

## ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΡΟΔΙΑΣ (*Punica granatum*) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Χ. Μελίδου<sup>1</sup>, Φ. Μυλωνά<sup>2</sup>, Π. Δρογούδη<sup>3</sup> & Α. Πολύδωρος<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Εργαστήριο Γενετικής & Βελτίωσης Φυτών, 541 24 Θεσσαλονίκη

<sup>2</sup> ΕΘΙΑΓΕ, Κέντρο Γεωργικής Έρευνας Βόρειας Ελλάδας, 570 01 Θέρμη

<sup>3</sup> ΕΘΙΑΓΕ, Ινστιτούτο Φυλλοβόλων Δένδρων, 592 00 Νάουσα

### Περίληψη

Στην εργασία αυτή εξετάζονται για πρώτη φορά οι γενετικές σχέσεις ελληνικών ποικιλιών ροδιάς με χρήση μοριακών δεικτών SSR. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν μοριακοί δείκτες SSR από τη διεθνή βιβλιογραφία για την ανάλυση 46 επιλεγμένων γενότυπων συμπεριλαμβανομένων ελληνικών καλλιεργούμενων ποικιλιών, τοπικών παραδοσιακών και διεθνών εμπορικών ποικιλιών. Εκτιμήθηκαν παράμετροι γενετικής ποικιλότητας καθώς και οι γενετικές τους αποστάσεις. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι οι ελληνικοί γενότυποι μπορεί να καταταχθούν σε τρεις ομάδες με στενή γενετική σχέση μεταξύ των μελών της κάθε ομάδας. Οι ομοιότητες αυτές πιθανόν εξηγούνται από το γεγονός ότι στην Ελλάδα εκτός από την περιοχή της Ερμιόνης δεν υπήρχε μέχρι πρόσφατα συστηματική καλλιέργεια του ροδιού και μεμονωμένα δένδρα που αποτελούν μεταφερόμενους κλώνους, με την πάροδο των ετών παίρνουν διαφορετικά ονόματα στις διάφορες περιοχές. Δυο δείγματα της παλαιάς (δημιουργήθηκε πριν το 1900) γνωστής και διαδεδομένης αμερικανικής ποικιλίας 'Wonderful' κατατάχθηκαν σε ξεχωριστό κλάδο του δένδρογράμματος, αλλά ένα δείγμα με τουρκική προέλευση που δηλώθηκε σαν πιθανή 'Wonderful' δεν είχε γενετική ομοιότητα με αυτά τα δείγματα. Αυτό πιθανόν να επισημαίνει την αμφίβολη ταυτότητα του δείγματος ή να υποδηλώνει αλλαγές που έχει υποστεί η ποικιλία με την πάροδο των ετών σε διαφορετικά μέρη. Τα αποτελέσματα της εργασίας μπορεί να αποτελέσουν βάση για περαιτέρω ανάλυση του ελληνικού γενετικού υλικού ροδιάς και να υποβοηθήσουν τη βελτίωση και αξιοποίησή του στην ελληνική γεωργία.

**Λέξεις κλειδιά:** *Punica granatum*, μοριακοί δείκτες, SSR, γενετική ποικιλότητα

### Εισαγωγή

Η ροδιά (*Punica granatum* L.) είναι είδος που ευδοκίμει σε εύκρατα κλίματα και απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες για κανονική ωρίμανση. Η καλλιέργειά της είναι διαδεδομένη σε όλη την λεκάνη της Μεσογείου, Νότια Ασία και σε αρκετές χώρες της Βόρειας και Νότιας Αμερικής, και σε περιβάλλοντα με μεγάλες διαφορές και έχει μεγάλη γενετική ποικιλότητα λόγω του ότι οι σπόροι της ροδιάς φυτρώνουν εύκολα (Mars, 2000). Αυτό αποδεικνύεται από την μεγάλη συλλογή ποικιλιών που περιγράφονται σε διάφορες χώρες της Ανατολής και της Δ. Μεσογείου. Έτσι, στο Τουρκμενιστάν υπάρχουν καταγεγραμμένες 1.117 ποικιλίες, στο Ιράν, που είναι και η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα, 700 ποικιλίες, στην Κίνα 80 ποικιλίες, στο Ισραήλ 60 ποικιλίες, στην Τυνησία 60 ποικιλίες, στην Ταϊλάνδη 29 ποικιλίες, στην Τουρκία πάνω από 180 και πολλές ακόμα στην Ινδία αλλά και σε άλλες χώρες (Mars, 2000, Verma κ.ά., 2010). Στην κεντρική τράπεζα φυτογενετικών πόρων της Ευρώπης, στην Ισπανία, έχουν καταγεγραμμένες περισσότερες από 104 ποικιλίες ροδιάς (Melgarejo κ.ά., 2009). Η καλλιέργεια της ροδιάς είναι γνωστή στην Ελλάδα από την αρχαιότητα. Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν ότι το ρόδι και τα προϊόντα του χρησιμεύουν σαν λειτουργικά τρόφιμα λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε αντιοξειδωτικά συστατικά, βιταμίνη C, μικρο- και μακρο-θρεπτικά στοιχεία που είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία και ευεξία με αποτέλεσμα τη ραγδαία αύξηση της κατανάλωσης. Ακολούθως η καλλιέργεια της ροδιάς ανταποκρινόμενη στη συνεχή αύξηση της κατανάλωσης επεκτείνεται παγκοσμίως. Στην Ελλάδα, η Ερμιόνη ήταν μέχρι το 2005 και η περιοχή που τροφοδοτούσε την αγορά της Αθήνας με

300-400 τόνους ροδιών της ομώνυμης τοπικής ποικιλίας. Μετά την έξαρση του ενδιαφέροντος για τη ροδιά το 2007, η καλλιεργούμενη έκταση έφτασε τα 4.000 στρέμματα και σήμερα πλησιάζει τα 8.000 στρέμματα. Στο διάστημα αυτό, η καλλιέργεια στη χώρα μας επεκτάθηκε σε πολλές περιοχές όπως της Ξάνθης, της Λάρισας, των Φαρσάλων, των Γιαννιτσών, της Λακωνίας, της Ηλείας και σε άλλες. Συνεπώς η καλλιέργεια της ροδιάς αποτελεί μια δυναμική, εναλλακτική καλλιέργεια ανοίγοντας νέους δίαυλους ανάπτυξης της αγροτικής οικονομίας.

Εξ' αιτίας της σημαντικής εξέλιξης της καλλιέργειας της ροδιάς κρίθηκε σκόπιμο να αξιολογήσουμε τους διαθέσιμους φυτογενετικούς πόρους, συμπεριλαμβανομένου τοπικών, παραδοσιακών ποικιλιών καθώς και εμπορικών ποικιλιών. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και η ταυτοποίηση ελληνικών ποικιλιών ροδιάς (*Punica granatum*) με τη χρήση μοριακών δεικτών SSR (Simple Sequence Repeats) που βασίζονται στην εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

### Υλικά και Μέθοδοι

Αναλύθηκαν 46 επιλεγμένοι γενότυποι συμπεριλαμβανομένου ελληνικών καλλιεργούμενων ποικιλιών, τοπικών παραδοσιακών και διεθνών εμπορικών ποικιλιών. Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από την συλλογή ποικιλιών-γενότυπων ροδιάς από το Ινστιτούτο Φυλλοβόλων Δένδρων Νάουσας (ΙΦΔ). Συγκεκριμένα, 27 διαφορετικοί γενότυποι που προέκυψαν από βελτιωτικό πρόγραμμα του ΙΦΔ με κωδικό 110xx, καθώς και οι γενότυποι ΙΦΔ(E3), ΙΦΔ(E4) και 'Καρύστου'. Το δείγμα 'Wonderful-Turkey' είναι μια πιθανή ποικιλία 'Wonderful'

τούρκικης προέλευσης που διατηρείται στο ΙΦΔ. Επτά (7) δείγματα από τοπικές ποικιλίες από την ευρύτερη περιοχή του Νομού Πέλλας, ονομαστικά: 'Άλμπασάνι', 'Τατάρνης', 'Καμπάδικο 1', 'Καμπάδικο 2', 'Καραμουσταφά', 'Σταμπονιάρη' και 'Σικερνάρη'. Μια ποικιλία με προέλευση από την Περσία ('Περσίας'), ένας γενότυπος από την περιοχή Μαραθώνα του Νομού Αττικής ('Μαραθώνας'), οι ποικιλίες 'Wonderful' και 'Ερμιόνη' από την συλλογή ποικιλιών ροδιάς του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ) και τέλος οι γενότυποι 'Wonderful', 'Γκοτζαρίδη', 'Άκκο', 'Ισπανικό' και 'Χατζάρ', που προέρχονται από την συλλογή της εταιρείας THESSA που δραστηριοποιείται στην καλλιέργεια της ροδιάς.

Η απομόνωση γονιδιωματικού DNA από νεαρά φύλλα έγινε με τη χρήση cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) σύμφωνα με δημοσιευμένο πρωτόκολλο (Doyle και Doyle, 1990) με μικρές τροποποιήσεις. Ένδεκα ζεύγη SSR εκκινητών που σχεδιάστηκαν από τους Hasnaoui κ.ά. (2010) και ήταν οι μόνοι διαθέσιμοι όταν ξεκίνησε η εργασία αυτή, επιλέχθηκαν για ανάλυση σύμφωνα με την προαναφερόμενη δημοσίευση.

Τα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν σε ηλεκτρική 4% αгарόζης Metaphor με ρυθμιστικό διάλυμα 0,5X TBE. Η βαθμονόμηση των ζωνών στην ηλεκτρική αгарόζης έγινε με τη συνδρομή του προγράμματος GelAnalyzer 2010 (<http://www.gelanalyzer.com>). Πιο συγκεκριμένα, ψηφιοποιημένη φωτογραφία της ηλεκτρικής τροφοδοτείται στο πρόγραμμα και γίνεται βαθμονόμηση των μοριακών βαρών του μάρτυρα στο εύρος που βρίσκεται η ζώνη με σκοπό να είναι γραμμική και σημαντική ( $R^2 > 0.98$ ) η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς. Προσδιορίζονται αυτόματα οι γραμμές που τρέχουν τα δείγματα και οι σχετικές ζώνες και γίνονται διορθώσεις όπου κρίνεται απαραίτητο. Διορθώνεται επίσης η απόσταση μετακίνησης όταν η διαδρομή των δειγμάτων είναι ανόμοια στα άκρα από ότι στη μέση της ηλεκτρικής. Τέλος καταγράφονται τα αποτελέσματα σαν μοριακά βάρη κάθε ζώνης στην ηλεκτρική. Ένα παράδειγμα μιας τέτοιας ανάλυσης δίνεται στην Εικ. 1. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα ανάλυσης μοριακών δεδομένων, GeneAIEx 6.3 (Peakall και Smouse, 2006). Ο πίνακας της γενετικής απόστασης των διαφόρων γενότυπων που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε στο πρόγραμμα MEGA 5 (Tamura κ.ά., 2011) για την κατασκευή δένδρου γράμματος (Εικ. 2) με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou και Nei, 1987).

## Αποτελέσματα και Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η ανάλυση του πολυμορφισμού των ελληνικών ποικιλιών με χρήση μοριακών δεικτών SSR που εφαρμόστηκαν σε ξενικές ποικιλίες ροδιάς είναι δυνατή, καθώς μπορούν να εκτιμηθούν παράμετροι γενετικής ποικιλότητας, να υπολογιστεί ο βαθμός γενετικής ομοιότητας μεταξύ των ποικιλιών και να εκτιμηθούν οι γενετικές τους αποστάσεις ώστε να διευκολυνθεί η ταυτοποίησή τους. Ωστόσο, οι συγκεκριμένοι δείκτες παρουσιάζουν κλιμάκωση της παραλλακτικότητας κυρίως σε επίπεδο ζευγών βάσεων, γεγονός που κάνει σχεδόν αδύνατη τη διάκριση των διαφορών σε ηλεκτρική αγα-

ρόζης χωρίς τη χρήση προγραμμάτων ανάλυσης εικόνας. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GelAnalyzer 2010, το οποίο διευκόλυνε την ανάλυση και ανταποκρίθηκε με επάρκεια στις ανάγκες της έρευνας. Η χρήση πιο εξειδικευμένων τεχνικών ανάλυσης όπως η High Resolution Melting PCR (HRM-PCR) ή άλλων μεθόδων υψηλής διακριτικής ικανότητας θα διευκόλυναν την ανάλυση, αλλά απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε ελέγχους ρουτίνας. Με βάση τη γενετική απόσταση που εκτιμήθηκε από την ανάλυση, κατασκευάστηκε δένδρου γράμμα που απεικονίζει τις γενετικές σχέσεις των διαφόρων γενότυπων (Εικ. 2). Η ανάλυση δείχνει ότι οι ελληνικοί γενότυποι μπορεί να χωριστούν σε τρεις ομάδες όπου η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει γενότυπους του (ΙΦΔ) μαζί με το 'Σταμπονιάρη' και τα δύο 'Καμπάδικο 1' και '-2', η δεύτερη ομάδα τους γενότυπους 'Καρύστου', 'Μαραθώνα', ΙΦΔ(E3) και 11022b σαν έναν υποκλάδο και σαν δεύτερο υποκλάδο γενότυπους του ΙΦΔ και τους γενότυπους 'Χατζάρ', 'Άκκο', 'Καραμουσταφά' και 'Ισπανικό', και η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει γενότυπους του ΙΦΔ μαζί με την 'Ερμιόνη', 'Άλμπασάνι' και την ποικιλία 'Wonderful' με προέλευση Τουρκίας. Οι υπόλοιποι γενότυποι δεν συνιστούν ομάδες. Η ποικιλία 'Wonderful' της THESSA και του ΑΠΘ δείχνουν κοινή προέλευση αλλά διαφέρουν από αυτή της Τουρκίας. Όπως αναφέρθηκε η ταυτότητα του δείγματος τουρκικής προέλευσης είναι αμφίβολη και πιθανόν να μην ανήκει στην ποικιλία 'Wonderful'. Μια εναλλακτική εξήγηση μπορεί να στηριχθεί στο γεγονός ότι η ποικιλία 'Wonderful' είναι πολύ παλιά (δημιουργήθηκε το 1896 στις ΗΠΑ) και είναι διαδεδομένη σ' όλο τον κόσμο, οπότε πιθανόν σπορόφυτα που προέρχονται από αυτή να ονομάζονται με το όνομα της ποικιλίας παρά το γεγονός ότι δεν είναι απόγονοι κλωνικής αναπαραγωγής. Επίσης οι γενετικές ομοιότητες των ελληνικών γενότυπων εξηγούνται από το γεγονός ότι στην Ελλάδα, εκτός της ποικιλίας 'Ερμιόνη' που καλλιεργήθηκε συστηματικά στη ομώνυμη περιοχή της Αργολίδας, δεν υπήρξε συστηματική καλλιέργεια του ροδιού και τα διάφορα ονόματα των ποικιλιών αντιπροσωπεύουν την ονομασία που αποδόθηκε στους γενότυπους αυτούς, κυρίως τις περιοχές απ' όπου προέρχονται και όχι τη γενετική τους ταυτότητα σαν ποικιλία. Συμπερασματικά μπορούμε να αναφέρουμε ότι το σύστημα των δεικτών SSR που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποτελεσματικό στην ανάλυση ελληνικών γενότυπων ροδιάς και διέκρινε ικανοποιητικά τα διάφορα υλικά. Οι ελληνικές ποικιλίες έχουν στενή γενετική βάση και οι ομοιότητές τους πιθανόν εξηγούνται από την καλλιέργεια μεμονωμένων δένδρων που ενώ μπορεί να αποτελούν μεταφερόμενους κλώνους, με την πάροδο των ετών παίρνουν διαφορετικά ονόματα στις διάφορες περιοχές. Μικρή ποικιλομορφία και στενή γενετική βάση έχει επίσης καταγραφεί στο γενετικό υλικό της ροδιάς στην Τυνησία (Hasnaoui κ.ά., 2012). Περεταίρω ανάλυση των προσαρμωμένων στο ελληνικό περιβάλλον γενότυπων θα οδηγήσει στην δυνατότητα βελτίωσης του εγχώριου γενετικού υλικού ροδιάς και την αποτελεσματική αξιοποίησή της στην ελληνική γεωργία.

## Βιβλιογραφία

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Hasnaoui, N., Buonamici, A., Sebastiani, F., Mars, M., Trifi, M. and Vendramin, G. 2010. Development and characterization of SSR markers for pomegranate (*Punica granatum* L.) using an enriched library. Conserv. Genet. Resour. 2:283-285.

Hasnaoui, N., Buonamici, A., Sebastiani, F., Mars, M., Zhang, D., and Vendramin, G.G. 2012. Molecular genetic diversity of *Punica granatum* L. (pomegranate) as revealed by microsatellite DNA markers (SSR). Gene, 493:105-112.

Mars, M. 2000. Pomegranate plant material: genetic resources and breeding, a review. Options Mediterraneenes. Series A: Seminaires Mediterraneens 42:55-62.

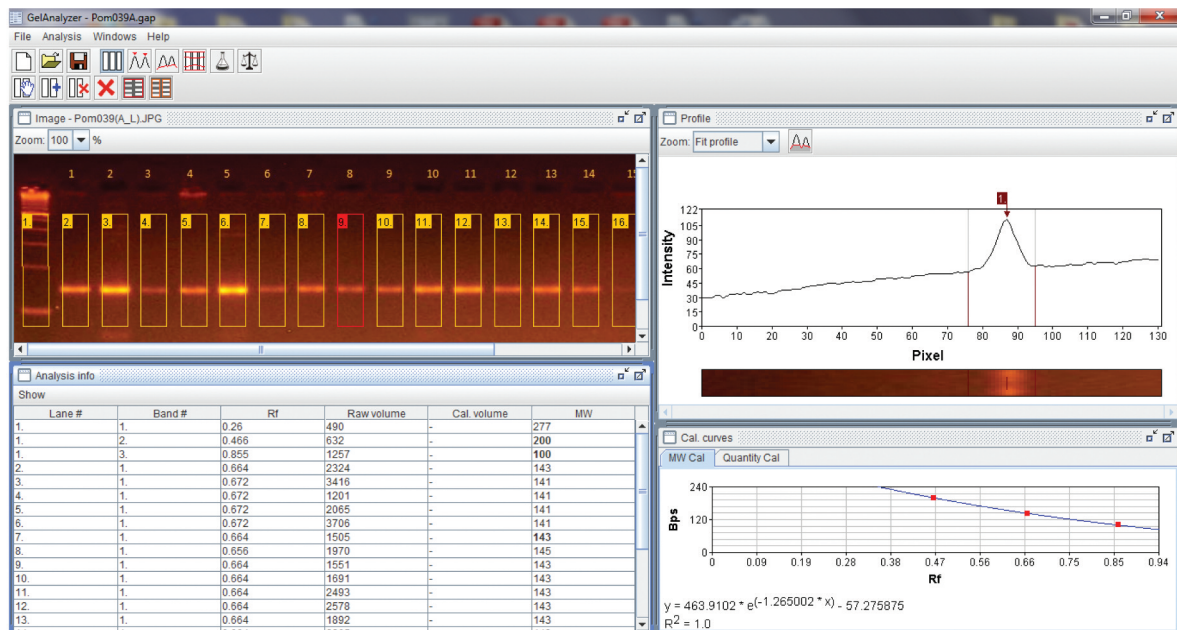
Melgarejo, P., Martinez, J.J., Hernandez, F., Martinez, R., Legua, P., Oncina, R. and Martinez-Murcia A. 2009. Cultivar identification using 18S-28S rDNA intergenic spacer-RFLP in pomegranate (*Punica granatum* L.). Sci. Hort. 120:500-503.

Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes 6:288-295.

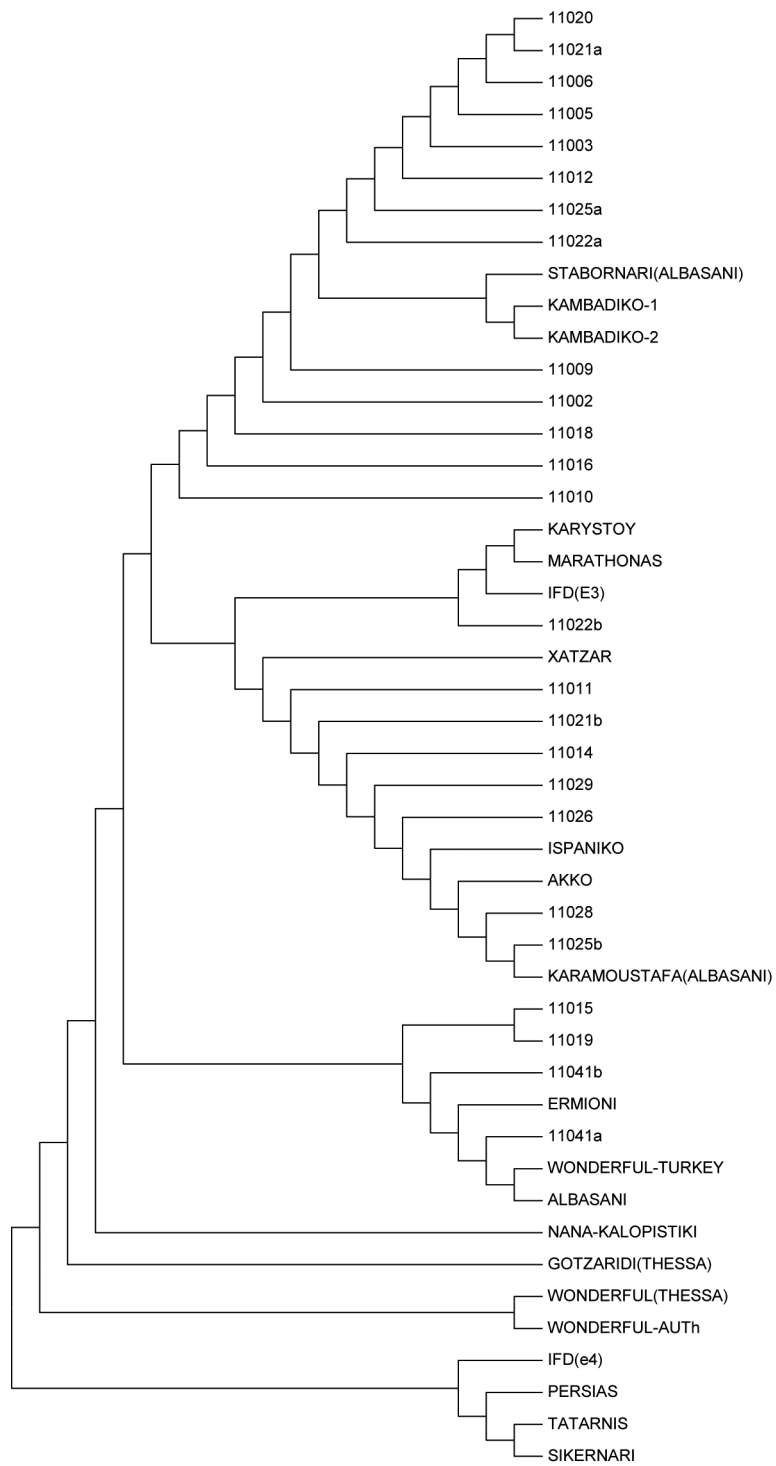
Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28:2731-2739.

Verma, N., Mohanty, A. and Lal, A. 2010. Pomegranate genetic resources and germplasm conservation: a review. Fruit Vegetable Cereal Sci. Biotechnol. 4:120-125.



**Εικ. 1.** Η επιφάνεια εργασίας του λογισμικού GelAnalyzer 2010 με ένα παράδειγμα ανάλυσης των δεδομένων ηλεκτροφόρησης δειγμάτων διαφόρων γενοτύπων ροδιάς με ενίσχυση του δείκτη SSR Pom39. Στην επιφάνεια διακρίνονται επάνω αριστερά η ψηφιοποιημένη φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης, επάνω δεξιά η ανάλυση της επιλεγμένης γραμμής 9 (σε κόκκινο πλαίσιο), κάτω δεξιά η καμπύλη βαθμονόμησης και κάτω αριστερά τα εκτιμώμενα μοριακά βάρη κάθε ζώνης. Παρατηρήστε την υψηλή διακριτική ικανότητα του λογισμικού όπου διακρίνονται ζώνες 141, 143 και 145 βάσεων στα δείγματα.



**Εικ. 2.** Δενδρόγραμμα (NJ) που απεικονίζει τις γενετικές σχέσεις των 46 γενοτύπων που αναλύθηκαν με 11 μοριακούς δείκτες SSR.