

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ  
ΒΑΛΚΑΝΙΚΗΣ Ή ΠΕΝΤΑΒΕΛΟΝΟΥ ΠΕΥΚΗΣ (*Pinus peuce*) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ  
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ**

**Μιαούλης Μιχάλης, Τσακτσίρα Μαρία και Σκαλτσογιάννης Απόστολος**

Εργαστήριο Δασικής Γενετικής και Βελτίωσης Δασοπονικών Ειδών  
Σχολή Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης  
e-mail: [skaltsoy@for.auth.gr](mailto:skaltsoy@for.auth.gr), τηλ. 2310992776

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η *Pinus peuce* είναι ενδημικό είδος πενταβέλονης πεύκης και απαντάται στη Βαλκανική Χερσονήσο. Θεωρείται λείψανο της τριτογενούς χρονο-γεωλογικής περιόδου. Είναι η μοναδική πενταβέλονη πεύκη στην Ευρώπη του υπομημήματος *Strobi*. Είναι είδος πολύ ανθεκτικό στο ψύχος και θεωρείται ένα από τα κατεξοχή αναδασωτικά είδη για αλπικές και υπαλπικές περιοχές. Είναι ανθεκτικό στην προσβολή από το *Cronartium ribicola* (μύκητας που προκαλεί τη φλυκταινώδη σκωρίαση των λευκών πεύκων) και έχει χρησιμοποιηθεί στην δημιουργία ανθεκτικών υβριδίων. Στην παρούσα εργασία αναλύθηκε η γενετική ποικιλότητα δέντρων από τους δύο μοναδικούς Ελληνικούς πληθυσμούς (Ροδόπης και Αριδαίας) με τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD). Αναλύθηκαν 10 δέντρα από κάθε πληθυσμό. Διαπιστώθηκε ο μενδελικός διαχωρισμός σε τρεις γονιδιακές θέσεις σε απλοειδή ενδοσπέρμια. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης γενετικής ποικιλότητας, εφόσον επιβεβαιωθούν μετά από αύξηση του μεγέθους δείγματος, δείχνουν ότι οι Ελληνικοί πληθυσμοί *P. peuce* αν και ακραίοι διατηρούν αρκετά μεγάλη γενετική ποικιλότητα γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην παλαιότητα του είδους. Επιπλέον από την ανάλυση αυτού του δείγματος φάνηκε η τάση οι δύο πληθυσμοί να διαφοροποιούνται γενετικά σε αρκετά μεγάλο βαθμό. Με βάση το εύρος της γενετικής διαφοροποίησης που εκτιμήθηκε, ο διαχωρισμός των δύο πληθυσμών Αριδαίας και Ροδόπης σε δύο ξεχωριστούς οικοτύπους *P. peuce* δεν μπορεί να αποκλειστεί.

**Λέξεις κλειδιά :** Βαλκανική Πεύκη, πενταβέλονη Πεύκη, *Pinus peuce*, μοριακοί δείκτες, RAPD, γενετική ποικιλότητα.

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η Βαλκανική πεύκη (*P. peuce*) είναι πολύ παλιό είδος ενδημικό της Βαλκανικής Χερσονήσου. Στον Vidakovic αναφέρεται ως λείψανο της περιόδου του Τριτογενούς (1991). Οι de Ferrè και Gaussen (1970) (Vidakovic 1991) σχημάτισαν την υπόθεση,

μελετώντας τις κοτυληδόνες πεύκων, σύμφωνα με την οποία την περίοδο πριν το Πλειστόκαινο υπήρχε το είδος *P. monticola* στην νοτιοδυτική Σιβηρία που θεωρούν ότι είναι κοινός πρόγονος των σημερινών πενταβέλωνων πεύκων, *P. monticola* της Βόρειας Αμερικής, *P. peuce* της Βαλκανικής, *P. wallichiana* των Ιμαλαιοειδών και *P. dalatensis* του νότιου Βιετνάμ. Τα παραπάνω σημερινά είδη προέκυψαν από την μετανάστευση των απογόνων της αρχικής Σιβηρικής *P. monticola* εξαιτίας των παγετώνων.

Είναι από τα ελάχιστα πενταβέλινα είδη πεύκης στην Ευρώπη με ιδιαίτερη οικολογική, αισθητική και οικονομική αξία παγκοσμίως και δεν είναι τυχαίο ότι από πολλούς ερευνητές θεωρείται ως ορεινός «θησαυρός» των Βαλκανίων.

Στη Βαλκανική χερσόνησο απαντάται στη Σερβία, στο Μαυροβούνιο, στην Αλβανία, στην Ελλάδα, στη Βουλγαρία και στο FYROM, σε υψόμετρα από 600m έως 2200m (Fukarek, 1950; Miron, 1967; Popnicola *et al.*, 1978; Jovanovic, 1986; Vidakovic, 1991; Alexandrov 1998).

Στη χώρα μας φύεται στη συνοριακή γραμμή με την Βουλγαρία (οροσειρά Ροδόπης) και τη FYROM (όρος Βόρας). Το ανατολικό σύνορο εξάπλωσης της Βαλκανικής πεύκης, είναι τα Βουλγάρικα βουνά Rila, Pirin, Slavnjanka η δυτική Ροδόπη και δυο ξεχωριστές τοποθεσίες στα βουνά Vitosa και Stara. Απαντάται επίσης sporadικά στα βόρεια σύνορα της χώρας μας με τα βαλκανικά σύνορα.

Η *Pinus peuce* ανήκει στο υπογένος *Strobus*, τμήμα *Strobus*, υποτιμήμα *Strobi* (Price *et al.*, 1998). Όσον αφορά στην ταξινόμηση μέσα στο είδος, υπάρχουν κάποιες απόψεις ότι οι πληθυσμοί της Βουλγαρίας ανήκουν στη διαφορετική ποικιλία *vermiculata* Christ, επειδή διαφέρουν από τους πληθυσμούς των δυτικών Βαλκανίων λόγω των λεπτότερων και κοντότερων βελονών και των μικρότερων κώνων (Cernjavski *et al.*, 1959). Όμως, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ποικιλότητα των πληθυσμών της Βουλγαρίας ουσιαστικά αλληλοκαλύπτεται με αυτή των πληθυσμών των δυτικών Βαλκανίων και η διάκριση ξεχωριστής ποικιλίας δεν είναι δυνατή μόνο με την παρατήρηση (Dobrev, 2007).

Η Βαλκανική πεύκη είναι είδος που ευδοκμεί σε μεγάλα υψόμετρα (600-2200 m) και παρουσιάζει περιορισμένη εξάπλωση, συνήθως σε πυριτικά εδάφη, ενώ έχει αποδειχθεί εξαιρετικά ανθεκτικό σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Θεωρείται ένα από τα κατ'εξοχήν αναδασωτικά είδη για αλπικές και υπαλπικές περιοχές. Είναι ανθεκτική στην προσβολή από τον μύκητα *Cronartium ribicola*.

Παρά το οικονομικό και επιστημονικό ενδιαφέρον έχει μελετηθεί ελάχιστα. Το 1963 οι Hagman & Mikola μελέτησαν τη συμπεριφορά του είδους σε διασταυρώσεις. Ο καρυότυπος του είδους μελετήθηκε από τους Petrovska & Stamenkov (1987), οι οποίοι επιβεβαίωσαν το κλασικό γένωμα των κωνοφόρων  $2n=24$ . Η γενετική και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά μελετήθηκαν σε μεγαλύτερη έκταση από τον Dobrev κατά την περίοδο 1998-2007 (Dobrev 2005, 2007). Οι Liston *et al.* (1999) μελέτησαν το ριβοσωμικό DNA σε 47 είδη πεύκης με σκοπό να ξεκαθαρίσει η ταξινόμηση του γένους. Οι Bogunic *et al.* (2003) μελέτησαν το μέγεθος του γενόματος της *P. peuce*. Η γενετική ανάλυση του είδους είναι περιορισμένη και ως τώρα έχει περιοριστεί στη χρήση βιοχημικών δεικτών (Miron 1967, Dobrev 1992, Henning *et al.* 1994, Petrakis *et al.* 2001) και ισοενζύμων (Zhelev *et al.* 2002, Βαϊτσόπουλος 2009).

Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε ο μεντελικός διαχωρισμός των γονιδιακών θέσεων που

προέκυψαν από γενετικούς δείκτες τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD) και αναλύθηκε η γενετική ποικιλότητα δυο ελληνικών φυσικών πληθυσμών Βαλκανικής πεύκης (*P. peuce*) με την χρήση μοριακών δεικτών (RAPDs).

### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Για την έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκε υλικό από 2 φυσικούς Ελληνικούς πληθυσμούς Βαλκανικής Πεύκης προερχόμενους από την Αριδαία και τη Ροδόπη. Από κάθε πληθυσμό αναλύθηκαν 10 δέντρα. Από κάθε δέντρο συλλέχθηκαν 8-10 ώριμοι κώνοι από το σύνολο της κόμης.

Πριν τη χρησιμοποίησή τους οι σπόροι αποστειρώθηκαν για την αποφυγή επιμολύνσεων κυρίως από μύκητες ή άλλους μικροοργανισμούς, με την διαδικασία που περιγράφηκε από τους Neal et al (1967) και Normand & Fortin (1982).

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε ο απλοειδής ιστός του ενδοσπερμίου των σπόρων και πραγματοποιήθηκε με τροποποιημένο πρωτόκολλο CTAB (Crowley *et al.* 2003) κατάλληλο για την απομάκρυνση λιπιδίων πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών από ιστούς πλούσιους στα παραπάνω μεταβολικά προϊόντα. Μισό ενδοσπέρμιο (0.02 g ιστού) ομογενοποιήθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα 1.5 ml σε 350  $\mu$ l διαλύματος Tris-EDTA (100 mM : 20 mM). Στη συνέχεια προστέθηκαν 140  $\mu$ l διαλύματος CTAB (10 % w/v) για τελική συγκέντρωση 2% και 210  $\mu$ l διαλύματος NaCl (5 M) για τελική συγκέντρωση 1.2 M. Το μείγμα θερμάνθηκε για 60 min στους 65°C παρουσία 4  $\mu$ l (10 mg/ml) Proteinase K (Sigma). Ακολούθησαν 2 φάσεις οργανικού διαχωρισμού. Κατά την πρώτη φάση, 350  $\mu$ l χλωροφορμίου: ισοαμλικής αλκοόλης (24: 1) και 350  $\mu$ l φαινόλης προστέθηκαν στο μείγμα ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 11.500 στροφές για 10 min και η ανώτερη υδατική φάση (600  $\mu$ l) μεταφέρθηκε σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε μια φορά ακόμα μόνο με 600  $\mu$ l χλωροφορμίου αυτή τη φορά. Το DNA κατακρημνίστηκε με έναν όγκο κρύας ισοπροπανόλης (- 20 °C) και μετά από φυγοκέντρωση (10 min στις 10.000 στροφές) απορρίφθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα του DNA ξεπλύθηκε με κρύα αλκοόλη (70 %) και αφέθηκε να στεγνώσει. Προστέθηκαν 100  $\mu$ l απεσταγμένου νερού και 1  $\mu$ l RNAase A (10 mg/ml). Το διάλυμα αφέθηκε στους 37 °C για να δράσει η RNAase A. Ακολούθησε κατακρύμνιση 200  $\mu$ l κρύας απόλυτης αλκοόλης παρουσία 12  $\mu$ l KOAc (3 M), φυγοκέντρωση στις 5000 στροφές για 5 min, απόρριψη του υπερκειμένου και στέγνωμα το ιζήματος DNA επαναδιαλύθηκε σε 50  $\mu$ l TE (10 mM Tris: 1 mM EDTA). Ακολούθησε ποσοτική και ποιοτική ανάλυση του διαλύματος DNA με φασματοφωτόμετρο (Thermo Scientific, Biomate 3).

Για τον πολλαπλασιασμό του DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες: 25  $\mu$ l μείγματος αντίδρασης περιείχε 2,5  $\mu$ l 10X PCR Buffer (Kappa Biosystems), 2 mM Mg<sup>2+</sup> (Kappa Biosystems), 200  $\mu$ M dNTPs (Invitrogen), 200 nM εκκινητή (Operon), 0.75 U Taq πολυμεράση (Kappa Biosystems), 5 ng DNA. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλωτή (Eppendorf) με το πρόγραμμα που ακολουθεί: 1ος κύκλος: 2 min στους 95°C, 1 min στους 42°C, 2 min στους 72°C. 4 κύκλοι: 45 sec στους 95°C, 1 min στους 42°C, 2 min στους 72°C. 30 min: 30 sec στους 95°C, 45 sec στους 36°C, 90 sec στους 72°C.

Ακολουθεί ένα τελευταίο στάδιο για 8 λεπτά στους 72 °C και στη συνέχεια η θερμοκρασία κατεβαίνει στους 15 °C μέχρι να βγουν τα δείγματα από το μηχανήμα. Η ανάλυση των προϊόντων του πολλαπλασιασμού έγινε σε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.5% w.v και προσθήκη EtBr (0,5 µg/mL). Η ποσότητα που ηλεκτροφορήθηκε από το κάθε δείγμα ήταν 8 µl προϊόντος μαζί με 2 µl loading buffer 6X. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συνεχή ηλεκτρική τάση 5 volt/cm, ενώ το διάλυμα ηλεκτροφόρησης ήταν TBE 0,5x (Tris 0,54% w.v, βορικό οξύ 0,275% w/v., 0,01 M EDTA). Για τον προσδιορισμό του μεγέθους προϊόντων της PCR, χρησιμοποιήθηκε σκάλα γνωστών μοριακών μεγεθών, Ladder 123 bp της Sigma (D5042). Ο προσδιορισμός του μεγέθους έγινε των τμημάτων έγινε με το πρόγραμμα DNAsize (Raghava, 1994).

Δοκιμάστηκε ο διαχωρισμός 40 μειωτικών προϊόντων (ενδοσπερμίων) από ένα δέντρο του πληθυσμού τη Αριδαίας με ένα εκκινητή. Χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο του  $\chi^2$  για τη σύγκριση με τις αναμενόμενες, σύμφωνα με μεντελικό διαχωρισμό, συχνότητες (1 : 1). Για το  $\chi^2$  χρησιμοποιήθηκε λογιστικό φύλλο Excel (Microsoft™).

Για την εύρεση των γενοτύπων κάθε ατόμου καταγράφηκαν αποκλειστικά καθαροί και ισχυροί ζωνότυποι RAPD. Για να εκτιμηθεί η επαναληψιμότητα η κάθε αντίδραση επαναλαμβανόταν και δεύτερη φορά με άλλο μείγμα αντίδρασης. Για κάθε δέντρο των δύο πληθυσμών αναλύθηκαν 7 απλοειδή ενδοσπέρμια. Με αυτό το τρόπο στάθηκε δυνατό να βρεθεί ο γενότυπος του κάθε ατόμου για κάθε γονιδιακή θέση με στατιστική ασφάλεια (  $p=0.0078$  ) και να αναχθούν σε συγκυρίαρχοι οι δείκτες RAPD. Καταρτίστηκε πίνακας των γενοτύπων για κάθε πληθυσμό σε λογιστικό φύλλο Excel, οι γενότυποι εισήχθεισαν στο λογισμικό PopGene (Yeh et al., 1997) και ακολούθησε στατιστική ανάλυση. Εξαιρέθηκαν από την ανάλυση σπάνια αλληλόμορφα (συχνότητα < 0.1) που βρέθηκαν μόνο στον ένα πληθυσμό για αποφυγή υπερεκτιμήσεων που σχετίζεται με το μικρό δείγμα (Szmidt *et al.*, 1996) Υπολογίστηκαν: Το ποσοστό πολυμορφικών θέσεων, ο μέσος αριθμός αλληλομόρφων ανα γονιδιακή θέση (locus), η μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία κατά Nei (1973), και η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία για κάθε γονιδιακή θέση. Για την αξιολόγηση των σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών εκτιμήθηκαν οι δείκτες ομομιξίας κατα Wright ( Fis, Fit, Fst) και η γενετική απόσταση κατά Nei (1978).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τους 30 εκκινητές που δοκιμάστηκαν επιλέχτηκαν 7 (OPA01, OPA07, OPE01, OPE05, OPE05, OPH02, OPH04) οι οποίοι έδωσαν καθαρές και επαναλήψιμες ζώνες. Συνολικά προέκυψαν 35 γονιδιακές θέσεις εκ των οποίων οι 14 πολυμορφικές (40%). Τα προϊόντα της PCR που καταγράφηκαν ως γονιδιακές θέσεις, όπως εκτιμήθηκαν από το πρόγραμμα DNAsize με βάση την κινητικότητα μάρτυρα, ήταν μεγέθους από 400 βάσεις έως 2090 βάσεις. Οι γονιδιακές θέσεις ονομάστηκαν με βάση το όνομα του εκκινητή και έναν αριθμό που αντιστοιχεί σε ένα ζωνότυπο (π.χ. OPH071). Συνήθως στα κωνοφόρα, τμήματα αρκετά μεγαλύτερα από 2000 βάσεις ή μικρότερα από 300 δίνουν μη επαναλήψιμα πρότυπα (Leibengouth & Shogi, 1997), κάτι που επιβεβαιώνεται και στην παρούσα εργασία. Για τον έλεγχο του μεντελικού διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής OPA-07 που είχε τρεις πολυμορφικές

θέσεις, στο δέντρο 8 του πληθυσμού της Αριδαίας που βρέθηκε ετεροζυγωτικό και για τις τρεις αυτές θέσεις.

**Έλεγχος μεντελικού διαχωρισμού.** Για τις τρεις πολυμορφικές γονιδιακές θέσεις που προέκυψαν για τον εκκινητή OPA07 μετρήθηκε ο αριθμός ενδοσπερμίων με το αλληλόμορφο A (παρουσία) για κάθε θέση. Το αλληλόμορφο A βρέθηκε: για την γονιδιακή θέση OPA07-1 σε 21 ενδοσπέρμια, για τη γονιδιακή θέση OPA07-2 σε 17 ενδοσπέρμια ενώ για την γονιδιακή θέση OPA07-3 σε 16 ενδοσπέρμια τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Ανάλυση μεντελικού διαχωρισμού  
Table 1 : Mendelian segregation analysis

Γον. Θέση	(A:0) obs	(A:0) exp	$\chi^2$	p
<b>OPA072</b>	25:15	20:20	2,5	0,114
<b>OPA076</b>	16:24	20:20	1,6	0,206
<b>OPA078</b>	17:23	20:20	0,9	0,340

Ο μεντελικός διαχωρισμός επιβεβαιώνεται για όλες τις γονιδιακές θέσεις που εξετάστηκαν. Ο μεντελικός διαχωρισμός των τμημάτων RAPD έχει επιβεβαιωθεί σε άλλες εργασίες που αφορούν πεύκα και άλλα κωνοφόρα (Bucci & Menozzi, 1993; Lu *et al.*, 1995; Gomez *et al.*, 2002)

**Ανάλυση γενετικής ποικιλότητας.** Ο μέσος αριθμός αλληλομόρφων ανα γονιδιακή θέση (A/L) βρέθηκε 1.4. Το ποσοστό πολυμορφικών γονιδιακών θέσεων  $P = 40\%$  για τους δύο πληθυσμούς είναι χαμηλό σχετικά με τιμές RAPDs σε μεσογειακά κωνοφόρα. Gomez *et al.* 2001, Lucic *et al.* 2010). Σε έρευνα με RAPDs στα συγγενικά είδη *P. monticola* και *P. strobus* η τιμή αυτή προέκυψε εξίσου χαμηλή για τη *P. strobus* και πολύ χαμηλότερη στη *P. monticola* (9%) (Mehes *et al.* 2007). Το αποτέλεσμα βρίσκεται σε συμφωνία με τη ισοενζυμική ανάλυση των ίδιων πληθυσμών (Βαϊτσόπουλος 2009).

Πίνακας 2 : Παράμετροι γενετικής ποικιλότητας  
Table 2 : Genetic diversity parameters

Πληθυσμοί	A/L	P	He	Ho
<b>Αριδαία</b>	1.4	40%	0.147	<b>0.1143</b>
<b>Ροδόπη</b>	1.4	40%	0.140	<b>0.1057</b>

Η μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία στους δύο πληθυσμούς (He) ήταν 0.1471 για την Αριδαία και 0.1404 για την Ροδόπη, τιμές πρακτικά ισοδύναμες. Οι τιμές αυτές είναι σχετικά μικρές σε σύγκριση με αυτές που συναντάμε σε άλλα κωνοφόρα (Szmídt *et al.* 1996, Gomez *et al.* 2001) με μεγαλύτερη όμως εξάπλωση. Οι Rajora *et al.* (1998) με ισοένζυμα στη *P. strobus* βρήκαν μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία 0.195. Η ετεροζυγωτία που έδειξαν οι δύο πληθυσμοί δικαιολογείται από το γεγονός ότι πρόκειται για ακραίους πληθυσμούς και από το μικρό υλικό έρευνας. Σε έρευνα με

RAPD στην *Pinus contorta* subsp. *Latifolia*, οι Fazekas & Yeh, (2001) βρήκαν σε ακραίους πληθυσμούς πανομοιότυπες τιμές. Επίσης τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με αυτά που έχουν βρεθεί για είδη με παρόμοια εξέλιξη, όπως έδειξαν αλληλοεξουχικές αναλύσεις στις πενταβέλονες *Pinus wallichiana* (Lee, 1998) και *Pinus sibirica* (Politon, 2004). Ο Politon (2004), ανέλυσε με ισοένζυμα πενταβέλονα πεύκα του τμήματος Strobos και υποτμήματος *Cembrae* (*P.sibirica*, *P.koraiensis*, *P. cembra* και *P. pumila*) κατέληξε σε μέσες τιμές  $H_e$  που κυμαίνονταν από 0.082 έως 0.198. Η ανάλυση των ιδίων πληθυσμών της παρούσας εργασίας με ισοένζυμα έδειξε χαμηλότερες τιμές (Βαϊτσόπουλος 2009). Αυτό είναι πιθανώς αναμενόμενο λόγω της μεγαλύτερης γενετικής ποικιλότητας που γενικά προκύπτει με τους μοριακούς δείκτες και ιδιαίτερα τους RAPDs.

Οι παρατηρούμενες ετεροζυγωτίες ( $H_o$ ) δεν παρουσίασαν διαφορές στα δείγματα Αριδαίας και Ροδόπης βρέθηκαν όμως αρκετά μικρότερες από τις αναμενόμενες και στις δύο περιπτώσεις (0.1143 για την Αριδαία και 0,1057 για τη Ροδόπη). Ο έλεγχος ισορροπίας Hardy-Weinberg με το κριτήριο του  $\chi^2$  έδειξε και για τα δύο δείγματα ότι ισχύει η ισορροπία για το 85% των γονιδιακών θέσεων. Στο δείγμα της Αριδαίας δεν βρέθηκε σε ισορροπία η θέση OPE09-4, ενώ στο δείγμα της Ροδόπης δεν βρέθηκαν σε ισορροπία οι θέσεις OPA01-4 και OPE01-6. Τα αποτελέσματα πιθανώς οφείλονται σε δειγματοληπτικό σφάλμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι για μικρό μέγεθος δείγματος οι εκτιμήσεις με τα κριτήρια  $\chi^2$  και  $G^2$  είναι επισφαλείς. Για τις γονιδιακές θέσεις που ήταν εκτός ισορροπίας έγινε έλεγχος με το διωνυμικό τεστ και για τις θέσεις OPE09-4 και OPE01-6 οι διαφορές δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές, στην περίπτωση της θέσης OPA01-4 οι διαφορές παρέμειναν στατιστικά σημαντικές ( $p=0.02$ ).

Η μέση τιμή  $F_{is}$  βρέθηκε 0.2408, τιμή που δείχνει έλλειψη ετεροζυγωτών. Ο Politon & Krutovsky (2004) βρήκαν αντίθετα περισσότερα ετεροζυγωτά σε όλα τα πενταβέλονα που εξέτασαν. Περίσσεια ετεροζυγωτών βρήκαν και οι Rajora et al. (1998) στην *P.strobos*. Οι Ελληνικοί πληθυσμοί της *P.peuce* είναι το νοτιότερο άκρο της εξάπλωσης του είδους. Ως επί το πλείστον οι πληθυσμοί αυτοί αποτελούνται από ελάχιστα δέντρα, πολλές φορές μάλιστα απομονωμένα άτομα. Σε τέτοιες περιπτώσεις είναι αναμενόμενος υψηλότερος βαθμός ομοζυγωτίας λόγω αυξημένης συγγένειας. Μεγαλύτερες τιμές  $F_{is}$  παρατήρησαν και οι Fazekas & Yeh (2001) σε ακραίους πληθυσμούς για την *Pinus contorta*.

Ο συντελεστής διαφοροποίησης  $F_{st}$  έχει μέση τιμή 0.0863. Αυτό σημαίνει, ότι εφόσον τα αποτελέσματα επιβεβαιωθούν από ανάλυση σε μεγαλύτερο δείγμα, ότι το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής ποικιλότητας (91%) βρίσκεται μέσα στους πληθυσμούς, ενώ ένα μικρό μέρος (9%) μεταξύ των πληθυσμών. Πρέπει να τονιστεί όμως ότι αυτό το ποσοστό δεν είναι ασήμαντο ειδικά αν συνυπολογίσουμε την μέτρια γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών,

Η γενετική απόσταση κατά Nei βρέθηκε 0.0278 τιμή που επιβεβαιώνει τα ευρήματα της ισοενζυμικής ανάλυσης (Βαϊτσόπουλος 2009). Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη οι πληθυσμοί της Ροδόπης και της Αριδαίας ανήκουν σε δύο ξεχωριστούς οικοτύπους δυτικά και ανατολικά της λεκάνης του ποταμού Αξιού και επιβεβαιώνουν τα ευρήματα και άλλων ερευνητών (Nikota & Stamenkov 1970). Οι Nikota & Stamenkov διέκριναν

τις παραπάνω δύο υποπεριοχές εξάπλωσης και με βάση αυτές καθόρισαν την ποικιλία *typica* και *vermiculata*.

#### **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Για πρώτη φορά η *P. peuce* αναλύθηκε με μοριακούς δείκτες. Έγινε ανάλυση μενδελικού διαχωρισμού και αναλύθηκαν οι παράμετροι γενετικής ποικιλότητας.

Από την ανάλυση του παρόντος δείγματος οι δύο πληθυσμοί Αριδαίας και Ροδόπης, δείχνουν να διατηρούν υψηλή γενετική ποικιλότητα και πιθανή αιτία είναι ότι το είδος αποτελεί λείψανο της πρώιμης εξελικτικής περιόδου του τριτογενούς. Τα αποτελέσματα αυτά όμως πρέπει να επιβεβαιωθούν από μεγαλύτερο δείγμα.

Με βάση το υλικό έρευνας οι πληθυσμοί δείχνουν την τάση να διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ τους, γεγονός που, αν επιβεβαιωθεί από ανάλυση μεγαλύτερου δείγματος, μπορεί να δικαιολογηθεί από την απομόνωσή τους και την προέλευση τους Ανατολικά και Δυτικά της λεκάνης του ποταμού Αξιού. (Vidaković, 1997).

### **DIVERSITY ANALYSIS AMONG NATURAL POPULATIONS OF BALKAN PINE OR FIVE-NEEDLE PINE (*Pinus peuce*) USING MOLECULAR MARKERS**

**Miaoulis Michail, Tsaktsira Maria**

Laboratory of Forest Genetic and Plant Breeding  
School of Forestry and Natural Environment  
Aristotle University of Thessaloniki  
e-mail: [tsaktsir@for.auth.gr](mailto:tsaktsir@for.auth.gr), tel. 2310992334

#### **ABSTRACT**

The five-needle pine *Pinus peuce* (Balkan Pine) is an endemic species in the Balkan Peninsula, considered a relict of the Tertiary period. It's the only white pine of the Strobi subsection in Europe. It is very resistant to low temperatures and it's considered as one of most valuable reforestation species in alpine and sub-alpine regions. It is resistant to *Cronartium ribicola* ( a pathogenic fungus causing White Pine blister rust). The timber produced is of high quality. In the present study the genetic variation of trees from the two unique Greek populations (Rodopi and Aridaia) was investigated using Random Amplified Polymorphic DNA markers. Ten trees from each provenance were analysed using endosperm haploid tissue. The Mendelian segregation of RAPD gene loci was confirmed. The results of the genetic variation analysis, if confirmed in a larger sample, indicate that the Greek *P. peuce* provenances, although they are marginal populations, maintain high genetic variability. This could be attributed to the evolutionary history of the species. Furthermore the genetic analysis of these samples

suggests that the genetic variation between the two populations is relatively high. This variation is high enough to allow classification of the two populations into two distinct ecotypes.

**Key words:** Balkan Pine, Five-Needle Pine, *Pinus peuce*, molecular markers, RAPD, genetic diversity.

## BIBLIOΓΡΑΦΙΑ

- Alexandrov, A.H.,1998. *Pinus peuce* Grsb. In: Enzyklopedie der Holzgewaeche-se. ECOMED, Landsberg, Germany, III(1), pp.1-10.
- Bucci, G. and Menozzi, P.,1993. Segregation analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Picea abies* Karst. *Molecular Ecology*, 2, pp.227–232
- Cernjavski, P., Nedjalkov, S., Ploshtakova, L., Dimitrov, I.,1959. Trees and shrubs in the forests of Bulgaria. Sofia, Zemizdat (in Bulgarian).
- Crowley, T.M., Muralitharan, M.S., Stevenson, T.W., 2003. Isolating conifers DNA: A superior polysaccharide elimination method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21, pp. 97a-97d.
- Dobrev, R., 1992. Monoterpene composition of the essential oil in some populations of Macedonian pine (*Pinus peuce* Griseb.) in Bulgaria. *Nauka za gorata*, 29(2), pp.8-16.
- Dobrev, R., 2005. Genetic correlations and expected genetic gain of height growth of 13 year-old progenies of Macedonian pine (*Pinus peuce* Griseb.) tested in experimental trials. *Nauka za gorata*, 42 (3), pp.11-28.
- Dobrev, R., 2007. Quantitative genetic studies of representative provenances of *Pinus peuce* Griseb. in Bulgaria. Dr.Sc.thesis, Forest Research Institute, Sofia (in Bulgarian). *Nauka za gorata*, 29(2), pp. 8-16 (in Bulgarian with English summary).
- Fazekas, A.J. and Yeh, F.C., 2001. Random amplified polymorphic DNA diversity of marginal and central populations in *Pinus contorta* subsp. *latifolia*. *Genome*, 44, pp.13-22.
- Fukarek, P., 1950. The natural distribution of *Pinus peuce* in Balkan peninsula. *Godi?njak Biolo?kog Instituta u Sarajevu*.
- Gomez A., Alia R. and M-A Bueno, 2001. Genetic diversity of *Pinus halepensis* Mill. Populations detected by RAPD loci. *Annals Of Forest Science*, 58, pp. 869- 875.
- Gomez A., Alia R. and M-A Bueno, 2001. Genetic diversity of *Pinus halepensis* Mill. Populations detected by RAPD loci. *Annals Of Forest Science*, 58, pp. 869- 875.
- Gomez A., Aravanopoulos F. A., Bueno M. A. and R. Alia, 2002. Linkage of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in *Pinus halepensis* MILL. *Silvae Genetica*, 47(5-6), pp. 273- 282.
- Hagman, M., Mikkola, L., 1963. Observations on cross-, self-, and interspecific pollinations in *Pinus peuce* Griseb. *Silvae Genetica* 12: 72-79.



- Henning, P., Steinborn, A., Engewald, W., 1994. Investigation on the composition of *Pinus peuce* needle oil by GC-MS and GC-GC-MS. *Chromatographia*, 38(11-12) pp. 689-693.
- Jovanovic, B., 1986. *Pinus peuce*. In: Flora Srbije. Belgadre, Serbian Academy of Sciences and Arts.
- Jovanovic, B., 1986. *Pinus peuce*. In: Flora Srbije. Belgadre, Serbian Academy of Sciences and Arts.
- Lee S. W., Choi W. Y., Norbub, L., Pradhanb R. 1998 Genetic diversity and structure of blue pine (*Pinus wallichiana* Jackson) in Bhutan Forest ecology and management 105(1-3), pp.43-45.
- Leibenguth, F., Shoghi, F., 1998. Analysis of random amplified polymorphic DNA markers in three conifer species. *Journal of Molecular Biology*, 27, pp. 87-106.
- Liston, A., Robinson, W. A., Pintero, D., Alvarez-Buylla, E. R., 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) Based on Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region Sequences *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(1), pp.95-109.
- Lu, M. Z., Szmids, A. E., Wang, X. R., 1995. Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris* (L.). *Heredity*, 74 pp. 582-589.
- Lucic, A., Mladenovic-Drinic, S., Stavretovic N., Isayev V., Lavadinovic, V., Ljubinko, R., Novakovic M., 2010. Genetic Diversity Of Austrian Pine (*Pinus nigra* Arnold) populations in Serbia revealed by RAPD. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 62 (2), pp. 329-336
- Mehes M. S., Nkongolo K. K., Michael P., 2007. Genetic analysis of *Pinus strobus* and *Pinus monticola* populations from Canada using ISSR and RAPD markers: development of genome-specific SCAR markers, *Plant Systematics and Evolution*, 267, pp. 47-63
- Mirov, N. T., 1967. The genus *Pinus*. New York: Ronald Press. Library of congress catalog card number: 67-14783
- Neale, J. L., Trappe J. M., Lu K. C., Bollen, W. B., 1967. Sterilization of red alder seedcoats with hydrogen peroxide. *Forest Science*, 13, pp. 104-105.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 70(12)(I), pp. 3321-3323.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, pp. 583-590.
- Nikota, B., Stamenkov, M. and Djordjeva, M. 1970. Prvi rezultati odmequvidovoto vkrstsuvanje na molikata (*Pinus peuce*). *Zbornikna simpoziumot za molikata, Pelister-Bitola, 2-9 September*: 183-190
- Normand, P., Fortin, J. A., 1982. Comparison of six surface sterilizing for aenic germination of *Alnus crispa* (Ait.) Pursh. *Canadian Journal of Forest Research*, 12, pp. 1003-1005.
- Petrakis, P. V., Tsitsmpikou, C., Tzakou, O., Couladis, M., Vagias, C., Roussis, V., 2001. Needle volatiles from five *Pinus* species growing in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(4), pp. 249-252.
- Politov, D. V., Krutovsky K. V., 2004. Phylogenetics, Genogeography and Hybridization of Five-needle pines in Russia and Neighboring countries. *USDA Forest Service*

- Proceedings RMRS-P-32.
- Popnikola, N., Jovancevic, M., Vidakovic, M., 1978. Genetics of *Pinus peuce* Gris. *Annates Forestales* 7/6, pp. 187-206.
- Price, R., Listen, A. and Strauss, S., 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. In: Richardson, D.M. (ed) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 49-68.
- Raghava G.P.S., 1994. Improved estimation of DNA fragment length from gel electrophoresis using a graphical method. *Biotechniques* 17, pp. 100.
- Rajora O. P., DeVerno, L., Mosseler, A. and Innes D.J., 1998. Genetic diversity and population structure of disjunct Newfoundland and central Ontario populations of eastern white pine (*Pinus strobus*). *Canadian Journal of Botany*, 76, pp.500–508
- Szmidt, A.E., Wang, X.R., Lu, M.Z., 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid analysis. *Heredity*, 76, pp. 412-420.
- Vidakovic, M., 1991. *Conifers. Morphology and variation*. Zagreb: Graficki Zavod Hrvatske. ISBN: 0 85198 807 5
- Yeh F. C., Yang R. C. and T. Boyle, 1997. POPGENE v. 1.21: Software for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Edmonton, 28 pp
- Zhelev, P., Gomory, D., Paule, L., 2002. Inheritance and linkage of allozymes in a Balkan epidemic, *Pinus peuce* Griseb. *Journal of Heredity*, 93, pp.60-63.
- Βαϊτσόπουλος Α., 2009 Εκτίμηση της Ποικιλότητας των δασικών πληθυσμών της Βαλκανικής πευκής με ισοενζυμικούς δείκτες (*Pinus peuce*). Μεταπτυχιακή διατριβή, Σχολή Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, 88 σελ.