

**Γοενζυμική ανάλυση επιλεγμένων ατόμων χαλεπίου πεύκης (*Pinus halepensis* Mill.) για παραγωγή ρητίνης και εφαρμογή μοριακών δεικτών για την ταυτοποίησή τους**

**ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΟΣ, ΜΗΤΡΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΤΣΑΚΤΣΙΡΑ ΜΑΡΙΑ  
και ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΣΚΑΛΤΣΟΓΙΑΝΝΗΣ**

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Δασικής Γενετικής και Βελτίωσης Δασοπονικών Ειδών, Τ.Θ. 238, 54124 Θεσσαλονίκη, Fax: +302310992777, e-mail: [skaltsoy@for.auth.gr](mailto:skaltsoy@for.auth.gr)

**Περίληψη**

Στη Χαλκιδική και στην Εύβοια εντοπίστηκαν άτομα χαλεπίου πεύκης (*Pinus halepensis* Mill.) υψηλοπαραγωγικά σε ρητίνη. Από αυτά, απομονώθηκαν τα ενδοσπέρμια, τα οποία αναλύθηκαν με την τεχνική της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης αμύλου. Χρησιμοποιήθηκαν 10 ενζυμικά συστήματα τα οποία έδωσαν 14 γονιδιακές θέσεις με 27 αλληλόμορφα. Η μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία  $\bar{H}_e$  για τα παραγωγικά δέντρα της Χαλκιδικής βρέθηκε ίση με 0,235 ενώ της Εύβοιας με 0,225. Οι δύο ομάδες (Χαλκιδικής και Εύβοιας) παραγωγικών δέντρων εμφάνισαν μια μικρή περίσσεια ετεροζυγωτίας ( $F_{IS}=-0,090$ ), ενώ το ποσοστό της ποικιλότητας που οφείλεται στις διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ήταν 5,2%. Η γονιδιακή ροή  $Nm$  μεταξύ των δύο αυτών ομάδων υπολογίστηκε σε περίπου 10 άτομα ανά γενιά. Επίσης, έγιναν κάποιες πρώτες αναλύσεις για την ταυτοποίηση ορισμένων επιλεγμένων ατόμων με μοριακούς δείκτες RAPDs. Χρησιμοποιήθηκαν έξι εκκινητές οι οποίοι εμφάνισαν 68 γονιδιακές θέσεις. Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των επιλεγμένων ατόμων επετεύχθη πολύ εύκολα με μόλις 9 γονιδιακές θέσεις από τις συνολικά 68.

**Εισαγωγή**

Η χαλέπιος πεύκη (*Pinus halepensis* Mill.), ανήκει στο γένος *Pinus* και στην οικογένεια *Pinaceae*. Η γεωγραφική της εξάπλωση επεκτείνεται περιμετρικά της Μεσογείου ενώ στην Ελλάδα τη συναντάμε στην Ήπειρο, Στερεά Ελλάδα, Πελοπόννησο, Χαλκιδική, Πήλιο, Εύβοια, Σκύρο, Σκόπελο και μερικά άλλα νησιά του Αιγαίου και του Ιονίου πελάγους (Αθανασιάδης, 1986). Στον Ελλαδικό χώρο, φύεται από παραθαλάσσιες περιοχές μέχρι και υψόμετρο 1000μ. (Vidakovic, 1991).

Τα δάση της χαλεπίου πεύκης, εκτός από την οικολογική σημασία τους, παρέχουν και αρκετά προϊόντα που γίνονται αντικείμενο εμπορίου. Το κυριότερο προϊόν, όπως είναι φυσικό, είναι η ξυλεία. Το μεγαλύτερο ποσοστό συγκομιζόμενου ξύλου χρησιμοποιείται ως καυσόξυλο ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιείται ως βιομηχανική ξυλεία. Εκτός όμως από την ξυλεία, το σημαντικότερο προϊόν είναι η ρητίνη. Η χαλέπιος πεύκη αποτελεί το κύριο είδος για ρητινοσυλλογή στη χώρα μας με μέση ετήσια παραγωγή ανά δέντρο περίπου 3kg, κατά πολύ μεγαλύτερη από όλα τα άλλα ελληνικά πεύκα (και ειδικότερα την τραχεία και μαύρη πεύκη). Βέβαια, οι χαμηλές τιμές πώλησης της ρητίνης και η δυσκολία στη συλλογή της, έχουν απομακρύνει τους παραδασόβιους πληθυσμούς από το επάγγελμα του ρητινοσυλλέκτη.

Καθώς αποτελεί ένα από τα κυρίαρχα είδη της λεκάνης της Μεσογείου, η χαλέπιος πεύκη έχει απασχολήσει τους ερευνητές και στο επίπεδο της γενετικής ανάλυσης. Μέχρι σήμερα, μελέτες γενετικής ανάλυσης και ταυτοποίησης με γενετικούς δείκτες (ισοένζυμα, μοριακά), έχουν γίνει από τους Schiller κ.ά. (1986), Korol κ.ά. (1995), Teisseire κ.ά. (1995), Korol και Schiller (1996), Agúndez κ.ά. (1997), Panetsos κ.ά. (1997), Σκαλτσογιάννης (1997), Μουλαλής κ.ά. (1999), Gómez κ.ά. (2002), Korol κ.ά. (2002) και Scaltsoyiannes (2004).

Γνωρίζοντας την γενετική ποικιλότητα ( $\bar{H}_e$ ) ενός είδους, μπορούμε αφενός να προβούμε σε ενέργειες σχετικά με την προστασία του και αφετέρου να προχωρήσουμε σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης. Συνεπώς, βασική προϋπόθεση για τη γενετική βελτίωση ενός είδους, σχετικά με κάποιο γνώρισμα που μας ενδιαφέρει οικονομικά, είναι η ύπαρξη γενετικής ποικιλότητας. Η ποσότητα παραγόμενης ρητίνης από τη χαλέπιο πεύκη είναι ένα ποσοτικό γνώρισμα με οικονομικό ενδιαφέρον και δεδομένων των προβλημάτων που σχετίζονται με τη ρητινοσυλλογή τις τελευταίες δεκαετίες, το συγκεκριμένο γνώρισμα αποτέλεσε το θέμα έρευνας της παρούσας εργασίας.

Συγκεκριμένα, πρωταρχικός σκοπός ήταν ο εντοπισμός και η επιλογή δέντρων που παράγουν μεγάλη ποσότητα ρητίνης. Στη συνέχεια, η ισοενζυμική ανάλυση και ο υπολογισμός της γενετικής ποικιλότητας, καθώς και άλλων γενετικών δεικτών, των επιλεγμένων δέντρων αποτέλεσε το δεύτερο σκοπό. Τέλος, ο τρίτος σκοπός της εργασίας ήταν οι προκαταρκτικές αναλύσεις για την ταυτοποίηση κάποιων εκ των επιλεγμένων ατόμων με τη μέθοδο των μοριακών δεικτών και συγκεκριμένα με τη μέθοδο του Τυχαία Ενισχυμένου Πολυμορφικού DNA (RAPD). Τα παραγωγικά σε ρητίνη δέντρα μπορούν να αποτελέσουν το φυτικό υλικό, μέσω εμβολιασμών, στην εγκατάσταση κήπων σποροπαραγωγής για την παραγωγή βελτιωμένου υλικού ή απευθείας στην ίδρυση βιομηχανικών φυτειών.

### **Υλικά και Μέθοδοι**

Το υλικό της έρευνας το αποτέλεσαν υψηλοπαραγωγικά σε ρητίνη δέντρα χαλεπίου πεύκης από τις περιοχές της Κασσάνδρας Χαλκιδικής και Κιρύνθου Β. Εύβοιας. Ως ελάχιστη παραγωγή ρητίνης ανά δέντρο και κατ' έτος τέθηκαν τα 10kg. Η παραγόμενη ρητίνη των επιλεγμένων ατόμων μετρήθηκε (ζυγίστηκε) για δύο συνεχόμενες χρονιές, το 2006 και το 2007. Τελικά επιλέχθηκαν 19 δέντρα από τη Χαλκιδική και 11 δέντρα από την Εύβοια. Παράλληλα, ως μάρτυρες που παράγουν μικρή ποσότητα ρητίνης, εντοπίστηκαν 11 δέντρα στη Χαλκιδική και 9 στην Εύβοια. Από τα επιλεγμένα δέντρα συλλέχθηκαν ώριμοι θηλυκοί κώνοι, από τους οποίους απομονώθηκε το ενδοσπέρμιο (μεγαγαμετόφυτο) το οποίο χρησιμοποιήθηκε το για τις εργαστηριακές αναλύσεις. Η απομόνωση και η ομογενοποίηση (λειοτριβίση) των ενδοσπερμίων έγινε σύμφωνα με τους Conkle κ.ά. (1982).

Για την ηλεκτροφόρηση των ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν τα ηλεκτροφορητικά συστήματα των Cheliak και Pitel (1985) (α,β) και Conkle κ.ά. (1982) (γ):

α) ηλεκτροφορητικό σύστημα **Lithium-Borate-Tris-Citrate** (LBTC ή B), όπου αναλύθηκαν τα ενζυμικά συστήματα: Γλουταμινική Αφυδρογονάση (GDH), Λευκίνη Αμινοπεπτιδάση (LAP) και Ισομεράση της Φωσφογλυκόζης (PGI).

β) ηλεκτροφορητικό σύστημα **Histidine-HCl** (H),

όπου αναλύθηκαν τα ενζυμικά συστήματα: 6-Φωσφογλυκονική Αφυδρογονάση (6PGD), Μηλική Αφυδρογονάση (MDH), Ρεδουκτάση της Μεναντιόνης (MNR), Φωσφογλυκομουτάση (PGM) και Ισοκιτρική Αφυδρογονάση (IDH).

γ) ηλεκτροφορητικό σύστημα **Morpholine-Citrate (D)**,

όπου αναλύθηκαν τα ενζυμικά συστήματα: 6-Φωσφορική Αφυδρογονάση της Γλυκόζης (G6PD) και MDH (και σε αυτό το ενζυμικό σύστημα).

Για να βρεθούν όλα τα πιθανά αλληλόμορφα μιας γονιδιακής θέσης του κάθε επιλεγμένου ατόμου, αναλύθηκαν επτά μεγαγαμετόφυτα από κάθε άτομο (Morris και Srieth, 1978). Οι γονιδιακές θέσεις και τα αλληλόμορφα αριθμήθηκαν με αύξουσα σειρά από την άνοδο προς την κάθοδο.

Η εκτίμηση των διάφορων γενετικών παραμέτρων (White κ.ά., 2007), έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού GenAlex 6.41 (Peakall και Smouse, 2006). Συγκεκριμένα:

Υπολογίστηκαν οι **συχνότητες αλληλομόρφων** σε κάθε γονιδιακή θέση. Εκτιμήθηκε η **παρατηρούμενη ετεροζυγωτία  $H_o$** , η οποία υπολογίζεται απευθείας από την παρατήρηση των γενοτυπικών συχνοτήτων και η **αναμενόμενη ετεροζυγωτία  $H_e$**  (ή **γενετική ποικιλότητα**). Εκτιμήθηκε ο **δείκτης  $F$**  ή  $F_S$  ως μέτρο της έλλειψης ή της περίσσειας ετεροζυγωτων για κάθε γονιδιακή θέση ενώ για τους υποληθυσμούς και πληθυσμούς (τις ομάδες των επιλεγμένων ατόμων στην προκειμένη περίπτωση) εκτιμήθηκαν οι δείκτες  $F$  του Wright (1946, 1951, 1965):  $F_{IS}$  (δείκτης ομομιξίας των ατόμων σε σχέση με τον πληθυσμό),  $F_{IT}$  (δείκτης ομομιξίας των ατόμων σε σχέση με το σύνολο των πληθυσμών) και  $F_{ST}$  (δείκτης ομομιξίας των πληθυσμών σε σχέση με το σύνολο των πληθυσμών που μας δίνει το ποσοστό της γενετικής ποικιλότητας που βρίσκεται μεταξύ των υποπληθυσμών). Τέλος, υπολογίστηκε η γονιδιακή ροή  $N_m$  (ή αριθμός μεταναστεύσεων σε μια γενιά).

Για την ταυτοποίηση και τον διαχωρισμό των επιλεγμένων ατόμων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Τυχαία Ενισχυμένου Πολυμορφικού DNA (RAPD). Οι δείκτες αυτοί ήταν οι πρώτοι, βασισμένοι στη PCR δείκτες, που αναπτύχθηκαν και αποτελούν τμήματα DNA που δημιουργήθηκαν μέσω της PCR αντίδρασης με τη χρήση τυχαίων 10-μερών εκκινητών (Williams κ.ά. 1990, Welsh και McClelland 1990). Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση και απομόνωση του DNA αποτελούνταν από ενδοσπέρμια, τεσσάρων επιλεγμένων ως προς τη παραγωγή ρητίνης, ατόμων χαλεπίου πεύκης, δυο άτομα προέρχονται από την περιοχή της Κασσάνδρας και τα άλλα δυο από την περιοχή των Βασιλικών στη Β. Εύβοια. Η διαδικασία απομόνωσης των ενδοσπερμίων ήταν όμοια όπως και στη περίπτωση των ισοενζύμων. Η εκχύλιση του DNA έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο CTAB (Doyle και Doyle 1987), με κάποιες τροποποιήσεις οι οποίες αποδείχτηκαν αποτελεσματικές ως προς την τελική ποσότητα και ποιότητα DNA που απομονώθηκε. Η ποιότητα και η ποσότητα του DNA εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο της φασματοφωτομέτρησης (Φασματοφωτόμετρο Biomate 3). Η ενίσχυση του DNA μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε συσκευή θερμικών κύκλων τύπου Mastercycler Eppendorf ep Gradient S με το πρόγραμμα σύμφωνα με τους Gomez κ.ά. (2001). Για την ανίχνευση εκκινητών που παρουσιάζουν πολυμορφισμούς, αρχικά δοκιμάστηκαν 30 εκκινητές με τη χρήση DNA από απλοειδή μεγαγαμετόφυτα των επιλεγμένων ατόμων και από τους οποίους τελικά επιλέχθηκαν 6 (OPA01, OPA07, OPE02, OPH05, OPH07 και OPH09).

Ο όγκος του μίγματος αντίδρασης ήταν 25μl και περιείχε: 2,5 μl 10X Buffer, 2

mM Mg<sup>2+</sup>, 200 μM dNTPs, 200 nM εκκινητή, 0.75 U Taq πολυμεράση, 10 ng DNA. Η οριζόντια υποβρύχια ηλεκτροφόρηση του πολλαπλασιασμένου DNA, πραγματοποιήθηκε σε πηκτική αгарόζης 1,5% η οποία περιείχε και διάλυμα βρωμιούχου εθιδίου (EtBr), συγκέντρωσης 0,5 mg/ml. Το ρυθμιστικό διάλυμα 0,5 X TBE, χρησιμοποιήθηκε τόσο για την πλήρωση της συσκευής όσο και για την παρασκευή της πηκτής. Ποσότητα ίση με 10μl από το προϊόν της αντίδρασης και 5μl από το ρυθμιστικό διάλυμα πλήρωσης φρεατίων πηκτής (loading buffer) 6X, ηλεκτροφορήθηκαν περίπου για 1 ώρα σε συνεχές ρεύμα τάσης 80V. Το μέγεθος των προϊόντων της ενίσχυσης του DNA εκτιμήθηκε με βάση σκάλα DNA γνωστών μοριακών μεγεθών, Ladder 123 bp της εταιρίας Sigma (D5042). Ο προσδιορισμός του μεγέθους των τμημάτων έγινε με το πρόγραμμα DNAsize (Raghava 1994). Με την παραδοχή ότι ισχύει ο Μενδελικός 1:1 διαχωρισμός των RAPD τμημάτων, αναλύθηκαν 7 ενδοσπερμια ανά άτομο το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό των ετεροζυγωτών σε ποσοστό περίπου 100% (Morris και Spieth 1978). Οι γενότυποι ταυτοποιήθηκαν με το λογισμικό GenAlex 6.41 (Peakall και Smouse 2006).

#### Αποτελέσματα

Συνολικά εντοπίστηκαν 14 γονιδιακές θέσεις με 27 αλληλομόρφα. Τα αλληλόμορφα κάθε γονιδιακής θέσης, καθώς και οι συχνότητές τους παρουσιάζονται στον Πίν. 1.

**Πίνακας 1.** Οι γονιδιακές θέσεις και οι συχνότητες των αλληλομόρφων σε κάθε ομάδα δέντρων

**Table 1.** Loci and allele frequencies for each group of trees

Γονιδιακή Θέση	6PGD-A		6PGD-B		MNR		IDH-A	IDH-B		LAP		PGI	
	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2
Χ Π	0,711	0,289	0,763	0,237	0,737	0,263	1	0,289	0,711	0,447	0,553	0,105	0,895
Χ Σ	0,818	0,182	0,773	0,227	0,818	0,182	1	0,227	0,773	0,318	0,682	0,136	0,864
Ε Π	0,818	0,182	0,909	0,091	0,682	0,318	1	0,045	0,955	0,682	0,318	0,409	0,591
Ε Σ	0,722	0,278	0,611	0,389	0,556	0,444	1	0	1	0,778	0,222	0,056	0,944

  

Γονιδιακή Θέση	MDH-A		MDH-B		MDH-C				MDH-D		PGM	G6PD		GDH
	1	2	1	2	1	2	3	4	1	2	1	1	2	1
Χ Π	0	1	1	0	0	0,079	0,105	0,816	0,868	0,132	1	0,579	0,421	1
Χ Σ	0,091	0,909	0,955	0,045	0	0	0,091	0,909	0,636	0,364	1	0,636	0,364	1
Ε Π	0	1	0,909	0,091	0,045	0,045	0	0,909	0,591	0,409	1	0,682	0,318	1
Ε Σ	0	1	0,944	0,056	0,056	0	0,056	0,889	0,722	0,278	1	0,667	0,333	1

Χ Π= Παραγωγικά δέντρα Χαλκιδικής, Χ Σ= Στείρα δέντρα Χαλκιδικής, Ε Π= Παραγωγικά δέντρα Εύβοιας και Ε Σ= Στείρα δέντρα Εύβοιας

Χ Π= Chalkidiki plus trees, Χ Σ= Chalkidiki control trees, Ε Π= Euboiia plus trees and Ε Σ= Euboiia control trees

Η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, η αναμενόμενη ετεροζυγωτία και ο δείκτης *F* παρουσιάζονται στον Πίν. 2.

**Πίνακας 2.** Παρατηρούμενη ( $H_o$ ) και αναμενόμενη ( $H_e$ ) ετεροζυγωτία και ο δείκτης  $F$  των παραγωγικών και στείρων δέντρων της Χαλκιδικής και της Εύβοιας.

**Table 2.** Observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity and fixation index  $F$  for plus and control trees from Chalkidiki and Euboea

Γονιδιακή θέση	Παραγωγικά δέντρα						Στείρα δέντρα					
	Χαλκιδική			Εύβοια			Χαλκιδική			Εύβοια		
	$H_o$	$H_e$	$F$	$H_o$	$H_e$	$F$	$H_o$	$H_e$	$F$	$H_o$	$H_e$	$F$
6PGD-A	0,579	0,411	-0,407	0,182	0,298	0,389	0,364	0,298	-0,222	0,333	0,401	0,169
6PGD-B	0,263	0,361	0,272	0,182	0,165	-0,100	0,455	0,351	-0,294	0,556	0,475	-0,169
MNR	0,316	0,388	0,186	0,455	0,434	-0,048	0,364	0,298	-0,222	0,667	0,494	-0,350
IDH-A	0,000	0,000	#Δ/Y	0,000	0,000	#Δ/Y	0,000	0,000	#Δ/Y	0,000	0,000	#Δ/Y
IDH-B	0,474	0,411	-0,152	0,091	0,087	-0,048	0,455	0,351	-0,294	0,000	0,000	#Δ/Y
LAP	0,474	0,494	0,042	0,455	0,434	-0,048	0,636	0,434	-0,467	0,444	0,346	-0,286
PGI	0,105	0,188	0,441	0,818	0,483	-0,692	0,091	0,236	0,614	0,111	0,105	-0,059
MDH-A	0,000	0,000	#Δ/Y	0,000	0,000	#Δ/Y	0,182	0,165	-0,100	0,000	0,000	#Δ/Y
MDH-B	0,000	0,000	#Δ/Y	0,182	0,165	-0,100	0,091	0,087	-0,048	0,111	0,105	-0,059
MDH-C	0,263	0,317	0,170	0,182	0,169	-0,073	0,182	0,165	-0,100	0,222	0,204	-0,091
MDH-D	0,263	0,229	-0,152	0,636	0,483	-0,316	0,364	0,463	0,214	0,556	0,401	-0,385
PGM	0,000	0,000	#Δ/Y	0,000	0,000	#Δ/Y	0,000	0,000	#Δ/Y	0,000	0,000	#Δ/Y
G6PD	0,526	0,488	-0,080	0,636	0,434	-0,467	0,727	0,463	-0,571	0,667	0,444	-0,500
GDH	0,000	0,000	#Δ/Y	0,000	0,000	#Δ/Y	0,000	0,000	#Δ/Y	0,000	0,000	#Δ/Y
Μέση τιμή	0,233	0,235	0,036	0,273	0,225	-0,150	0,279	0,236	-0,135	0,262	0,213	-0,192
SE	0,058	0,053	0,069	0,074	0,052	0,077	0,064	0,045	0,087	0,071	0,054	0,055

SE= Τυπικό σφάλμα και #Δ/Y = Δεν υπολογίζεται

SE= Standard error and #Δ/Y = Undefined

Τα  $F$ -στατιστικά του Wright, καθώς και η γονιδιακή ροή  $Nm$ , υπολογίστηκαν για τα ακόλουθα ζεύγη των επιλεγμένων δέντρων: α) Παραγωγικά δέντρα Χαλκιδικής με Εύβοιας και β) Στείρα δέντρα Χαλκιδικής με Εύβοιας. Τα αποτελέσματά τους δίνονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3.**  $F$ -στατιστικά του Wright και  $Nm$

**Table 3.** Wright's  $F$ -statistics and  $Nm$

Γονιδιακή θέση	Παραγωγικά δέντρα				Στείρα δέντρα			
	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$Nm$	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$Nm$
6PGD-A	-0,073	-0,056	0,016	15,291	0,003	0,016	0,013	18,971
6PGD-B	0,155	0,188	0,039	6,184	-0,222	-0,185	0,031	7,911
MNR	0,063	0,066	0,004	67,850	-0,302	-0,198	0,080	2,868
IDH-A	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y
IDH-B	-0,133	-0,012	0,107	2,091	-0,294	-0,128	0,128	1,700
LAP	0,000	0,056	0,056	4,222	-0,386	-0,091	0,213	0,923
PGI	-0,375	-0,208	0,121	1,819	0,407	0,418	0,019	13,035
MDH-A	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	-0,100	-0,048	0,048	5,000
MDH-B	-0,100	-0,048	0,048	5,000	-0,054	-0,053	0,001	469,75
MDH-C	0,086	0,107	0,023	10,590	-0,095	-0,088	0,006	38,887
MDH-D	-0,263	-0,140	0,098	2,311	-0,064	-0,055	0,008	29,303
PGM	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y
G6PD	-0,262	-0,248	0,011	21,768	-0,536	-0,535	0,001	247,00
GDH	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y	#Δ/Y
Μέση τιμή	-0,090	-0,030	0,052	9,795	-0,149	-0,086	0,050	59,668
SE	0,046	0,037	0,011	4,789	0,066	0,059	0,018	35,920

SE= Τυπικό σφάλμα και #Δ/Y = Δεν υπολογίζεται  
SE= Standard error and #Δ/Y = Undefined

Η γενετική ταυτότητα των επιλεγμένων ατόμων προκύπτει από τα αλληλόμορφα που εμφάνισε το κάθε άτομο για τις 68 γονιδιακές θέσεις. Στον Πιν.4 παρουσιάζεται το γενετικό προφίλ των ατόμων της Χαλκιδικής και της Εύβοιας, που πήραν μέρος σε αυτό το πείραμα. Παράλληλα, έγινε και έλεγχος για την πιθανή ύπαρξη ιδίων γενοτύπων με βάση τις 68 γονιδιακές θέσεις. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα και τα 4 επιλεγμένα άτομα εμφανίζουν διαφορετικό γενότυπο.

**Πίνακας 4.** Γενότυποι των υψηλοποδοτικών σε ρητίνη ατόμων  
**Table 4.** Genotypes of oleoresin plus trees

ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΘΕΣΕΙΣ	E3	X5	E5	X6	ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΘΕΣΕΙΣ	E3	X5	E5	X6	ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΘΕΣΕΙΣ	E3	X5	E5	X6
ΟΡΑ01-250	11	00	11	00	ΟΡΑ07-1720	11	00	00	00	ΟΡΗ07-620	11	11	11	00
ΟΡΑ01-400	11	11	11	11	ΟΡΑ07-2000+	11	00	00	00	ΟΡΗ07-700	00	00	11	11
ΟΡΑ01-490	11	11	11	00	ΟΡΕ02-600	11	00	11	00	ΟΡΗ07-750	00	11	11	11
ΟΡΑ01-500	00	11	00	11	ΟΡΕ02-850	00	00	00	10	ΟΡΗ07-850	11	11	11	11
ΟΡΑ01-550	11	00	11	00	ΟΡΕ02-900	00	11	00	00	ΟΡΗ07-880	00	00	11	00
ΟΡΑ01-620	00	11	00	00	ΟΡΕ02-980	00	11	10	11	ΟΡΗ07-980	11	11	11	11
ΟΡΑ01-700	11	11	11	00	ΟΡΕ02-1100	11	11	11	11	ΟΡΗ07-1100	00	11	11	11
ΟΡΑ01-750	00	11	00	11	ΟΡΕ02-1230	11	11	11	11	ΟΡΗ07-1470	00	11	11	00
ΟΡΑ01-900	11	00	00	11	ΟΡΕ02-1350	00	00	10	10	ΟΡΗ07-1600	00	11	00	11
ΟΡΑ01-1050	00	11	11	00	ΟΡΕ02-1470	11	11	11	11	ΟΡΗ07-1720	11	11	11	00
ΟΡΑ01-1170	00	00	00	11	ΟΡΕ02-1850	11	11	11	11	ΟΡΗ07-2000	11	11	11	11
ΟΡΑ01-1300	00	00	00	11	ΟΡΗ05-300	11	11	11	11	ΟΡΗ09-500	11	00	11	11
ΟΡΑ01-1400	00	00	11	00	ΟΡΗ05-550	11	11	00	11	ΟΡΗ09-580	00	11	00	00
ΟΡΑ07-400	11	00	00	00	ΟΡΗ05-650	11	11	11	11	ΟΡΗ09-620	00	11	00	00
ΟΡΑ07-490	00	11	00	00	ΟΡΗ05-700	00	11	11	00	ΟΡΗ09-650	00	11	00	00
ΟΡΑ07-750	00	00	11	11	ΟΡΗ05-750	00	11	00	00	ΟΡΗ09-700	00	11	00	11
ΟΡΑ07-850	11	11	00	00	ΟΡΗ05-860	00	00	11	11	ΟΡΗ09-850	11	11	11	11
ΟΡΑ07-980	00	11	11	00	ΟΡΗ05-980	00	11	00	11	ΟΡΗ09-980	00	11	00	11
ΟΡΑ07-1050	00	00	00	11	ΟΡΗ05-1100	00	00	00	11	ΟΡΗ09-1100	11	00	11	00
ΟΡΑ07-1230	00	11	11	11	ΟΡΗ05-1350	11	11	11	11	ΟΡΗ09-1230	00	11	00	11
ΟΡΑ07-1350	11	00	00	00	ΟΡΗ05-2000	11	11	11	11	ΟΡΗ09-1600	11	11	11	00
ΟΡΑ07-1400	00	00	00	11	ΟΡΗ05-2000+	11	11	11	11	ΟΡΗ09-2000+	11	11	11	11
ΟΡΑ07-1600	00	00	11	00	ΟΡΗ07-550	00	00	00	11					

Στον Πίν. 5 παρουσιάζεται ο αριθμός των ατόμων που εμφάνισαν ίδιο γενότυπο σε σχέση με τον αριθμό των γονιδιακών θέσεων που συμπεριλαμβάνονται στην ανάλυση.

**Πίνακας 5.** Ταυτιζόμενοι και μοναδικό γενότυποι ανά συνδυασμό γονιδιακών θέσεων για τα 4 άτομα.

**Table 5.** Matching and unique genotypes for the loci combination of 4 trees.

Αριθμός γονιδιακών θέσεων	#με ταυτιζόμενο γενότυπο	#με μοναδικό γενότυπο	#που ταυτιζονται εκτός 1 Γ.Φ.	#που ταυτιζονται εκτός 2 Γ.Φ.	#που ταυτιζονται εκτός 3 Γ.Φ.
1	4	0	0	0	0
1+2	4	0	4	0	0
1+2+3	2	2	4	3	0

1+2+3+4	2	2	2	3	3
1+2+3+4+5	2	2	2	0	3
1+2+3+4+5+6	2	2	0	2	0
1+2+3+4+5+6+7	2	2	0	0	2
1+2+3+4+5+6+7+8	2	2	0	0	2
1+2+3+4+5+6+7+8+9	0	4	2	0	0
1+2+3+4+5+6+7+8+9+10	0	4	0	2	0
.....	.....	.....	.....	.....	.....
1+2+3+4.....67+68	0	4	0	0	0

#= Αριθμός δέντρων, Γ.Θ. = Γονιδιακή θέση

#= Number of trees, Γ.Θ. = Locus

Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι ο πλήρης διαχωρισμός των επιλεγμένων ατόμων γίνεται αν ληφθούν υπόψη 9 γονιδιακές θέσεις. Η πιθανότητα να βρεθεί ένα ακόμη άτομο που να παρουσιάζει τον ίδιο γενότυπο σε αυτό τον αριθμό των γονιδιακών θέσεων είναι ίση με  $7,3 \times 10^{-4}$ . Η αντίστοιχη πιθανότητα για το σύνολο των 68 γονιδιακών θέσεων είναι ίση με  $2,7 \times 10^{-20}$ , που θεωρείται εξαιρετικά μικρή. Η ιδιαιτερότητα των ατόμων αυτών, ως προς την παραγωγή ρητίνης, είναι και ο λόγος της ταυτοποίησης τους έτσι ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους στο μέλλον από άλλα διαφορετικά άτομα, που έχουν όμως επιλεγθεί για το συγκεκριμένο γνώρισμα, και όχι από τυχαία άτομα του πληθυσμού.

#### Συζήτηση – Συμπεράσματα

Από τα 27 αλληλόμορφα (Πίν. 1) που εντοπίστηκαν στις 4 ομάδες δέντρων (παραγωγικά και στείρα Χαλκιδικής, παραγωγικά και στείρα Εύβοιας), ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το IDH-B-1, το οποίο εμφανίστηκε στα δέντρα της Χαλκιδικής με μέτριες συχνότητες 0,289 και 0,227 για τα παραγωγικά και τα στείρα δέντρα, αντίστοιχα. Όμως, στα παραγωγικά δέντρα της Εύβοιας η συχνότητά του ήταν πάρα πολύ μικρή (0,045) ενώ δεν εντοπίστηκε στα στείρα δέντρα της ίδιας περιοχής. Πιθανόν, το συγκεκριμένο αλληλόμορφο να μην συναντάται με μεγάλη συχνότητα στον πληθυσμό της Εύβοιας και γι' αυτό δεν βρέθηκε και μεταξύ των επιλεγμένων ατόμων. (Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων, η απουσία κάποιου αλληλομόρφου ή η συχνότητα της παρουσίας του, πιθανόν να οφείλεται στο μέγεθος του δείγματος και μόνο. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι ενδεικτικά των συγκεκριμένων ομάδων δέντρων και δείχνουν κάποιες τάσεις.) Αντιθέτως, το αλληλόμορφο MDH-C-1 εντοπίστηκε σε πολύ μικρές συχνότητες (0,045 στα παραγωγικά και 0,056 στα στείρα) στην Εύβοια ενώ δεν ανιχνεύθηκε στα επιλεγμένα δέντρα της Χαλκιδικής. Παράλληλα, το αλληλόμορφο MDH-C-2 εντοπίστηκε μόνο μεταξύ των παραγωγικών δέντρων, τόσο της Χαλκιδικής όσο και της Εύβοιας. Πιθανόν, το συγκεκριμένο αλληλόμορφο να είναι δείκτης διαχωρισμού των παραγωγικών από τα στείρα άτομα. Πάντως, όσον αφορά στις συχνότητες αλληλομόρφων, παρατηρούνται παρόμοιες τιμές και στις 4 ομάδες δέντρων για την κάθε γονιδιακή θέση αντίστοιχα. Εξαιρέση αποτελεί ίσως, η γονιδιακή θέση PGI στα παραγωγικά άτομα της Εύβοιας, όπου το αλληλόμορφο PGI-1 εμφανίστηκε με συχνότητα 0,409, ενώ στις υπόλοιπες ομάδες δέντρων βρέθηκε σε συχνότητες από 0,056 έως 0,136.

Όσον αφορά στις αναμενόμενες ετεροζυγωτίες στις 4 ομάδες δέντρων, παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές (Πίν. 2). Μάλιστα, η ψηλότερη τιμή ήταν  $H_e=0,494$

στην LAP των παραγωγικών δέντρων της Χαλκιδικής και την MNR των στείρων δέντρων της Εύβοιας. Πάντως, οι  $\bar{H}_e$  και για τις 4 ομάδες δέντρων ήταν πολύ κοντά και κυμάνθηκαν από 0,213 ως 0,236. Αυτές οι τιμές γενετικής ποικιλότητας θεωρούνται υψηλές για το συγκεκριμένο είδος (Loukas κ.ά. 1983 και Schiller κ.ά. 1986). Οι Korol κ.ά. (2002) που μελέτησαν τους πληθυσμούς χαλεπίου πεύκης της Κασσάνδρας και της Β. Εύβοιας, βρήκαν λίγο χαμηλότερες αντίστοιχες τιμές  $\bar{H}_e$ .

Η ανάλυση των στατιστικών δεικτών  $F$  του Wright (Πίν. 3), έγινε μεταξύ των παραγωγικών ατόμων της Χαλκιδικής και της Εύβοιας, καθώς και μεταξύ των στείρων ατόμων της Χαλκιδικής και της Εύβοιας. Και στις δύο περιπτώσεις, η γενετική ποικιλότητα που οφείλεται στις διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ήταν μικρή και ίδιου μεγέθους,  $F_{ST}= 0,052$  για τα παραγωγικά και  $F_{ST}= 0,050$  για τα στείρα δέντρα. Επίσης, οι μέσες τιμές των δεικτών  $F_{IS}$  και  $F_{IT}$  και για τις δύο αναλύσεις βρέθηκαν σχετικά κοντά στο 0, γεγονός που καταδεικνύει πως για τις ομάδες των υπό μελέτη δέντρων ισχύει η ισορροπία Hardy-Weinberg. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί πως το  $F_{IS}$  των στείρων δέντρων, εμφάνισε μια μέτρια αρνητική απόκλιση από το 0 ( $F_{IS}= -0,149$ ) η οποία δείχνει μια περίσσεια ετεροζυγωτίας σε αυτά τα άτομα. Αξιοσημείωτη είναι επίσης η τιμή του  $F_{IS}$  στην γονιδιακή θέση PGI. Στα μεν παραγωγικά βρέθηκε ίση με  $-0,375$ , που σημαίνει σημαντική περίσσεια ετεροζυγωτίας, στα δε στείρα δέντρα βρέθηκε ίση με  $0,407$ , που σημαίνει σημαντική έλλειψη ετεροζυγωτίας. Η μεγάλη αυτή διαφορά οφείλεται στη σημαντική ετεροζυγωτία των παραγωγικών ατόμων της Εύβοιας (περίπου 82% των ατόμων βρέθηκαν ετεροζύγωτα στη συγκεκριμένη γονιδιακή θέση). Τέλος, η γονιδιακή ροή  $Nm$  διέφερε σημαντικά μεταξύ των παραγωγικών και των στείρων ατόμων. Μεταξύ των παραγωγικών ατόμων της Χαλκιδικής και της Εύβοιας βρέθηκε ότι μετακινούνται περίπου 10 ανά γενιά, ενώ μεταξύ των στείρων περίπου 60 άτομα ανά γενιά.

Η μέθοδος του Τυχαία Ενισχυμένου Πολυμορφικού DNA (RAPD) με τη χρήση 6 εκκινητών, αποτέλεσε μια απλή και σίγουρη διαδικασία για την ταυτοποίηση και τον διαχωρισμό των 4 επιλεγμένων ατόμων. Η συγκεκριμένη τεχνική ταυτοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και διαχωρισμό πλήθους ακόμη ατόμων όπως αποδεικνύεται από την πολύ μικρή πιθανότητα ταυτόσημου γενοτύπου που υπολογίστηκε με τις συγκεκριμένες γονιδιακές θέσεις για τα αναλυθέντα άτομα.

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε πως αφού βρέθηκαν υψηλές τιμές ετεροζυγωτίας στα επιλεγμένα άτομα, υπάρχουν περιθώρια γενετικής βελτίωσης του είδους ως προς κάποιο γνώρισμα που μας ενδιαφέρει οικονομικά. Εν προκειμένω, το γνώρισμα οικονομικού ενδιαφέροντος είναι η ποσότητα παραγόμενης ρητίνης και θα πρέπει να γίνουν προσπάθειες για την εγκατάσταση σποροπαραγωγών κήπων επιλεγμένων υψηλοαποδοτικών σε ρητίνη ατόμων χαλεπίου πεύκης ή βιομηχανικών φυτειών απευθείας.

#### **Isozyme analysis of selected high-yielding oleoresin trees of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) and their fingerprinting with molecular markers**

**KARANIKAS CHRISTOFOROS, MITRAS DIMITRIOS, TSAKTSIRA MARIA  
and APOSTOLOS SCALTSOYIANNES**



Aristotle University of Thessaloniki, School of Forestry and Natural Environment, Lab of Forest Genetics and Plant Breeding, P.O. Box 238, 54124 Thessaloniki, Fax: +302310992777, e-mail: [skaltsoy@for.auth.gr](mailto:skaltsoy@for.auth.gr)

#### **Abstract**

High-yielding oleoresin trees were located and selected in Chalkidiki and Euboia. Starch gel electrophoresis was used in order to analyze the endosperms of the selected trees. Ten enzyme systems were applied which resulted in 14 loci with 27 alleles. Mean expected heterozygosity  $\bar{H}_e$  for the plus trees was 0,235 and 0,225 for Chalkidiki and Euboia, respectively. Between the two (Chalkidiki and Euboia) high-yielding groups of trees was found a small excess of heterozygosity ( $F_{IS}=-0,090$ ), while the proportion of genetic diversity between the two groups accounted for 5,2% of the total genetic variation. The number of migrants  $Nm$  between Chalkidiki and Euboia plus trees was also calculated and it was about 10 individuals per generation. Furthermore, a first analysis for the discrimination and the fingerprinting of certain selected trees was performed with molecular markers (RAPDS). In total, six primers were applied which resulted in 68 loci. The discrimination and fingerprinting of the selected trees was successful using just 9 loci.

#### **Βιβλιογραφία**

- Αθανασιάδης, Ν.Η., 1986. Δασική Βοτανική: Δέντρα και θάμνοι των δασών της Ελλάδος II. Εκδόσεις Γιαχούδη – Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, σελ. 17-19.
- Cheliak, W.M. and Pitel, J.A., 1985. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes of forest tree species. Information report PI-X-42, Nat. Fores. Inst., Petawawa.
- Conkle, M.T., Hodgkiss, P.D., Nunnally, L.B. and Hunter, S.C., 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. Res. Note PSW-64. USDA, Forest Service, Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Berkley.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Gómez, A., Alia, R. and Bueno, M.A., 2001. Genetic diversity of *Pinus halepensis* Mill. populations detected by RAPD loci. *Ann. For. Sci.* 58: 869-875.
- Gómez, A., Aravanopoulos, F.A., Bueno, M.-A., Alia, R., 2002. Linkage of random amplified polymorphic DNA markers in *Pinus halepensis* Mill. *Silvae Genetica*, Volume 51, Issue 5-6, 2002, Pages 196-201.
- Korol, L. and Schiller, G., 1996. Relations between native Israeli and Jordanian Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) based on allozyme analysis: a note. *Forest Genetics* 3: 197-202.
- Korol, L., Madmony, A., Riov, Y. and Schiller, G., 1995. *Pinus halepensis* × *Pinus brutia* subsp. *brutia* hybrids? Identification using morphological and biochemical traits. *Silvae Genetica* 44: 186-190.
- Korol, L., Shklar, G. and Schiller, G., 2002. Diversity among circum-Mediterranean populations of Aleppo pine and differentiation from *Brutia* pine in their isoenzymes: additional results. *Silvae Genetica* 51: 35-41.
- Loukas, M., Vergini, Y. and Krimbas, C.B., 1983. Isozyme variation and heterozygosity in *Pinus halepensis* L.. *Biochem. Genetics* 21: 497-509.

- Morris, R.W. and Spieth, P.T., 1978. Sampling strategies for using female gametophytes to estimate heterozygosities in conifers. *Theor. Appl. Genet.* 51: 217-222.
- Μουλαλής, Δ., Πανέτσος, Κ.Π., Σκαλτσογιάννης, Α., Αραβανόπουλος, Φ.Α., Τσακτσίρα Μ. και Γ., Πασαγιάννης, 1999. "Πιστοποίηση και απόδοση τεχνητών υβριδίων F1 γενεάς μεταξύ τραχείας και χαλεπίου πεύκης". Πρακτικά 8ου Πανελληνίου Συνεδρίου της Ελληνικής Δασολογικής Εταιρείας, Αλεξανδρούπολη 1998, σελ. 354-360.
- Panetsos, K., Scaltsoyiannes, A., Aravanopoulos, F., Dounavi, K. and A., Demetrakopoulos, 1997. "Identification of *Pinus brutia* and their putative interspecific natural hybrids". *Silvae Genetica* 46, 253-257.
- Peakall, R. and Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Raghava, G.P.S., 1994. Improved estimation of DNA fragment lengths from gel electrophoresis. *Biotechniques* 17: 100-104.
- Ronning, C.M. and Schnell, R.J., 1995. Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Theobroma cacao* L. *Amer.Soc.Hort.Sci.*, 120: 681-686.
- Σκαλτσογιάννης, Α., 1997. "Πιστοποίηση τεχνητών υβριδίων πεύκης F1 γενιάς: *Pinus brutia* x *P. halepensis* και *Pinus nigra* var. *austriaca* x *P. sylvestris*, με τη χρήση των ισοενζυμικών δεικτών της μηλικής αφυδρογονάσης (MDH)". Υπό Δημοσίευση στην Επετηρίδα του Τμήματος Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος προς τιμή του ομότιμου Καθηγητή Κ.Π. Πανέτσου, Τόμος Μ/2: 837-850.
- Scaltsoyiannes, A., 2004. "Identification by isozyme gene markers of European pine species used for ornamental purposes". *Propagation of Ornamental Plants*, 4(1): 42-46.
- Schiller, G., Conkle, M.T. and Grunwald, C., 1986. Local differentiation among Mediterranean populations of Aleppo pine in their isoenzymes. *Silvae Genetica* 35: 11-19.
- Teisseire, H., Fady, B. and Pichot, C., 1995. Allozyme variation in five French populations of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Miller). *Forest Genetics* 2: 225-236.
- Vidakovic, M., 1991. Conifers. Morphology and variation. Zagreb., Graficki Zavod Hrvatske, 755 pp.
- Welsh, J. and McClelland, (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski J.A. and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- White, T., Adams, T. and D. Neale, 2007. *Forest Genetics*. CABI Publishing, 800 pp.
- Wright, S., 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics* 31: 39-59.
- Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics* 15:323-354.
- Wright, S., 1965. The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. *Evol.* 19:395-420.