

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΡΟΔΙΑΣ (*Punica granatum* L.) ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ

Μ. Πιτσιούνη<sup>1</sup>, Α. Λίνος<sup>1</sup>, Π. Δρογούδη<sup>2</sup>, Σ. Βέμμος<sup>1</sup>, Μ. Χατζηδημητρίου<sup>1</sup>  
1Εργαστήριο Δενδροκομίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα.  
2Ινστιτούτο Φυλλοβόλων Δένδρων-ΕΘ.ΙΑΓ.Ε, 592 00 Νάουσα

### Περίληψη

Διάκριση και ταυτοποίηση διαφόρων γονοτύπων και ποικιλιών ροδιάς έγινε στην παρούσα εργασία με τη μέθοδο του τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) και των ένδο - επαναλήψεων απλής ακολουθίας νουκλεοτιδίων (ISSR, Inter Simple Sequence Repeats). Είκοσι ένα γονότυποι ροδιάς συλλέχθηκαν από το Ινστιτούτο Φυλλοβόλων Δένδρων Νάουσας, δεκαεπτά δείγματα από πέντε διαφορετικούς γονότυπους συλλέχθηκαν από τις αγροτικές περιοχές του Ν. Πέλλης και δύο ποικιλίες ροδιάς συλλέχθηκαν από τον Δενδροκομικό Σταθμό του Πόρου (ΔΣΠ). Η απομόνωση του DNA στα νεαρά φύλλα έγινε με τη μέθοδο CTAB. Τριάντα πέντε δεκαμερείς RAPD εκκινητές και δέκα πέντε ISSR εκκινητές δοκιμάστηκαν και επιλέχθηκαν δέκα εκκινητές για κάθε μοριακό δείκτη που έδωσαν πολυμορφικές ζώνες. Τα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν σε πηκτή αгарόζης 3% και 5% αντίστοιχα. Η γενετική ομοιότητα των πληθυσμών υπολογίστηκε με βάση το συντελεστή ομοιότητας του Jaccard. Τα δενδρογράμματα κατασκευάστηκαν με τις μεθόδους UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means) και N. Join (Neighborhood Join). Οι μοριακοί δείκτες RAPD και ISSR έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς τον εντοπισμό του πολυμορφισμού μεταξύ των γονοτύπων και ποικιλιών ροδιάς, με τους δεύτερους να δίνουν μεγαλύτερο αριθμό ενισχυμένων και πολυμορφικών ζωνών αυξάνοντας έτσι την διαχωριστική τους ικανότητα. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τις περιοχές του Ν. Πέλλης όσο και τα δείγματα που συλλέχθηκαν από το Ι.Φ.Δ.Ν. παρουσίασαν μεγάλη γενετική ομοιότητα (>0,70), υποδεικνύοντας ότι πιθανόν να πρόκειται για κλώνους ή σπορόφυτα. Οι δύο ποικιλίες “Ερμιόνη” και “Wonderful” παρουσίασαν επίσης μεγάλη γενετική ομοιότητα φτάνοντας το 95%, δείχνοντας ότι πιθανόν η μια ποικιλία να προέρχεται από την άλλη.

### Εισαγωγή

Η ροδιά πρωτοεμφανίστηκε στην Περσία και σιγά-σιγά μεταφέρθηκε στην Ινδία, βόρειο Αφρική, Ευρώπη, Κίνα και Αμερική. Είναι ένα από τα πρώτα σπρωφοφόρα δένδρα που καλλιεργήθηκαν (3000 π.Χ). Στην Ελλάδα η ροδιά καλλιεργείται σε πολλές περιοχές και κυρίως στα νησιά του Αιγαίου, στην Κρήτη, στην Πελοπόννησο, στην κεντρική Ελλάδα και στη Μακεδονία. Το σύνολο της παγκόσμιας παραγωγής τα τελευταία χρόνια ανέρχεται σε 2.250.000 τόνους, ενώ στην περιοχή της Ερμιόνης Αργολίδας, όπου η ροδιά αποτελεί παραδοσιακή καλλιέργεια, παράγεται ο κύριος όγκος (300-400 τόνοι) ροδιών στην Ελλάδα. Πρόσφατα το ρόδι έγινε γνωστό στη διεθνή αγορά για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες και τα θρεπτικά συστατικά του, που θεωρούνται ευεργετικά για την υγεία και την θεραπεία νόσων. Λόγω της σημαντικής εξέλιξης της καλλιέργειας της ροδιάς στο εμπόριο, είναι απαραίτητο να εκτιμηθεί και να διατηρηθεί το τοπικό πρωτογενές υλικό.

### Υλικά και Μέθοδοι

Για το φυτικό υλικό συλλέχθηκαν 21 γονότυποι από το Ι.Φ.Δ.Ν., 17 αυτόρριζα δένδρα από τον Ν. Πέλλας και 2 ποικιλίες η “Wonderful” και η “Ερμιόνη” από τον Δ.Σ.Π. (Πίνακας 1). Η απομόνωση του DNA έγινε με την μέθοδο CTAB.

Πίνακας 1. Γονότυποι και ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

A/A	Γονότυποι και ποικιλίες	Τόπος προέλευσης	A/A	Γονότυποι και ποικιλίες	Τόπος προέλευσης
01	11002	I.Φ.Δ.N.	21	11041	I.Φ.Δ.N.
02	11003	I.Φ.Δ.N.	22	Θηριόπετρα 1	N. Πέλλης
03	11005	I.Φ.Δ.N.	23	Θηριόπετρα 2	N. Πέλλης
04	11006	I.Φ.Δ.N.	24	Θηριόπετρα 3	N. Πέλλης
05	11009	I.Φ.Δ.N.	25	Θηριόπετρα 4	N. Πέλλης
06	11010	I.Φ.Δ.N.	26	Θηριόπετρα 5	N. Πέλλης
07	11011	I.Φ.Δ.N.	27	Θηριόπετρα 6	N. Πέλλης
08	11012	I.Φ.Δ.N.	28	Θηριόπετρα 7	N. Πέλλης
09	11014	I.Φ.Δ.N.	29	Θηριόπετρα 8	N. Πέλλης
10	11015	I.Φ.Δ.N.	30	Θηριόπετρα 9	N. Πέλλης
11	11016	I.Φ.Δ.N.	31	Πολύκαρπη 1	N. Πέλλης
12	11018	I.Φ.Δ.N.	32	Πολύκαρπη 2	N. Πέλλης
13	11019	I.Φ.Δ.N.	33	Πολύκαρπη 3	N. Πέλλης
14	11020	I.Φ.Δ.N.	34	Πολύκαρπη 4	N. Πέλλης
15	11021	I.Φ.Δ.N.	35	Χρυσή	N. Πέλλης
16	11022	I.Φ.Δ.N.	36	Μεγαλοπλάτανος	N. Πέλλης
17	11025	I.Φ.Δ.N.	37	Αψαλος 1	N. Πέλλης
18	11026	I.Φ.Δ.N.	38	Αψαλος 2	N. Πέλλης
19	11028	I.Φ.Δ.N.	39	“Ερμιόνη”	Δ.Σ.Π.
20	11029	I.Φ.Δ.N.	40	“Wonderful”	Δ.Σ.Π.

Για την ανάλυση RAPD χρησιμοποιήθηκαν 10 εκκινητές. Κάθε αντίδραση PCR περιείχε 25ng από το DNA, 1X PCR buffer, 1.75mM MgCl<sub>2</sub>, 200μM dNTPs, 0.5μM από τον εκκινητή και 1U Taq πολυμεράση. Ο όγκος της αντίδρασης συμπληρώθηκε με διπλά αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τα 25μl.

Ο πολλαπλασιασμός του DNA έγινε σε θερμοκυκλικό μηχάνημα PCR με τις εξής συνθήκες: αποδιάταξη του DNA στους 94oC για 4 λεπτά και ακολούθησαν 35 κύκλοι της αντίδρασης οι οποίοι χωρίζονται σε τρία επιμέρους στάδια. Τη θέρμανση στους 94oC για 1 λεπτό ακολούθησε πτώση της θερμοκρασίας στους 37oC για 1 λεπτό ώστε να υβριδίσει ο εκκινητής και τέλος στους 72oC για 2 λεπτά για να πραγματοποιηθεί η επιμήκυνση του εκκινητή για την σύνθεση των νέων κλώνων. Μετά την ολοκλήρωση των απαιτούμενων κύκλων η θερμοκρασία παρέμεινε στους 72oC για 5 λεπτά ώστε να υπάρξει η τελική επιμήκυνση των νέων κλώνων. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα παραγόμενα προϊόντα της PCR διατηρήθηκαν στους 10oC.

Για την ανάλυση ISSR χρησιμοποιήθηκαν 10 εκκινητές. Κάθε μίγμα PCR περιείχε 25ng από το DNA, 1X PCR buffer, 2.75mM MgCl<sub>2</sub>, 200μM dNTPs, 0.2μM από τον εκκινητή και 1U Taq πολυμεράση. Ο όγκος της αντίδρασης συμπληρώθηκε με διπλά αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τα 20μl.

Ο πολλαπλασιασμός του DNA έγινε σε θερμοκυκλικό μηχάνημα PCR με τις εξής συνθήκες: αποδιάταξη του DNA στους 94oC για 5 λεπτά και ακολούθησαν 40 κύκλοι της αντίδρασης οι οποίοι χωρίζονται σε τρία επιμέρους στάδια. Τη θέρμανση στους 94oC για 40 δευτερόλεπτα, την αύξηση της θερμοκρασίας στους 50oC για 45 δευτερόλεπτα ώστε να υβριδίσει ο εκκινητής και τέλος την επιμήκυνση του εκκινητή για την σύνθεση των νέων κλώνων στους 72oC για 90 δευτερόλεπτα. Μετά την ολοκλήρωση των απαιτούμενων κύκλων η θερμοκρασία παρέμεινε στους 72oC για 5 λεπτά ώστε να έχουμε την τελική επιμήκυνση των νέων κλώνων. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα παραγόμενα προϊόντα της PCR διατηρήθηκαν στους 10oC.

#### Αποτελέσματα - Συζήτηση

Από τους συνολικά 35 εκκινητές RAPD και 15 εκκινητές ISSR που δοκιμάστηκαν, επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν 10 εκκινητές RAPD και 10 εκκινητές ISSR και ο αριθμός των ενισχυμένων και πολυμορφικών ζωνών DNA για κάθε εκκινητή φαίνεται στον Πίνακα 2.

Για την ανάλυση των δεδομένων αρχικά υπολογίστηκε ο συντελεστής ομοιότητας του Jaccard για τους γονότυπους και τις ποικιλίες και στη συνέχεια, με βάση τον συντελεστή ομοιότητας, ομαδοποιήθηκαν οι γονότυποι και οι ποικιλίες. Η ομαδοποίηση έγινε με τη μέθοδο UPGMA και με τη μέθοδο Njoin. Το εύρος των τιμών που μπορεί να λάβει ο συντελεστής ομοιότητας είναι μεταξύ 0 και 1.

Για τους RAPD δείκτες ο συντελεστής ομοιότητας του Jaccard κυμάνθηκε από 0,66 μέχρι 0,97, για τους ISSR δείκτες κυμάνθηκε από 0,61 μέχρι 0,96 και για τον συνδυασμό RAPD και ISSR δεικτών κυμάνθηκε από 0,69 μέχρι 0,93 (Εικόνα 3).

Η Ανάλυση των Κύριων Συντεταγμένων (PCORDA) προέκυψε από την περαιτέρω επεξεργασία της μήτρας ομοιότητας του Jaccard. Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται σε απεικόνιση 2 συντεταγμένων (2D) (Εικόνα 4)

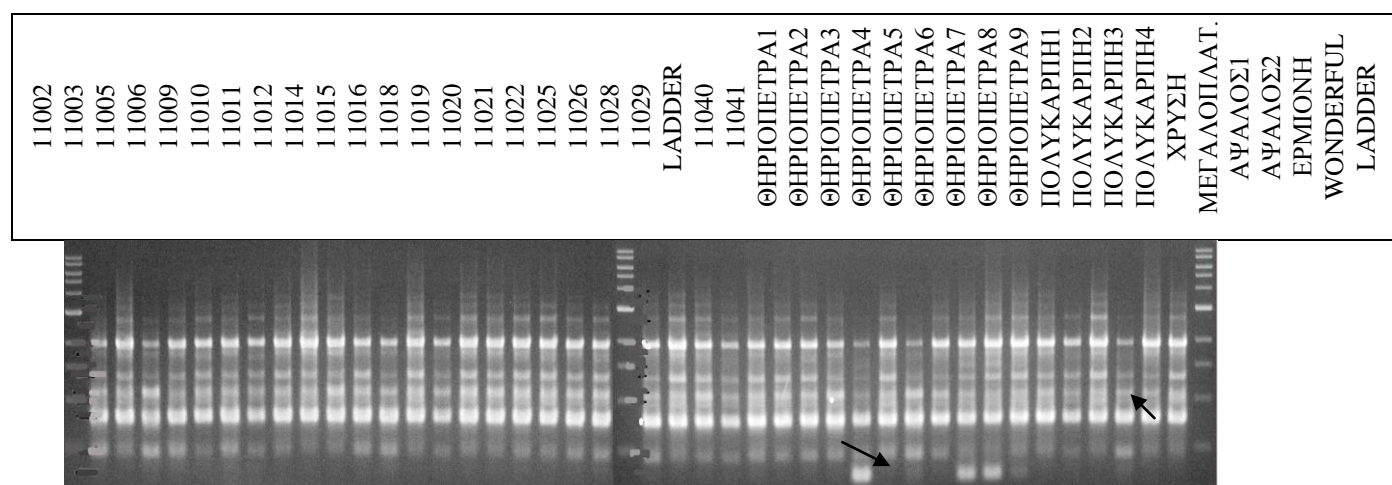
Οι μοριακοί δείκτες RAPD και ISSR έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς τον εντοπισμό του πολυμορφισμού μεταξύ των γονοτύπων και ποικιλιών ροδιάς, με τους δεύτερους να έχουν μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα όπως έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Bradford et al. 2001). Η χρήση δύο μοριακών μεθόδων που δίνει συγκρίσιμα αποτελέσματα, αυξάνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Στο δένδρογραμμα RAPD&ISSR-UPGMA (Εικόνα 3) παρατηρήθηκε ότι οι γονότυποι του Ν. Πέλλας ομαδοποιούνται μαζί ξεχωρίζοντας από τους γονότυπους του Ι.Φ.Δ.Ν. Ωστόσο, τα δείγματα που συλλέχθηκαν και από τις δύο περιοχές, παρουσίασαν μεγάλη γενετική ομοιότητα ( $>0,70$ ), υποδεικνύοντας ότι πιθανόν να πρόκειται για κλώνους ή σπορόφυτα. Ο γονότυπος 11028 φαίνεται να διαφοροποιείται από τους υπόλοιπους (0,72), όπως και ο γονότυπος 11006 ο οποίος ξεχωρίζει από τους υπόλοιπους γονότυπους της δεύτερης (2) ομάδας (0,76), ενώ οι γονότυποι 11016, 11019 και 11041 παρόλο που ανήκουν στο γενετικό υλικό του Ι.Φ.Δ.Ν. φαίνεται να ομαδοποιούνται μαζί διατηρώντας μια γενετική απόσταση από τους άλλους γονότυπους του Ι.Φ.Δ.Ν. (0,77). Οι δύο ποικιλίες “Ερμιόνη” και “Wonderful” παρουσίασαν μεγάλη γενετική ομοιότητα φτάνοντας το 95%, δείχνοντας ότι πιθανόν η μια ποικιλία να προέρχεται από την άλλη.

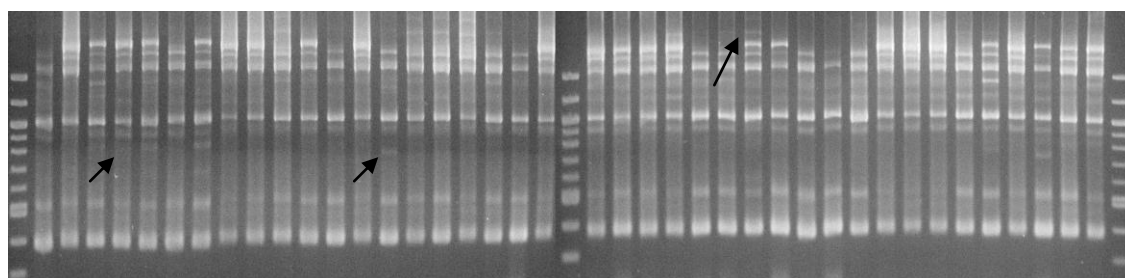
Συγκρίνοντας τη γενετική ομοιότητα στους Ελληνικούς γονότυπους ροδιάς με αντίστοιχα πειράματα Ιρανικών και Τουρκικών γονοτύπων ροδιάς, παρατηρούμε ότι οι Ελληνικοί γονότυποι εμφανίζουν χαμηλή γενετική παραλλακτικότητα, γεγονός που δείχνει ότι το αρχικό φυτικό υλικό προέρχεται από περιορισμένη γενετική δεξαμενή, δημιουργώντας μια πολύ περιορισμένη γενετική βάση για τους Ελληνικούς γονότυπους ροδιάς (Ercisli et al., 2007, Sarkhosh et al., 2006). Θα ήταν χρήσιμο οι Ελληνικοί γονότυποι να συγκριθούν, με βάση τους μοριακούς δείκτες, με γονότυπους από το Ιράν χώρα καταγωγής της ροδιάς και να εισαχθούν γονότυποι ή ποικιλίες ροδιάς με διαφορετική γενετική σύσταση για να αυξηθεί η γενετική παραλλακτικότητα της ροδιάς στην Ελλάδα.

Πίνακας 2. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, η αλληλουχία των βάσεων τους και ο αριθμός των ενισχυμένων και πολυμορφικών ζωνών DNA για κάθε εκκινητή.

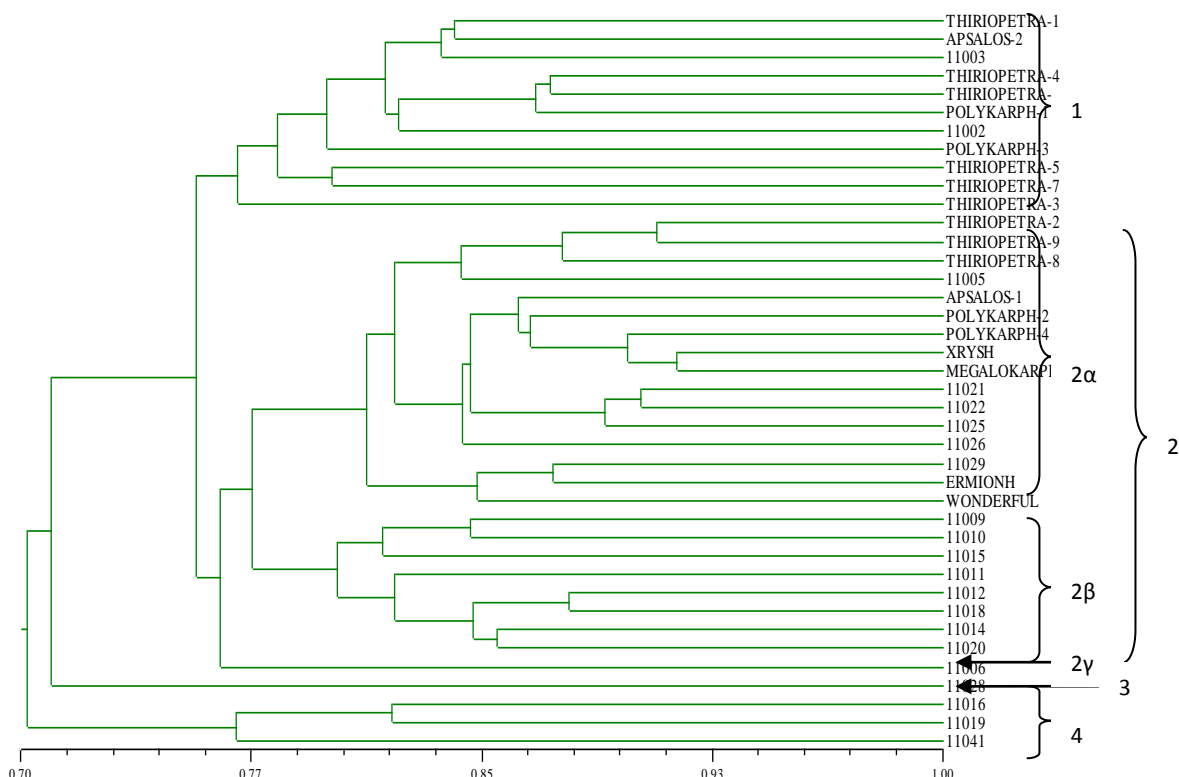
Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5'→3'	Αριθμός ενισχυμένων ζωνών	Αριθμός πολυ/κών ζωνών	Ποσοστό πολυ/σμού
<b>RAPD</b>				
OPB – 11	GTAGACCCGT	7	5	71%
OPB – 1	GTAGACCCGT	5	2	40%
OPBA – 3	GTGCGAGAAC	12	7	58%
OPBB – 4	ACCAGGTCAC	6	1	17%
ΟΡΑΗ-17	CAGTGGGGAG	7	5	71%
ΟΡΗ – 18	GAATCGGCCA	10	5	50%
ΟΡΗ – 13	GACGCCACAC	8	3	37%
ΟΡΑ – 9	GGGTAACGCC	10	4	40%
RI – 3	GTCCGTGAAC	5	2	40%
RI – 16	GTCGCCGTCA	11	4	36%
Σύνολο:		81	38	47%
<b>ISSR</b>				
818	(CA)8G	9	5	56%
823	(TC)8C	11	9	82%
825	(AC)8T	14	10	71%
826	(AC)8C	10	8	80%
842	(GA)8YG	16	9	56%
844	(CT)8RC	16	13	81%
850	(GT)8YC	13	10	77%
856	(AC)8YA	10	9	90%
861	(ACC)6	8	1	12%
889	DBD(AC)7	12	10	83%
Σύνολο		119	84	71%



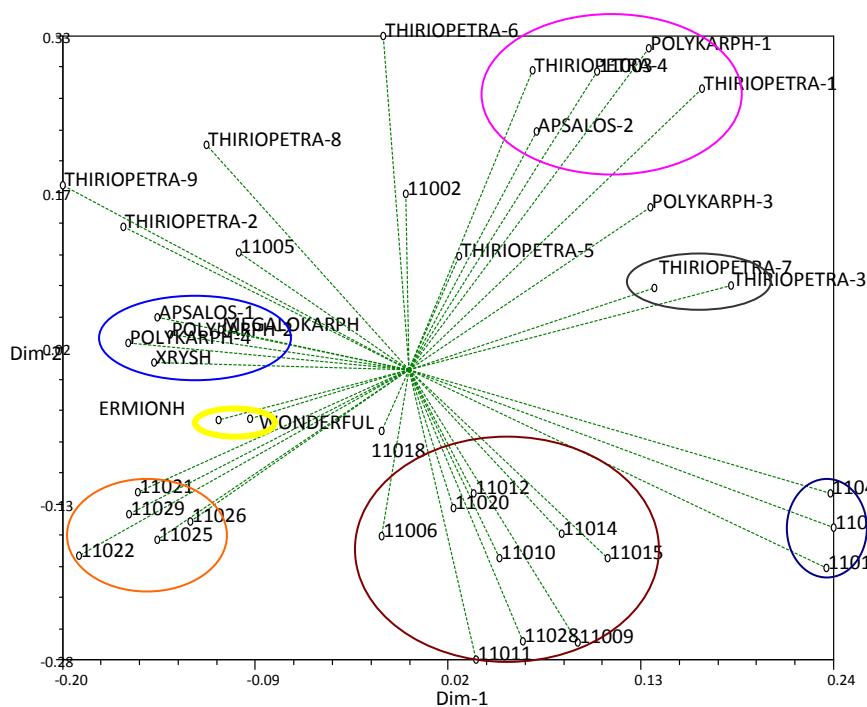
Εικόνα 1. 38 γονότυποι και 2 ποικιλίες ροδιάς μετά από την ενίσχυση με τον εκκινητή OPBA-3. Όπου LADDER συμβολίζεται ο μάρτυρας. Το ηλεκτρογράφημα ήταν σε πηκτή αгарόζης 1,5%(w/v) με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Με τα βελάκια φαίνονται κάποιες διαφοροποιήσεις (παρουσίες ή απουσίες ενισχυμένης ζώνης DNA) μεταξύ των δειγμάτων.



Εικόνα 2. 38 γονότυποι και 2 ποικιλίες ροδιάς μετά από την ενίσχυση με τον εκκινητή 844. Όπου LADDER συμβολίζεται ο μάρτυρας. Το ηλεκτρογράφημα ήταν σε πηκτή αгарόζης 2,5%(w/v) με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Με τα βελάκια φαίνονται κάποιες διαφοροποιήσεις (παρουσίες ή απουσίες ενισχυμένης ζώνης DNA) μεταξύ των δειγμάτων.



Εικόνα 3. Δενδρόγραμμα συνδυασμού RAPD-ISSR με την μέθοδο UPGMA.



Εικόνα 4. Απεικόνιση των γενετικών σχέσεων σε 2 άξονες (PCOORDA) για τον συνδυασμό RAPD – ISSR.

## Βιβλιογραφία

- Bradford K, S. Liarakos, K Skogen, A. Tietmeyer, P. V. and K. Havens, 2001. Comparing the ability of two PCR based techniques, RAPD and ISSR, to detect low levels of genetic diversity. Chicago Botanic Garden, Glencoe IL. Midwestern Plant Conservation Conference and Task Force Meeting. (<http://www.chicagobotanic.org/downloads/conservation/Poster1.pdf>)
- Ercisli S., G. Agar, E. Orhan, N. Yildirim and Y. Hizarci, 2007. Interspecific variability of RAPD and fatty acid composition of some pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) growing in Southern Anatolia Region in Turkey, *Biochemical systematics and ecology* 35 (11): 764 – 769.
- Sarkhosh A., Z. Zamani, R. Fatahi and A. Ebadi, 2006. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Scientia Horticulturae* 111(1):24-29.

## GENETIC DIVERSITY OF GREEK WILD AND CULTIVATED POMEGRANATE (*Punica granatum* L.) GENOTYPES AND CULTIVARS USING MOLECULAR MARKERS

Pitsiouni M.1, Linos A.1, Drogoudi P.2, Hagidimitriou M.1  
1 Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, 11855 Athens, Greece  
2 Pomology Institute-National Agricultural Research Foundation (N.AG.RE.F.)  
592 00 Naoussa, Greece

## Abstract

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is widely cultivated throughout Iran, India, South Africa, Europe, China and America. Pomegranate is cultivated in many different parts of Greece. Pomegranate became known recently to the international market for its antioxidant properties and nutritional value, which is considered beneficial to human health. It is important to study and preserve the Greek local genotypes due to the increased demand for pomegranates and the increased pomegranate cultivation. In this study, different pomegranate genotypes and cultivars were discriminated and identified using the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and the Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) molecular markers. Twenty one pomegranate genotypes were sampled from a collection at the Institute of Pomology of Naoussa, seventeen samples of five different genotypes were collected from the agricultural area of Pella and two cultivars of pomegranate were collected from the Pomology Station of Poros. Genomic DNA was extracted from young leaves using the CTAB method. Thirty five decamer RAPD primers and fifteen ISSR primers were tested from which ten RAPD primers and ten ISSR primers, which gave us the polymorphic bands, were used. Amplified products of PCR were separated by electrophoresis in 3% (w/v) and 5% (w/v) agarose gel equivalent. NTSYS software, version 2.02, was used to estimate genetic similarities using Jaccard's algorithm while the dendrogram was constructed by UPGMA and Neighbor Joining methods. High genetic similarity between the samples collected from the agricultural area of Pella and the samples collected from the Institute of Pomology of Naoussa (>0,70), concludes that they might be clones of some cultivars. The Greek cultivar "Ermioni" showed high genetic similarity (95%) with cultivar "Wonderful" (95%). RAPD and ISSR molecular markers were useful for studying the genetic relationships between pomegranate genotypes and cultivars, with the ISSR markers generating more polymorphic bands.