>Allium pallens</i> L.	569587	3871249	6	Disturbed area, close to the beach
60	<i>Allium pallens</i> L.	509124	3845927	88	Road margins, disturbed area along lake
61	<i>Allium pallens</i> L.				
62	<i>Allium roseum</i> L.	452255	3858793	570	Roadbanks on calcareous soils
63	<i>Allium rotundum</i> L. subsp. <i>rotundum</i>	515286	3867104	928	Roadmargins - abandoned land
64	<i>Allium rotundum</i> L. subsp. <i>rotundum</i>	466651	3862882	1100	Roadbanks and field margins
65	<i>Allium rotundum</i> L. subsp. <i>rotundum</i>				
66	<i>Allium sphaerocephalon</i> L. subsp. <i>sphaerocephalon</i>	465489	3862940	927	Roadbanks on a stone wall
67	<i>Allium sphaerocephalon</i> L. subsp. <i>sphaerocephalon</i>	487532	3856160	789	In burned field

68	Allium sphaerocephalon L. subsp. sphaerocephalon	465362	3858404	600	Roadbanks and field margins
69	Allium trifoliatum	582078	3869919	10	Phrygana and roadside
70	Allium trifoliatum	455114	3873415	1148	Roadside on igneous formations
71	Allium trifoliatum	497393	3828746	61	Roadside and openings of garrigue vegetation
72	Allium trifoliatum	503343	3874499	512	Road sites within Pine forests
73	Allium willeanum Holmboe	518593	3870972	592	Cliffs - Roadmargins
74	Allium willeanum Holmboe	507138	3847920	115	Rocky slopes, Roadside



Διάγραμμα 1 : σημεία συλλογής δειγμάτων Allium (2024)

Συνθήκες Ανάπτυξης

Οι βολβοί, φυτεύτηκαν σε γλαστράκια διαμέτρου 10cm και καλύφθηκαν με μείγμα χώματος και περλίτη. Οι ίδιες διαδικασίες έγιναν για όλους τους μάρτυρες πυρηνικού περιεχομένου. Στην συνέχεια τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με διάρκεια φωτισμού 12 Ωρες και σκότους 12 (με ένταση φωτός 150-175 $\mu\text{instein/m/sec}$) και θερμοκρασία περίπου 25 βαθμούς Κελσίου . Τα φυτά ποτίζονταν κάθε 2 ημέρες και οι αναλύσεις γίνονταν από νεαρά φύλλα ηλικίας δυο-τριών εβδομάδων .

Πίνακας 2: Μάρτυρες πυρηνικού περιεχομένου

Είδος	2C DNA (pg)
<i>Raphanus sativus cv. Saxa</i>	1.11 pg
<i>Lycopersicon esculentum cv. Stupické polní tyčkové rané</i>	1.96 pg
<i>Glycine max cv. Polanka</i>	2.50 pg
<i>Zea mays cv. CE-777</i>	5.43 pg
<i>Pisum sativum cv. Ctirad</i>	9.09 pg
<i>Secale cereale cv. Dankovské</i>	16.19 pg
<i>Vicia faba cv. Inovec</i>	26.90 pg
<i>Allium cepa cv. Alice</i>	34.89 pg

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για μάρτυρες πύρινου περιεχομένου ήταν το *Pisum sativum* και η *Vician faba*

Διαλύματα

Πίνακας 3: Σύσταση διαλύματος SBB

Χημική ουσία	Ποσότητα
<i>Tris-HCl</i>	100mM
<i>Sorbitol</i>	0,35M
<i>Glycine</i>	0,05M
<i>EDTA</i>	5mM

<i>NaCl</i>	90mM
<i>Polyvinylpyrrolidone(PVP-40)</i>	1%(w/v)
<i>Tween 20</i>	0,5%(v/v)
<i>β-marcaptoethanol</i>	0,1%(v/v)
<i>RNase</i>	50 μ g/mL
<i>Propidium Iodide</i>	50 μ g/mL

Πειραματική Διαδικασία

Για τη συλλογή και απομόνωση των κυτταρικών πυρήνων έγινε δειγματοληψία (τιμήματα φυλών μέγεθος 0,5 cm) από ένα φυτό *Allium* και ένα από τους δύο μάρτυρες που χρησιμοποιήσαμε κατά τη διάρκεια του πειράματος. Το κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν μέσα σε τρυβλίο. Ακολούθησε η προσθήκη ενός διαλύματος Sorbitol-based buffer (SBB) Όγκου 800μl, και ο τεμαχισμός των φύλλων με τη χρήση ξυραφιού διπλής όψης. Τέλος, με τη πιπετα συλλέχθηκε το δείγμα και το πέρασε από φίλτρο των 0.22 filter μ m για να κατακρατηθούν υπολείμματα μεγάλου μεγέθους. Έγινε συλλογή του δείγματος σε σωληνάρια (Eppendprf Tubes) χωρητικότητας 2ml. Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά για την αποσύνθεσης του RNA. Ο ιδανικός χρόνος επώασεις αντιστοιχεί σε τιμές με το μικρότερο δυνατό συντελεστή παραλλακτικότητας (Coefficient of Variation - CV)

Ρυθμίσεις Flow Cytometer

Για να αρχίσει η χρήση του κυτταρομετρητή ροής είναι απαραίτητο να το ξεκινήσουμε για τουλάχιστο 10 λεπτά πριν αρχίσει η φόρτωση και η ανάλυση των δειγμάτων. Πριν την ανάλυση των δειγμάτων γίνεται έλεγχος σωστή λειτουργίας με χρήση των 8-peak fluorescent bead mixture (spherotech) σύμφωνα με τον οδηγό χρήσης του.

Τα όρια που τέθηκαν είναι στα 80.000 (FSC-H). Για να γίνει απομόνωση των θορύβων από την ανάλυση. Ακόμη προσθέσαμε άλλο ένα ακόμη όριο στα 1.000 για το FL2-H. Η ροή ρύθμισης τέθηκε στην μικρή ταχύτητα, που είναι κατάλληλη για μέγεθος πυρήνων 10 μ m. Με τη χρήση παραμέτρων FL2-A έναντι FL1-A Βάλαμε όρια εμπειρικά, βρήκαμε τον πληθυσμό των πυρήνων και έγινε η επιλογή της περιοχής που συλλέχθηκαν οι τιμές από τα κυτταρικά θραύσματα (debris) Για κάθε δείγμα μετρήθηκαν 3000 πυρήνες περίπου. Από τη χρήση των

ορίων των πληθυσμών, βρέθηκαν οι μέσοι όροι και ο συντελεστής παραλλακτικότητας των δειγμάτων.

Ανάλυση με τη χρήση του λογισμικού Modfit LT

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Modfit LT (verify) με τη εισαγωγή παραμέτρων από το χρήστη (manual). Με περισσότερες λεπτομέρειες βρέθηκαν οι κορυφές φθορισμού του κυτταρικού κύκλου G0/G1 και G2/M (και το πόσο των πυρήνων που βρίσκονταν στο στάδιο S) για τα δείγματα και του μάρτυρες έγινε αυτόματος υπολογισμών των μέσων όρων και της διακύμανσης τους. Ο υπολογισμός του περιεχομένων του πυρήνα των δειγμάτων έγινε με τη χρήση της εξίσωσης

$$\text{Sample 2C DNA content} = \frac{\text{Sample G1 peak mean} \times \text{Standard 2C DNA content}}{\text{Standard G1 peak mean}}$$

Αποτελέσματα

Προσδιορισμός πειραματικών συνθηκών

Οι πυρήνες από τα είδη *Allium* απομονώθηκαν με επιτυχία από νεαρά και ώριμα φύλλα. Ο συντελεστής παραλλακτικότητας ήταν $CV < 5\%$. Κατά τη πειραματική διαδικασία επιλέχθηκαν νεαρά φύλλα για το λόγο ότι έχουν μικρότερα επίπεδα μεταβολιτών που παρεμβαίνουν στις μετρήσεις και επειδή έχουμε περισσότερες κυτταροδιαιρέσεις. Κατά τη δημιουργία των γραφημάτων ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα 4 κορυφές όπου αντιστοιχούν στα σωματικά κύτταρα (2C και 4C) δύο διαφορετικών κυτταρικών κύκλων. Όμως υπήρχαν περιπτώσεις όπου εμφανίζονταν πάνω από 4 κορυφές που μπορούσαν να διακριθούν.

Για το υπολογισμό του πυρηνικού περιεχομένου χρησιμοποιήθηκε Propidium Iodine (PI) όπου είναι μια χρωστική που μπορεί να μας δώσει ασφάλεια αποτελέσματα αφού δεσμεύεται και σε ζεύγη AT αλλά και GC εξίσου. Για να δημιουργηθούν οι καλύτερες συνθήκες υβριδισμού, έγιναν προκαταρκτικές μετρήσεις που είχαν στόχο τη εύρεση τη στοιχειομετρίας και του κατάλληλου χρόνου επώασης (για να είναι αξιόπιστες οι μετρήσεις οι τιμές φθορισμού να έχουν συντελεστή παραλακτικότητας κάτω από 5%). Για το σκοπό των προκαταρκτικών μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από *Pisum sativum* και *Vicia faba* που είναι και οι μάρτυρες, έτσι ώστε να βρεθεί ο καλύτερος χρόνος επώασης που έδινε τις ως πιο δυνατό μικρότερες τιμές παραλακτικότητας.

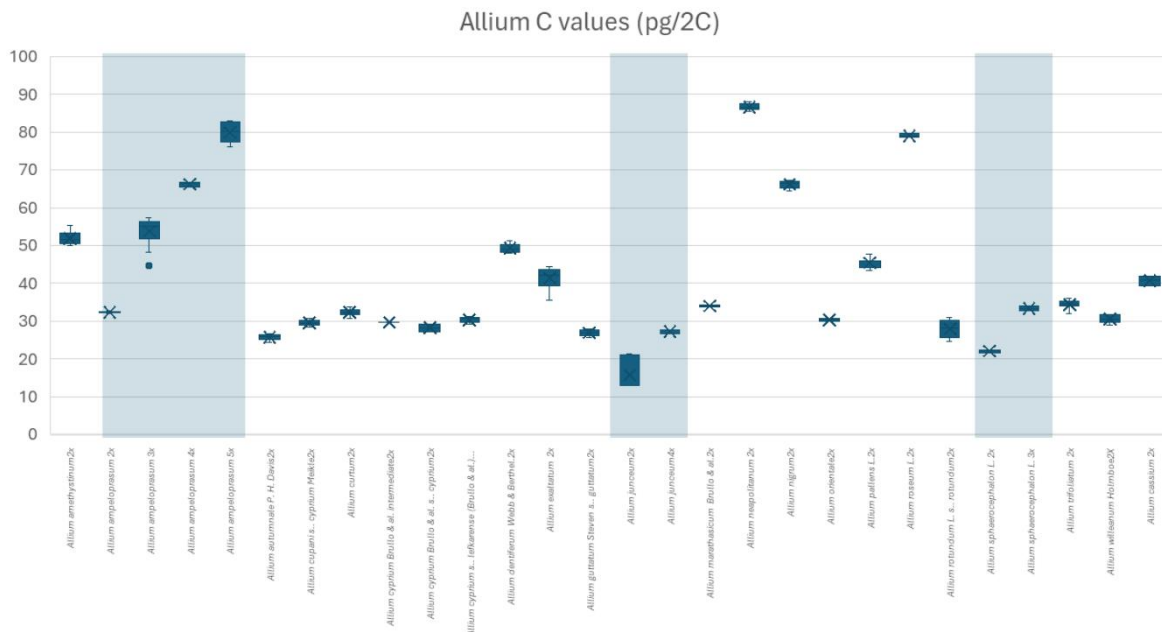
Σύγκριση C values

Το γονιδίωμα του γένους *Allium* στην Κύπρο παρουσιάζουν πολύ μεγάλη διακύμανση εντός ειδών ήταν από πολύ μικρές (*Allium junceum* 2C 13,0 (pg)) έως και αρκετά μεγάλη (*Allium neapolitanum* 2C 87,3 (pg)) τιμές. Ο μέσος όρος των ειδών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν πυρηνικό περιεχόμενο 76,6 (pg). Παράλληλα ανιχνεύθηκαν και περιπτώσεις πολυπλοειδίας μεταξύ των φυτών τα οποία όμως είχαν παρόμοια μορφολογικά γνωρίσματα (Διάγραμμα 3 και Διάγραμμα 4).

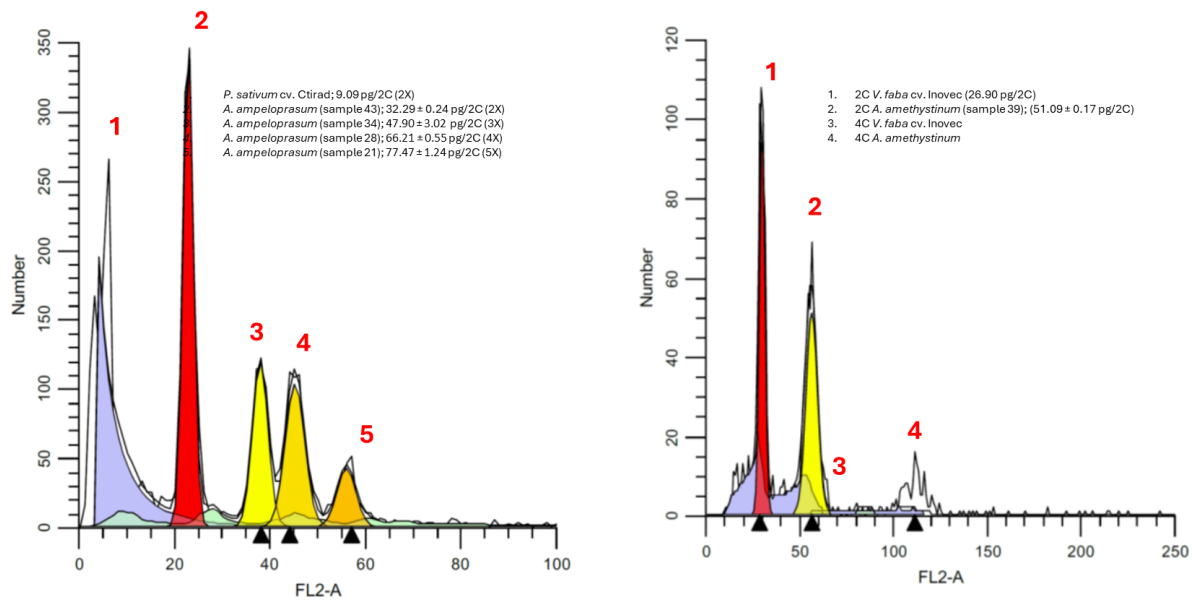
Πίνακας 4: Τιμές πυρηνικού περιεχομένου σε Κυπριακά είδη *Allium*

	Species	ploidy	2C average	2C sd	CV average sample
1	Allium amethystinum	2x	52.338	0.871	3.923
2	Allium amethystinum	2x	55.150	0.367	3.920
3	Allium amethystinum	2x	51.187	0.523	4.557
4	Allium amethystinum	2x	51.098	0.179	5.027
5	Allium amethystinum	2x	50.044	0.048	2.980
6	Allium ampeloprasum	2x	32.557	0.138	3.870
7	Allium ampeloprasum	2x	32.291	0.247	3.640
8	Allium ampeloprasum	3x	55.204	0.503	5.743
9	Allium ampeloprasum	3x	55.002	0.122	4.857
10	Allium ampeloprasum	3x	47.907	3.026	4.697
11	Allium ampeloprasum	4x	57.107	0.416	4.393
12	Allium ampeloprasum	4x	66.217	0.557	4.487
13	Allium ampeloprasum	5x	77.475	1.241	4.967
14	Allium ampeloprasum	5x	82.477	0.567	4.660
15	Allium autumnale P. H. Davis	2x	26.381	0.062	3.693
16	Allium autumnale P. H. Davis	2x	25.756	0.050	4.323
17	Allium autumnale P. H. Davis	2x	24.823	0.393	5.330
18	Allium autumnale P. H. Davis	2x	26.210	0.748	4.600
19	Allium cassium	2x	40.772	1.314	4.480
20	Allium cupani subsp. cyprium Meikle	2x	29.111	0.138	4.187
21	Allium cupani subsp. cyprium Meikle	2x	30.141	0.440	4.593
22	Allium cupani subsp. cyprium Meikle	2x	29.369	0.954	2.433
23	Allium curtum	2x	32.902	0.028	3.403
24	Allium curtum	2x	33.789	0.056	3.497
25	Allium curtum	2x	30.937	0.096	3.693
26	Allium curtum	2x	32.059	0.088	4.197
27	Allium curtum	2x	31.766	0.224	3.730
28	Allium curtum	2x	32.626	0.054	2.100
29	Allium cyprium Brullo & al. intermediate	2x	31.073	0.071	3.460
30	Allium cyprium Brullo & al. intermediate	2x	29.660	0.028	4.523
31	Allium cyprium Brullo & al. subsp. cyprium	2x	27.302	0.171	3.937
32	Allium cyprium Brullo & al. subsp. cyprium	2x	29.202	0.074	4.727
33	Allium cyprium subsp. lefkarensis (Brullo & al.) Christodoulou & Hand	2x	29.471	0.190	3.987
34	Allium cyprium subsp. lefkarensis (Brullo & al.) Christodoulou & Hand	2x	30.543	0.404	4.897
35	Allium cyprium subsp. lefkarensis (Brullo & al.) Christodoulou & Hand	2x	31.023	0.179	4.240
36	Allium dentiferum Webb & Berthel.	2x	50.225	0.161	4.767
37	Allium dentiferum Webb & Berthel.	2x	48.842	0.301	4.463

38	<i>Allium dentiferum</i> Webb & Berthel.	2x	50.449	1.312	3.100
39	<i>Allium dentiferum</i> Webb & Berthel.	2x	48.139	0.105	2.610
40	<i>Allium exaltatum</i>	2x	42.541	0.455	5.083
41	<i>Allium exaltatum</i>	2x	41.868	0.077	4.360
42	<i>Allium exaltatum</i>	2x	37.089	1.448	4.413
43	<i>Allium exaltatum</i>	2x	44.177	0.255	3.153
44	<i>Allium guttatum</i> Steven subsp. <i>guttatum</i>	2x	25.979	0.258	4.173
45	<i>Allium guttatum</i> Steven subsp. <i>guttatum</i>	2x	27.130	0.308	5.537
46	<i>Allium guttatum</i> Steven subsp. <i>guttatum</i>	2x	27.714	0.291	5.107
47	<i>Allium junceum</i>	2x	21.090	0.186	3.877
48	<i>Allium junceum</i>	2x	12.972	0.030	2.567
49	<i>Allium junceum</i>	2x	13.024	0.030	2.950
50	<i>Allium junceum</i>	4x	27.337	0.688	3.960
51	<i>Allium junceum</i>	4x	24.721	0.210	4.843
52	<i>Allium marathasicum</i> Brullo & al.	2x	34.050	0.249	3.693
53	<i>Allium neapolitanum</i>	2x	87.253	0.830	4.317
54	<i>Allium neapolitanum</i>	2x	86.144	0.638	4.223
55	<i>Allium nigrum</i>	2x	65.679	1.221	5.157
56	<i>Allium nigrum</i>	2x	66.720	0.546	5.120
57	<i>Allium orientale</i>	2x	30.350	0.389	4.907
58	<i>Allium orientale</i>	2x	97.551	3.529	4.307
59	<i>Allium pallens</i> L.	2x	46.540	1.002	5.163
60	<i>Allium pallens</i> L.	2x	43.605	0.269	4.293
61	<i>Allium pallens</i> L.	2x	45.921	0.039	2.460
62	<i>Allium roseum</i> L.	2x	79.109	0.569	4.470
63	<i>Allium rotundum</i> L. subsp. <i>rotundum</i>	2x	30.123	0.153	3.483
64	<i>Allium rotundum</i> L. subsp. <i>rotundum</i>	2x	30.594	0.411	4.283
65	<i>Allium rotundum</i> L. subsp. <i>rotundum</i>	2x	26.054	0.195	4.040
66	<i>Allium sphaerocephalon</i> L. subsp. <i>sphaerocephalon</i>	2x	22.076	0.376	4.447
67	<i>Allium sphaerocephalon</i> L. subsp. <i>sphaerocephalon</i>	3x	32.796	0.100	3.347
68	<i>Allium sphaerocephalon</i> L. subsp. <i>sphaerocephalon</i>	3x	33.846	0.280	3.250
69	<i>Allium trifoliatum</i>	2x	34.732	0.300	3.767
70	<i>Allium trifoliatum</i>	2x	35.852	0.331	3.470
71	<i>Allium trifoliatum</i>	2x	34.380	0.139	3.013
72	<i>Allium trifoliatum</i>	2x	32.816	0.972	3.947
73	<i>Allium willeaenum</i> Holmboe	2X	29.451	0.576	4.220
74	<i>Allium willeaenum</i> Holmboe	2X	31.733	0.037	3.160
75	<i>Allium willeaenum</i> Holmboe	2X	30.431	0.103	2.713



Διάγραμμα 3: Απεικόνιση της κατανομής των 2C-values στα είδη *Allium* της παρούσας μελέτης (Boxplots)



Διάγραμμα 4: (A) Ιστογράμματα φθορισμού FL2-A των γονότυπων *A. ampeloprasum*. Εκτός από διπλοειδείς, ανιχνεύθηκαν επίσης πυρήνες με υψηλότερο επίπεδο πλοειδίας (τριπλοειδείς έως πενταπλοειδείς) (B) ιστογράμματα φθορισμού FL2-A του *V. faba* cv. Inovec (κόκκινες κορυφές) και *A. amethystinum* (κίτρινες κορυφές) βαμμένοι με PI.

Συζήτηση

Στην παρούσα έρευνα πολλές από τις τιμές πυρηνικού περιεχομένου καταγράφηκαν για πρώτη φορά και μερικά αυτά που βρέθηκαν σε πιο παλιές μελέτες. Με τη χρυσή της κυτταρομετρίας ροής έγινε πιο ακριβής υπολογισμός των C-Values των κυπριακών ποικιλιών. Οι διαφορές που προκύπτουν μεταξύ αυτή της μελέτης και των τιμών που καταγράφηκαν κυμάνθηκαν από -45,65% (*Allium ampeloprasum*) έως σε 287,79% (*Allium roseum*) διαφορά. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι χρησιμοποιούνται άλλος τρόπος ποσοτικοποίησης. Για παράδειγμα έγιναν με Feulgen cytophotometry σε φάσμα φωτός 565 nm. Ενώ σε αυτή τη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Flow cytometry και βάθη με PI. Όσον αφορά τις διαφορές το τιμών το διαφόρων *Allium ampeloprasum* σημειώνονται λόγο διαφορετικής πλοειδίας (2x, 3x, 4x και 5x)(Ohri, Fritsch and Hanelt, 1998b)

Ποσοτικές διαφορές στο DNA μεταξύ των φυτών *Allium spp.*

Το γένος *Allium* παρουσιάζει σημαντικές διαφορές στο μέγεθος του γονιδιώματος, με παρατηρούμενη διαφορά περίπου μέχρι και 4 φορές μεταξύ των ειδών. Αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί εν μέρη από το επίπεδο τη πολυπλοειδίας και των αριθμ;ο των χρωμοσωμάτων. Όμως η κύρια διαφορά στο μέγεθος του πυρηνικού περιεχομένου του γένους οφείλετε στην διαφορά στην ποσότητα μην κωδικοποιημένων γονιδίων, τα οποία αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA. Οι διαφορές αυτές προκύπτουν από εξελεγκτικά γεγονότα που είτε ο πολλαπλασιασμός η οι απώλειες αυτών των αλληλουχιών χωρίς να ασκούν λειτουργική πίεση επιλογής .(Ohri, Fritsch and Hanelt, 1998b)

Διάσπαρτες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA

Οι διάσπαρτες αλληλουχίες αποτελούν ένα κύριο δομικό και εξελικτικό στοιχείο στα φυτικά γονιδιώματα. Τα στοιχεία αυτά κύριος είναι τα ρετροστοιχεία, τα LINEs (Long interspersed nuclear elements) και άλλες επαναλήψεις. Αυτή η ιδιότητα τους οδηγεί σε εκτεταμένη αντιγραφή τους και διασπορά τους έτσι αυξάνουν το μέγεθος του γονιδιώματος χωρίς να προσθέτουν νέες λειτουργικές γονιδιακές μονάδες. Για παράδειγμα το γονιδίωμα του ζαχαρότευτλου (*Beta vulgaris*) αποτελείται κατά το 63% από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Τόσο το Ty1-copia και τα LINEs βρίσκονται διασκορπισμένες κατά μήκος των

χρωμοσωμάτων του φυτού. Η εκτεταμένη παρουσία τους στο γονιδίωμα, υποδηλώνει τη συμμετοχή τους στην διαμόρφωση του μεγέθους του πυρηνικού περιεχομένου που μπορεί να εξήγησε τις διαφορές του μεγέθους μεταξύ των συγγενικών φυτών (Kubis, Schmidt and Seymour Heslop-harrison, 1998)

Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες σε σειρά

Στο γένος *Allium* οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες σε σειρά αποτελούν ένα σημαντικό τμήμα του γονιδιώματος και έχουν μεγάλη διακύμανση εντός του είδους. Οι σύντομες επαναλήψεις σε σειρά αντιστοιχούν στο 0,9% του γονιδιώματος του *Allium cernuum*, 2,3% στο *Allium sativum* και 2,4% στο *Allium ursinum* με πιο συχνά μοτίβα τις αλληλουχίες (TTAA)_n και (ATCCG)_n αντίστοιχα. Σε αυτό το ποσοστό επίσης συμπεριλαμβάνονται και ριβοσωμικά γονίδια (rDNA), τα οποία είναι οργανωμένα σε σειρές και εντοπίζονται σε ειδικές περιοχές των χρωμοσωμάτων. Παρότι είναι εξελεγκτικά συντηρημένα, παρουσιάζουν διάφορα στο αριθμό επαναλήψεων σε είδος. Επίσης αντίστοιχα μεταξύ του γονιδιώματος των φυτών εμφανίζονται και σημεία μακρών επαναλήψεων που αποτελεί το 1,68%-0,17% του γονιδιώματος τους. Οι διαφορές στην αφθονία και ποικιλομορφία των επαναλήψεων σίγουρα συμβάλουν στην διαμόρφωση του πυρηνικού περιεχομένου μεταξύ των ειδών του γένους (Peška *et al.*, 2019)

Αβιοτική καταπόνηση

Το περιβάλλον είναι ένας σημαντικός παράγοντας που παρουσιάζει μια σχέση αλληλεξάρτηση με το γονότυπο, όπου ο συνδυασμός τους μας δίνουν το φαινότυπο του φυτού. Όμως ως συνήθως οι αντιδράσεις του φυτικού οργανισμού προς τις περιβαλλοντικές συνθήκες περιορίζονται συνήθως εντός της συγκεκριμένης γενιάς και δεν μπορεί να μεταφερθεί στην επόμενη. Ωστόσο υπάρχουν εξαιρέσεις όπου συγκεκριμένες περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν και το γονότυπο των οργανισμών. Η αλλαγή του DNA μέσω περιβαλλοντικών επιδράσεων συναντάται σε καταστάσεις οι οποίες το περιβάλλον ασκεί μεγάλη πίεση στην επιλογή ενός πληθυσμού. Σε πείραμα που έγινε στο φυτό *Linum usitatissimum* (λινάρι) μετά από πειραματικές εφαρμογές διαφόρων περιβαλλοντικών συνθηκών παρουσιάστηκαν μέχρι και 15% διαφορές στην ποσότητα του πυρηνικού DNA. Οι αλλαγές που εμφανίστηκαν κυρίως φαίνονταν να προέρχονται από μοριακούς μηχανισμούς όπως μεταβολή στο αριθμό

επαναλαμβανόμενων γονιδιακών αλληλουχιών, ανομοιόμορφη αντιγραφή και ανασυνδυαστικών ανταλλαγών με αποτέλεσμα να οδηγούν σε μεταβολή του μεγέθους του γονιδιώματος (Cullis, 1983)

Ενδοπολυπλοειδία

Στα φυτά συχνά εμφανίζονται περιπτώσεις ενδοπολυπλοειδίας, δηλαδή διπλασιασμός του πυρηνικού περιεχομένου χωρίς να πραγματοποιηθεί το στάδιο της μίτωσης. Στην παρούσα μελέτη εμφανίστηκαν παραπάνω από 2 (2C,4C) κορυφές κατά τη ανάλυση. Η εμφάνιση των επιπρόσθετων κορυφών μας δείχνει ότι οι αλλαγές των C-values μπορεί να σχετίζονται με φαινόμενα μη τυπικού διπλασιασμού του DNA.(Price, 1988)

Συμπέρασμα

Οι τιμές του 2C περιεχομένου που καταγράφηκαν για τα είδους του γένους *Allium* στην Κύπρο αποκαλύπτουν υψηλό επίπεδο γενετικής ποικιλομορφίας. Η Σημαντική διακύμανση των μετρήσεων τόσο μεταξύ τους αλλά και όσο εντός του ίδιου είδους υποδηλώνει τη πιθανή παρουσία πολυπλοειδίας, γεωγραφικά διαφοροποιημένους πλυθισμούς αλλά υβριδισμού. Η ποικιλομορφία που εμφανίζεται στο Πυρηνικό περιεχόμενο απαιτεί διερεύνηση και με χρήση άλλων μεθόδων όμως ανάλυση του αριθμού και μορφολογίας των χρωματοσωμάτων. Η εφαρμογή αυτών των τεχνικών θα συμβάλουν στην κατανομή της φυλογενετικής σχέσης μεταξύ των ειδών και κατανόηση της εξελικτικής τους πορείας.

Βιβλιογραφία

Cullis, C.A. (1983) 'Environmentally induced DNA changes in plants', *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1(2), pp. 117–131. Available at: <https://doi.org/10.1080/07352688309382174>.

Dhall, R.K. *et al.* (2023) 'History, evolution and domestication of garlic: a review', *Plant Systematics and Evolution*. Springer. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00606-023-01869-9>.

Hao, F. *et al.* (2023) 'Chromosome-level genomes of three key *Allium* crops and their trait evolution', *Nature Genetics*, 55(11), pp. 1976–1986. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01546-0>.

Kubis, S., Schmidt, T. and Seymour Heslop-harrison, J. (1998) *Repetitive DNA Elements as a Major Component of Plant Genomes*, *Annals of Botany*.

Lim, T.K. (2015) *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*. Dordrecht: Springer Netherlands. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9511-1>.

Lopez-Bellido, F.J. *et al.* (2016) 'New phenological growth stages of garlic (*Allium sativum*)', *Annals of Applied Biology*, 169(3), pp. 423–439. Available at: <https://doi.org/10.1111/aab.12312>.

Mushtaq, S. *et al.* (2018) 'Gibberellins application timing modulates growth, physiology, and quality characteristics of two onion (*Allium cepa* L.) cultivars', *Environmental Science and Pollution Research*, 25(25), pp. 25155–25161. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2542-9>.

Ohri, D., Fritsch, R.M. and Hanelt, P. (1998a) *Systematics and Evolution Evolution of genome size in Allium (Alliaceae)*, *Pl. Syst. Evol.*

Ohri, D., Fritsch, R.M. and Hanelt, P. (1998b) *Systematics and Evolution Evolution of genome size in Allium (Alliaceae)*, *Pl. Syst. Evol.*

Pareek, S. *et al.* (2017) 'Onion (*Allium cepa* L.)', in *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health: Second Edition*. Wiley Blackwell, pp. 1145–1161. Available at: <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch58>.

Peruzzi, L., Carta, A. and Altinordu, F. (2017) 'Chromosome diversity and evolution in *Allium* (Allioideae, Amaryllidaceae)', *Plant Biosystems*, 151(2), pp. 212–220. Available at: <https://doi.org/10.1080/11263504.2016.1149123>.

Peška, V. *et al.* (2019) 'Comparative dissection of three giant genomes: *Allium cepa*, *Allium sativum*, and *Allium ursinum*', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20030733>.

Price, H.J. (1988) *DNA Content Variation among Higher Plants*, Source: *Annals of the Missouri Botanical Garden*.

Rabinowitch, H.D.. and Brewster, J.L.. (1990) *Onions and allied crops. Vol. 1 Botany, physiology, and genetics ; editors Haim D. Rabinowitch, James L. Brewster*. CRC Press.

Shigyo, M. *et al.* (no date) *Compendium of Plant Genomes*. Available at: <http://www.springer.com/series/11805>.

Stavělková, H. (2008) 'Morphological characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) genetic resources collection - Information', *Horticultural Science*, 35(3), pp. 130–135. Available at: <https://doi.org/10.17221/661-HORTSCI>.

von Wettberg, E., Davis, T.M. and Smýkal, P. (2020) 'Editorial: Wild Plants as Source of New Crops', *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.591554>.

Xie, D.F. *et al.* (2020) 'Insights into phylogeny, age and evolution of *Allium* (Amaryllidaceae) based on the whole plastome sequences', *Annals of Botany*, 125(7), pp. 1039–1055. Available at: <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa024>.