

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΒΑΛΚΑΝΙΚΗΣ ΠΕΥΚΗΣ (*Pinus peuce*)

Σιδέρη Ευσταθία, Σκαλτσογιάννης Βασίλειος, Τσακτσίρα Μαρία

Εργαστήριο Δασικής Γενετικής και Βελτίωσης Δασοπονικών Ειδών
Σχολή Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
e-mail: tsaktsir@for.auth.gr, τηλ. 2310992334

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Pinus peuce* ή Βαλκανική πεύκη, ως λείψανο του Τριτογενούς, θεωρείται μοναδικό είδος στην Ευρώπη, μαζί με την *P. cembra* και την *P. sibirica*, που φέρει πέντε βελόνες στα βραχυκλάδιά της. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε ισοενζυμική ανάλυση σε δύο πληθυσμούς του είδους (Ροδόπη, Αριδαία), χρησιμοποιώντας 4 γονιδιακές θέσεις (LAP-B, DIA-A, GDH-A, PGI-A). Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι το είδος, παρά τη μικρή γεωγραφική του εξάπλωση, φέρει ικανοποιητικά φορτία γενετικής παραλλακτικότητας. Παρά το μικρό αριθμό των ατόμων που αναλύθηκαν για κάθε πληθυσμό, διαπιστώθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των δύο πληθυσμών. Τα στοιχεία της παρούσας έρευνας, αν και προκαταρκτικά, φανερώνουν τη δυναμική και τη μοναδικότητα του είδους.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Βαλκανική πεύκη ανακαλύφθηκε ως είδος το 1939 από τον August Grisebach στο όρος Περίστερ κοντά στη Βίτολα, στην περιοχή του FYROM και περιγράφηκε το 1845. Είναι από τα ελάχιστα πενταβέλονα είδη πεύκης στην Ευρώπη με ιδιαίτερη οικολογική, αισθητική, ιστορική και οικονομική αξία παγκοσμίως και δεν είναι τυχαίο ότι από πολλούς ερευνητές θεωρείται ως ο ορεινός “θησαυρός” των Βαλκανίων. Είναι λείψανο του τριτογενούς (Tertiary period) και τα συγγενικά του είδη (*Pinus mondicola*, *Pinus strobus*, *Pinus wallichiana*, *Pinus dalatensis*), βρίσκονται σήμερα στη Β. Αμερική και στην Ασία. Η Βαλκανική πεύκη έχει πολύ περιορισμένη φυσική εξάπλωση. Απαντάται στην Βαλκανική χερσόνησο και πιο συγκεκριμένα στη Σερβία, στο Μαυροβούνιο, στην Αλβανία, στην Ελλάδα, στη Βουλγαρία και στο FYROM σε υψόμετρο 600 με 2200 μέτρα. (Fukarek 1950, Mirov 1967, Popnicola *et al.* 1978, Vidakovic 1991, Alexandrov 1998). Στη χώρα μας φύτευται στη συνοριακή γραμμή με τη Βουλγαρία (οροσειρά Ροδόπη) και τη FYROM (Όρος Βόρρας).

Είναι ενδημικό είδος, ενώ λόγω της σπανιότητάς του, θεωρείται μοναδικό δείγμα φυσικής κληρονομιάς παγκόσμια (οδηγία 92/43/EEC). Ο βιότοπός του έχει ενταχθεί στο NATURA 2000 (Κωδικός NATURA GR1120003 OROS CHAIDOU-KOULA & GYRO KORYFES). Επίσης η Βαλκανική πεύκη έχει ενταχθεί στο περιβαλλοντικό πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για την προστασία της, καθώς έχει καταχωρηθεί στη λίστα δεδομένων του παγκόσμιου κέντρου διατήρησης και παρακολούθησης ως είδος οριακά απειλούμενο (UNEP, World Conservation Monitoring Centre – Trees).

Η *Pinus peuce* ανήκει στο υποείδος *Strobus*, τμήμα *Quinquefoliae* (= τμήμα *Strobus*), υποτμήμα *Strobi* (Critchfield and Little 1966). Η *Pinus peuce* είναι μεγάλο δέντρο ύψους 35-40 με βελόνες οργανωμένες ανά πέντε. Είναι είδος ορεινό και φύεται σε υψόμετρο 600-2.200 m και παρά την περιορισμένη εξάπλωση, αποδεικνύεται πολύ ανθεκτική στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Δεν είναι απαιτητική, είναι αδιάφορη στην υγρασία εδάφους και μπορεί να αναπτύσσεται σε φτωχά πετρώδη εδάφη (Dimitrov 1980, Mickovski & Ennos 2003). Σχηματίζει αμιγείς και μικτές συστάδες με ελάτη και ερυθρελάτη. Είναι πολύ ανθεκτική στις πολύ χαμηλές χειμερινές θερμοκρασίες, ακόμα και κάτω από τους -45°C , και στην έκθεση σε δυνατό άνεμο. Η *P. peuce* διαθέτει κάποια χαρακτηριστικά που την κάνουν το κατάλληλο είδος για αναδασώσεις σε μεγάλα υψόμετρα και οι φυτείες που έχουν εγκατασταθεί μέχρι σήμερα στα αλπικά δασοόρια επιβεβαιώνουν ότι είναι το πιο ικανό είδος για αυτές τις συνθήκες. Εξαιτίας της υψηλής ανθεκτικότητας της, η *Pinus peuce* μπορεί επίσης να φύεται και σε χαμηλότερα υψόμετρα όπου και μπορεί να αναπτύσσεται γρηγορότερα από ότι στα ψηλά βουνά με τις αντίξοες συνθήκες. Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε αναδασώσεις, για ανύψωση των δασοορίων σε υψηλά βουνά της Βόρειας Ελλάδας με πυριτικά πετρώματα, αλλά και για παραγωγή νερού (Ντάφης 2010).

Η Βαλκανική πεύκη έχει ξύλο ελαφρύ, μαλακό και ανθεκτικό, μ' ένα ευχάριστο άρωμα εξαιτίας της ρητίνης. Το ξύλο της είναι κατάλληλο για οικοδομική ξυλεία, έπιπλα και επενδύσεις.

Οι Hagman & Mikola (1963) ξεκίνησαν τη γενετική ανάλυση του είδους δοκιμάζοντας την ικανότητα και συμπεριφορά του στις διασταυρώσεις. Οι γνώσεις πάνω στη γενετική του είδους μέχρι το 1978 αναφέρονται από τους Popnikola *et al.* (1978). Ο καρυότυπος του είδους μελετήθηκε από τους Petrovska & Stamenkov (1987), οι οποίοι επιβεβαίωσαν το κλασικό γένωμα των κωνοφόρων $2n=24$, όπως και σε άλλα πεύκα. Η γενετική και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά μελετήθηκαν σε μεγαλύτερη έκταση από τον Dobrev κατά την περίοδο 1998-2007, ο οποίος βασισμένος στα αποτελέσματα των μελετών του (Dobrev 2005, 2007), προτείνει περαιτέρω επιλογή ως την καλύτερη στρατηγική για την γενετική βελτίωση της *Pinus peuce*. 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 γενώματος σε 5 είδη πεύκης της Βαλκανικής χερσονήσου, όπου συμπεριλαμβανόταν και η *P. peuce*. Το μέγεθος του γενώματος αυτού του είδους ήταν το μεγαλύτερο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα υπό μελέτη είδη, αποτέλεσμα που είναι και τυπικό για τα πενταβέλονα είδη πεύκης.

Η εφαρμογή των βιοχημικών δεικτών στη γενετική ανάλυση της *P. peuce*, έγινε με δευτερογενή προϊόντα (Mirov 1967, Dobrev 1992, Henning *et al.* 1994, Petrakis *et al.* 2001) και ισοένζυμα (Zhelev *et al.* 2002, Τελική Έκθεση του προγράμματος INTERREG Ελλάδα-Βουλγαρία 2008 – Ε.Υ.: Α. Σκαλτσογιάννης, Βαϊτσόπουλος 2009).

Η ηλεκτροφόρηση των ισοενζύμων μας παρέχει μοναδικές πληροφορίες επειδή στηρίζεται στο φαινότυπο ποιοτικών χαρακτηριστικών (τα ένζυμα θεωρούνται η άμεση έκφραση του γονιδίου) που δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον, και γι' αυτό το λόγο πλεονεκτεί έναντι των μορφολογικών χαρακτηριστικών και της χημείας των δευτερογενών προϊόντων στις γενετικές αναλύσεις (Crawford, 1983). Οι Scogin (1969) και Turner (1969) προέβλεψαν ότι όσον αφορά στην ποικιλότητα των ισοενζύμων εντός και μεταξύ των πληθυσμών των φυτών, η ηλεκτροφόρηση, ως τεχνική, θα μπορούσε να

είναι πολύ χρήσιμη όχι μόνο στην πιστοποίηση ή στη διάκριση των προελεύσεων, των ποικιλιών και των φυσικών ή τεχνητών υβριδίων, αλλά και στις μελέτες της εξέλιξης των ειδών. Ισοένζυμα είναι οι διαφορετικοί τύποι ενός ενζύμου που καταλύουν την ίδια αντίδραση με διαφορετικό τρόπο.

Η παρούσα εργασία έχει στόχο την εκτίμηση και τον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλότητας 2 φυσικών πληθυσμών της *Pinus peuce* με την τεχνική της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης αμύλου και την έρευνα τυχόν γενετικών διαφορών μεταξύ τους.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις ήταν ενδοσπέρμια σπόρων που προήλθαν από 2 φυσικούς πληθυσμούς της *Pinus peuce*. Οι 2 πληθυσμοί που μελετήθηκαν είναι από την περιοχή της Αριδαίας και της Ροδόπης στην Ελλάδα.

Η ανάλυση των ενζύμων έγινε σε απλοειδή ενδοσπέρμια σπόρων (7 ενδοσπέρμια ανά άτομο) για 7 άτομα της *Pinus peuce* από τη Ροδόπη και 10 άτομα από την Αριδαία, με την τεχνική της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε άμυλο, ακολουθώντας τα πρωτόκολλα των Conkle *et al.* (1982) και Cheliak & Pitel (1985). Μετά από προκαταρκτικές μελέτες, μελετήθηκε το ηλεκτροφορητικό σύστημα LBTC και τα ενζυμικά συστήματα: Γλουταμινική Αφυδρογονάση (GDH, E.C.1.4.1.3), Λευκίνη της αμινοπεπτιδάσης (LAP, E.C.3.4.11.1), Ισομεράση της Φωσφογλυκόζης (PGI, E.C.5.3.1.9) και Διαφοράση (DIA, E.C.1.1.1.40)

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις ηλεκτροφορήσεις αποτελούνταν από ενδοσπέρμια μη φυτρωμένων σπόρων, επειδή οι σπόροι της *P. peuce* χρειάζονται ειδική διαδικασία για να φυτρώσουν. Οι σπόροι, πριν χρησιμοποιηθούν, τοποθετήθηκαν σε petri πάνω σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με νερό. Το ενδοσπέρμιο κάθε σπόρου ομογενοποιήθηκε σε μικρά ιγδία (γουδάκια) με ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης 0.2 M Phosphate buffer pH 7.5 (Conkle *et al.*, 1982). Για την παρασκευή της πηχτής χρησιμοποιήθηκαν άμυλο (11.5 % w/v) και ζάχαρη (3 % w/v) διαλυμένα σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης η συσκευή παρέμενε στη θερμοκρασία των 4°C. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης για το σύστημα LBTC διαρκούσε 3,5 ώρες σε σταθερή ένταση 60 mA. Οι γονιδιακές θέσεις και τα αλληλόμορφα αριθμήθηκαν με αύξουσα σειρά από την άνοδο προς την κάθοδο.

Για την γενετική ανάλυση των δύο υπό μελέτη πληθυσμών χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις στατιστικές γενετικές παράμετροι: Ποσοστό πολυμορφικών γονιδιακών θέσεων (P), Μέσος αριθμός των αλληλομόρφων ανά γονιδιακή θέση (A), Αναμενόμενη ετεροζυγωτία (h_e) ανά γονιδιακή θέση και ανά πληθυσμό, Μέση Αναμενόμενη Ετεροζυγωτία (Nei και Shkravarti 1977, Nei 1978).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι σπόροι, πριν χρησιμοποιηθούν, τοποθετήθηκαν σε petri πάνω σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με νερό. Η ωρίμανση του ενδοσπερμίου επιτεύχθηκε σε διάστημα 7 ημερών και σταθερή θερμοκρασία $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Στη συγκεκριμένη έρευνα ανάλυσης πληθυσμών *Pinus peuce*, τέσσερα ενζυμικά συστήματα (Πίν. 1) παρουσίασαν ευκρίνεια και ικανοποιητικό διαχωρισμό. Συνολικά καταγράφηκαν 7 αλληλόμορφα που κωδικοποιούνταν από 4 γονιδιακές θέσεις για τους δύο πληθυσμούς που μελετήθηκαν.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Ενζυμικά συστήματα που αναλύθηκαν στους 2 υπό μελέτη πληθυσμούς της *Pinus peuce*.

TABLE 1. Enzyme systems analyzed in the two populations studied of *Pinus peuce*

Όνομασία ενζυμικού συστήματος	Συντομογραφία	Ηλεκτροφορητικό σύστημα	Γονιδιακές θέσεις	Αριθμός αλληλομόρφων
Λευκίνη της αμινοπεπτιδάσης	LAP	B	LAP-B	2
Διαφοράση	DIA	B	DIA-A	2
Γλουταμινική Αφυδρογονάση	GDH	B	GDH-A	1
Ισομεράση της Φωσφογλυκόζης	PGI	B	PGI-A	2

1. Λευκίνη της αμινοπεπτιδάσης (LAP, E.C.3.4.11.1)

Στο ενζυμικό σύστημα της LAP, εμφανίστηκαν 2 γονιδιακές θέσεις, στο ηλεκτροφορητικό σύστημα B, από τις οποίες η δεύτερη (LAP-B) είχε αρκετή ευκρίνεια ώστε να καταγραφεί. Η LAP-B κωδικοποιούνταν από 2 αλληλόμορφα.

2. Διαφοράση (DIA, E.C.1.1.1.40)

Το ενζυμικό σύστημα της διαφοράσης αναλύθηκε στο ηλεκτροφορητικό σύστημα B όπου καταγράφηκε μία γονιδιακή θέση (DIA-A) που κωδικοποιούνταν από 2 αλληλόμορφα.

3. Γλουταμινική αφυδρογονάση (GDH, E.C.1.4.1.3)

Στο ενζυμικό σύστημα της GDH, το οποίο αναλύθηκε στο ηλεκτροφορητικό σύστημα B, εμφανίστηκε μία γονιδιακή θέση (GDH-A) που ήταν μονομορφική.

4. Ισομεράση της φωσφογλυκόζης (PGI, E.C.5.3.1.9)

Το ενζυμικό σύστημα της PGI, αναλύθηκε στο ηλεκτροφορητικό σύστημα B, όπου εμφανίστηκαν δύο γονιδιακές θέσεις από τις οποίες μόνο η πρώτη (PGI-A) παρουσίαζε σταθερότητα εμφάνισης και ευκρίνειας και καταγράφηκε να έχει 2 αλληλόμορφα.

Οι αλληλομορφικές συχνότητες των γονιδιακών θέσεων που αναλύθηκαν σε αυτήν την έρευνα στους δύο πληθυσμούς της *Pinus peuce*, παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα, οι πληθυσμοί που αναλύθηκαν ήταν πολυμορφικοί σε όλες τις γονιδιακές θέσεις που χρησιμοποιήθηκαν εκτός από τη GDH-A όπου και οι δύο ήταν μονομορφικοί. Οι δύο πληθυσμοί διέφεραν σημαντικά στη γονιδιακή θέση DIA-A, όπου εμφάνισαν συχνότητες 0,50 και 0,15 στο αλληλόμορφο A1, στους πληθυσμούς της Ροδόπης και της Αριδαίας αντίστοιχα και κατά συνέπεια 0,50 και 0,85 στο αλληλόμορφο A2 αντίστοιχα. Επίσης, στη γονιδιακή θέση PGI-A καταγράφηκαν συχνότητες 0,07 και 0,30 στο αλληλόμορφο A1 στους πληθυσμούς Ροδόπης και Αριδαίας αντίστοιχα και ανάλογα 0,93 και 0,70 στο αλληλόμορφο A2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Συχνότητες αλληλομόρφων σε 4 γονιδιακές θέσεις στους 2 υπό μελέτη πληθυσμούς της *Pinus peuce*

TABLE 2. Allelic frequencies of 4 loci in the 2 populations studied of *Pinus peuce*

Ενζυμικά συστήματα Αλληλόμορφα Πληθυσμοί	LAP-B		DIA-A		GDH-A	PGI-A	
	B1	B2	A1	A2	A1	A1	A2
Ροδόπη	0,64	0,36	0,50	0,50	1,00	0,07	0,93
Αριδαία	0,80	0,20	0,15	0,85	1,00	0,30	0,70

Με βάση τις συχνότητες των αλληλομόρφων, υπολογίστηκαν οι αναμενόμενες ετεροζυγωτίες ανά πληθυσμό και γονιδιακή θέση (h_k) (Πίν. 3), καθώς και οι γενετικές παράμετροι μέσος αριθμός αλληλομόρφων ανά γονιδιακή θέση (A), ποσοστό πολυμορφικών γονιδιακών θέσεων (P) και μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία (He) (Πίν. 4).

Όσον αφορά στην αναμενόμενη ετεροζυγωτία ανά γονιδιακή θέση και ανά πληθυσμό, οι τιμές της κυμαίνονταν από 0,000 έως 0,519 στον πληθυσμό της Ροδόπης και από 0,000 έως 0,431 για τον πληθυσμό της Αριδαίας. Τη μεγαλύτερη συμβολή στην ετεροζυγωτία εμφάνισε η γονιδιακή θέση DIA-A (0,519) στον πληθυσμό της Ροδόπης ενώ η PGI-A (0,431) στον πληθυσμό της Αριδαίας

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Αναμενόμενη ετεροζυγωτία ανά γονιδιακή θέση και ανά πληθυσμό της *Pinus peuce*.

TABLE 3. Expected heterozygosity per loci and per population of *Pinus peuce*

Πληθυσμοί Γονιδιακές θέσεις	Ροδόπη	Αριδαία
LAP-B	0,477	0,328
DIA-A	0,519	0,262
GDH-A	0,000	0,000
PGI-A	0,135	0,431
Μέση Ετεροζυγωτία	0,283	0,255

Στον πίνακα 4, μπορούμε να δούμε τις παραμέτρους ετεροζυγωτίας συνολικά για τους δύο πληθυσμούς. Δεν εμφανίστηκε καμία διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών που μελετήθηκαν όσον αφορά στις τιμές του μέσου αριθμού αλληλομόρφων ανά γονιδιακή θέση (1,75) και στο ποσοστό πολυμορφικών γονιδιακών θέσεων (75%). Η μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία κυμαίνονταν από 0,255 (Αριδαία) έως 0,283 (Ροδόπη). Η συνολική τιμή ετεροζυγωτίας και για τους δύο υπό μελέτη πληθυσμούς ήταν 0,269.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Παράμετροι ετεροζυγωτίας για τους 2 υπό μελέτη πληθυσμούς της *Pinus peuce*.

TABLE 4. Parameters of heterozygosity for the two populations studied of *Pinus peuce*

Πληθυσμοί \ Γενετικές Παράμετροι	Μέσος αριθμός αλληλ/ρφον ανά γονιδιακή θέση (A)	Ποσοστό πολυμορφικών γονιδιακών θέσεων (P)	Μέση Αναμενόμενη Ετεροζυγωτία (He)
Ροδόπη	1,75	75,00	0,283
Αριδαία	1,75	75,00	0,255
Μέσος όρος	1,75	75,00	0,269

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Φύτρωση των σπόρων

Οι σπόροι, πριν χρησιμοποιηθούν, τοποθετήθηκαν σε petri πάνω σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με νερό. Η ωρίμανση του ενδοσπερμίου επιτεύχθηκε σε διάστημα 7 ημερών και σταθερή θερμοκρασία $23\text{ C}^{\circ} \pm 2\text{ C}$.

Σύμφωνα με άλλους ερευνητές (Dimitrov 1980, Mason *et al.* 1995, Milev *et al.* 1999), οι σπόροι της *Pinus peuce* χρειάζονται ειδικούς χειρισμούς όσον αφορά στη φύτρωσή τους εξαιτίας του ληθάργου τους. Για την επιτυχή φύτρωση των σπόρων, απαιτείται διαστρωμάτωσή τους και ένας συνδυασμός χαμηλής και υψηλής θερμοκρασίας για περίπου τέσσερις μήνες. Στην περίπτωση μας, αποδείχθηκε ότι η παραμονή των σπόρων σε υγρό περιβάλλον για μερικές ημέρες ήταν αρκετή ώστε, παρόλο που δεν υπήρξε φύτρωση, τα ένζυμα που αναλύθηκαν να ενεργοποιηθούν, κάτι που αναφέρεται και από τους Zhelev *et al.* (2002).

Ηλεκτροφορητική ανάλυση

Στη συγκεκριμένη έρευνα ανάλυσης πληθυσμών *Pinus peuce*, τέσσερα ενζυμικά συστήματα (Πίν. 1) παρουσίασαν ευκρίνεια και ικανοποιητικό διαχωρισμό και χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στην ανάλυση της γενετικής ποικιλότητας σε άτομα *Pinus peuce* της Ελλάδας. Στα τέσσερα αυτά ενζυμικά συστήματα (LAP, DIA, PGI και GDH) καταγράφηκαν 4 γονιδιακές θέσεις που κωδικοποιούνται από 7 αλληλόμορφα.

Φαινοτυπική ανάλυση ενζυμικών συστημάτων

1. Λευκίνη της αμινοπεπτιδάσης (LAP, E.C.3.4.11.1)

Στο ενζυμικό σύστημα της LAP, εμφανίστηκαν 2 γονιδιακές θέσεις, από τις οποίες η δεύτερη (LAP-B) είχε αρκετή ευκρίνεια ώστε να καταγραφεί. Η LAP-B κωδικοποιούνται από 2 αλληλόμορφα. Δύο γονιδιακές θέσεις έχουν καταγραφεί και από άλλους ερευνητές στο συγκεκριμένο ενζυμικό σύστημα (Zhelev *et al.* 2002), όπου αναφέρεται η παρουσία 2 αλληλομόρφων σε κάθε μία από αυτές. Η παρουσία του null αλληλομόρφου που είναι συνηθισμένη στη LAP δεν αναφέρθηκε για την *Pinus peuce*, γεγονός που συμφωνεί και με τη συγκεκριμένη εργασία.

2. Διαφοράση (DIA, E.C.1.1.1.40)

Στο ενζυμικό σύστημα της διαφοράσης καταγράφηκε μία γονιδιακή θέση (DIA-A) που κωδικοποιούνται από 2 αλληλόμορφα. Το συγκεκριμένο ενζυμικό σύστημα δεν έχει καταγραφεί ξανά στο υπό μελέτη είδος. Η ομοιότητα του ενζυμικού συστήματος της DIA με το ενζυμικό σύστημα της μεναντιόνης της ρεδουκτάσης (MNR, E.C.1.6.99.2), που έχει αναφερθεί σε άλλα κωνοφόρα (π.χ. μαύρη πεύκη –

Scaltsoyiannes *et al.* 1994), δεν υφίσταται στην *P. peuce*, όπως διαπιστώθηκε από τα προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν στην αρχή αυτής της εργασίας.

3. Γλουταμινική αφυδρογονάση (GDH, E.C.1.4.1.3)

Στο ενζυμικό σύστημα της GDH, εμφανίστηκε μία γονιδιακή θέση (GDH-A) που ήταν μονομορφική. Μία ζώνη δράσης αναφέρεται και σε άλλες μελέτες (Zhelev *et al.* 2002), όπου εμφανίζεται με δύο αλληλόμορφα, αλλά το ένα αλληλόμορφο είναι εξαιρετικά σπάνιο. Στα λευκά πεύκα, μόνο στην *P. longaeva* παρατηρήθηκε ξανά πολυμορφισμός σε αυτή τη γονιδιακή θέση (Hiebert & Hamrick 1983).

4. Ισομεράση της φωσφογλυκόζης (PGI, E.C.5.3.1.9)

Το ενζυμικό σύστημα της PGI εμφάνισε δύο γονιδιακές θέσεις από τις οποίες μόνο η πρώτη (PGI-A) παρουσίαζε σταθερότητα εμφάνισης και ευκρίνειας και καταγράφηκε να έχει 2 αλληλόμορφα. Η δεύτερη γονιδιακή θέση φαίνεται να ακολουθεί την πρώτη όταν αυτή παρουσιάζει διαφορετικά αλληλόμορφα βοηθώντας μερικές φορές στην καταγραφή του ενζυμικού συστήματος. Οι Zhelev *et al.* (2002), αναφέρουν ότι βρήκαν επίσης 2 γονιδιακές θέσεις από τις οποίες κατέγραψαν τη δεύτερη, ως πιο ευκρινή, αλλά χωρίς να εμφανίζεται πάντα για τεχνικούς πιθανόν λόγους. Δύο ζώνες δράσης έχουν καταγραφεί και σε άλλα πενταβέλονα είδη κωνοφόρων (Beaulieu & Simon 1994).

Ανάλυση συχνότητας αλληλομόρφων

Οι αλληλομορφικές συχνότητες των γονιδιακών θέσεων που αναλύθηκαν σε αυτήν την έρευνα στους δύο πληθυσμούς της *Pinus peuce*, παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα, οι πληθυσμοί που αναλύθηκαν ήταν πολυμορφικοί σε όλες τις γονιδιακές θέσεις που χρησιμοποιήθηκαν εκτός από τη GDH-A όπου και οι δύο ήταν μονομορφικοί. Η GDH αναφέρεται πολυμορφική (δύο αλληλόμορφα) στην *P. peuce*, αλλά το ένα αλληλόμορφο εμφανίζεται εξαιρετικά σπάνια (Zhelev *et al.* 2002) και γενικά μόνο στην *P. longaeva* εμφάνισε πολυμορφισμό από όλες τις λευκές πεύκες (Hiebert & Hamrick 1983).

Τα άτομα από τις δύο περιοχές της Ροδόπης και της Αριδαίας, διέφεραν σημαντικά στη γονιδιακή θέση DIA-A (συχνότητες 0,50 και 0,15 στο αλληλόμορφο A1 αντίστοιχα), και στη γονιδιακή θέση PGI-A (συχνότητες 0,07 και 0,30 στο αλληλόμορφο A1 αντίστοιχα). Διαφοροποίηση των δύο αυτών πληθυσμών έχει αναφερθεί και σε άλλη εργασία (Τελική Έκθεση INTERREG 2008, Βαϊτσόπουλος 2009), στις γονιδιακές θέσεις 6PGD-A, MDH-D και ACP-A, γεγονός που δείχνει την ιδιαίτερη γενετική σύσταση αυτών των πληθυσμών, αφού είναι δυνατόν να ξεχωρίσει ο ένας από τον άλλο με τη χρήση λίγων γονιδιακών θέσεων αλλά και λίγων ατόμων, όπως στη δική μας περίπτωση.

Παράμετροι ετεροζυγωτίας

Με βάση τις συχνότητες των αλληλομόρφων, υπολογίστηκαν οι γενετικές παράμετροι: αναμενόμενη ετεροζυγωτία ανά πληθυσμό και γονιδιακή θέση (h_k) (Πίν. 4), μέσος αριθμός αλληλομόρφων ανά γονιδιακή θέση (A), ποσοστό πολυμορφικών γονιδιακών θέσεων (P) και μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e) (Πίν. 5).

Όσον αφορά στην αναμενόμενη ετεροζυγωτία ανά γονιδιακή θέση και ανά πληθυσμό, οι τιμές της κυμαίνονταν από 0,000 έως 0,519 στον πληθυσμό της Ροδόπης και από 0,000 έως 0,431 για τον πληθυσμό της Αριδαίας. Τη μεγαλύτερη συμβολή στην

ετεροζυγωτία εμφάνισε η γονιδιακή θέση DIA-A στη Ροδόπη ενώ η PGI-A (0,431) στην Αριδαία. Η διαφορετική συμβολή των γονιδιακών θέσεων στη διαμόρφωση της ετεροζυγωτίας είναι σύνηθες φαινόμενο στους πληθυσμούς των δασικών ειδών και έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (Lundkvist & Rudin 1977, Yeh & Layton 1979, Yeh & El-Kassaby 1980, Τσακτσίρα 1999).

Στον πίνακα 4, μπορούμε να δούμε τις παραμέτρους ετεροζυγωτίας συνολικά για τους δύο πληθυσμούς. Ίδιο βαθμό πολυμορφισμού έδειξαν τα άτομα των δύο περιοχών όσον αφορά στις τιμές του μέσου αριθμού αλληλομόρφων ανά γονιδιακή θέση (1,75) και στο ποσοστό πολυμορφικών γονιδιακών θέσεων (75%), με την πρώτη τιμή παρόμοια (1,4 έως 1,7) με άλλη έρευνα (Τελική Έκθεση INTERREG 2008, Βαϊτσόπουλος 2009) ενώ η δεύτερη τιμή εμφανίζεται ιδιαίτερα υψηλή σύμφωνα με την ίδια μελέτη (τιμές από 9,1 έως 36,4%). Η μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία κυμαινόταν από 0,255 (Αριδαία) έως 0,283 (Ροδόπη). Η μέση συνολική τιμή της ετεροζυγωτίας και για τους δύο υπό μελέτη πληθυσμούς ήταν 0,269. Οι τιμές αυτές της ετεροζυγωτίας μπορεί να συμφωνούν με τιμές ετεροζυγωτίας που βρέθηκαν σε άλλα κωνοφόρα (Hamrick *et al.* 1979, Scaltsoyiannes *et al.* 1994, Τσακτσίρα 1999, Πασαγιάννης 2000, Scaltsoyiannes *et al.* 2010), αποκλίνει όμως από τις αντίστοιχες τιμές που βρέθηκαν για το είδος από άλλους ερευνητές (Τελική Έκθεση INTERREG 2008, E.Y. A. Σκαλτσογιάννης, Βαϊτσόπουλος 2009 - μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία 0.089), αρκετά μικρότερης από αυτήν της συγκεκριμένης εργασίας. Οι υψηλότερες τιμές ετεροζυγωτίας που βρέθηκαν σε αυτήν την εργασία δικαιολογούνται, ως ένα βαθμό, από το μικρό αριθμό ατόμων που αναλύθηκε και από τον επίσης μικρό αριθμό μονομορφικών γονιδιακών θέσεων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η *P. peuce*, αν και είναι είδος με πολύ περιορισμένη γεωγραφική εξάπλωση, χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα παραλλακτικότητας.
2. Οι γενετικές παράμετροι (A, P, He), του είδους προσομοιάζουν με αυτές των άλλων κωνοφόρων της Βαλκανικής Χερσονήσου και της Ευρώπης γενικότερα.
3. Αν και ο αριθμός των ισοενζυμικών δεικτών στην παρούσα εργασία ήταν μικρός, η γενετική ανάλυση του είδους με τους ισοενζυμικούς δείκτες, έδειξε ότι υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των υπό μελέτη πληθυσμών, επιβεβαιώνοντας παλαιότερα ευρήματα.
4. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, αν και προκαταρκτικά, συμβάλουν ουσιαστικά στη βελτίωση (ίδρυση σποροπαραγωγών κήπων, σποροπαραγωγών συστάδων κτλ.), διατήρηση και προστασία του είδους.
5. Τέλος, το είδος, αν και χαρακτηρίζεται από τη μικρή γεωγραφική εξάπλωση, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον ως λείψανο του πρώιμου Τριτογενούς (από τα λίγα παρόμοια είδη στην Ευρώπη) και χρήζει περαιτέρω έρευνας με βιοχημικούς και μοριακούς δείκτες και συστηματικότερη δειγματοληψία από όλες τις περιοχές της φυσικής του εξάπλωσης (Βουλγαρία, Ελλάδα, FYROM, Αλβανία, Σερβία).

ESTIMATION OF THE GENETIC VARIABILITY IN THE GREEK NATURAL POPULATIONS OF *Pinus peuce*

Sideri Eustathia, Scaltsoyiannes Vassilios, Tsaksira Maria

Laboratory of Forest Genetic and Plant Breeding
School of Forestry and Natural Environment
Aristotle University of Thessaloniki
e-mail: tsaksir@for.auth.gr, tel. 2310992334

ABSTRACT

Balkan pine (*Pinus peuce*), as a relict of Tertiary, is considered unique pine species in Europe together with *P. cembra* and *P. sibirica*, that had five needle brachyblasts. In the present work, isozyme analysis is conducted in two natural populations of the species (Rodopi, Aridaia), using four loci (LAP-B, DIA-A, GDH-A, PGI-A). The results of this study show that although the species have small natural distribution, showed high level of genetic variability as a genetic pool. Also, analysis of the genetic parameters (A, P, h_k , H_e), exhibits a considerable differentiation between the studied populations. Although, the present investigation is based on data from small tree samples, the results give new knowledge about the dynamic and the uniqueness of the species.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alexandrov, A. H., 1998. *Pinus peuce* Grsb. In Enzyklopedie der Holzgewaechse. Ecomed, Landsberg, Germany, III-1 : 1-10.
- Βαϊτσόπουλος, Αντ., 2009. Εκτίμηση της ποικιλότητας των δασικών πληθυσμών της Βαλκανικής Πεύκης με ισοενζυμικούς δείκτες (*Pinus peuce*). Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 65 σελ.
- Beaulieu, J., Simon, P., 1994. Inheritance and linkage relationships of allozymes in *Pinus strobes*. *Silvae Genet* 43: 253-261
- Bogunic, F., Muratovic, E., Brown, S.C., Siljak – Yakolev, S., 2003. Genome size and base composition of five *Pinus* species from the Balkan region. *Plant Cell Reports*, 22(1):59-63
- Cheliak, W.M., Pitel, J.A., 1985: Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information report PI-X-42, Petawawa Nat. Fores. Inst., 47 pp.
- Conkle, M.T., Hodgkinss, P., Nunnally, L., Hunter, S., 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. General Technical Report, PSW-64. Washington, DC, U.S. Forest Service, pp. 18.
- Crawford, D.J., 1983: Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In: Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Tanksley, S.D. and Orton, T.J. (ed.) part B, pp. 257-287.
- Critchfield, Little, 1966. Geographic distribution of the pines of the world. USDA Misc. Pub. 991, 97 pp.
- Dimitrov, M., 1980. The Macedonian pine (*Pinus peuce* Griseb.). Zemizdat, Sofia, 180 pp.
- 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): 8-16.

- Dobrev, R., 2005. Genetic correlations and expected genetic gain of height growth of 13 year-old progenies of Macedonian pine (*Pinus peuce* Grisb.) tested in experimental trials. *Nauka za gorata*, 42 (3): 11-28.
- Dobrev, R., 2007. Quantitative genetic studies of representative provenances of *Pinus peuce* Grisb. in Bulgaria. Dr. Sc. Thesis, Forest Research Institute, Sofia, 185 pp.
- Fukarek, P., 1950. The natural distribution of *Pinus peuce* in Balkan peninsula. *God. Biol. Inst.*, Sarajevo.
- Hagman, M., Mikkola, L., 1963. Observations on cross-, self-, and interspecific pollinations in *Pinus peuce* Griseb. *Silvae Genetica* 12: 72-79.
- Hamrick, J. L., Linhart, Y.B. and Mitton, J.B., 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann.Rev.Ecol. Syst.*10: 173-200.
- 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): 689-693.
- Hiebert, R.D. and Hamrick, J.L., 1983. Patterns and levels of genetic variation in Great Basin bristlecone pine, *Pinus longaeva*. *Evolution* 37:302-310.
- Liston, A., Robinson, W. A., Pinero, D., Alvarez-Buylla, E. R., 1999. Phyloge-netics of *Pinus* (Pinaceae) Based on Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region Sequences *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(1): 95-109.
- Lundkvist, K. and Rudin, D., 1979. Genetic variation in eleven populations of *Picea abies* as determined by isozyme analysis. *Hereditas* 85: 67-74.
- Mason, W.L., Negussie, G., Hollingsworth, M.K., 1995. Seed pretreatments and nursery regimes for raising Macedonian pine (*Pinus peuce* Grisebach). *Forestry*, 68(3): 255-264.
- Mickovski, S.B., Ennos, A.R., 2003. Anchorage and asymmetry in the root system of *Pinus peuce*. *Silva Fennica*, 37 (2): 161-173.
- Milev, M., Petkova, K., Alexandrov, P., Iliev, N., 1999. Seeds of coniferus species. S., Univ., Forestry Publ. House, 124 pp.
- Mirov, N.T., 1967. The genus *Pinus*. New York: Roland Press. Library of congress catalog card number: 67-14783.
- Nei, M., 1978: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei, M., Shakhavarti, A., 1977. Drift variances of F_{st} and G_{st} statistics obtained from a finite number of isolated populations. *Theor. Pop. Biol.* 1:307-325.
- Ντάφης Σπ., 2010. Τα δάση της Ελλάδας. Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας, Θεσσαλονίκη. 192 σελ.
- Πασαγιάννης, Γ., 2000. Μελέτη της γενετικής ποικιλότητας 12 φυσικών πληθυσμών της Δασικής πεύκης (*Pinus sylvestris* L.) στον Ελλαδικό χώρο, με βιοχημικά γνωρίσματα. Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σελ. 163.
- 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): 249-252.
- Petrovska, D., Stamenkov, M., 1987. Karyotype analysis of *Pinus peuce* Griseb. *Sumarsvo*, 33 (1).

- Popnikola, N., Jovanevic, M., Vidakovic, M., 1978. Genetics of *Pinus peuce* Gris. *Annales Forestales* 7/6: 187-206.
- Scaltsoyiannes, A., Rohr, R., Panetsos, K.P., M., Tsaktsira, 1994: Allozyme frequency distributions in five European populations of Black pine (*Pinus nigra* Arnold). I. Estimation of genetic variation within and among populations. II. Contribution of isozyme analysis to the taxonomic status of the species. *Silvae Genet.* 43(1):20-30.
- Scaltsoyiannes, A., Tsaktsira, M., Drouzas, A. 1999. Allozyme differentiation in the Mediterranean firs. A first comparative study with phylogenetic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 216: 289-307.
- Scogin, R., 1969. Isoenzyme polymorphisms in natural populations of the genus *baptista* (Leguminosae). *Phytochemistry (Ox.)*, 8:1733-1737.
- Τελική Έκθεση Προγράμματος INTERREG Ελλάδα-Βουλγαρία, 2008. Ε.Υ.: Απ. Σκαλτσογιάννης, σελ. 102.
- Τσακτίρα, Μ., 1999. Έρευνα ισοενζυμικής παραλλακτικότητας φυσικών πληθυσμών Μαύρης Πεύκης (*Pinus nigra* ARNOLD). Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 120 σελ.
- Turner, B.L., 1969: Chemosystematics: recent developments. *Taxon*, 18:134-151.
- Vidakovic, M., 1991. Conifers. Morphology and variation. Zagreb: Graficki Zavod Hrvaske. ISBN: 0 85198 807 5
- Yeh, F.C., El-Kassaby, Y.A., 1980. Enzyme variation in natural populations of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). I. Genetic variation patterns among trees from 10 IUFRO provenances. *Can. J. For. Res.* 10: 415-422.
- Yeh, F.C, Layton, C., 1979. The organization of genetic variability in central and marginal populations of Lodgepole pine (*Pinus contorta* ssp. *latifolia*). *Can.J.Genet. Cytol.* 21: 487-503.
- Zhelev, P., Gomory, D., Paule, L., 2002. Inheritance and linkage of allozymes in a Balkan epidemic, *Pinus peuce* Griseb. *Journal of Heredity*, 93: 60-63.